نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۳، تابستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۳۲۳~۳۳٤

بررسی روابط فیلوژنتیکی زنبورعسل نژاد ایرانی (*Apis mellifera meda*) با سایر نژادهای زنبورعسل دنیا با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی

- **عطااله رحیمی** (نویسنده مسئول)
  گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- **علینقی میرمویدی**
  گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
- **دانیال کهریزی**
  گروه زارعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
- **لیلا زارعی**
  گروه زارعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
- **صمد جمالی**
  گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۹۰۷۴۹۹۵
Email: Rahimi.ata.1@gmail.com

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : مهر ۱۳۹۷

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.121251.1676

چکیده

مطالعات مورفولوژیک و مولکولی به عنوان ابزاری قدرتمند جهت برآورد تنوع‌ژنتیکی و تعیین روابط فیلوژنتیک در بین جمعیت‌های مختلف زیرگونه‌های زنبورعسل مطرح می‌باشند. در تحقیق حاضر، به منظور بررسی روابط فیلوژنتیک زنبورعسل نژاد ایرانی با سایر نژادهای زنبورعسل در سراسر جهان، از نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی (PCR-RFLP) استفاده شد. نمونه‌ها در تابستان سال ۱۳۹۳ از ۲۰ استان و ۱۰۰ شهرستان کشور جمع‌آوری و به ترتیب در مجموع ۲۲۵۰ و ۳۰۰ زنبورکارگر برای بررسی‌های مورفولوژیک و مولکولی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج درخت‌های فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از داده-های حاصل از نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی، ۲۹ زیرگونه زنبورعسل مورد مطالعه را در پنج گروه قرار داد. در این گروه-بندی زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی (*A. m. meda*) با زیرگونه‌های *A. m. cyprica*، *A. m. syriaca*، *A. m. anatolica*، *A. m. armeniaca*، *A. m. caucasica*، *A. m. caucasica* و *A. m. pomonella* در یک گروه قرار گرفتند. این گروه شامل زیرگونه-های شرق مدیترانه، خاور نزدیک و شرق خاورمیانه(O) می‌باشد که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نژاد زنبورعسل موجود در ایران همان زنبورعسل نژاد ایرانی است و واردات نژادهای خارجی در دو دهه گذشته و همچنین واردات قاچاق ملکه در دهه اخیر به علت سازگاری این نژاد با اقلیم‌های کشور و ناپایداری و ناسازگاری سایر نژادهای وارد شده، تاثیر قابل توجهی روی خلوص نژادی و ژنتیکی زنبورعسل نژاد ایرانی نگذاشته و این نژاد هویت ژنتیکی خود را از دست نداده است. نتایج آنالیزهای مورفولوژیک و مولکولی مطالعه حاضر نیز این موضوع را تایید کرد.

واژه‌های کلیدی: روابط فیلوژنتیک، نشانگر مورفولوژیک، نشانگر PCR-RFLP، زنبورعسل ایرانی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 123 pp: 323-334

Phylogenetic relationship study of Iranian subspecies honeybee with other honeybee subspecies using morphological and molecular markers

By: Ataollah Rahimi[1*], Alinaghi Mirmoayedi[1], Danial Kahrizi[2], Leila Zarei[2], Samad Jamali[1]
1-Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, Kermanshah, Iran.
2- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.
*Corresponding author e-mail: Rahimi.ata.1@gmail.com

Received: April 2018 **Accepted: October 2018**

Morphological and molecular studies are considered as a powerful tool for estimating genetic diversity and the determination of phylogenetic relationships among different populations of honeybee subspecies. In the present study, morphological and molecular markers (PCR-RFLP) were used to study the phylogenetic relationships of Iranian subspecies honeybee with other honeybee subspecies around the world. Samples were collected from 100 cities belonging to 20 Iranian provinces during the summer of 2016. A total of 2,250 and 300 worker bees were studied for morphological and molecular analyses, respectively. The results of phylogenetic trees plotted using morphological and molecular markers revealed that 29 honeybee subspecies were classified into five groups. In this clustering, the Iranian subspecies honeybee (*A. m. meda*) with *A. m. cyprica, A. m. syriaca, A. m. anatolica, A. m. armeniaca, A. m. caucasica, A. m. caucasica, Am. Pomonella* subspecies were assigned in same cluster. This group included subspecies from Eastern Mediterranean, the Near East and the East of the Middle East (O), which was reported in previous studies. The results showed that the honeybee subspecies (or race) in Iran was exactly the same as the Iranian honeybee subspecies (*A. m. meda*); it also seems that imports of foreign subspecies in the past two decades and the trafficking imports of queen in the last decade had no significant impact on Iranian honeybee subspecies genetic purity due to its adaptation to the country's climates and the instability and incompatibility of other imported subspecies, so that it has not lost its genetic identity. This was also confirmed by the morphological and molecular analyzes.

Key words: Iranian honeybee, Morphological marker, PCR-RFLP, Phylogenetic relationship.

مقدمه

امروزه با توجه به رشد روز افزون جمعیت، محدودیت منابع و افزایش نیاز بشر به مواد غذایی، ضرورت توجه به افزایش بازده محصولات زراعی و باغی، امری انکار ناپذیر است که در این میان زنبورعسل به دلیل نقش ممتاز و برجسته‌اش در گرده‌افشانی گیاهان زراعی و باغی، حفظ فلور و تنوع گیاهی و محیط زیست، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. (Rahimi و همکاران، 2017؛ Rahimi و همکاران، ۲۰۱۸). زنبورعسل علاوه بر تولید عسل با تولید محصولات دیگر مثل گرده، موم، بره‌موم، ژله‌رویال، زهر و اشتغال‌زایی در صنایع جانبی نقش مهمی در اقتصاد کشور ایفا می-کند. براساس تحقیقات انجام شده، نقش زنبورعسل در افزایش تولیدات کشاورزی در دنیا بین ۶۰ - ۱۴۰ برابر ارزش تولیدات مستقیم کندوهای زنبورعسل (عسل، گرده، موم، بره‌موم، ژله‌رویال و زهر) می‌باشد (Morse and Calderone, 2000).

طبق نظر متخصصین پرورش زنبورعسل، ایران دارای یک زیرگونه یا نژاد بومی زنبورعسل می‌باشد (طهماسبی، ۱۳۷۵؛ عبادی و احمدی، ۱۳۸۷؛ Rahimi و همکاران، 2014 ؛ Rahimi، 2015 ؛ Rahimi و همکاران، 2016 ؛ Rahimi و همکاران، 2017؛ Rahimi و همکاران، 2018). این نژاد بعد از میلیون‌ها سال انتخاب طبیعی وگذر از موانع بسیار، با غلبه بر ناملایمات و شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به

تکثیر و ازیاد نسل پرداخته است. بنابراین، در راستای حفظ ذخایر ملی و منابع ژنتیکی کشور، توجه به زنبورعسل نژاد ایرانی و اصلاح آن، امری ضروری می‌باشد. بعضی مواقع با گذشت زمان و پیشرفت علم و تکنولوژی، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن بر می‌دارد که از نژادهای بومی که قبلاً اهمیت زیادی برای آنها قائل نبودند، استفاده کنند. اگر در این ذخایر ژنتیکی دگرگونی و تغییرات زیادی صورت گرفته باشد به طور قابل ملاحظه‌ای امکان استفاده از آنها کاهش می‌یابد. لذا در حال حاضر در اکثر کشورهای پیشرفته، اقدام به حفظ ذخایر و منابع ژنتیکی در مناطق ایزوله می‌کنند تا در صورت لزوم از آنها استفاده کنند (Royan و همکاران، 2007 ؛ رحیمی، ۱۳۹۵).

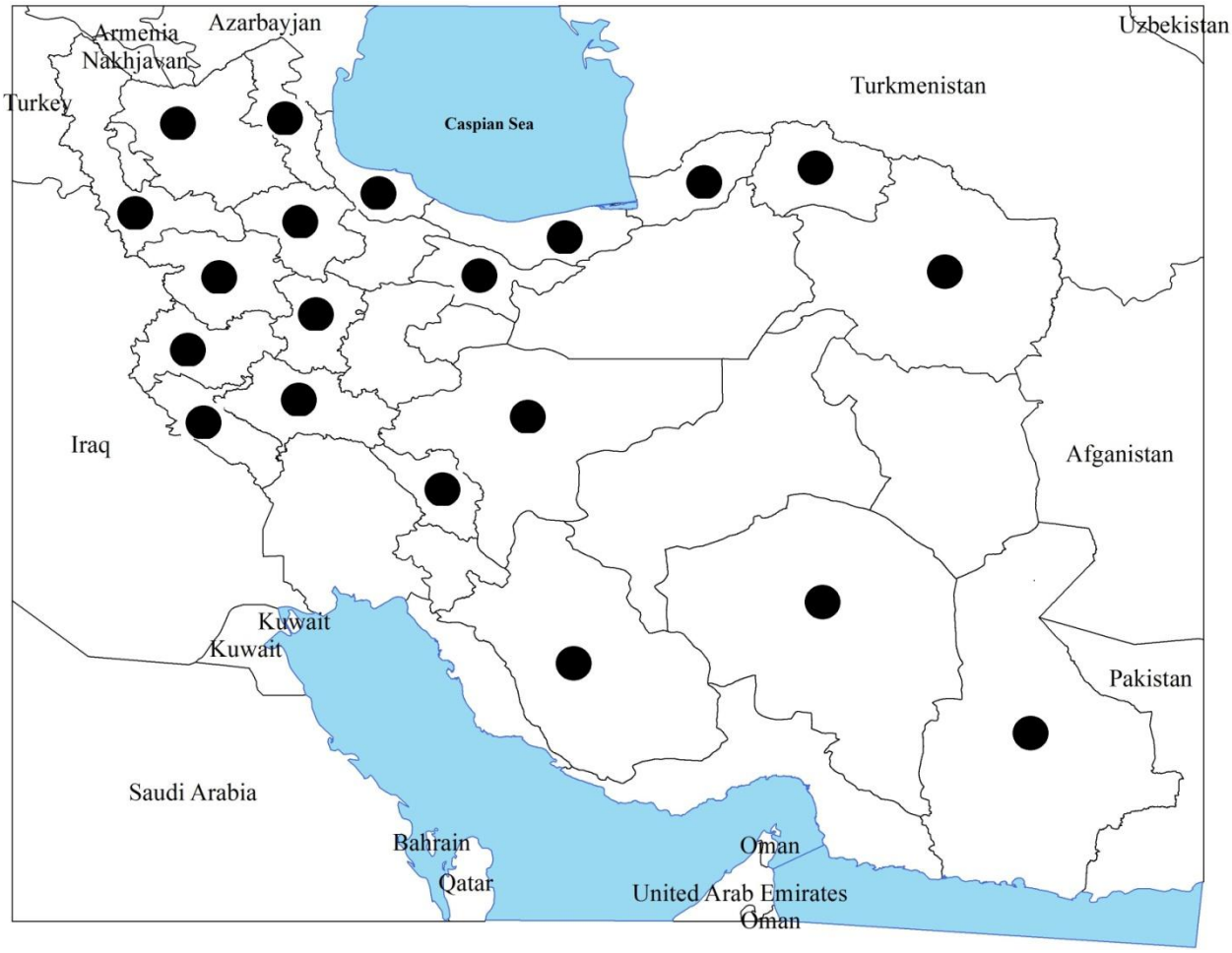
تکنیک‌های مختلفی در دنیا جهت تعیین وضعیت ژنتیکی زنبورعسل استفاده می‌شود. امروزه، مطالعات ژنتیکی در زنبورعسل، براساس آنالیز اطلاعات مورفولوژیکی و همچنین مولکولی صورت می‌گیرید (Özdil و همکاران، 2009 ؛ Papachristoforou و همکاران، 2013 ؛ Rahimi و همکاران، 2014 ؛ Rahimi، 2015 ؛ Rahimi و همکاران، 2016 ؛ Rahimi و همکاران، 2017) که این دو روش در حال حاضر به عنوان ابزاری قدرتمند جهت برآورد تنوع‌ژنتیکی و تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف زیرگونه‌های زنبورعسل در دنیا استفاده می‌شوند. خصوصیات مورفولوژیکی تنها برای مطالعات فیلوژنتیک مناسب نیستند زیرا آنها نسبت به انتخاب‌های محیطی و تغییر شرایط محیطی خیلی حساس هستند از طرف دیگر، برای مطالعات فیلوژنتیک روش آنالیز هضم آنزیمی با استفاده از اطلاعات DNA میتوکندریایی، نشانگر ژنتیکی بهتر و قابل اعتمادتری می‌باشد (Avise و همکاران، 1987 ؛ Franck و همکاران، 2000 ؛ Bouga و همکاران، 2005 ؛ Özdil و همکاران، 2009 ؛ Rahimi، 2015). یک مزیت اطلاعات DNA میتوکندریایی نسبت به اطلاعات مورفولوژیکی این است که اطلاعات DNA میتوکندریایی در زمینه مباحث فیلوژنتیکی به آسانی تجزیه و تحلیل می‌شوند. همچنین به علت توارث مادری، فقدان نوترکیبی و کارایی کم مکانیسم‌های ترمیم DNA، تکامل mtDNA نسبت به ژن‌های تک کپی در DNA هسته‌ای سریع‌تر است و به همین خاطر برای پی بردن به روابط فیلوژنتیکی و مطالعه تاریخ تغییرات میان زیرگونه‌های زنبورعسل مفید است (Palmer و همکاران، 2000).

ایران از لحاظ تعدادکلنی‌ها و تولید عسل، جایگاه چهارم و هشتم دنیا را دارد. تحقیقات و هزینه‌های زیادی در دو دهه گذشته برای اصلاح نژاد زنبورعسل ایرانی در کشور انجام شده (طهماسبی و همکاران، ۱۳۹۵) اما واردات قاچاق ملکه نژادهای خارجی توسط برخی عوامل و گزارش وجود چندین زیرگونه زنبورعسل در مناطق مختلف کشور (Rahimi و همکاران، 2017)، موضوعی شده است که امروزه متخصصین را به نگرانی وا داشته است به همین دلیل تحقیق حاضر، برای بررسی روابط فیلوژنتیکی زنبورعسل نژاد ایرانی با سایر نژادهای زنبورعسل دنیا با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی انجام شد تا به این سئوالات: ۱) آیا واردات قاچاق ملکه‌های خارجی به کشور باعث از بین رفتن خلوص نژادی و ژنتیکی زنبورعسل نژاد ایرانی شده است یا خیر؟ و ۲) آیا در حال حاضر زنبورعسل نژاد ایرانی با توجه به واردات قاچاق ملکه نژادهای خارجی در کشور وجود دارد یا با سایر نژادهای وارد شده از لحاظ ژنتیکی مخلوط شده است؟ پاسخ داده شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه‌برداری در تابستان سال ۱۳۹۳ از ۲۰ استان کشور (استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، اردبیل، زنجان، کردستان، گیلان، مازندران، گلستان، خراسان شمالی، خراسان رضوی، تهران، همدان، کرمانشاه، ایلام، لرستان، اصفهان، چهار محال و بختیاری، فارس، کرمان و سیستان وبلوچستان) انجام شد (شکل ۱). در این نمونه‌برداری از هر استان پنج شهرستان و از هر شهرستان یک زنبورستان با تعداد بالای ۳۰۰ کلنی انتخاب و از هر زنبورستان با توجه به ظرفیت و پتانسیل زنبورداری آن شهرستان، ۱ الی ۳ کندو مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند. از هر کندو به ترتیب ۱۵ و ۲ نمونه زنبور کارگر برای بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی برداشته شد.



شکل ۱: مناطق مورد مطالعه و تحت نمونه‌بردای در این پژوهش

بررسی‌های مورفولوژیکی

در مجموع ۲۲۵۰ زنبور کارگر با استفاده از ۱۴ صفت مورفولوژیکی (طول بال جلو، عرض بال جلو، طول بال عقب، عرض بال عقب، زاویه A4، زاویه D7، زاویه G18، کوبیتال اندیکس، طول خرطوم، شاخص نیم حلقه ششم شکمی، رنگ-سپرچه، طول ترژیت سوم و چهارم شکم، طول پای عقب و رنگ ترژیت سوم شکم) در آزمایشگاه مورد مطالعه و اندازه‌گیری قرار گرفتند. تمام اندازه‌گیری‌ها براساس دستورالعمل Ruttner و همکاران (۱۹۷۸) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی

اطلاعات صفات مورفولوژیکی استفاده شده در این مطالعه در مورد سایر زیرگونه‌های دیگر زنبورعسل از منابع معتبر (Ruttner و همکاران، 1978 ; Ruttner و همکاران، 1985 ; Ruttner و همکاران، 1988) و بانک اطلاعاتی زیرگونه‌های زنبورعسل جهان بدست آمد. درخت فیلوژنتیکی بین زنبورعسل زیرگونه-ایرانی با سایر زیرگونه‌های زنبورعسل سرتاسر جهان با استفاده از نرم‌افزار SPSS V. 22 براساس فاصله مربع اقلیدسی و به روش نزدیک‌ترین همسایه ترسیم شد.

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA از قسمت‌های سر و قفسه‌سینه زنبورهای کارگر براساس روش Salting out (Aljanabi and Martinez, 1997) با اندکی تغییرات انجام شد و در مجموع DNA ۳۰۰ نمونه زنبورکارگر استخراج شد.

نشانگر PCR-RFLP و آغازگرهای استفاده شده

در این پژوهش، برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی زنبورعسل زیرگونه ایرانی با دیگر زیرگونه‌های زنبورعسل جهان، از آنالیزهای PCR-RFLP نواحی DNA میتوکندریایی استفاده-گردید. بدین منظور، از نتایج حاصل از تکثیر دو قطعه مربوط به دو ژن میتوکندریایی (COI و16S rDNA) استفاده شد. برای تکثیر قطعه ۱۰۲۸ bp از ژن COI و ۹۶۴ bp از ژن 16S rDNA د.ان.ا میتوکندریایی نمونه‌های زنبورعسل مورد مطالعه، از آغازگرهای ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده جهت تکثیر قطعاتی از ژن‌های COI و 16S rDNA د.ان.ا میتوکندریایی

نام ژن	جهت آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	منبع
COI	Forward	5´-GATTACTTCCTCCCTCATTA-3´	۵۵	Özdil *et al* ., 2012
	Reverse	5´-AATCTGGATAGTCTGAATAA-3´		
16S rDNA	Forward	5´-CAACATCGAGGTCGCAAACATC-3´	۵۵	Bouga *et al*., 2005
	Reverse	5´-GTACCTTTTGTATCAGGGTTGA-3´		

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

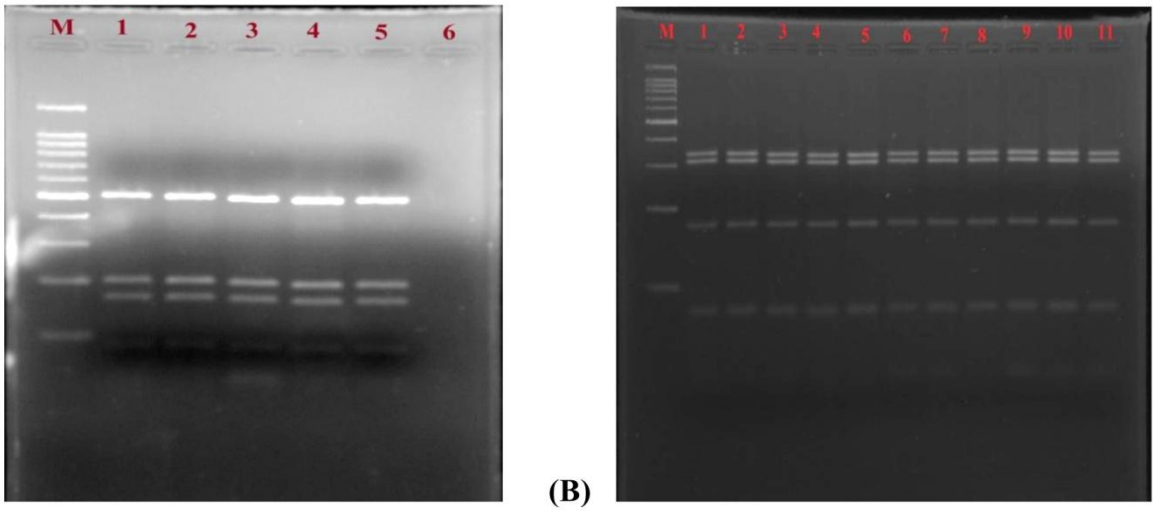
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و در حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با مقادیر و غلظت‌های ارایه شده در جدول ۲ با مقداری تغییرات برای هر دو قطعه از ژن‌های مورد نظر صورت‌گرفت. سیکل‌های واکنش حراراتی PCR شامل: واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در چهار دقیقه (یک تکرار) و ۳۵ تکرار واسرشته‌سازی ثانویه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه ، دمای اتصال آغازگر ۵۵ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه و گسترش‌اولیه۷۲ درجه سانتی‌گراد در دو دقیقه و در نهایت گسترش‌نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ده دقیقه (یک تکرار) بودند. جهت اطمینان از تکثیر موفقیت‌آمیز قطعات مورد نظر، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردیده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه تصویربرداری از ژل مشاهده شد. پس از تکثیر موفق قطعات مورد نظر، تمام نمونه‌ها با همین برنامه تکثیر شدند. سپس محصول PCR ، با استفاده از آنزیم‌های برشی ارایه شده در جدول ۳ مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. تمام آنزیم‌ها به‌جز آنزیم *Taq*I (در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶- ۱۲ ساعت با اندکی تغییرات برای هر آنزیم انکوبه شدند. سپس به منظور تفکیک باندهای حاصل از هضم توسط آنزیم‌های برشی از ژل آگارز دو درصد استفاده‌گردید. پس از الکتروفورز، جهت نمایان کردن قطعات برش داده شده با آنزیم‌های برشی، از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. بعد از رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه تصویربرداری از ژل، از تمام تصاویر ژل‌ها (شکل ۲) عکس گرفته و جهت آنالیزهای بعدی در حافظه سیستم ذخیره شدند.

جدول۲: مقدار مواد مورد نیاز از هر ماده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعاتی از ژن‌های COI و 16S rDNA د.ان.ا میتوکندری زنبورعسل

مواد واکنش	مقدار ماده مورد نیاز به ازای هر واکنش(میکرولیتر)	غلظت نهایی
PCR –buffer (10x)	۲/۵	۱X
$MgCl_2$ (50mM)	۱	۲ mM
dNTP mix (10 mM)	۰/۴	۰/۱۶ mM
Primer Forward (10 ng)	۱	۰/۴ ng
Primer Reverse (10 ng)	۱	۰/۴ ng
Taq DNA Polymerse	۰/۲	۱ U
DNA(20 ng/µl)	۳	۶۰ ng/µl
Distilled Distil Water	۱۵/۹	-

جدول۳: آنزیم‌های برشی استفاده شده در این مطالعه جهت هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن‌های COI و 16S rDNA د.ان.ا میتوکندری زنبورعسل

نام ژن‌ها	نام آنزیم‌ها	منبع
COI	*Sau*3AI, *Ssp*I, *Taq*I, *Nco*I	Özdil *et al* ., 2012
16S rDNA	*Dra*I, *Eco*RI, *Sau*3AI, *Ssp*I	Bouga *et al*., 2005



شکل ۲: الگوی باندی قطعه bp ۱۰۲۸ ژن COI زنبورعسل بعد از هضم با آنزیم‌های برشی، (A): آنزیم برشی *Ssp*I، (B): آنزیم برشی *Sau*3AI. (M: سایز مارکر bp ۱۵۰۰، چاهک‌های ۶-۱ شکل A و ۱۱-۱ شکل B نمونه‌های محصول PCR هضم شده با آنزیم‌های برشی نامبرده)

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

توالی ژن‌های COI و 16S rDNA و قطعات ذکر شده مربوط به هر ژن در سایر زیرگونه‌های زنبورعسل را از پایگاه اطلاعاتی NCBI[1] استخراج و با استفاده از نرم‌افزار CLC و آنزیم‌های برشی استفاده شده در این تحقیق، مورد هضم آنزیمی قرارگرفتند. در این مطالعه تمام تصاویر ژل‌های حاصل از هضم با آنزیم‌های برشی با استفاده از روش صفر و یک (حضور و عدم حضور باند) و روش الفبای انگلیسی امتیازبندی شدند. در این تحقیق از سایز مارکر bp ۱۵۰۰ و bp ۱۰۰۰ استفاده گردید. جهت بدست آوردن اندازه باندها و امتیازدهی با روش اندازه باند، از نرم‌افزار AlphaEaseFC استفاده شد. به منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی بین زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی با دیگر زیرگونه‌های زنبورعسل در سراسر جهان، از نرم افزار PASTE V. 4 استفاده گردید.

نتایج

بررسی‌های مورفولوژیکی

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس آنالیز داده‌های مورفولوژیکی

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از صفات مورفولوژیکی حاصل از این مطالعه و صفات مورفولوژیکی مربوط به سایر زیرگونه‌های زنبورعسل جهان، بین زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی با دیگر زیرگونه‌های زنبورعسل براساس روش نزدیک‌ترین همسایه در شکل ۲ ارایه شده‌است. نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان داد که ۲۹ زیرگونه زنبورعسل مورد مطالعه در پنج گروه مجزا قرار گرفتند.

بررسی‌های مولکولی

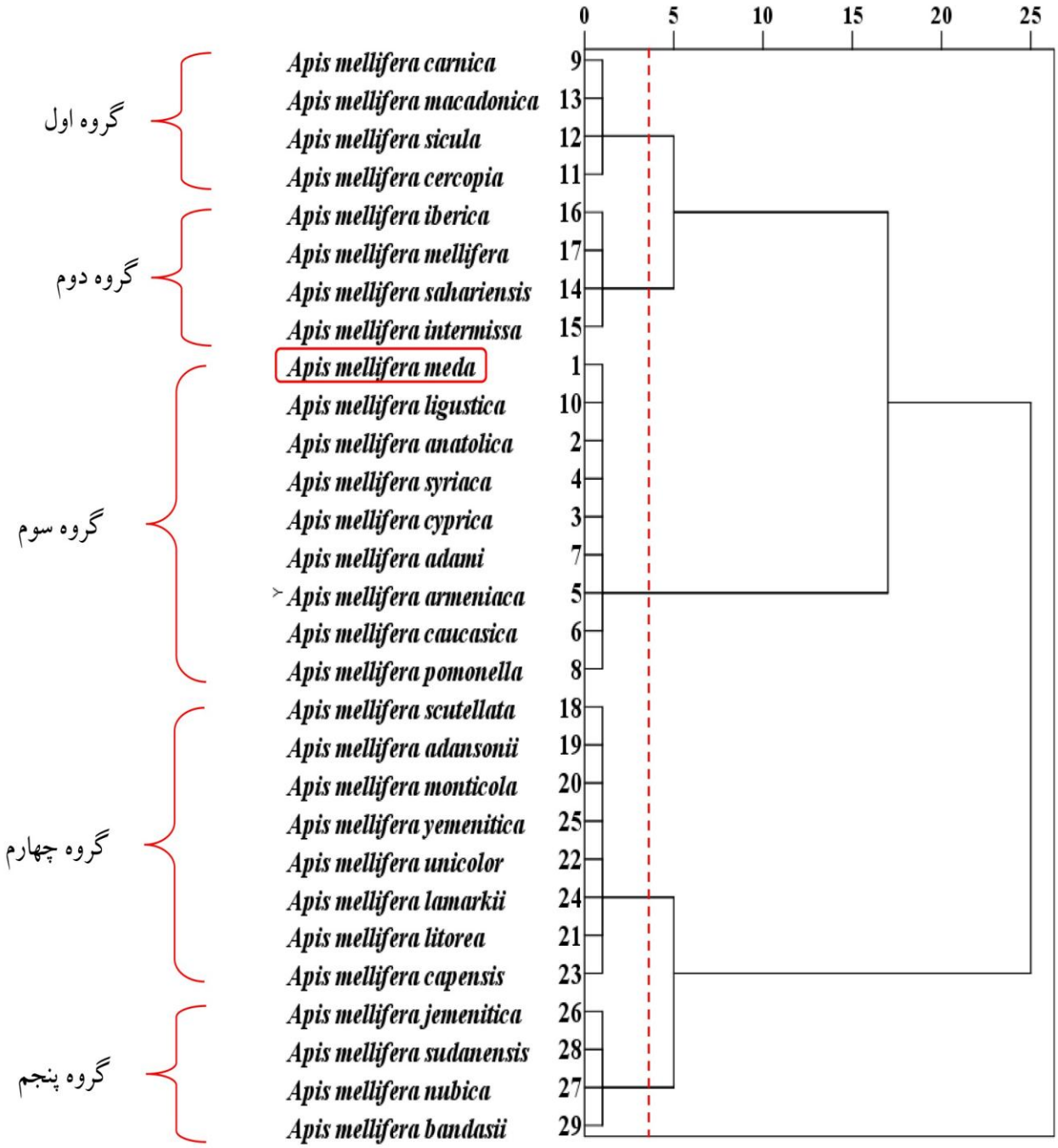
استخراج DNA

ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت بالایی برخوردار بودند. غلظت DNA استخراج شده از ۹۱۷ تا ۲۶۲۹ ng/µl متغییر بود. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ به‌طور متوسط بین ۱/۸ تا ۲/۰۱ و نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ به طور متوسط بین ۱/۹ تا ۲/۴ بود. حصول DNA مناسب و ایده‌آل، بیانگر کارآمدی دستورالعمل استفاده شده در این مطالعه است.

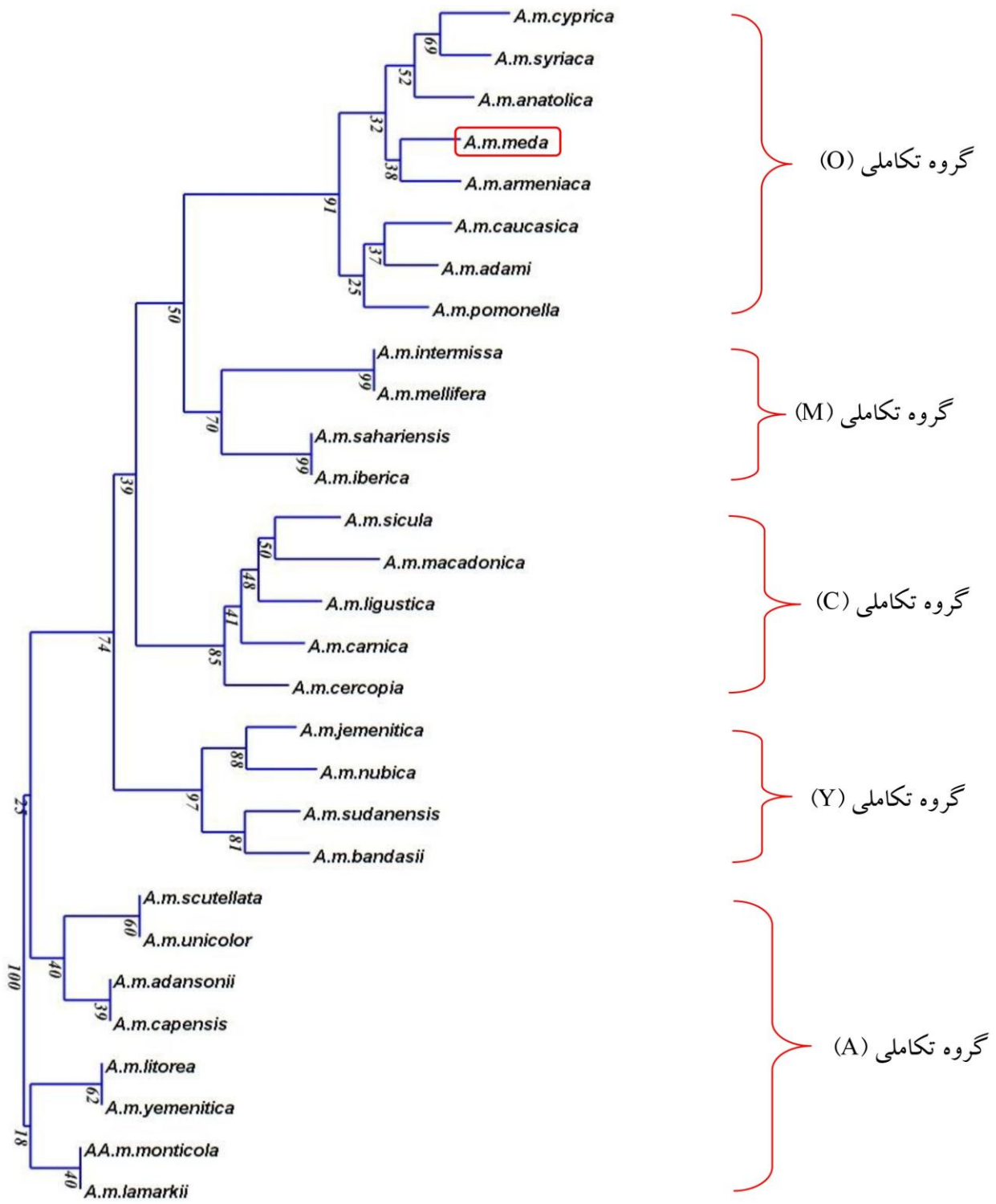
درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس آنالیز داده‌های مولکولی

درخت فیلوژنتیکی با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر PCR-RFLP بین زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی با دیگر زیرگونه‌های زنبورعسل با استفاده از روش Neighbor-joining و براساس ضریب تشابه‌جاکارد ترسیم شده است (شکل ۳). همان‌طوری که مشاهده می‌شود ۲۹ زیرگونه زنبورعسل شناسایی شده در نقاط مختلف جهان با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر PCR-RFLP به پنج گروه مختلف تقسیم شدند.

[1] - National Center for Biotechnology Information



شکل۲: درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از صفات مورفولوژیکی بین زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی با دیگر زیرگونه‌های زنبورعسل براساس روش نزدیک‌ترین همسایه



شکل۳: درخت فیلوژنتیکی حاصل از داده‌های نشانگر PCR-RFLP بین زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی با دیگر زیرگونه‌های زنبورعسل با استفاده از روش Neighbor-joining و براساس ضریب تشابه‌جاکارد

بحث

طبق نظر متخصصین پرورش زنبورعسل، ایران دارای یک زیرگونه یا نژاد بومی زنبورعسل می‌باشد که این نژاد بعد از میلیون‌ها سال انتخاب طبیعی وگذر از موانع بسیار، با غلبه بر ناملایمات و شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازیاد نسل پرداخته‌است (عبادی و احمدی، ۱۳۸۷؛ طهماسبی، ۱۳۷۵؛ طهماسبی و همکاران، ۱۳۷۷؛ Rahimi و همکاران، 2017). از آنجایی‌که نژادهای بومی در هر کشوری، یک سرمایه ملی و محصولی راهبردی در اقتصاد آن کشور محسوب می‌شوند بنابراین حفظ و نگهداری گنجینه نژادی و ژنتیکی این نژاد ارزشمند در درجه اول و اصلاح و مدیریت ژنتیک آن در درجه دوم از اقدامات اساسی و مهم در جهت پیشرفت صنعت زنبوداری کشور محسوب می‌شود. علی‌رغم اینکه واردات ملکه نژادهای خارجی به کشور به دلایل علمی مختلف از دو دهه گذشته ممنوع شده است اما گزارشات حاکی از وجود نژادهای خارجی در برخی زنبورستان‌ها (Rahimi و همکاران، 2017) و واردات قاچاق ملکه نژادهای خارجی در سال‌های اخیر به کشور، این نگرانی را ایجاد کرده است که گنجینه نژادی و ژنتیکی این نژاد ارزشمند در حال از بین رفتن و یا با سایر نژادهای وارد شده مخلوط شده است. براساس مطالعاتDupraw زیرگونه‌های زنبورعسل بر حسب گسترش جغرافیایی به پنج گروه تقسیم شدند (Dupraw, 1965) که در این گروه‌بندی زنبورعسل زیرگونه-ایرانی در گروه زیرگونه‌های شرق مدیترانه و خاور نزدیک و شرق خاورمیانه(O) قرار گرفت. همچنین محققان دیگری، ۲۹ زیرگونه زنبورعسل شناسایی شده در مناطق مختلف جهان را براساس خصوصیات موفولوژیکی، رفتاری و مولکولی در پنج گروه تکاملی توصیف کردند که در این گروه‌بندی نیز زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی در گروه تکاملی زیرگونه‌های شرق مدیترانه و خاور نزدیک و شرق خاورمیانه(O) قرار گرفت (Ruttner، 1988؛ Garnery و همکاران، 1993؛ Sheppard و همکاران، 1997؛ Engel، 1999؛ and Meixner, 2003؛ Sheppard ؛ Meixner، 2003؛ and Sheppard, 2005؛ Meixner و همکاران، 2011). براساس نتایج درخت‌های فیلوژنتیکی حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی مطالعه اخیر، ۲۹ زیرگونه زنبورعسل مورد بررسی در پنج گروه قرار گرفتند که در این گروه‌بندی، زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی با زیرگونه‌های *A. m. ligustica*، *A. m. anatolica*، *A. m. syriaca*، *A. m. cyprica*، *A. m. adami*، *A. m. armeniaca*، *A. m. caucasica* و *A. m.* pomonella (نتایج درخت فیلوژنتیکی حاصل از داده‌های مورفولوژیکی) و با زیرگونه‌های *A. m. cyprica*، *A. m. syriaca*، *A. m. anatolica*، *A. m. armeniaca*، *A. m. caucasica*، *A. m. adami* و *A. m. pomonella* (نتایج درخت فیلوژنتیکی حاصل از داده‌های مولکولی) تشکیل یک گروه را دادند که این زیرگونه‌ها به‌غیر از زیرگونه *A. m. ligustica* همان زیرگونه-های گروه تکاملی شرق مدیترانه و خاور نزدیک و شرق خاورمیانه(O) می‌باشد که Dupraw و سایر محققان دیگر توصیف کرده بود که از این لحاظ نتایج مطالعه حاضر با گروه-بندی محققان ذکر شده مطابقت داشت. طبق نظر محققین زنبورعسل، زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی از نظر خصوصیات مورفولوژیکی شبیه زنبورعسل زیرگونه‌ایتالیایی(*A. m. ligustica*) است(Ruttner، ۱۹۸۸). نتایج درخت فیلوژنتیکی حاصل از داده‌های مورفولوژیکی مطالعه حاضر، این موضوع را تأیید کرد و زنبورعسل زیرگونه‌ایتالیایی با زیرگونه‌های موجود در گروه تکاملی (O) و نزدیک زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی تشکیل یک گروه را دادند. همین محققین بیان کردند که زنبورعسل زیرگونه‌ایتالیایی ازلحاظ خصوصیات زیستی، رفتاری و مولکولی از زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی متفاوت بوده و آنرا در گروه تکاملی زیرگونه‌های منطقه مدیترانه مرکزی و جنوب شرقی اروپا (C) قرار دادند(Ruttner، 1988، 1992؛ Garnery و همکاران، 1993؛ Sheppard و همکاران، 1997؛ Engle، 1999؛ Sheppard and Meixner, 2003). نتایج درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر

PCR-RFLP مطالعه حاضر نیز همین موضوع اثبات شد و در این گروه‌بندی، زنبورعسل زیرگونه‌ایرانی از نظر صفات زیستی، رفتاری و مولکولی در گروه تکاملی O (گروه تکاملی زیرگونه-های شرق مدیترانه و خاور نزدیک و شرق خاورمیانه) و زنبورعسل زیرگونه‌ایتالیایی در گروه تکاملی C (گروه تکاملی زیرگونه‌های منطقه مدیترانه مرکزی و جنوب شرقی اروپا) قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نژاد زنبورعسل موجود در ایران همان زنبورعسل نژاد ایرانی (*A. m. meda*) است و علی-رغم گزارش وجود زیرگونه‌های دیگر زنبورعسل در برخی زنبورداری‌های مناطق مختلف کشور (Rahimi و همکاران، 2017) و واردات قاچاق ملکه نژادهای خارجی در چند سال اخیر به کشور، این نژاد هویت خود را از لحاظ ژنتیکی از دست نداده و به علت سازگاری بالایی که با شرایط و اقلیم‌های مختلف کشور دارد با نژادهای وارد شده به کشور در دو دهه گذشته اختلاط ژنتیکی پیدا نکرده و واردات قاچاق ملکه هم در سال‌های اخیرتاثیر روی خلوط نژادی و ژنتیکی آن نداشته است و نتایج درخت‌های فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی مطالعه حاضر نیز این موضوع را تایید کرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج درخت‌های فیلوژنتیکی مطالعه حاضر نشان داد که واردات ملکه در دو دهه گذشته و واردات قاچاق ملکه در سال‌های اخیر تاثیری روی خلوص ژنتیکی و نژادی زنبورعسل ایرانی نداشته است و این نژاد علی‌رغم موارد ذکر شده هویت ژنتیکی خود را حفظ کرده است. با توجه به اینکه واردات ملکه‌های خارجی تبعات منفی زیادی هم از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ ورود بیماری‌های جدید به کشور دارد لذا پیشنهاد می‌شود کماکان سیاست عدم واردات ملکه به طور جدی‌تری به کشور ادامه یابد.

منابع

عبادی، ر.، احمدی، ع.ا. ۱۳۸۷. پرورش زنبورعسل. انتشارات چاپخانه راه نجات، اصفهان، ایران. ص ۱۶، ۱۷ و ۱۸.

رحیمی، ع. ۱۲۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلیوژنتیکی زنبورعسل زیرگون ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریخت شناسی و مولکولی. پایان نام دکترای تخصصی رشته حشره شناشی، دانشگاه رازی.

طهماسبی، غ. ۱۳۷۵. مطالعه مورفولوژیکی و بیوشیمیایی توده‌های زنبورعسل ایران . پایان نامه دکترای حشره شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

طهماسبی، غ.، عبادی، ر.، اسماعیلی، م. و کامبوزیا، ج. ۱۳۷۷. مطالعه مورفولوژیک زنبورعسل معمولی (*Apis mellifera* .L) در ایران. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۲، ص ۸۹-۱۰۰.

طهماسبی، ع.، سروستانی، م.، عبادی، ر.، جوارمی، ا.، بابایی، م.، بانه، ح.، قره‌داغی، ع.، افروزان، ه.، جمشیدی، م. و سیفی، ع. ۱۳۹۵. تعیین پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی صفات تولید عسل، بچه‌دهی و رفتار دفاعی در کلنی‌های زنبورعسل نسل چهاردهم در استان‌های مرکزی کشور. مجموعه مقالات اولین کنگره بین المللی و نهمین کنگره پژوهشی زنبورعسل ایران. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. ص ۵.

Aljianabi, S.M. and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.

Arias, M.S. and Sheppard, W.S. (2005). Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera:Apinae:Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1): 25–35.

Avise, J.C., Arnold, J. and Ball, R.M. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18(2): 489-522.

Bouga, M., Harizanis, P.C., Kilias, G. and Alahiotis, S. (2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, 36(1): 335-344.

Dupraw, E.J. (1965). The recognition and handling of honey bee specimens in non linnean taxonomy. *Journal of Apicultural Research*, 4(2): 71 – 84.

Engel, M.S. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 8(1): 165-196.

Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, J.M. (2000). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, 3(1)1: 167–180.

Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G. and Cornuet, J.M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49(2): 1016-1021.

Meixner, M.D., Leta, M.A., Koeniger, N. and Fuchs, S. (2011). The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera – Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie*, 42(2): 425-43.

Morse, R.A., Calderone, N.W. (2000). The Value of Honey Bees As Pollinators of U.S. Crops in 2000. *Pollination*, 1-15.

Özdil, F., Fakhri, B., Meydan, H., Yildiz, M.A. and Hall, H.I. (2009). Molecular characterization of Turkish honey bee population(*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results. *Apidologie*, 40(5): 570-576.

Palmer, M., Smith, D. and Kaftano, A.O. (2000). Genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *Journal of Heredity*, 4(2): 42- 46.

Papachristoforou, A., Rortais, A., Bouga, M., Arnol, G. and Garnery, L. (2013). Genetic characterization of the cyprian honey bee (*Apis mellifera cypria*) based on microsatellites and mitochondrial DNA polymorphisms. *Journal Apiculture Science*, 57(2): 127-134.

Rahimi, A., Miromayedi, A., Kahrizi, D., Abdolshahi, R., Kazemi, E. and Yari, K. (2014). Microsatellite genetic diversity of *Apis mellifera meda* skorikov. *Molecular Biology Reports*, 41(3): 7755-7761.

Rahimi, A., Hasheminasab, H. and Azati, N. (2015). Predicting honey production based on morphological characteristics of honey bee (*Apis mellifera* L.) using multiple regression model. *Ecology-Environment-Conservation*, 21(1): 29-33.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L, and Jamali, S. 2016. Genetic diversity of Iranian honey bee(*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. ***Cellular and Molecular Biology,*** 62 (4): 53-58.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L, and Jamali, S. (2017). Morphological diversity and phylogenetic relationships Study of Iranian subspecies honey bee (*Apis mellifera meda*) populations via morphological characteristics. *Sociobiology*, 64(1): 33-41.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L, and Jamali, S. (2018). Genetic Variation in Iranian Honeybees, *Apis mellifera meda* Skorikow, 1829, (Hymenoptera: Apidae) Inferred from RFLP Analysis of two mtDNA Regions (COI and 16S rDNA). *Sociobiology, In press.*

Royan, M., Rahimi, G., Esmaeilkhanian, S. and Ansari, Z. (2007). A study on the genetic diversity of the *Apis mellifera meda* population in the south coast of the Caspian Sea using microsatellite markers. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46(4): 236–241.

Ruttner, F., Tassencourt, L. and Louvaux, J. (1978). Biometrical – statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9 (4): 363 – 381.

Ruttner, F., Pourasghar, D. and Kauhausen, D. (1985). Honey bees of Iran .2. *Apis mellifera meda* Skorikoow. The Persian bee. *Apidologie*, 9(4): 363 – 381.

Ruttner, F. (1988). Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag. Berlin. 284 pp.

Ruttner, F. (1992). Naturgeschichte der Honigbienen. Ehrenwirth Verlag. Münich. Germany. 357pp.

Sheppard, W.S., Arias, M.C., Greech, A. and Meixner, M.D. (1997). *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*, 28(2): 287-293.

Sheppard, W.S. and Meixner, M.D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34(3): 367–375.