

تنوع جمعیت‌های زنبور عسل بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و ریزماهواره

(microsatellite) در استان اردبیل

صابر زهری^{۱*}، علی اصغری^۲ و معصومه دادخواه^۱^۱ اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم^۲ اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱

چکیده

شناسایی و مطالعه تنوع موجود در جمعیت‌های زنبور عسل یکی از اهداف مهم در اصلاح نژاد زنبور عسل محسوب می‌شود. بدین منظور ۳۲ نمونه تصادفی از کلنیهای زنبور عسل و عمدتاً در طول تابستان در استان اردبیل جمع‌آوری گردید. گروه‌بندی جمعیتها بر اساس صفات کلیدی مورفولوژیک با روش تجزیه خوشه‌ای به روش حداقل واریانس وارد (WARD) کلنیهای مورد بررسی را به چهار گروه مجزا تقسیم نمود. این یافته‌ها جدایی مورفولوژیک نژاد زنبور عسل ایرانی و نژادهای خارجی آن را اثبات کرد. نژادهای وارد شده به این منطقه شامل نژاد ایتالیایی و هیبرید استارلاین در گروههای کاملاً مجزا قرار گرفتند ولی نژاد میدنایت کاملاً از نژاد استارلاین مجزا نشد. استفاده از دو جایگاه ریزماهواره (microsatellite) نشانگر حداقل ۲ و حداکثر ۴ آلل در هر مکان ژنی بود. تحلیل کلیه پارامترهای حاصل از مطالعه ژنتیک جمعیت و برآورد رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیتها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای نشان داد که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۹۳ و مورد انتظار ۰/۵۳ است. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نژاد ایتالیایی و استارلاین به میزان ۰/۹۸ و کمترین آن بین نژاد میدنایت و ایتالیایی به میزان ۰/۵۷ برآورد شد. نتایج این تحقیق نشان داد که نمونه‌های ایرانی از هیبریدهای میدنایت، استارلاین و ایتالیایی تفکیک شدند.

واژه‌های کلیدی: زنبور عسل - تنوع ژنتیکی - ریزماهواره - Apis

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۵۱۵۵۱۰۸۰۱، پست الکترونیکی: zahri@uma.ac.ir

مقدمه

و قسمت‌های مرکزی و غرب آسیا می‌باشد. در حدود ۲۶ زیر گونه و اکوتیپ‌های (موجود سازش یافته با یک زیستگاه خاص) متعدد گونه *Apis mellifera* بر اساس رفتار، صفات ظاهری و شواهد مولکولی معرفی شده است. برخی نژادها منطقه جغرافیایی وسیع و برخی دیگر مناطق کوچکی را اشغال می‌کنند (۱۸). بعضی از محققین از تفاوت‌هایی همچون واکنش به سرما، ابتلا به بیماری، ریتم‌های (رقص‌های) حین برقراری ارتباط و ویژگیهای یادگیری به عنوان عامل تعیین کننده تمایز بین گونه‌ها استفاده کرده‌اند (۱۹).

شمال غرب آسیا منطقه‌ای است که تنوع گسترده مورفولوژیکی زنبور عسل در آنجا دیده می‌شود (۱۷). جدایی جغرافیایی می‌تواند منجر به تمایز ژنتیکی جمعیتها به واسطه انتخاب محلی (Local selection) و رانش ژنی (Gene flow) شود و در نهایت باعث ایجاد گروه‌هایی شود که نژاد نامیده می‌شوند (۶). از مدتها قبل برای زنبور عسل فقط چهار گونه شناخته شده بود. در حالی که طبق مطالعه فیلوژنتیکی، حداقل شش گونه از جنس آپیس (*Apis*) در دنیا انتشار دارد (۵). زنبور عسل حشره‌ای بسیار سازش یافته با اکوسیستم‌های متغیر در گستره آفریقا، اروپا

در زنبورها، از آغازگرهای ریزماهوره برای اولین بار در *Bombus terrestris* و *Apis mellifera* استفاده شد و سپس برای سه نوع زنبور عسل بدون نیش استفاده گردید (۸). ریزماهوره‌ها توالیهای ساده و تکراری کوتاهی (SSR) هستند که اگر طول آنها به حد کافی بلند و غیر منقطع باشد، به دلیل چند شکل بودن به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مناسبی به کار می‌روند (۴). شمار زیادی از میکروستلاپت‌ها برای ژنوم انسانی، حیوانات مدل و تعدادی از گیاهان زراعی توسعه پیدا کرده است. در زنبوران عسل نقشه پیوستگی ژنی برای گونه آپیس و چندین زنبور دیگر تهیه شده است (۱۸). فرانک و همکاران در سال ۲۰۰۱ در بررسی زنبوران عسل آفریقا با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره و میتوکندریایی، نشان دادند که جایگاههای ریزماهوره به طور گسترده در جمعیت‌های آفریقایی نسبت به اروپایی چندشکلی زیادی را نشان می‌دهد و این خود تفسیری بر اندازه بزرگ جمعیتها در آفریقا است (۱۰). با مطالعه ۷ جایگاه ریز ماهوره در ساختار ژنتیکی زنبوران عسل مشخص شد که هیچ کدام از جایگاهها از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف ندارند (۹).

استان اردبیل از لحاظ تولید عسل و پرورش زنبور عسل در ایران از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های زنبورعسل موجود در برخی مناطق استان اردبیل با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی (ریز ماهوره) انجام شد.

مواد و روشها

۱- مطالعات مورفولوژیکی: برای انجام مطالعات مورفولوژیکی، از کندوهای مربوط به زنبورداریهای برخی شهرستانهای استان اردبیل (اردبیل، نمین، نیر، هیر، مشکین-شهر، سرعین و گرمی) که دارای بیش از صد کلنی بودند و حدود ۶ سال سابقه زنبورداری داشتند، نمونه برداری به عمل آمد. در هر منطقه، نمونه برداری به طور تصادفی از ۳-۱ کلنی و در طی ماههای تیر، مرداد و شهریور سال

۲- استخراج DNA: برای انجام مطالعات مولکولی، استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه (Salting out method) با اندکی تغییرات انجام شد (۷). پس از جدا کردن قسمت سینه حشره و شستشوی آن با آب مقطر، نمونه‌ها به لوله‌های میکروتیوب منتقل و با استفاده از لوله پلاستیکی خرد شدند. بافرهای استخراج CTAB و TNE به ترتیب به مقدار $120 \mu\text{l}$ و $500 \mu\text{l}$ به میکروتیوبها اضافه و مخلوط ورتکس گردید. آنزیم پروتئیناز K به مقدار ۸ واحد در داخل یخ به نمونه‌ها اضافه و در حمام آب ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت اینکوبه شدند.

با روش حداقل واریانس وارد (Ward) استفاده شد (۱۲). تجزیه تنوع ژنتیکی جمعیتها در جایگاههای مورد نظر شامل تعداد آلله‌ها در هر لوکوس، تعداد ژنوتیپها و میزان تنوع در هر جمعیت و لوکوس، فراوانی آلی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم افزار Popgen3.2 انجام گرفت (۱۳). گروه‌بندی نژادها براساس داده‌های مولکولی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام شد.

نتایج

برای شناسایی نژادهای مختلف زنبورعسل با استفاده از کلیدهای شناسایی روتنر (۱۶)، از یازده صفت مختلف استفاده شد. پس از اندازه‌گیری صفات مذکور در نمونه‌های زنبورعسل و مقایسه آنها با کلید شناسایی در مجموع چهار نژاد در مناطق مختلف استان اردبیل شناسایی شد. نژادهای شناسایی شده عبارت بودند از: نژاد ایرانی، نژاد ایتالیایی، هیبرید میدنایت، هیبرید استارلاین. میانگین این صفات در چهار نژاد در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

تجزیه واریانس صفات کمی در نژادهای زنبورعسل نشان داد که بین نژادها در صفات کمی کوپیتال A، کوپیتال B، طول خرطوم، طول پای عقبی و زاویه A₄ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). به غیر از صفات مورد استفاده در شناسایی، صفات مورفولوژیکی مختلفی (جدول ۴) در این نژادها اندازه‌گیری شد. میانگین و معیار اشتباه صفات اندازه‌گیری شده در جدول ۴ نشان داده شده است. برای مقایسه نژاد ایرانی با سایر نژادهای وارد شده به استان اردبیل، این نژادها بر اساس صفات مورفولوژیکی و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند.

گروه‌بندی جمعیتها با استفاده از صفات کیفی از قبیل رنگ نیم حلقه‌های پشتی، شکل تومنتوم و وضعیت زاویه دیسکوئیدال، صفات کمی از قبیل شاخص کوپیتال و طول خرطوم، طول و زاویه رگبالها و ترکیب صفات مذکور

مخلوط حاصل در دو نوبت با محلول فنل کلروفرم سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰×g/min) و محلول رویی دور ریخته شد. برای رسوب DNA، ۲/۵ برابر اتانل سرد ۱۰۰ درصد اضافه و پس از سانتریفیوژ و دور ریختن محلول رویی، رسوب حاصل با اتانل ۷۰ درصد شستشو و در هوای آزاد خشک گردید. رسوب خشک شده در آب دیونیزه حل و پس از ارزیابی کمی و کیفی با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، در فریزر نگهداری گردید.

۳- بررسی نشانگرهای ریزماهوره: در این تحقیق از ۲ جایگاه ریز ماهوره‌ای AM2 و A88 استفاده شد (جدول ۱). آغازگرهای AM2f و AM2B با استفاده از نرم افزار Oligo 0.6 و الگو قرار دادن توالی ثبت شده به شماره AJ509247 طراحی گردید و آغازگرهای A88f و A88b بر اساس گزارشات قبلی ساخته شد (۵). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، ۱/۲ میلی‌مول dNTP، ۱/۵ میلی‌مول MgCl₂، ۴ میلی‌مول از هر آغازگر و ۳۰ نانوگرم DNA صورت گرفت. مراحل واکنش PCR شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه در یک چرخه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۴ چرخه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت تکمیل نهایی تکثیر بود. محصول PCR در سطح ژل آگارز ۲ درصد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد بررسی اولیه قرار گرفت و جهت ارزیابی و سنجش دقیق آلله‌های ریز ماهوره از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۲ درصد استفاده شد.

۴- تجزیه و تحلیل آماری: پس از اندازه‌گیری صفات ظاهری، تجزیه واریانس و محاسبه میانگین، معیار اشتباه صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از نرم افزار SPSS14 انجام شد (۱۲). برای بررسی میزان دوری و نزدیکی جمعیتها و نژادهای مورد مطالعه از روش تجزیه خوشه‌ای

انجام گرفت. نتیجه گروه‌بندی حاصل از صفات کیفی در شکل ۱ دیده می‌شود. در این گروه‌بندی جمعیت‌های نژاد ایرانی، ایتالیایی، استارلاین و میدنایت به خوبی از هم تفکیک شدند و این مسئله نشان می‌دهد که صفات کیفی در تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه بهتر عمل کرده است.

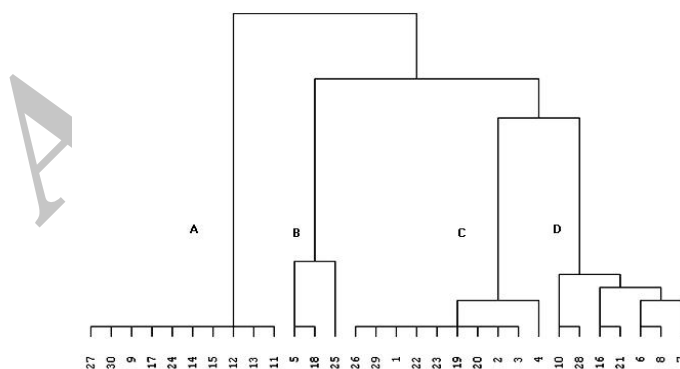
جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره در زنبور عسل

نام آغازگر	توالی ریزماهواره	لوکوس	مرجع
AM2f	GGAGCGGAGAAGACTTCACC	AJ509247	این تحقیق
AM2b	GATCGGGAACCGTAGAAACC	AJ509247	این تحقیق
A88f	CGAATTAACCGATTGTGCG	AJ509283	استوپ و همکاران (۱۹۹۵)
A88b	GATCGCAATTATTGAAGGAG	AJ509283	استوپ و همکاران (۱۹۹۵)

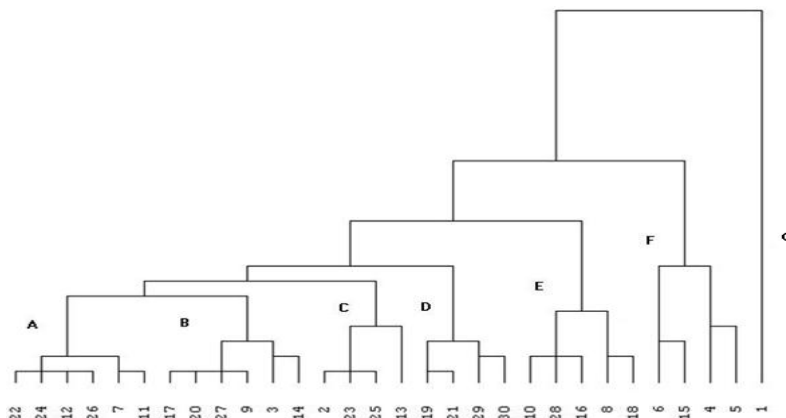
جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه واریانس یکطرفه برای صفات کمی مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)											
		شاخص کویتال	کویتال a	کویتال b	طول خرطوم	طول جلویی	عرض بال جلویی	عرض بال عقبی	طول پای	زاویه G ₁₈	زاویه D ₇	زاویه A ₄	طول سلول رادیال
بین گروه	۳	۰/۲۲ ^{ns}	۰/۱۹*	۰/۰۲۶*	۴/۳۹ ^{**}	۰/۰۴۵ ^{ns}	۰/۰۴۵ ^{ns}	۰/۰۴۵ ^{ns}	۰/۰۷۰۴ ^{**}	۷/۹۹ ^{ns}	۷/۰۱ ^{ns}	۳۰/۷۶ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{ns}
داخل گروه	۱۷۶	۰/۱۱۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۵۸	۰/۰۷۴	۰/۰۰۸	۰/۰۰۳	۳/۸۲	۳/۸۲	۳/۸۲	۴/۵۶	۰/۰۰۷

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد



شکل ۱- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش حداقل واریانس وارد (Ward) برای جمعیت‌های زنبور عسل با به کار بردن صفات کیفی: جمعیت‌های گروه A مربوط به نژاد ایتالیایی، گروه B مربوط به نژاد هیبرید میدنایت، گروه C مربوط به نژاد ایرانی و گروه D مربوط به هیبریدهای میدنایت و استارلاین است.



شکل ۲- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش حداقل واریانس وارد (Ward) برای جمعیت‌های زنبور عسل با بکار بردن صفات کمی: گروه‌های A و G و D مربوط به اقلیم نیمه خشک و گروه‌های B و F مربوط به اقلیم نیمه مرطوب و گروه‌های C و G مربوط به اقلیم نیمه خشک و نیمه مرطوب است.

گروه بندی جمعیتها با استفاده از صفات کمی نیز به طور جداگانه انجام شد (شکل ۲). در این گروه‌بندی نژادها به خوبی از هم تفکیک نشده‌اند. بنابراین، نمی‌توان تنها با استفاده از صفات کمی، جمعیت‌های مزبور را از هم مجزا کرد. در حالی که تفکیک جمعیتها بیشتر با شرایط اقلیمی آنها مطابقت داشت. در این نمودار جمعیت‌های مربوط به اقلیم‌های نیمه خشک و نیمه مرطوب در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند.

گروه بندی جمعیتها با استفاده از صفات کمی نیز به طور جداگانه انجام شد (شکل ۲). در این گروه‌بندی نژادها به خوبی از هم تفکیک نشده‌اند. بنابراین، نمی‌توان تنها با استفاده از صفات کمی، جمعیت‌های مزبور را از هم مجزا کرد. در حالی که تفکیک جمعیتها بیشتر با شرایط اقلیمی آنها مطابقت داشت. در این نمودار جمعیت‌های مربوط به اقلیم‌های نیمه خشک و نیمه مرطوب در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند.

قابل توجهی نشان داد. این آغازگر چهار آلل در چهار جایگاه ژنی تولید کرد که هر چهار آلل چند شکل بودند. آغازگر A88 دو نوار در دو لوکوس نشان داد که هر دو نوار مونومورف بودند. برای تعیین تعادل هاردی-واینبرگ از آزمون کای اسکوئر برای یک جایگاه ژنی استفاده شد. براساس این روش جمعیت ایتالیایی برای جایگاه ژنی AM2 در سطح ۰/۰۵ از تعادل انحراف نشان دادند (۰/۰۵ $P \leq$). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از این آغازگر، میزان هتروزیگوسیتی آللها تا حدودی متفاوت است که امری کاملاً طبیعی است. مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) در هر جایگاه ژنی و برای هر جمعیت با استفاده از شاخص نی (Nei) محاسبه شد (۱۲).

در گروه‌بندی جمعیتها و نژادها با ترکیب داده‌های کمی (تومتوم، رنگ نیم حلقه‌ها و وضعیت زاویه دیسکوئیدال) و داده‌های کیفی (طول بال جلویی، شاخص کویتال، طول خرطوم، طول و زاویه رگبالها)، جمعیتها تا حدود زیادی از هم تفکیک گردیدند (شکل ۳). بطوری‌که مشاهده می‌گردد، نژادهای ایرانی و ایتالیایی در این نمودار کاملاً از هم مجزا شده‌اند. اما نژادهای میدنایت و استارلاین همانند نمودار رده‌بندی جمعیتها با استفاده از صفات کیفی به طور کامل از هم مجزا نشدند. همچنین گروه‌بندی جمعیتها بر اساس شرایط اقلیمی تا حدودی منطبق با گروه بندی جمعیتها بر اساس داده‌های کیفی و کمی بود.

میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۶۰ در نژاد ایرانی و ۱/۰۰ در نژاد ایتالیایی بود و هیبریدهای میدنایت و استارلاین متغیر بودند. بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جمعیت میدنایت (۱/۰۲۹) و کمترین مقدار آن مربوط به جمعیت ایتالیایی (۰/۶۹۳۱) بود. محاسبه ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بین چهار نژاد بر اساس تشابه نی (۱۳) نشان داد که کمترین تشابه ژنتیکی مربوط به نژاد استارلاین و میدنایت (برابر ۰/۵۷۳۵) می‌باشد. بیشترین

جهت بررسی تنوع ژنتیکی از دو جایگاه ریزماهواره نیز استفاده گردید. آغازگر AM2 پلی مورفیسم و تنوع نواری

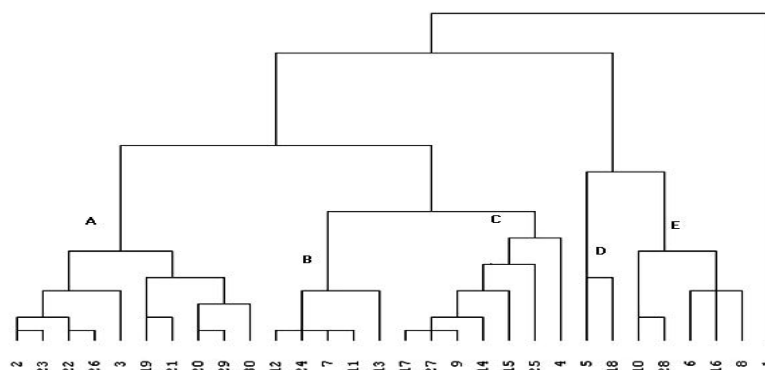
تشابه ژنتیکی نیز بین نژاد ایتالیایی و استارلاین (برابر ۰/۹۸۲۰) بود (جدول ۵).

جدول ۳- نتایج حاصل از بیومتری مربوط به چهار نژاد مورد بررسی

نژاد	شاخص کوبیتال	طول خرطوم (میلی‌متر)	تومتوم (Tomentum)	رنگ نیم حلقه‌های پشتی	وضعیت زاویه دیسکوئیدال
ایرانی	۲/۳۹	۶/۲۰	پهن	تیره	مثبت
ایتالیایی	۲/۳۱	۶/۴۲	پهن	روشن	مثبت
میدنایت	۲/۴۷	۶/۲۳	پهن	تیره	صفر
استارلاین	۲/۵۵	۵/۳۰	پهن	روشن	صفر

جدول ۴- میانگین صفات کمی اندازه‌گیری شده و معیار اشتباه آنها در نژادهای میدنایت، استارلاین، ایتالیایی و ایرانی

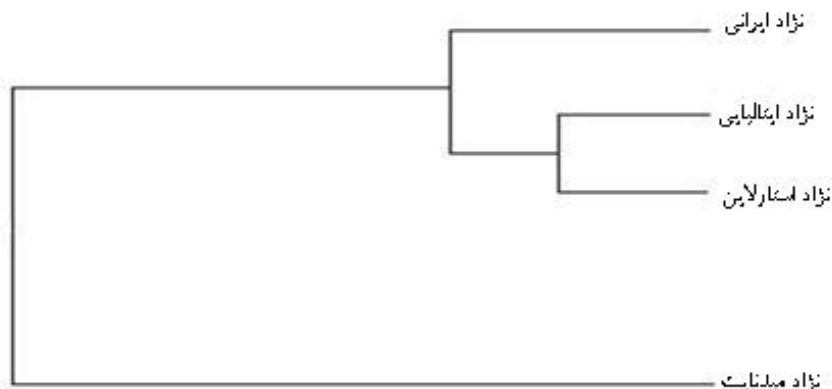
صفات مورفولوژیکی نژادها	هیبرید میدنایت	هیبرید استارلاین	نژاد ایتالیایی	نژاد ایرانی	واحد
ایندکس کوبیتال	۲/۴۷ ± ۰/۰۷	۲/۵۴ ± ۰/۰۴	۲/۳۱ ± ۰/۰۵	۲/۳۹ ± ۰/۰۶	-
طول رگبال A	۰/۵۸ ± ۰/۰۱	۰/۵۱ ± ۰/۰۷	۰/۵۶ ± ۰/۰۱	۰/۵۵ ± ۰/۰۴	میلی‌متر
طول رگبال B	۰/۲۳ ± ۰/۰۱	۰/۳۰ ± ۰/۰۷	۰/۲۴ ± ۰/۰۱	۰/۲۸ ± ۰/۰۳	میلی‌متر
طول خرطوم	۶/۲۳ ± ۰/۰۳	۵/۵۶ ± ۰/۲۳	۶/۲۳ ± ۰/۰۳	۹/۲۰ ± ۰/۰۳	میلی‌متر
طول بال جلویی	۹/۵۳ ± ۰/۰۷	۹/۵۳ ± ۰/۰۹	۹/۶۲ ± ۰/۰۷	۹/۵۸ ± ۰/۰۴	میلی‌متر
عرض بال جلویی	۳/۲۸ ± ۰/۰۳	۱۱/۶۶ ± ۰/۰۲	۳/۲۷ ± ۰/۰۳	۳/۲۹ ± ۰/۰۲	میلی‌متر
طول پای عقبی	۱۱/۴۹ ± ۰/۱۳	۹۰/۷۶ ± ۰/۱۶	۱۱/۵۰ ± ۰/۰۴	۱۱/۷۵ ± ۰/۰۹	میلی‌متر
زاویه G18	۸۰/۹۲ ± ۱/۲۶	۷۲/۵۰ ± ۰/۱۳	۹۱/۳۸ ± ۱/۰۵	۹۰/۹۸ ± ۰/۴۵	درجه
زاویه D7	۷۲/۱۳ ± ۱/۰۱	۳۲/۸۶ ± ۱/۱۰	۷۲/۴۵ ± ۰/۵۲	۷۲/۳۶ ± ۰/۶۵	درجه
زاویه A4	۳۱/۶۳ ± ۱/۱۱	۳/۵۳ ± ۰/۰۶	۳۱/۷۶ ± ۰/۵۵	۳۱/۴۸ ± ۰/۰۷	درجه
طول سلول رادیال	۳/۴۹ ± ۰/۰۲	۰/۰۰ ± ۰/۰۴	۵/۱۲ ± ۰/۰۷	۳/۴۸ ± ۰/۰۲	میلی‌متر



شکل ۳- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش حداقل واریانس وارد (Ward) برای جمعیت‌های زنبور عسل با بکار بردن صفات کیفی و کمی: گروه‌های A، B، D و F مربوط به اقلیم نیمه خشک، گروه‌های C و E مربوط به اقلیم نیمه مرطوب است.

جدول ۵- فاصله‌ها و تشابهات ژنتیکی بین نژادهای مورد بررسی. اعداد بالای قطر جدول، تشابه ژنتیکی و اعداد پایین قطر جدول فاصله ژنتیکی بین نژادها را نشان می‌دهد.

ایرانی	میدانیت	استارلاین	ایتالیایی
ایرانی	***	۰/۸۲۶۹	۰/۸۹۷۳
میدانیت	۰/۱۹۰۰	***	۰/۶۲۵۸
استارلاین	۰/۱۴۷۳	۰/۵۵۵۹	۰/۹۸۲۰
ایتالیایی	۰/۱۰۸۳	۰/۴۶۸۸	***



شکل ۴- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس داده‌های ملکولی برای چهار نژاد زنبورعسل.

میزان بارندگیهای سالانه متفاوت (مقدار بارندگی در مناطق شمالی استان نسبت به مناطق دیگر کمتر است) و تنوع مناطق (نیمه خشک، استپی، معتدل) دارای شرایط اقلیمی متنوعی است که این عوامل در مجموع باعث ایجاد تفاوتی در صفات ظاهری نمونه‌های مورد مطالعه شده است. با توجه به اطلاعاتی که از زنبورداران محلی به دست آمده است، زنبورعسل نژاد ایرانی بسیار نیش زن بوده و از بره موم زیادی استفاده می‌کند. این نژاد زنبوری صرفه جو است و زمستانها را به راحتی به پایان می‌رساند. همچنین چون در فصل زمستان تعداد جمعیت کلنی کاهش می‌یابد، در فصل بهار سریعاً رشد کرده و کمبود جمعیت را جبران می‌نماید. عملکرد این نژاد در مقایسه با نژادهای خارجی در حد پایینی است، ولی به دلیل صرفه جویی و زمستان گذرانی خوب، عملکرد اقتصادی مناسبی دارد. ورود ملکه های خارجی به ایران در سالهای گذشته به طور وسیعی گسترش یافته است که به علت عدم مشخص بودن هویت

در نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های ملکولی، دو نژاد ایتالیایی و استارلاین در یک گروه قرار گرفتند و نژادهای ایرانی و میدانیت در گروه‌های مجزا واقع شدند. طبق این نمودار، بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت نژاد میدانیت با استارلاین و سپس با نژاد ایتالیایی و ایرانی می‌باشد. زنبوران عسل نژاد ایتالیایی و استارلاین کمترین فاصله را داشتند (شکل ۴).

بحث زنبور عسل از نظر اقتصادی در تولید عسل و گرده افشانی گیاهان نقش داشته و از نظر پتانسیل کاربرد سم آنها (Bee venom) در درمان بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) مورد توجه محققان قرار گرفته است (۲۱). جدایی جغرافیایی می‌تواند منجر به تنوع ژنتیکی جمعیتها به واسطه انتخاب جغرافیایی جمعیتها و رانش ژنی در جمعیتها شده و باعث ایجاد گروههایی شود که به اصطلاح زیر گونه یا نژاد نامیده می‌شوند (۶). استان اردبیل به دلیل وجود دامنه وسیع تغییرات ارتفاع (۴۸۱۱-۴۰ متر) و نیز دارا بودن

شد با وجودی که کلنیهای زنبورعسل در این مناطق توسط رانش ژنی و همچنین جایگزینی ملکه‌های سایر نژادهای زنبورعسل مورد تهدید قرار گرفته اند، هنوز نژاد بومی این منطقه (*Apis mellifera mellifera*) حفظ شده است. این جمعیتها از نظر ژنتیکی تقریباً همگن هستند. با این وجود این نژاد در این منطقه حفظ شده و اکوتیپهای مختلفی را به وجود آورده است که نشان می‌دهد توانایی تکاملی نسبتاً بالایی برای سازگاری محلی دارد. با توجه به نتیجه به دست آمده بیشترین شباهت ژنتیکی مربوط به جمعیت استارلاین و ایتالیایی بوده و برابر ۰/۹۸۲۰ می‌باشد. چون هیبرید استارلاین هیبریدی از لاینهای ایتالیایی است، بنابراین می‌توان گفت، منشاء نژادی یکسان دلیل اصلی تشابه زیاد این دو جمعیت است. همچنین ممکن است وجود هر دو نژاد در یک زنبورستان که از آن نمونه برداری به عمل آمده است، باعث ایجاد یک جریان ژنی با شدت کم بین این دو نژاد و ایجاد تشابه ژنتیکی بین دو جمعیت شده باشد. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش حداقل واریانس وارد (Ward) برای جمعیتهای زنبور عسل با به کار بردن صفات کیفی نشان می‌دهد که نژادهای ایرانی و ایتالیایی از بقیه گروهها کاملاً مجزا شده‌اند ولی دو نژاد میدنایت و استارلاین با همدیگر تداخل دارند. البته احتمال دارد که این نژادها کاملاً خالص نباشند.

اصلی ملکه‌های وارداتی اثرات نامطلوبی روی نژاد ایرانی گذاشته است. احتمالاً همین عامل باعث گردیده است که زنبورعسل خالص نژاد ایرانی در اثر اختلاط نژادی، صفات مطلوب خود را از دست بدهد (۳). برای مقایسه یک صفت باید تعداد زیادی از نمونه‌های یک منطقه را اندازه گیری کرد و بر روی نتایج به دست آمده از این اندازه گیریها تجزیه و تحلیل آماری صورت گیرد. این کار به خصوص در سطح شناسایی نژادها بسیار رایج است. با وجودی که صفات فنوتیپی، تنوع ژنتیکی مستقیمی را نشان می‌دهند، به نظر می‌رسد که برای تمایز تاکسونها در سطح مورفولوژیکی و ظاهری مفید باشند (۱۱). هر چقدر فاصله موقعیتهای نمونه برداری بیشتر باشد، احتمال وجود مورفوکلاسترهای بزرگتر در آنالیز چند متغیره بیشتر خواهد بود (۱۴ و ۱۵). در این تحقیق سعی شد، حتی الامکان فاصله نقاط نمونه برداری بیشتر باشد تا نتایج صحیح تری به دست آید. به نظر می‌رسد که بررسیهای مورفولوژیکی نسبت به مطالعات مولکولی جهت شناسایی جمعیتهای محلی *A. mellifera* مفیدتر باشند. داده‌های مولکولی اطلاعات کمی را در شناسایی کلنیهای بومی و غیر بومی فراهم می‌سازد (۱۹). با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق برای تعیین آماره‌هایی مانند میزان هتروزیگوسیتی، فراوانی آللها و فاصله ژنتیکی، میکروستلایت‌ها به عنوان ابزار مناسبی تشخیص داده شدند. در این بررسی مشخص

منابع

۱. آذر نیا، م.، نبیونی، م.، رجیبی زلتی، س.، میرابوالقاسمی، غ.، حویزی، ا. (۱۳۸۸) تأثیر سم زنبور عسل بر رمیلینه شدن در رتهای ویستار دمیلینه شده با اتیدیوم پروماید. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۲ شماره ۴، ص ۵۶۶-۵۷۳.
۲. تقوی زاد، ر.، مجد، ا.، نظریان، ح. (۱۳۸۷) مقایسه گرده شناختی گیاهان در ماه‌های مختلف فعالیت زنبور عسل در منطقه Annals of the Entomological Society of America. 84(2): 137-149.
۳. طهماسبی، غ.، عبادی، ر.، اسماعیلی، ر.، کامبوزیا، ج. (۱۳۷۵) مطالعه مورفولوژیک زنبور عسل معمولی در ایران. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۲ شماره ۱ ص ۸۹-۱۰۱.
4. Archak, S., Meduri, E., Kumar, P.S., Nagaraju J. (2007) InSatDb: a microsatellite database of fully sequenced insect genomes. Nucleic Acids Research 35: 36-39.
5. Alexander, A. B. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Apis* (Hymenoptera; Apidae).
6. Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Frank, P., Quezada-Euan, J. G., Oldroyd, P. (2002) The africanization of the honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yukatan: A study of a massive

- hybridization event across time. *Evolution*. 56: 1462-1474.
7. Doyle, J. J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
 8. Estoup, A., Solognac, M., Harry, M., Cornuet, J.M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species : *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*. 21:1427-1431.
 9. Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (1995) Microsatellite variation in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Populations: Hierarchical Genetic Structure .
 10. Frank, P., Garnery, L., Oiseau, A., Oidroyd, B.P., Hepburn, H.R., Solignac, M., Cornuet, J.M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 86: 420-430.
 11. Kandemir, I., Pinto, M., Meixner, A., Marina, D., Sheppard, W.S. (2006) Hinf-I digestion of cytochrome oxidase I region is not a diagnostic test for *A.m.lamarckii*. *Genetics and Molecular biology*. 29: 747-749.
 12. Nei, M.A.C., Aravind, A. (1977) Drift Variances of FST and GST Statistics Obtained from a Finite Number of Isolated Populations. *Theoretical population biology*. 11: 307.
 13. Nie, M. (1972) Genetic distance between populations. *American naturalist*, 106: 383-299.
 14. Radloff, S.E., Hepburn, H. (2000) Population structure and morphometric variance in the *Apis mellifera scutellata* group of honeybees in Africa. *Genetics and Molecular Biology*. 23: 305-316.
 15. Radloff, S.E., Hepburn, H.R., Fuchs, S. (2005) The morphometric affinities of *Apis cerana* of the hindu kush and Himalayan regions of western Asia. *Apidologie*. 36: 25-30.
 16. Ruttner, F., Tassencourt, L., Louvaux, J. (1948) Biometrical-Statistical Analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 9: 363-381.
 17. Ruttner, F. (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 285pp. 11:55-88.
 18. Strange, J.P., Garnery, L., Sheppard, W.S. (2007) Morphological and molecular characterization of the Landes honeybee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. *J. Insect Conservation*. 12: 527-537
 19. Trouve, S., Degen, L., Meunier, C., Tirads, C., Hurtrez-Bousses S., Durand P., Guegan, J.F., Goudet, J., Renaud, F. (2000) Microsatellites in the hermaphroditic snail, *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Molecular ecology*. 9:1661-1686.

Archive

Morphologic and microsatellite genetic variation of honeybee populations in Ardabil

Zahri S.¹, Asghari A.² and Dadkhah M.¹

¹ Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

² Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

Identification and analysis of the variation of honeybee populations is an outstanding subject in the bees breeding. The grouping of populations based on the morphological keys using cluster analysis by the minimum variance WARD method divided the colonies into four groups. The results showed morphological dissociation of Iranian race from the foreign ones. The imported race to this region including Italian and hybrid Starline were dissociated into four different groups but the Midnite race were not completely dissociated from the Starline. The study of two microsatellite loci showed a minimum of 2 and a maximum of 4 alleles per locus. The analysis of population genetic parameters and phylogenetic relationships using cluster analysis method showed that the mean observed and expected heterozygosity was 0.93 and 0.53, respectively. The most similarity was observed between Italian and Starline races as 0.98 and the less similarity was revealed between Midnite and Italian races as 0.57. The results implies that the Italian race was completely separated from the Italian ones, Starline and Midnite hybrids.

Key words: Honey bee, genetic variation, microsatellite, Apis