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 جمع آوری 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.

واژه های کلیدی: زنبور عسل- تنوع ژنتیکی – ریزماهواره- Apis

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

مقدمه

شمال غرب آسیا منطقه‌ای است که تنوع گسترده موفولوژیکی زنبور عسل در آنجا دیده می‌شود (17). 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). زنبورعسل حشره‌ای بسیار سازش یافته با اکوسیستمهای متغیر در گستره آفریقا، اروپا و قسمتهای مرکزی و غرب آسیا می‌باشد. در حدود ۲۶ زیر گونه و اکوتیپهای (موجود سازش یافته با یک زیستگاه خاص) متعدد گونه *Apis melifera* 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).

در زنبورها، از آغازگرهای ریزماهواره برای اولین بار در *Apis melifera* و *Bombus terrestris* استفاده شد و سپس برای سه نوع زنبور عسل بدون نیش استفاده گردید (۸). ریزماهواره‌ها 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 میکروستلایت ها 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 ریزماهواره و میتوکندریایی، نشان دادند که جایگاههای ریزماهواره 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 ماهواره 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 نشانگر های مورفولوژیکی و مولکولی (ریز ماهواره) انجام شد.

مواد و روشها

۱- مطالعات مورفولوژیک: برای انجام مطالعات مورفولوژیک، 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 ۱-۳ کلنی و در طی ماههای تیر، مرداد و شهریور سال ۱۳۸۵ انجام شد. از هر کلنی در حدود ۱۵ زنبور عسل کارگر انتخاب گردید. برای نمونه برداری از ظروف پلاستیکی دهان گشاد استفاده شد و زنبورها با احتیاط از داخل هر کندو و از روی شانهای زنبور عسل در داخل بطریهای پلاستیکی قرار داده شدند. صفات ظاهری روی ۶ زنبور کارگر از هر کلنی اندازه‌گیری شد و در مورد اعضایی که به طور قرینه در بدن زنبور عسل وجود دارند، همیشه عضو سمت راست برای اندازه‌گیری انتخاب شد. از بین حدود ۴۰ صفت ظاهری که برای متمایز ساختن نژادهای زنبور عسل دنیا استفاده می‌شود، ۱۱ صفت ظاهری کمی (جدول ۳) و سه صفت کیفی (شکل تومنتوم، وضعیت زاویه دیسکوئیدال و رنگ نیم حلقه‌های پشتی و شکمی ناحیه شکم) انتخاب شد. برای بررسی ویژگیهای مربوط به بال جلو، پس از جدا کردن بال سمت راست مدتی آن را در محلول الکل ۷۰ درصد قرار داده و سپس بالها به ترتیب روی اسلایدهای دو جداره چیده شدند تا پس از تبخیر الکل به اسلایدها بچسبند و اندازه‌گیری روی آنها انجام شود. داده‌های حاصل از اندازه گیری طول و زاویه رگبالها و شاخص کوبیتال در شناسنامه هر کلنی ثبت گردید. برای اندازه‌گیری طول خرطوم، طول و عرض بال جلویی، طول پای عقبی و سلول رادیال از استریو میکروسکوپ مجهز به عدسی مدرج استفاده شد. کلیه اندازه‌گیریها با استفاده از روش بین المللی روتنر انجام گرفت (۱۶).

۲- استخراج DNA : برای انجام مطالعات مولکولی، استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه (Salting out method) با اندکی تغییرات انجام شد (7). 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 وTNE به ترتیب به مقدار۱۲۰µl و۵۰۰µl 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.

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 ریزماهواره: در این تحقیق از ۲ جایگاه ریز ماهواره‌ای AM2 وA88 استفاده شد (جدول ۱). آغازگرهای AM2f وAM2B با استفاده از نرم افزار Oligo 0.6 و الگو قرار دادن توالی ثبت شده به شماره AJ509247طراحی گردید و آغازگرهای A88f و A88b بر اساس گزارشات قبلی ساخته شد(۵). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۱/۲ میلی‌مول dNTP، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۴ میلی‌مول از هر آغازگر و ۳۰ نانوگرم DNA صورت گرفت. مراحل واکنش PCR شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه در یک چرخه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۴ چرخه و ۷۲ درجه سانتی گراد 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 آلل‌های ریز ماهواره از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل پلی آکریلامید ۱۲ درصد استفاده شد.

۴- تجزیه و تحلیل آماری: پس از اندازه‌گیری صفات ظاهری، تجزیه واریانس و محاسبه میانگین، معیار اشتباه صفات اندازه گیری 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 با روش حداقل واریانس وارد (Ward) استفاده شد (۱۲). تجزیه تنوع ژنتیکی جمعیتها در جایگاههای مورد نظر شامل تعداد آللها در هر لوکوس، تعداد ژنوتیپها و میزان تنوع در هر جمعیت و لوکوس، فراوانی آللی، 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 اندازه گیری 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 زنبور عسل نشان داد که بین نژادها در صفات کمی کوبیتال A، کوبیتالB، طول خرطوم، طول پای عقبی و زاویه A_4 اختلاف معنی-داری 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.

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

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.

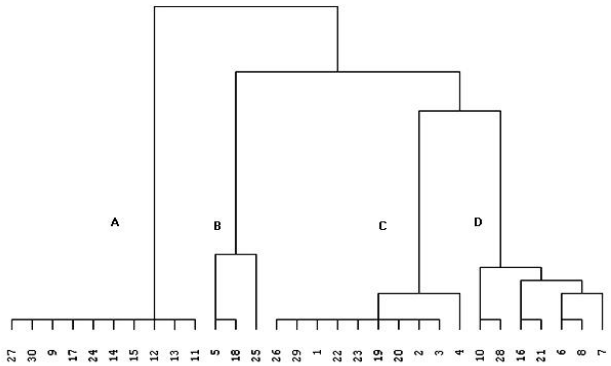
جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره در زنبور عسل

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

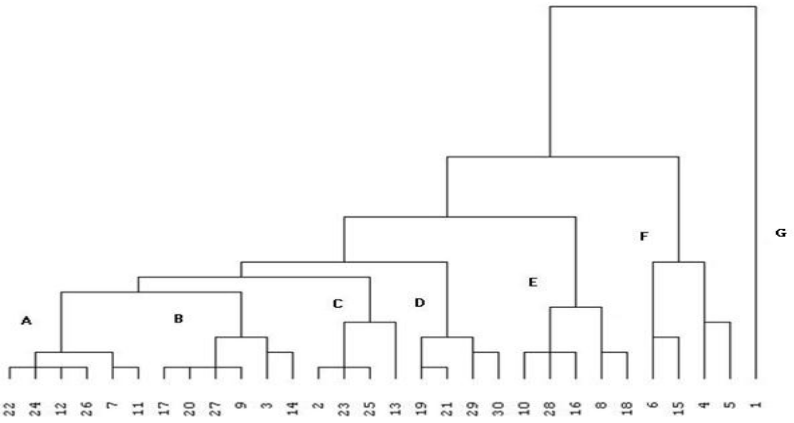
جدول۲- نتایج حاصل ازتجزیه واریانس یکطرفه برای صفات کمی مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)										
		شاخص کوبیتال	کوبیتال a	کوبیتال b	طول خرطوم	طول بال جلویی	عرض بال جلویی	طول پای عقبی	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}	۰/۷۰۴**	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	۰/۱۰۳	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 وG وD مربوط به اقلیم نیمه خشک و گروه‌های B و F مربوط به اقلیم نیمه مرطوب و گروه های G و C 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.

در گروه‌بندی جمعیتها و نژادها با ترکیب داده‌های کمی (تومنتوم، رنگ نیم حلقه ها و وضعیت زاویه دیسکوئیدال)و داده‌های کیفی (طول بال جلویی، شاخص کوبیتال، 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.

جهت بررسی تنوع ژنتیکی از دو جایگاه ریزماهواره نیز استفاده گردید. آغازگر AM2 پلی مورفیسم و تنوع نواری 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 AM2در سطح ۰/۰۵ از تعادل انحراف نشان دادند (۰/۰۵ $\geq$ P) . 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).

میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۶۰ در نژاد ایرانی و۱/۰۰ 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

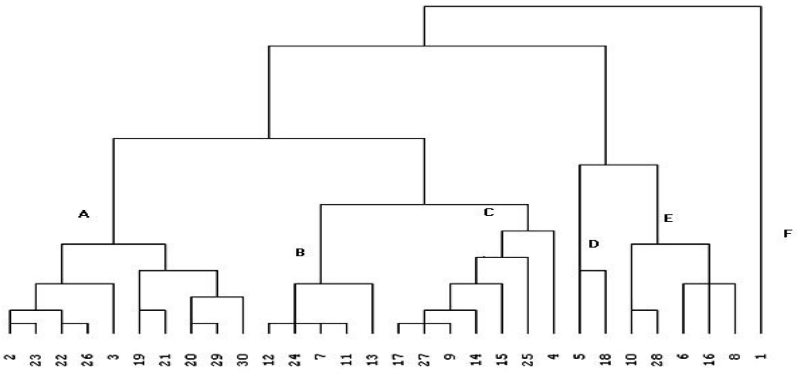
تشابه ژنتیکی نیز بین نژاد ایتالیایی و استارلاین (برابر ۰/۹۸۲۰) بود (جدول ۵).

جدول۳- نتایج حاصل از بیومتری مربوط به چهار نژاد مورد بررسی

نژاد	شاخص کوبیتال	طول خرطوم (میلیمتر)	تومنتوم(Tomentum)	رنگ نیم حلقه های 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

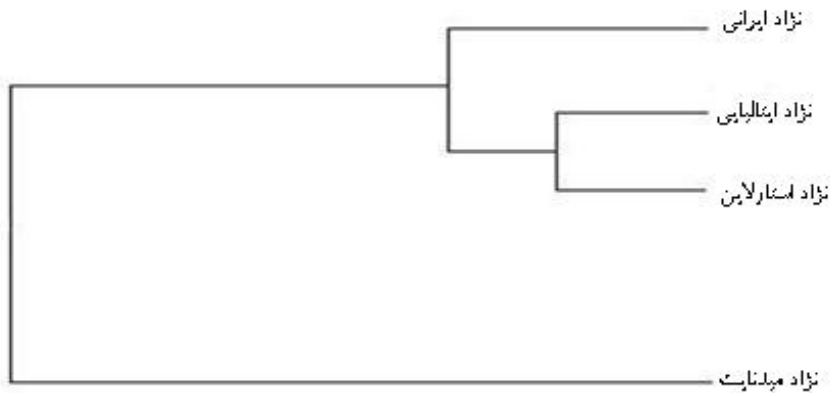
صفات مورفولوژیکی نژادها	هیبرید میدنایت	هیبرید استارلاین	نژاد ایتالیایی	نژاد ایرانی	واحد
ایندکس کوبیتال	۲/۴۷ ± ۰/۰۷	۲/۵۴ ± ۰/۰۴	۲/۳۱ ± ۰/۰۵	۲/۳۹ ± ۰/۰۶	-
طول رگبال A	۰/۵۸ ± ۰/۰۱	۰/۵۱ ± ۰/۰۷	۰/۵۶ ± ۰/۰۱	۰/۵۵ ± ۰/۰۴	میلی‌متر
طول رگبال B	۰/۲۳ ± ۰/۰۱	۰/۳۰ ± ۰/۰۷	۰/۲۴ ± ۰/۰۱	۰/۲۸± ۰/۰۳	میلی‌متر
طول خرطوم	۶/۲۳ ± 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 ± ۰/۶	۳۱/۷۶ ± ۰/۵۵	۳۱/۴۸ ± ۰/۷	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 E و C مربوط به اقلیم نیمه مرطوب است.

جدول ۵- فاصله ها 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	میدنایت	استارلاین	ایتالیایی
ایرانی	***	۰/۸۲۶۹	۰/۸۵۳۰	۰/۸۹۷۳
میدنایت	۰/۱۹۰۰	***	۰/۵۷۳۵	۰/۶۲۵۸
استارلاین	۰/۱۴۷۳	۰/۵۵۵۹	***	۰/۹۸۲۰
ایتالیایی	۰/۱۰۸۳	۰/۴۶۸۸	۰/۰۱۸۲	***



شکل۴- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس داده های ملکولی برای چهار نژاد زنبورعسل.

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 میدنایت در گروه‌های مجزا واقع شدند. طبق این نمودار، بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت نژاد میدنایت با استارلاین و سپس با نژاد ایتالیایی و ایرانی می‌باشد. زنبوران عسل نژاد ایتالیایی و استارلاین کمترین فاصله را داشتند (شکل ۴).

بحثزنبور عسل از نظر اقتصادی در تولید عسل وگرده 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 (۱و۲). 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 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 تفاوتهایی 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

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 موفولوژیکی 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 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 لاینهایی ایتالیایی است، بنابراین می توان 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 کاملا خالص نباشند.

منابع

۱. آذر نیا، م.، نبیونی، م.، رجبی زلتی، س.، میرابوالقاسمی، غ.، حویزی، ا. (۱۳۸۸) تأثیر سم زنبور عسل بر رمیلینه شدن در رتهای ویستار دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید. مجله زیست شناسیایران، 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 "سیراچال" استان تهران. مجله زیست شناسی. جلد۲۲ شماره ۲ ص ۲۰۴-۲۱۷.

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، جلد۲ 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*). Annals of the Entomological Society of America. 84(2): 137-149.

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) Isoltion 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 microsatelltes 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., Solignak, M., Cornuet, J.M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microstellite 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. Theorical 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. Radloof, 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. Aapidologie. 9: 363-381.
17. Ruttnert, 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., Meuntier, C., Tirads, C., Hurtrez-Bousses S., Durand P.,Guegan, J.F., Goudet, J., Renaud, F. (2000) Microsatelltes in the hermaphroditic snail, *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke, *Fasiola hepatica*. Molecular ecology. 9:1661-1686.

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 allels per locous. 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