

بررسی تعادل هاردی-وینبرگ و چندشکلی در جمعیت‌های زنبورعسل شمال غرب ایران با استفاده از آنالیز ریزماهواره
 نعمت‌الله اسدی^۱، صابر خدرزاده^۲، سیروس امیری‌نیا^۳

چکیده

به منظور مطالعه درون جمعیتی کلنی‌های زنبورعسل نواحی شمال غربی ایران، با استفاده از نمونه‌های استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل، از ۹ نشانگر ریزماهواره استفاده گردید. پس از تکثیر هر جایگاه به وسیله تکنیک PCR و تعیین ژنوتیپ، با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف، آنالیزهای مربوطه انجام پذیرفت. در این تحقیق از بین نشانگرهای مورد مطالعه، جایگاه A7 دارای بیشترین تعداد آلل مشاهده شده و جایگاه‌های A35 و B124 دارای کمترین تعداد آلل و جایگاه‌های A14 و A24 نیز مونومورف بودند. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در جایگاه‌های A107 و A7 و کمترین مقدار آن در جایگاه A35 نمایان شد. بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی در جایگاه A107 (به ترتیب ۰/۹۸۳ و ۰/۹۲۱) و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه A88 (۰/۱۰۱) و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی نیز در جایگاه A35 (۰/۴۸۱) مشاهده گردید. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون نیز به ترتیب در جایگاه‌های A107 (۲/۶۴۰) و A35 (۱/۰۱۸) دیده شد. در این جمعیت، جایگاه‌های A107 و A7 در تعادل هاردی-وینبرگ و بقیه جایگاه‌ها دارای انحراف معنی داری از وضعیت تعادل بودند.

واژه‌های کلیدی: زنبورعسل، تعادل هاردی-وینبرگ، چندشکلی، ریزماهواره‌ها

=====

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد زنبورعسل، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
- ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین
- ۳- عضو هیات علمی بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

مقدمه

امروزه با آشکار شدن نشانگرهای با تعداد آلل زیاد همچون ریزماهورها و ژنهای شناخته شده با توالی‌های آللی متفاوت که منجر به هاپلوتیپ‌های زیادی خواهند شد، برقراری تعادل هاردی-وینبرگ اهمیت ویژه‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت پیدا کرده است. این موضوع نشان می‌دهد که فراوانی‌های ژنوتیپی یک جایگاه را بعد از یک نسل آمیزش تصادفی، می‌توان با نسبت بی‌نومیال (برای دوآللی) و مولتی‌نومیال (برای چندآللی) براساس فراوانی‌های آللی نمایش داد. نسبت‌های ژنوتیپی به دلایل مختلف از تعادل هاردی-وینبرگ انحراف خواهند داشت. مهمترین فاکتورهای تأثیرگذار در این امر انتخاب، آمیزش‌های غیرتصادفی و جریان ژنی می‌باشند. مقادیر کم هر یک از این فاکتورها فقط اندکی نسبت‌های هاردی-وینبرگی را تغییر می‌دهد.

گاهی اوقات مشکلات موجود در بعضی از روش‌های مولکولی (همچون آلل‌های صفر^۱) باعث ایجاد انحراف از تعادل مذکور می‌شود (۸). اگر کلیه داده‌های یک مکان ژنی که در آن تمام ژنوتیپ‌ها قابل تشخیص هستند وجود داشته باشد، می‌توان مطابقت فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده را با فراوانی‌های مربوط به یک جمعیت در تعادل هاردی-وینبرگ مورد قیاس و آزمون قرار داد. برای آزمون تعادل هاردی-وینبرگ در یک جمعیت، روش‌های مختلفی از جمله آزمون مربع کای^۲، آزمون نسبت درست‌نمایی^۳، آزمون صحیح^۴ و آزمون لگاریتم خطی^۵ وجود دارد (۱۱). بررسی این قانون در جمعیت‌ها نیاز به ابزارهای ویژه‌ای داشته تا بتوان با دقت برقراری و یا عدم برقراری تعادل مذکور را برآورد نمود. با توجه به اینکه منشأ جنسیت زنبورعسل نر، زنبور دیپلوئید است و از طرفی جفت‌گیری ملکه زنبورعسل نیز به‌طور طبیعی و تصادفی با زنبورهای نر موجود در محوطه خارج از کنترل انسان انجام می‌پذیرد، لذا این امر عاملی در جهت افزایش تنوع و گسترش هرچه بیشتر خصوصیات نژادی زنبورعسل بوده (۲) و با توجه به تعریف قانون هاردی-وینبرگ و در صورت عدم وجود دخالت انسان که به عنوان مثال می‌توان به معرفی نمودن ملکه جدید و اصلاح شده و یا مهاجرت کلنی‌ها و غیره اشاره نمود، انتظار می‌رود که تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برقرار باشد. در این رابطه بر روی زنبورعسل مطالعات فراوانی صورت پذیرفته که می‌توان به مطالعات استاپ و همکاران (۱۹۹۵) اشاره نمود که با تحقیقی بر روی ۳ نژاد آفریقایی و ۴ نژاد اروپایی زنبورعسل معمولی، فرانک و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با تعیین تنوع زنبورعسل آفریقایی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورها و دلاروآ و همکاران (۲۰۰۱، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳) بررسی چندشکلی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهورها و به ترتیب بر روی جمعیت‌های زنبورعسل جزایر قناری، کلنی‌های غیرمهاجر جنوب شرقی اسپانیا و جزیره بالیریک اشاره نمود. در این تحقیق نیز برقراری و یا عدم برقراری تعادل هاردی-وینبرگ و معیارهای چندشکلی موجود در کلنی‌های زنبورعسل شمال غرب ایران بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، زنبورستان‌های استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل برحسب ظرفیت و تعداد کلنی به صورت 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 مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگهداری گردیدند. انتخاب مناطق، زنبورستان‌ها و نمونه‌گیری از کلنی‌های زنبورعسل متعلق به هر جمعیت به‌نحوی صورت پذیرفت که نمونه‌ها بتوانند آلگوی مناسبی از آن جمعیت باشند. سپس، DNA نمونه‌ها به روش اصلاح شده CTAB استخراج (۱) و پس از ارزیابی‌های کمی و کیفی، با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد، نمونه‌های DNA به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شدند.

^۱ Null alleles^۲ Chi-square Test^۳ Likelihood Ratio Test (G-square Test)^۴ Exact Test^۵ Log-Linear Test

سپس برای بررسی تنوع موجود در داخل جمعیت، از ۹ نشانگر ریزماهواره 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 (۶) 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 (جدول ۲)، محصولات PCR هر کدام به‌طور مجزا بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز گردیدند. کلیه 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

غلظت نهایی	اجزای واکنش
۱X	بافر PCR
۱/۵mM	MgCl ₂
۰/۵μM	آغازگرها
۲۰۰μM	dNTPs
۰/۵unit/μl	آنزیم Taq پلی مرز
۱۰۰ng/μl	DNA الگو
متغیر	ddH ₂ O

جدول ۲- دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

مراحل PCR	درجه حرارت (°C)	زمان
۱	۹۴°C	۹ دقیقه
۲	۹۴°C	۳۰ ثانیه
۳	۵۵-۵۸°C	۳۰ ثانیه
۴	۷۲°C	۳۰ ثانیه
۵	-	-
۶	۷۲°C	۹ دقیقه
۷	۴°C	-

پس از رنگ‌آمیزی و اسکن نمودن ژل‌ها، با استفاده از برنامه Gel-Pro Analyzer 3.1، طول آل‌ها براساس جفت‌باز اندازه‌گیری و سپس ژنوتیپ افراد تعیین گردید (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در راستای تعیین فاکتورهای همچون معیارهای چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی جایگاه‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار ن‌آریب 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 (۹، ۱۰ و ۱۲).

نتایج و بحث

نتایج حاصله از جایگاه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که این نشانگرها براساس استفاده آنها در تحقیقات مختلف (۳، ۴، ۵ و ۶)، 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 نشان‌دهنده عدم آلودگی پروتئینی و RNA

A107 و سپس به میزان کمتری در جایگاه‌های A88، B124 و A113 دلیلی مشهود بر چندشکلی زیاد این جایگاه‌ها و از طرفی بیانگر کارآمدی بالای آنها در تمایز ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت‌ها می‌باشد.

با منظور شدن کلیه جایگاه‌ها در جمعیت شمال غرب، با آزمون مربع کای و آزمون نسبت درست‌نمایی، جایگاه‌های A107 و A7 در تعادل هاردی-وینبرگ و جایگاه‌های A88، B124، A113 و A35 انحراف معنی‌داری را از این تعادل نشان دادند. کوچ‌های مختلف کلنی‌ها، اشتراک نقاط مختلف کوچ و تأثیرپذیری از کندوهای موجود در مرز مشترک دارای نقش به‌سزایی در امر این انحرافات هستند و از طرفی وجود آل‌های صفر در جایگاه‌های مذکور نیز می‌تواند در راستای عدم تعادل هاردی-وینبرگ در این جایگاه‌ها تأثیرگذار باشند.

بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه A107 (۰/۹۸۳) و کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه A88 (۰/۱۰۱) بود (جدول ۳) که در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) به ترتیب در جایگاه‌های A35 (۰/۸۶۷) و A88 (۰/۰۶۷) مشاهده گردیده است. بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی نیز در جایگاه A107 (۰/۹۲۱) و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی در جایگاه A35 (۰/۴۸۱) مشاهده گردید که به دلیل تفاوت نژادی، این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت ندارد. در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی به ترتیب در جایگاه‌های A35 (۰/۸۱۶) و A88 (۰/۱۲۹) مشاهده شده است. با در نظر گرفتن کلیه جایگاه‌ها، بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه A107 (۲/۶۴۰) و کمترین مقدار آن در جایگاه A35 (۱/۰۱۸) مشاهده گردید که با نتایج حاصله از مقادیر هتروزیگوسیتی نیز مطابقت دارد (جدول ۳). همانگونه که مشاهده می‌شود هتروزیگوسیتی موجود دارای دامنه بالایی بوده و نمایانگر تنوع زیاد موجود در این جمعیت است که در اثر جفتگیری غیرقابل کنترل ملکه زنبور عسل با زنبورهای نر کلنی‌های مختلف حاصل گردیده و نتایج حاصله از عدم تعادل هاردی-وینبرگ نیز مؤید آن بوده و از طرفی تداخلات ژنتیکی به وجود آمده باعث کاهش هموزایگوسیتی و همخونی شده و یکی از عوامل تولید میزان عسل بالا در جمعیت‌های زنبور عسل شمال غرب کشور است.

جدول ۳- معیارهای آماری بررسی درون جمعیتی مربوط به هر جایگاه

	Na	Ne	PIC	I	Ho	He
A88	۱۱/۰۰۰	۵/۶۴۷	۰/۶۷۰	۱/۸۵۵	۰/۱۰۱	۰/۸۲۶
A107	۱۹/۰۰۰	۱۲/۱۴۴	۰/۸۹۰	۲/۶۴۰	۰/۹۸۳	۰/۹۲۱
A7	۲۲/۰۰۰	۱۰/۷۰۴	۰/۸۹۰	۲/۶۰۷	۰/۸۰۱	۰/۹۱۰
B124	۸/۰۰۰	۵/۶۴۴	۰/۶۱۵	۱/۸۸۶	۰/۲۱۴	۰/۸۳۲
A113	۱۰/۰۰۰	۳/۷۵۲	۰/۶۵۵	۱/۵۶۰	۰/۱۱۱	۰/۷۳۸
A35	۸/۰۰۰	۱/۹۱۹	۰/۳۹۰	۱/۰۱۸	۰/۱۹۶	۰/۴۸۱
SE میانگین	۱۳/۰۰۰±۶/۰۰۰	۶/۶۳۵±۳/۹۸۵	۰/۶۸۵±۰/۱۸۸	۱/۹۲۸±۰/۶۲۲	۰/۴۰۱±۰/۳۸۷	۰/۷۸۵±۰/۱۶۳

Na: تعداد آل مشاهده شده، Ne: تعداد آل مؤثر، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، I: شاخص شانون، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی

منابع

- اسدی، ن.، اسماعیل خانیان، س.، نجاتی جوارمی، ا.، قره‌داغی، ع.، ا.، طهماسبی، غ. ح. و میرهادی، ا. ۱۳۸۲. استخراج DNA ژنوم زنبور عسل با استفاده از اصلاح تکنیک استاندارد در ایران. خلاصه مقالات پنجمین سمینار پژوهشی زنبور عسل ایران، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، او ۲ بهمن ۱۳۸۲، صص ۱۳.
- عبادی، ر. ۱۳۶۷. مقایسه عملکرد پنج نژاد و هیبرید خارجی زنبور عسل با نژاد بومی ایران در منطقه اصفهان. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۱۹، شماره ۳: ۲۲ - ۱۱.

3- Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A. 2001. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*. 10:1733-1742.

- 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- Hedrick, P. W. 1999. *Genetics of population*. Second edition, Jones and Bartlett publishers, Sudbury, MA, USA.
- 9- Ott, J. 2001. Program HET version 1.80, utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York, NY, USA.
- 10- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Note*, 6:288-295.
- 11- Weir, B. S. 1996. *Genetics data analysis: methods for discrete population genetic data*. Sinauer associations, INC.
- 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.