بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی جمعیتهای زنبور عسل کوچک (*Apis florea*) با استفاده از ژنهای سیتوکروم اکسیداز I، ناحیه بین ژنی و سیتوکروم اکسیداز II

داود نجف‌زاده[۱]، جواد ناظمی رفیع[۱*] و جلال رستم‌زاده[۲]

[۱] **ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی**

[۲] **ایران، سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی**

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

تعیین خصوصیات ژنتیکی موجودات زنده، اولین قدم برای اصلاح نژاد آنها می‌باشد. این تحقیق در راستای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای زنبورعسل کوچک (Apis *florea*) در جنوب و جنوب غربی ایران انجام گرفت. به این منظور نمونه‌برداری در مهرماه سال ۱۳۹۳ از چهار استان خوزستان (دزفول و آبادان)، بوشهر (بندردیلم و خورموج)، فارس (فیروزآباد و خرم‌بید) و هرمزگان (حمیران و بندرعباس) انجام شد. جهت بررسی خصوصیات ژنتیکی بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I و ژن $tRNA^{leu}$، ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز II مورد استفاده قرار گرفت. درخت فیلوژنی نواحی ژنی به روشهای بیزی وحداکثر تشابه (MP) رسم گردید. پس از همردیفی توالیهای هشت ناحیه نمونه‌برداری شده از ایران مشخص گردید که بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I و ناحیه بین ژنی (واقع در بین $tRNA^{leu}$ و ژن سیتوکروم‌اکسیداز II) به ترتیب دو و یک تفاوت تک نوکلئوتیدی (SNP) در جمعیتهای مورد مطالعه داشتند. همچنین در این مطالعه، تفاوت نوکلئوتیدی بین توالیهای $tRNA^{leu}$ و ژن سیتوکروم‌اکسیداز II توالیهای هشت ناحیه نمونه‌برداری شده از ایران مشاهده نشد. نتایج نشان داد که نمونه‌های مورد مطالعه در ایران براساس ژن سیتوکروم‌اکسیداز I به سه گروه تقسیم شدند که بر اساس آن نمونه‌های دیلم، فیروزآباد، آبادان و حمیران در گروه اول، نمونه‌های خورموج و بندرعباس در گروه دوم و نمونه‌های دزفول و خرم‌بید در گروه سوم قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن سیتوکروم‌اکسیداز I در جمعیتهای زنبور عسل کوچک جنوب غربی و جنوب ایران تنوع ژنتیکی بیشتری داشت.

واژه های کلیدی: *Apis florea*، ناحیه بین ژنی، زنبورعسل کوچک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۹۹۲۵۰۹۴۸، پست الکترونیکی: j.nazemi@uok.ac.ir

مقدمه

امروزه نقش زنبورعسل در گرده‌افشانی گیاهان زراعی، باغی و بهبود محیط زیست به اثبات رسیده است. به طور کلی در تولید میوه‌ها و بذرها در مجموع ۱ درصد گرده افشانی به وسیله باد، ۶ درصد گرده‌افشانی توسط همه حشرات به غیر از زنبورعسل و ۹۳ درصد گرده‌افشانی تنها توسط زنبورعسل انجام می‌گیرد (۴). زنبورعسل کوچک *A. florea* (Fabricus, 1787) از سلسله جانوران، شاخه بندپایان، رده حشرات، راسته بال‌غشائیان، بالاخانواده Apoidea، خانواده Apidae، زیرخانواده Apinae، قبیله Apini و جنس *Apis* می‌باشد. زنبورعسل کوچک برای اولین بار در سال ۱۷۸۷ معرفی گردید (۱۵). این زنبور با ساختن یک شان در فضای باز زندگی می‌کند. همچنین زنبورعسل کوچک بر خلاف زنبورعسل معمولی می‌تواند در دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به گرده افشانی بپردازد

در نتیجه نقش مؤثری در گرده‌افشانی درخت خرما در مناطق گرمسیری دارد. بر خلاف زنبورعسل معمولی که در تاریکی فضای کندو، تنه خالی درختان، شکاف سنگها قادر به زندگی است، زنبور عسل کوچک قادر به زیستن در فضای تاریک نیست. منطقه انتشار زنبورعسل کوچک در منطقه غرب آسیا در کشورهایی همانند ایران، عمان، پاکستان، هندوستان، اندونزی،جزیره پاوالان در فیلیپین و همچنین در آفریقای جنوبی و در برخی کشورهای قاره آمریکاست (۱۹). این گونه در ایران در مناطق غربی، جنوبی غربی، جنوبی و گاهی اوقات در جنوب شرق کشور نیز دارای پراکندگیهایی است. مطالعه جمعیتهای جغرافیایی مختلف یک گونه مهم استراتژیک از اهمیت زیادی برخوردار است (۴). برای مطالعه جمعیت، روشهای متعددی وجود دارد که امروزه بین محققین سیستماتیک گسترش زیادی یافته است، از جمله آنها می‌توان به تنوع ژنتیکی اشاره کرد (۵). انعطاف‌پذیری فنوتیپی و تغییر پذیری ژنتیکی در صفاتی که برای تشخیص گونه‌ها به کار می‌رود، می‌تواند منجر به شناسایی نادرست شود، اما استفاده از سیستمهای دقیق‌تر و سریع‌تر جهت شناسایی موجودات زنده، از جمله شناساگرهای مولکولی می‌تواند به روند شناسایی نمونه‌ها کمک کند (۲۱). در تحقیقات ژنتیکی مرتبط با جانوران، ژنوم میتوکندری ارجحیت بیشتری نسبت به ژنوم هسته دارد (۷و۲۳). ژن سیتوکروم-اکسیداز I میتوکندری (سیتوکروم اکسیداز c زیر واحد یک) به عنوان مناسب‌ترین ژن برای تحقیقات با شناساگرهای مولکولی جانوری شناخته شده است. در واقع تکامل این ژن به گونه‌ای است که قادر می‌باشد گونه‌های بسیار نزدیک به هم را نیز از هم جدا کند (۱۲). از آنجایی که زنبوران کارگر و نر یک کلنی دی. ان. آی میتوکندری ملکه را به ارث می‌برند، بنابراین با استفاده از آنالیز DNA میتوکندری فقط یک زنبور کارگر، اطلاعاتی در مورد اجداد مادری یک کلنی فراهم خواهد شد (۶و۸).

با توجه به اهمیت اقتصادی زنبورعسل و نظر به اینکه باید هر فعالیتی در جهت حفاظت از جمعیت این حشره مفید صورت گیرد، شناسایی و طبقه‌بندی برای اصلاح و بهبود زنبوران عسل در ایران ضروری است. با توجه به اینکه تاکنون هیچ گونه تحقیقی در مورد توانایی نواحی ژنی $tRNA^{leu}$ ، ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II در تفکیک جمعیتهای مختلف *A.florea* انجام نگرفته بود، مقایسه بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I و نواحی ژنی $tRNA^{leu}$ ، ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II و بررسی خصوصیات ژنتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت. ضمنا نمونه‌های زنبور عسل کوچک جمع‌آوری شده از ایران با جمعیتهای زنبورعسل کوچک واقع در نقاط دیگر جهان و گونه‌های دیگر زنبورعسل مورد مقایسه قرار گرفت تا توانایی این نواحی ژنی در تفکیک جمعیتهای مختلف زنبورعسل کوچک و گونه‌های دیگر زنبورعسل مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

این تحقیق در آزمایشگاههای گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان در طول سالهای ۱۳۹۳ – ۱۳۹۴ انجام شد. توده‌های زنبورعسل کوچک از چهار استان خوزستان (دزفول و آبادان)، بوشهر (بندردیلم و خورموج)، فارس (فیروزآباد و خرم‌بید) و هرمزگان (حمیران و بندرعباس) جمع‌آوری شد. کد و مختصات جغرافیایی محلهای نمونه‌برداری با استفاده از GPS ثبت گردید (جدول ۱). جهت نمونه‌برداری از پنبه آغشته به کلروفرم استفاده شد. از هر منطقه نمونه برداری سه شان با فواصل نسبتاً زیاد از یکدیگر به عنوان سه تکرار انتخاب و ۵۰ زنبور کارگر از هر شان نمونه‌برداری شد. سپس زنبورهای بیهوش به ظرف حاوی الکل مطلق منتقل شدند و مشخصات محل جمع‌آوری بر روی ظرف جمع‌آوری، نوشته شد. نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور بررسیهای خصوصیات ژنتیکی، استخراج DNA تمامی نمونه‌ها به وسیله روش CTAB انجام شد (۱۰). کیفیت DNA و آلودگی احتمالی آن با اندازه گیری نسبت جذب نوری در طول موجهای A260 وA280 مورد بررسی قرار گرفت و جهت اطمینان از استخراج DNA ، مقدار ۵ میکرولیتر از DNA به همراه ۳ میکرولیتر محلول dye در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. پس از حصول اطمینان از استخراج و کیفیت DNA استخراجی مشاهده شده روی ژل آگارز، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با استفاده از جفت آغازگرهایی که توالی آن در جدول ۲ آمده است ژنهای سیتوکروم اکسیداز I و نواحی ژنی $tRNA^{leu}$ ، ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II انجام شد. در این تحقیق برای انجام واکنش PCR از روش برخی محققین (۱۱، ۱۳) استفاده گردید. به منظور مشاهده قطعات تکثیر یافته مورد انتظار در PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها، ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR به شرکت بایونر کره‌جنوبی ارسال شد. توالیهای نوکلئوتیدی ژن COI با کدهای MG548252، MG548253، MG548254، MG548255، MG548256، MG548257، MG548258، MG548259 و توالیهای نوکلئوتیدی ژن COII با کدهای MG548260، MG548261، MG548262، MG548263، MG548264، MG548265، MG548266، MG548267 در بانک ژن NCBI به ثبت رسید. همردیف کردن توالیها با استفاده از نرم‌افزار تحت وب MAFFT انجام شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی به روش MP به وسیله نرم‌افزار PAUP (V. 4.0b10) (۲۲) و روش بیزی با استفاده از نرم‌افزار MrBayes (V. 3.2.1) و مدل GTR انجام شد (۱۶). همچنین به روش کیموری دوپارامتری و با نرم افزار MEGA6.0 فواصل ژنتیکی بین توالیهای نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی محل جمع‌آوری توده‌های زنبورعسل کوچک (*Apis florea*) در جنوب و جنوب‌غربی ایران

نام منطقه	مختصات جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
دزفول	N32º 22' 16.1" E48º 22' 58.2"	۱۲۰
آبادان	N30º 22' 45.4" E48º 17' 39.0"	۴
بندر دیلم	N30º 03' 17.0" E50º 10' 38.7"	۱۱
خورموج	N28º 39' 19.8" E51º 23' 47.5"	۶۳
فیروز آباد	N28º 51' 39.1" E52º 29' 59.0"	۱۲۸۶
خرم بید	N30º 16' 21.3" E53º 15' 05.9"	۱۹۰۴
حمیران	N27º 02' 00.2" E53º 41' 30.5"	۲۲۱

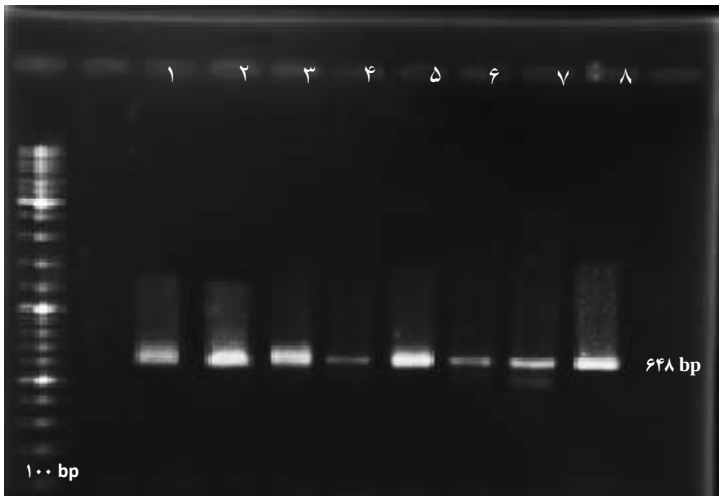
جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز DNA زنبورعسل کوچک (*Apis florea*)

ناحیه قابل تکثیر	توالی
بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز I	5'- ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' (Forward) 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3' (Reverse)
$tRNA^{leu}$، ناحیه بین‌ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II	5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3' (Forward) 5'-CAATATCATTGATGACC-3' (Reverse)

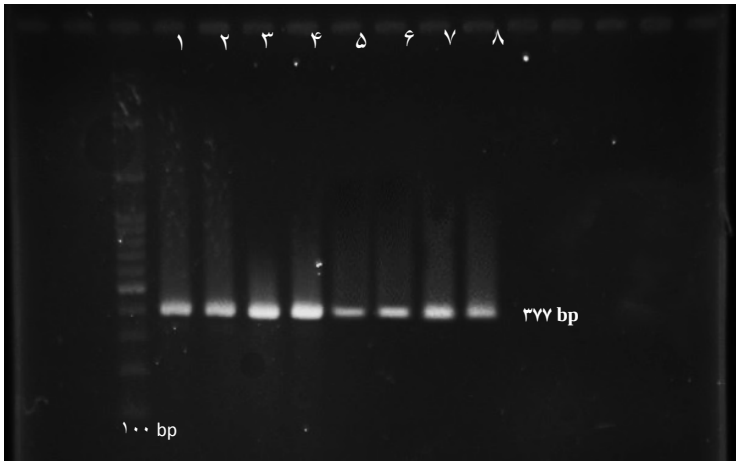
نتایج

نتایج حاصل از تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I به طول ۶۴۸ جفت باز متعلق به زنبورعسل کوچک (*Apis florea*) جمع آوری شده از جنوب و جنوب‌غربی ایران در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج آنالیز توالیهای این ناحیه پس از همردیفی توالیهای هشت جمعیت مورد بررسی جمع آوری شده از ایران نشان داد که نوکلئوتید T با ۴۱/۴۶ درصد بیشترین فراوانی و نوکلئوتید G با ۱۰/۴۴

درصد کمترین فراوانی را داشتند. همچنین در مقایسه جمعیتهای ایرانی با یکدیگر، دو جایگزینی تک نوکلئوتیدی A/G و G/A به ترتیب در فواصل نوکلئوتیدی ۶۵ و ۲۰۰ پس از پرایمر رفت (forward) وجود داشت (شکل ۳). هنگامی که ژن سیتوکروم اکسیداز I جمعیتهای زنبورعسل کوچک ایرانی با زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین (*A.florea* JX982136) مورد مقایسه قرار گرفت، ۱۷ جایگزینی نوکلئوتیدی مشاهده گردید که نشان دهنده تفاوت نوکلئوتیدی بالای این دو گروه بود (شکل ۳). نتایج حاصل از تکثیر توالیهای نواحی ژنی $tRNA^{leu}$، ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II به طول ۳۷۷ جفت باز در شکل۲ نشان داده شده است. مقایسه توالیهای هشت جمعیت مورد بررسی جمع آوری شده از ایران مشخص نمود که نوکلئوتید T با ۴۷/۱۴ درصد بیشترین فراوانی و نوکلئوتید G با ۵/۹۱ درصد کمترین فراوانی را داشتند. پس از همردیفی توالیهای جمعیتهای زنبورعسل کوچک ایرانی با یکدیگر فقط یک جایگزینی T/C در فاصله ۷۹ نوکلئوتیدی پس از پرایمر رفت وجود داشت همچنین پس از مقایسه جمعیتهای ایرانی با جمعیت زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین (*A.florea* JX982136) مشخص گردید که در موقعیت ۷۹ نیز جایگزینی نوکلئوتیدی A وجود دارد (شکل ۴). مقایسه جمعیتهای ایرانی زنبورعسل کوچک با زنبورعسل کوچک چین نشان داد که ناحیه $tRNA^{leu}$ زنبورعسل کوچک چین یک حذف نوکلئوتیدی A در موقعیت ۹ پس از پرایمر رفت دارد. همچنین حذف نوکلئوتیدهای TAA در ناحیه بین ژنی جمعیتهای زنبورعسل کوچک چین در موقعیتهای ۶۹، ۷۰ و ۷۱ مشاهده گردید. به علاوه یک جایگزینی نوکلئوتیدی در جایگاه نوکلئوتیدی ۸۲ (A→T) در ناحیه بین ژنی زنبورعسل کوچک چین وجود داشت. هیچ گونه تفاوت نوکلئوتیدی بین توالیهای سیتوکروم اکسیداز II زنبورهای عسل کوچک جمع‌آوری شده از ایران وجود نداشت ولی مقایسه توالیهای سیتوکروم اکسیداز II زنبورعسل کوچک چین (*A.florea* JX982136) با جمعیتهای ایرانی نشان داد که چهار جایگزینی G→T، T→C، T→C و A→T به ترتیب در موقعیتهای نوکلئوتیدی ۱۶۰، ۱۶۶، ۲۳۵ و۲۵۰ پس از پرایمر رفت وجود دارد (شکل ۴).

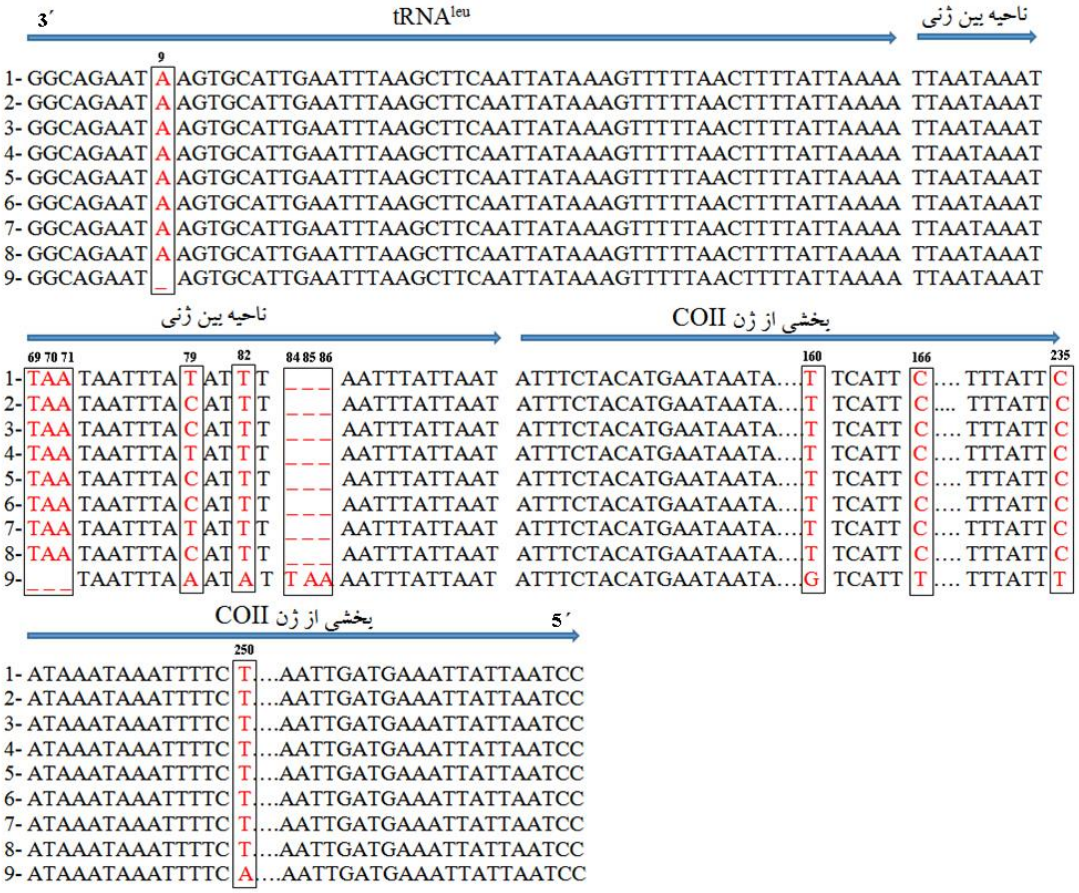


شکل۱- عکس ژل حاصل از بارگذاری نتایج حاصل از تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I زنبورعسل کوچک *Apis florea* در جنوب و جنوب-غربی ایران. چاهکها به ترتیب از چپ به راست:۱- دزفول، ۲- آبادان، ۳-فیروزآباد، ۴- خرم‌بید، ۵- حمیران، ۶- بندرعباس ۷- خورموج، ۸-بندردیلم، خط‌کش ژنی ۱۰۰bp



شکل ۲- عکس ژل حاصل از بارگذاری تکثیر نواحی ژنی $tRNA^{leu}$ ، ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II زنبورعسل کوچک در جنوب و جنوب‌غربی ایران. چاهکها به ترتیب از چپ به راست: ۱- دزفول، ۲- آبادان، ۳-فیروزآباد، ۴- خرم‌بید، ۵- حمیران، ۶- بندرعباس ۷- خورموج، ۸- بندردیلم، خط‌کش ژنی ۱۰۰bp

شکل ۳- تفاوتهای نوکلئوتیدی حاصل از مقایسه بخشی از توالیهای ژن سیتوکروم‌اکسیداز I هشت جمعیت زنبورعسل کوچک (*Apis florea*) در جنوب و جنوب‌غربی ایران با جمعیت زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین. ۱- بندردیلم، ۲- خورموج، ۳- حمیران، ۴- آبادان، ۵- بندرعباس، ۶-دزفول، ۷- فیروزآباد، ۸- خرم‌بید، ۹- جمعیت زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین (*Apis florea* JX982136). موقعیتهای مشخص شده نشان دهنده فاصله از پرایمر رفت است.

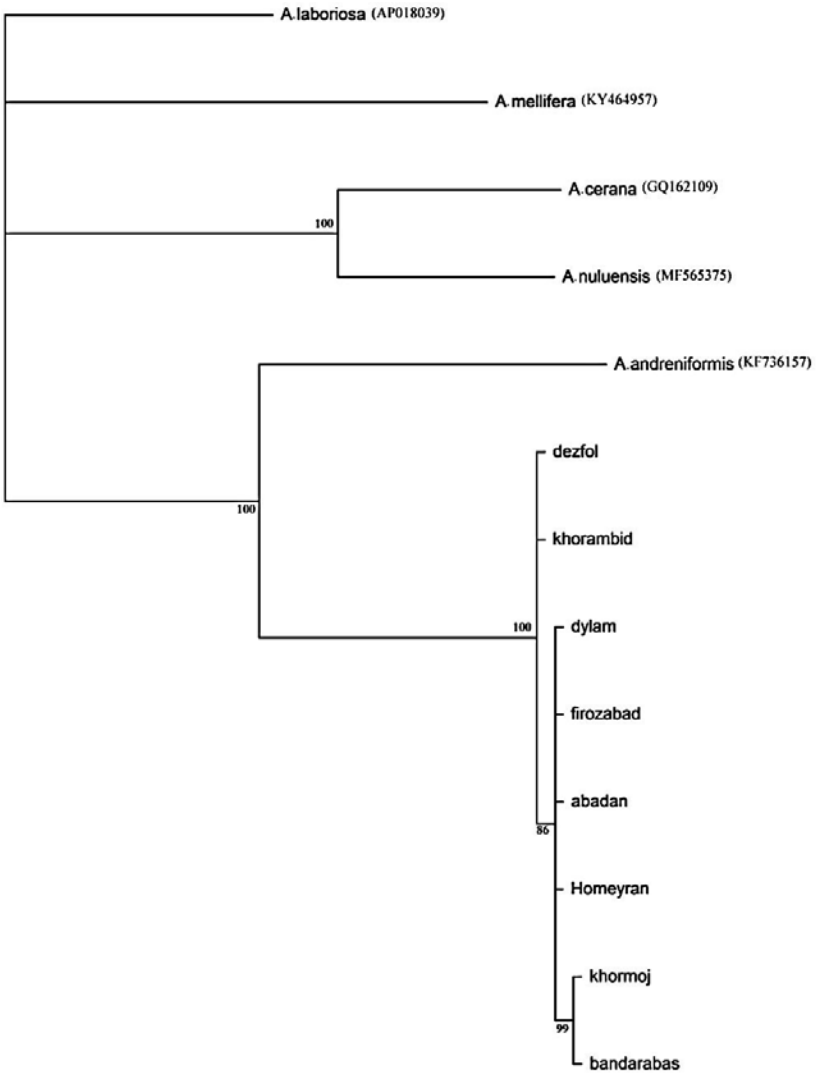


شکل ۴- تفاوتهای نوکلئوتیدی حاصل از مقایسه نواحی ژنی $tRNA^{leu}$، ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز II هشت جمعیت زنبور عسل کوچک (*Apis florea*) در جنوب و جنوب‌غربی ایران با جمعیت زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین. ۱- بندردیلم، ۲- خورموج، ۳- حمیران، ۴- آبادان، ۵- بندرعباس، ۶-دزفول، ۷- فیروزآباد، ۸- خرمبید، ۹- جمعیت زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین (*Apis florea* JX982136). موقعیتهای مشخص شده نشان دهنده فاصله از پرایمر رفت است.

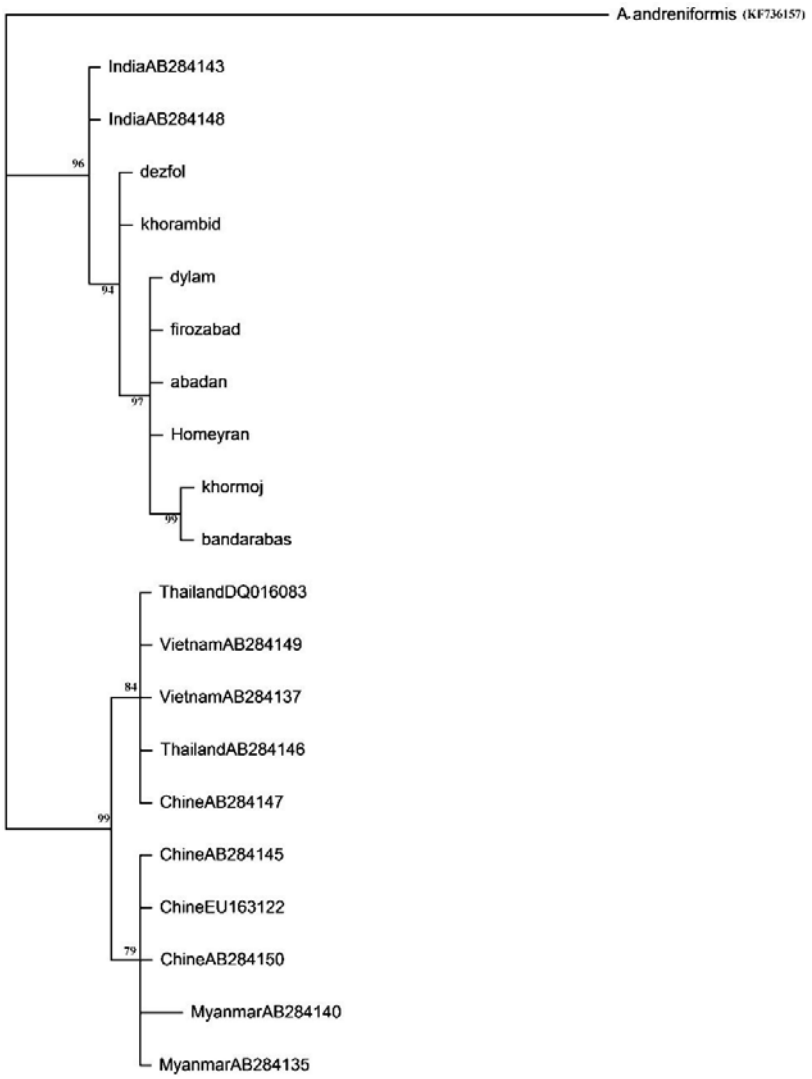
توالیهای بخشی از ژن سیتوکرم اکسیداز **I** مورد بررسی قرار گرفت و پس از همترازی، درخت فیلوژنی ترسیم و مقایسه‌ای بین توالیهای زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از جنوب غربی و جنوب ایران و توالیهای گونه‌های دیگر زنبورعسل به دست آمده از بانک ژن انجام شد (شکل ۵). نتایج نشان داد که نمونه‌های مورد مطالعه در ایران براساس ژن سیتوکروم اکسیداز I به سه گروه تقسیم شدند که بر اساس آن نمونه‌های دیلم، فیروزآباد، آبادان و حمیران در گروه اول، نمونه‌های خورموج و بندرعباس در گروه دوم و نمونه‌های دزفول و خرمبید در گروه سوم قرار گرفتند. در این بررسی از زنبورعسل معمولی یا اروپایی (*Apis mellifera* L.) به عنوان گروه خارجی برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنی استفاده گردید. زنبور عسل ریز (*A. andreniformis*) نزدیکترین فاصله ژنتیکی را با نمونه‌های زنبورعسل کوچک جمع آوری شده از ایران (۰/۷۹ تا ۰/۸۳) داشت. همچنین زنبورعسل معمولی (*A. mellifera*) بیشترین فاصله ژنتیکی را نسبت *A. florea* از خود نشان داد (۰/۱۳۲ تا ۰/۱۳۷) (شکل ۵).

همچنین مقایسه‌ای بین بخشی از ژن سیتوکروم اکسیداز I زنبورعسل کوچک نمونه‌برداری شده از هشت منطقه ایران و داده‌های موجود در پایگاه داده مرتبط با نمونه‌های زنبورعسل کوچک چین، هند، میانمار، تایلند و ویتنام انجام

گرفت. از گونه *A. andreniformis* به عنوان گروه خارجی استفاده گردید. نتایج نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از ایران نزدیکترین فاصله ژنتیکی را با نمونه‌های هند (IndiaAB284148 و IndiaAB284143) داشتند (۰/۰۰۳ تا ۰/۰۰۵). نمونه‌های مربوط به ویتنام (AB284149 و AB284137) و چین (AB284147) و تایلند DQ016083 و AB284146), درکنار یکدیگر قرار گرفتند. همچنین نمونه‌های میانمار (AB284140 وAB284135) بیشترین فاصله ژنتیکی را با نمونه‌های زنبورعسل کوچک ایران داشتند (۰/۰۳۱ تا ۰/۰۳۴) (شکل۶).

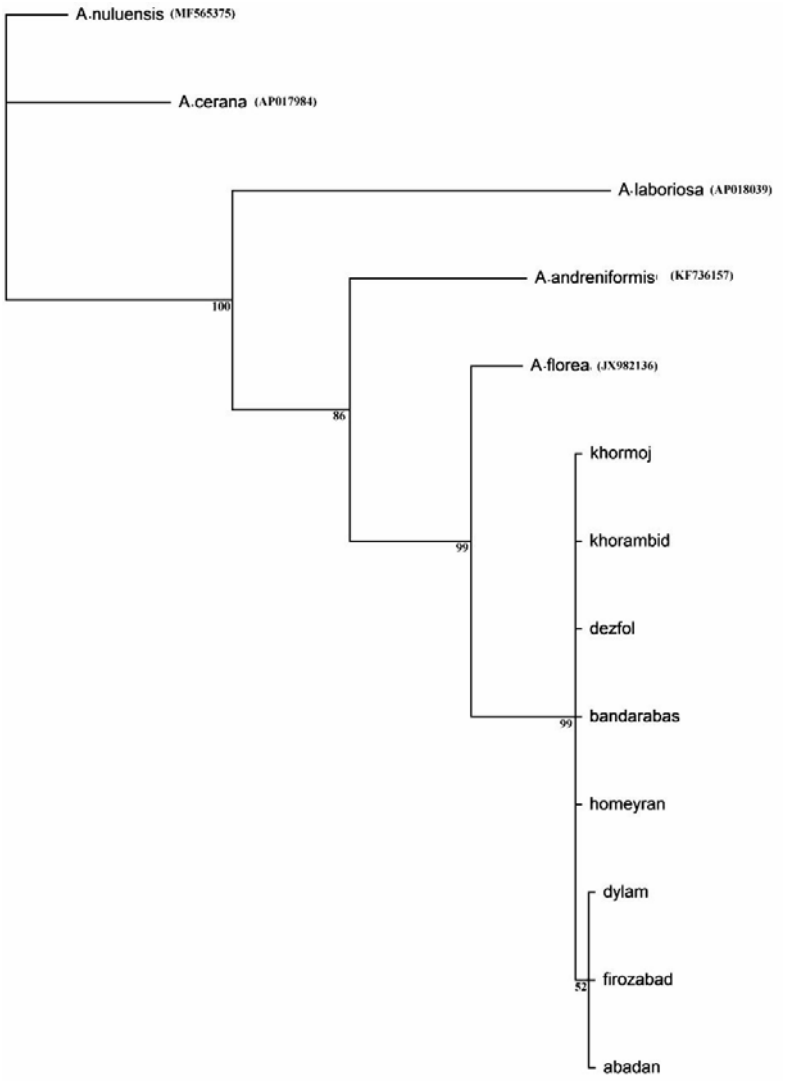


شکل ۵- دندروگرام حاصل از مقایسه داده‌های بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I متعلق به هشت جمعیت زنبورعسل کوچک (*Apis florea*) جمع آوری شده از جنوب و جنوب غربی ایران با توالیهای گونه‌های دیگر زنبورعسل موجود در پایگاه داده‌ها. گونه زنبورعسل اروپایی (*A. mellifera*) به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شد.



شکل ۶- دندروگرام حاصل از مقایسه توالی بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز I متعلق به هشت جمعیت زنبورعسل کوچک *(Apis florea)* جمع آوری شده از جنوب و جنوب غربی ایران با توالیهای زنبورعسل کوچک موجود در پایگاه داده‌ها. گونه زنبورعسل ریز (*A.andreniformis*) به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شد.

توالیهای $tRNA^{leu}$، ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن سیتوکرم اکسیداز **II** مورد بررسی قرار گرفت و پس از همترازی، درخت فیلوژنی ترسیم و مقایسه‌ای بین توالیهای زنبورعسلهای کوچک جمع‌آوری شده از جنوب غربی و جنوب ایران و توالیهای گونه‌های دیگر زنبورعسل به دست آمده از بانک ژن انجام شد (شکل۷). نتایج نشان داد که این نواحی ژنی، جمعیتهای زنبورعسل کوچک ایرانی را به دو گروه تقسیم کردند که شامل دیلم، فیروزآباد و آبادان در گروه اول و خرموج، خرم بید، دزفول، بندرعباس و حمیران در گروه دوم بودند. گونه *A. cerana* بیشترین فاصله ژنتیکی را از نمونه‌های زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از جنوب ایران نشان دادند (۰/۱۳۰). نمونه‌های زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین (*A.florea* JX982136) کاملاً از زنبورهای عسل کوچک ایران جدا شدند همچنین این نواحی ژنی توانستند زنبورعسل ریز (*A.andreniformis*) را از *A. florea* به طور کامل جدا کنند (شکل ۷).



شکل ۷- دندروگرام حاصل از مقایسه داده‌های $tRNA^{leu}$، ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن سیتوکرم اکسیداز II متعلق به هشت جمعیت زنبورعسل کوچک (*Apis florea*) جمع آوری شده از جنوب غربی و جنوب ایران با توالیهای گونه‌های دیگر زنبورعسل موجود در پایگاه داده‌ها. گونه زنبورعسل هندی (*A. cerana*) به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شد.

بحث

روشهای مولکولی بررسی تنوع و مخصوصاً تنوع DNA میتوکندری می‌توانند در بین جمعیتهای زنبورعسل تفاوتها را نشان دهند و روشی برای تمایز آنها از هم باشند. در مطالعه انجام گرفته در این تحقیق، ژنهای مورد استفاده توانستند به خوبی باعث تمایز جمعیتهای مورد مطالعه از همدیگر شوند. پس از انجام بررسیهای مورفومتریک و مولکولی زنبورعسل در مطالعه‌ای مشخص شد که روش مولکولی روش دقیق‌تر و مورد اعتمادتری نسبت به روش مورفومتریک در شناسایی و تشخیص گونه‌ها است (۱۸). در بررسی داده‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی، رفتاری و اکولوژیکی زنبورعسل کوچک (*A.florea*) و زنبورعسل ریز (*A.andreniformis*) در تایلند از مقایسه‌های ژنتیکی ژنهای میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز I و سیتوکروم - اکسیداز II استفاده شد (۹). آنها در این بررسی به این نتیجه رسیدند که این ژن‌ها به خوبی می‌توانند جمعیتهای

این دو گونه را از یکدیگر تفکیک کنند به طوری که این موضوع نیز در مطالعه حاضر به اثبات رسید. همچنین در تحقیقاتی که محققین بر روی جانوران و با ژنهای مختلف انجام داده‌اند، به این نتیجه رسیده‌اند که ژن سیتوکروم-اکسیداز I می‌تواند یکی از گزینه‌های قابل استفاده و قابل اعتماد در تمایز جمعیتها باشد (۱۲). همچنین در بررسیهای انجام شده بر روی موجودات دیگر نیز استفاده از نواحی ژنی میتوکندری مانند نواحی D-loop در تفکیک گونه‌های جنس *Rattus* spp به کار گرفته شده است (۱).

در این تحقیق از بخشی از ژن COI و ناحیه tRNAleu، ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن COII برای بررسی توانایی این نواحی ژنی در تفکیک جمعیتهای زنبورعسل استفاده گردید. تاکنون هیچ گونه تحقیقی در مورد توانایی نواحی ژنی tRNAleu، ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن COII در تفکیک جمعیتهای زنبورعسل کوچک (*Apis florea*) انجام نشده بود بنابراین در تحقیق حاضر برای اولین بار این نواحی مورد بررسی قرار گرفت؛ این نواحی به عنوان مهم ترین نواحی ژنی در تفکیک جمعیتها و زیرگونه‌های زنبورعسل اروپایی یا معمولی (*Apis mellifera* L.) مورد استفاده قرار گرفته است و به اثبات رسیده است که این نواحی ژنی به خصوص ناحیه بین ژنی (بین tRNAleu و COII) نقش مهمی در تفکیک جمعیتها و زیرگونه‌ها دارد (۵ و ۱۱). همچنین در تحقیق انجام شده توسط مدبر و ناظمی رفیع (۳) از اغلب نواحی ایران نمونه‌های زنبورعسل معمولی جمع‌آوری شد و به اثبات رسید که ناحیه بین ژنی نقش مهمی در تفکیک جمعیتها و زیرگونه‌های زنبورعسل اروپایی دارد به طوری که در مجموع پنج هاپلوتیپ زنبورعسل در نواحی مورد مقایسه در ایران مشاهده شد. یکی از دلایل مهم استفاده از این ناحیه بین ژنی در تفکیک جمعیتهای زنبورعسل این است که جهش می‌تواند در توالی غیر کد کننده، بدون آسیب رساندن به توانایی زنبور عسل تجمع یابد. این ناحیه بین ژنی در بین گونه‌های زنبورعسل تنوع و طول بسیار متفاوتی دارد به طوری که بیشترین طول در زنبور عسل اروپایی (۱۹۶ تا ۶۴۲ جفت باز) تا کوچکترین طول در زنبورعسل کوچک (۲۸ تا ۳۹ جفت باز) را دربرمی‌گیرد (۱۴). در تحقیق حاضر و در مقایسه بین توالیهای جمعیتهای زنبورعسل کوچک در برخی نواحی ایران، فقط یک تفاوت نوکلئوتیدی در ناحیه بین ژنی (۳۵ جفت باز) زنبورعسل کوچک (*A. florea*) مشاهده شد زیرا زنبورعسل کوچک کوتاه ترین ناحیه بین ژنی را در بین گونه‌های دیگر زنبور عسل دارد همچنین هیچ گونه تفاوت نوکلئوتیدی در ناحیه COII و $tRNA^{leu}$ مشاهده نگردید؛ ولی در مقایسه بین جمعیتهای مورد مطالعه در ایران با جمعیت زنبورعسل کوچک جمع‌آوری شده از چین (*A.florea* JX982136)، تفاوتهای نوکلئوتیدی اعم از جایگزینی و حذف و اضافه (insertion/deletion) نوکلئوتیدی در ناحیه بین ژنی مشاهده شد و نمونه‌های مورد مطالعه کاملاً از جمعیت چین جدا شدند. بنابراین با وجود کوتاه بودن ناحیه بین ژنی زنبورعسل کوچک، این ناحیه نقش موثری در تفکیک جمعیتهای مختلف زنبورعسل کوچک از یکدیگر و حتی گونه‌های دیگر زنبورعسل دارد که این موضوع نشان‌دهنده توانمندی این نواحی ژنی در تفکیک جمعیتهای مختلف زنبورعسل کوچک می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نیز مناسب بودن ژن سیتوکروم‌اکسیداز I برای مطالعه و تفکیک جمعیتهای مختلف زنبور عسل در ایران را نشان می‌دهد. چنانچه در دندروگرام شکل ۶ به خوبی مشخص است که نه تنها بر اساس این ناحیه ژنی می توان دوگونه بسیار نزدیک زنبورعسل کوچک (*A.florea*) و زنبورعسل ریز (*A.andreniformis*) را از یکدیگر تفکیک نمود بلکه به خوبی می‌توان جمعیتهای مختلف زنبور عسل کوچک را از یکدیگر تفکیک کرد. این نتایج نیز تأییدی بر توانمندی ژن سیتوکروم‌اکسیداز I برای این نوع مطالعات است. پس از انجام مقایسه بین توالی ژن سیتوکروم‌اکسیداز I با سایر توالیهای ثبت شده جمعیتهای

مختلف زنبورعسل کوچک در پایگاههای داده به این نتیجه رسیده که گونه زنبورعسل کوچک در نواحی مورد مطالعه ایران در کنار نمونه‌های هندوستان قرار گرفت و تمامی نمونه‌های شرق آسیا همانند نمونه‌های تایلند، میانمار، چین در کنار هم قرار گرفتند. دلیل این همسایگی را می‌توان به فاصله جغرافیایی مناطق مورد مقایسه نسبت داد به‌عنوان مثال نمونه‌های هند و ایران که از نظر فاصله جغرافیایی به یکدیگر نزدیک‌تر بودند در کنار یکدیگر قرار گرفتند. بنابراین جمعیتهایی که دارای فاصله جغرافیایی کمتری نسبت به یکدیگر بودند در یک گروه قرار گرفتند.

بررسی منابع موجود نشان از توافق کلی در رابطه با توانمندی یکسان نشانگرهای ریخت شناختی و مولکولی ندارد. برای مثال بررسی تنوع جمعیتهای زنبورعسل در استان اردبیل بر اساس نشان‌گرهای ریخت‌شناسی و ریزماهواره‌ها نشان داد که هر دو روش مورفومتریک و مولکولی به خوبی می توانند نژادهای مورد مطالعه را از هم تفکیک کنند و آنها را در گروههای جداگانه‌ای قرار دهند (۲). ولی با بررسی رابطه فیلوژنتیکی زنبوران عسل با استفاده از DNA میتوکندری (ژن ND2) و هسته‌ای (ژن *EF- 1α*) مشخص شد که ژنهای میتوکندریایی توانایی بهتری در تفکیک گونه‌ها دارند. به علاوه آنها عوامل طبیعی و جغرافیایی را به عنوان عواملی نام بردند که می‌توانند باعث تمایز گونه‌ها شوند (۵).

داده های حاصل از آنالیز توالی ژن $tRNA^{leu}$ و ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II، هشت منطقه مورد مطالعه این جمعیتهای مورد مطالعه را به دو گروه اصلی تقسیم کرد که شامل دیلم، فیروزآباد و آبادان در گروه اول و خرموج، خرم بید، دزفول، بندرعباس و حمیران در گروه دوم بودند. نوع میزبان گیاهی و شرایط جغرافیایی و اقلیمی مشابه می‌تواند از دلایل شباهت و کنار هم قرار گرفتن این جمعیتها باشد (۲۰). از طرف دیگر عامل حمل و نقل می‌تواند به‌عنوان یکی از دلایل این گروه‌بندی باشد. همان طور که محققان در سالهای اخیر اذعان نمودند که زنبورعسل کوچک به صورت تصادفی و طبیعی و به طور مداوم از طریق حمل و نقل به سایر نقاط هم امتداد انتقال پیدا کرده است. به عنوان مثال می‌توان به جمع‌آوری کندوهای زنبورعسل کوچک تشکیل شده بر روی دکل کشتیهایی که از بندر جاکارتا در اندونزی به سمت سودان و اردن در حرکت بودند، اشاره کرد (۱۷). از آنجا که قدرت پرواز این زنبوران بسیار کم و محدود است عوامل فیزیکی مانند کوهستان، دریا، زمینهای بایر و غیره می توانند باعث تفرق و جدایی جمعیتهای مورد مطالعه در نبود عامل حمل ونقل شده باشند (۱۵).

نتیجه گیری کلی

مقایسه توالیهای نوکلئوتیدی جمعیتهای زنبورعسل کوچک جمع آوری شده از ایران و توالیهای نوکلئوتیدی جمعیتهای زنبورعسل کوچک نقاط دیگر دنیا در بانک ژن نشان داد که $tRNA^{leu}$، ناحیه بین ژنی و بخشی از سیتوکروم‌اکسیداز II و بخشی از ژن سیتوکروم اکسیداز I توانایی تفکیک جمعیتهای مختلف زنبورهای عسل کوچک را دارند.

منابع

۱- رجبی مهام، ح.، کشتکار، س.، حسن زاده کیابی، ب. و میرزایی، م. ۱۳۹۴. تنوع ژنتیکی جمعیت نزد گونه های جنس *Rattus* در شهر تهران. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۸، شماره ۲، ۲۳۶-۲۲۳.

۲- زهری، ص.، اصغری، ع. و دادخواه، م. ۱۳۹۲. تنوع جمعیتهای زنبورعسل بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی وریزماهواره در استان اردبیل. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد۲۶، شماره ۴، ۴۶۲-۴۷۱.

۳- مدبر، م. و ناظمی رفیع، ج. ۱۳۹۵. بررسی خصوصیات مرفومتریک هندسی و ژنتیکی زنبورعسل معمولی (*Apis mellifera* L.). پایان نامه، دانشگاه کردستان، ۹۰ صفحه.

۴- نراقی، م. ۱۳۸۸. زنبورعسل و زنبورداری. انتشارات آییژ، ۲۴۸ صفحه.

5- Arias, M .C . and Sheppard, W .S. 2005. Phylogenetic relationships of honeybees (Hym.: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. Molecular phylogenetics and evolution, 37(1): 25-35.

6- Behura, S .K. 2007. Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome. Molecular Biology and Evolution, 24: 1492-1505.

7- Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G .R. and Thorpe, R .S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Science International, 173(1): 1-6.

8- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I. and Serrano, J. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. Apidologie, 40(3): 263-284.

9- Deowanish, S., Wattanachaying, W., Wongsiri, S., Oldroyd, B. P., Leepitakrat, S., Rinderer, T. E. and Sylvester, H. A. 2001. Biodiversity of dwarf honeybees in Thailand. In Procceding. Seven International Conference on Tropical Bees, 97-102.

10- Evans, D. J., Schwarz, R. S., Chen, Y. P., Budge, G., Cornman, R. S., Delarua, P., Miranda, J., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Lun, D. M., Moritz, R., Maleszka, R., Muñoz, I. and Pinto, M. A. 2013. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research, 52(4): 8-15.

11- Garnery, L., Vautrin D., Cornuet J. M., and Solignac, M. 1991. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. Apidologie, 22: 87-92.

12- Hebert, P. D., Cywinska, A. and Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences, 270: 313-321.

13- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(41): 14812-14817.

14- Hepburn, R. and Radloff, S. 2011. Honetbees of asia. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, P 683.

15- Hepburn, H. R., Radloff, S. E., Otis, G. W., Fuchs, S., Verma, L. R., Ken, T., Chaiyawong, T., Tahmasebi, G., Ebadi, R. and Wongsiri, S. 2005. *Apis florea*: morphometrics, classification and biogeography. Apidologie, 36: 359-376.

16- Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17(8): 754-755.

17- Mcmillan, A. A. 2005. A provisional Quaternary and Neogene lithostratigraphical framework for Great Britain. Netherlands Journal of Geosciences, 84(2): 87-107.

18- Reece, R. J. 2004. Analysis of genes and genomes. John Wiley and Sons, 492 P.

19- Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybee. Springer-Verlag Berlin Germany, 284 P.

20- Smith, M. A., Fisher, B.L. and Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 360: 1825-1834.

21- Stoeckle, M., Janzen, D., Hallwachs, W., Hanken, j. and Baker. J. 2003. Taxonomy, DNA and the barcode of life. BioScience, 53(9): 1-14.

22- Swofford, D. L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10.

23- Wade, N. 2004. A species in a second: promise of DNA barcodes. New York Times. 14 P.

Evaluation of phylogenetic characteristics of dwarf honeybee populations (Apis florea) using COI, intergenic region and COII

Davod Najafzadeh[1], Javad Nazemi-Rafie[1] and Jalal Rostamzadeh[2]

[1] Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

[2] Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

Determination of genetic characteristics of animates is the first step in breeding. This research was conducted for evaluation of genetic diversity of dwarf honeybee populations (*Apis florea*) in southwest and southern of Iran. The sampling was conducted in four provinces of Iran including Khozestan (Dezful and Abadan), Boshehr (Bndardeylm and Khormoj) Fars (Firoozabad and Khorrambid) and Hormozgan (Hamiran and Bandar Abbas). For studying of the genetic characteristics, partial COI, $tRNA^{leu}$, intergenic region and partial COII were evaluated. Phylogenetic trees were drawn by Baysian and Maximum Parsimony (MP) methods. After sequence alignment, there was one and two single nucleotide polymorphism (SNP) in partial COI and intergenic region (situated between $tRNA^{leu}$ and COII) respectively in studied populations of Iran. Sequences of COI gene grouped the studied populations in three groups including Dylam, Firozabad, Abadan and Homeyran in the first group, Khormoj and Bandarabas in the second group and Dezfol and Khorambid in the third group. In addition, COI gene showed more genetic diversity in dwarf honeybee populations in southwest and southern areas of Iran.

Key words: *Apis florea,* dwarf honeybee, intergenic region, Iran