نشریه علوم دامی

شماره ۱۵۰، بهـار ۱۴۰۵

ص‌ص: ۸۹~۱۰۲

ارتباط چندشکلی ژن *AmTYR1* با عملکرد گرده‌آوری در زنبورعسل ایرانی (*Apis mellifera meda*)

• **حاجیه لطفی**[۱]، **مهدی مخبر**[*](نویسنده مسئول)۲، **علی هاشمی**[۲]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار، دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت : اسفند ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۴۰۴

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۳۲۲۲۱۶

Email: m.mokhber@urmia.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ASJ.2025.368892.2476

چکیده

زنبور عسل یکی از مفیدترین حشرات در طبیعت است که نقشی حیاتی در گرده‌افشانی محصولات کشاورزی و حفظ اکوسیستم ایفا می‌کند. این فعالیت زنبورها تأثیر زیادی در امنیت غذایی و تولید ناخالص داخلی کشورها دارد. به همین دلیل، تقویت صنعت زنبورداری و افزایش بهره‌وری زنبورستان‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه با هدف بررسی وجود چندشکلی در ژن گیرنده تیرامین (*AmTYR1*) و ارتباط احتمالی آن با عملکرد گرده‌آوری در کلنی‌های زنبورعسل طراحی شد. در این پژوهش، تولید گرده ۱۲۵ کلونی زنبورعسل با تنوع ژنتیکی بالا (ملکه‌های متفاوت) از یک زنبورستان در شهرستان ارومیه، طی ۵ هفته متوالی (تیرماه و هفته اول مرداد ۱۴۰۳) با استفاده از تله‌های گرده‌گیر استاندارد و ترازوی دیجیتال ثبت شد. از هر کدام کلنی‌های تحت رکوردبرداری، تعداد ۳ الی ٤ شفیره برای آزمایشات ژنتیکی، نمونه‌برداری شدند. شفیره‌های تهیه شده از سلول‌های پرورش نوزاد، پس از نگهداری در الکل ۷۰ درصد، در نیتروژن مایع پودر شدند و DNA از آنها با استفاده از روش اصلاح‌شده CTAB استخراج گردید. سپس قطعه‌ای از ژن *AmTYR1* با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر و چندشکلی این ژن با استفاده از نشانگر SSCP بررسی شد. میانگین گرده جمع‌آوری شده در هر نوبت ۵۹/۵۱ گرم (دامنه: ۵ تا ۲۰۱ گرم) بود که نشان‌دهنده تنوع عملکردی قابل توجه در رکوردهای گرده‌آوری است.

یکی از چالش‌های اصلی این پژوهش، استخراج DNA با کیفیت از لاروهای زنبورعسل بود که با موفقیت حل شد. همچنین، تکثیر موفقیت‌آمیز جایگاه‌های هدف و استفاده دقیق از نشانگر SSCP از نقاط قوت این مطالعه محسوب می‌شود. الگوی ژنتیکی جایگاه مورد مطالعه‌ی ژن گیرنده تیرامین، تک‌شکل بود. عدم وجود چندشکلی ممکن است ناشی از محدودیت جمعیت مورد مطالعه یا ویژگی‌های ژنتیکی جایگاه مورد مطالعه‌ی ژن باشد علیرغم ثبت رکوردهای تولید گرده، ارتباط این ژن‌ها با صفت تولید گرده به‌دلیل تک شکل بودن جایگاه ژنتیکی، مورد بررسی قرار نگرفت. با توجه به چند تک شکلی بودن جایگاه ژنی در جمعیت مورد مطالعه، پیشنهاد می‌شود در پژوهش های آینده، ژن‌های دیگر مرتبط با رفتار گرده آوری یا بخش‌های دیگری از این ژن در جمعیت‌های متنوع تر زنبورعسل بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی ، رفتار چراگری گرده ، آپیس ملیفرا مدا .*AmTYR1*

Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by **Research Journal of Livestock Science** (https://asj.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Research Journal of Livestock Science No 150 pp: 89-102

Association of *AmTYR1* Gene Polymorphism with Pollen Foraging Performance in the Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda*)

By: Hajieh Lotfi[1], Mahdi Mokhber[2,*] and Ali Hashemi[2]
1: Graguated Student (MS), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2: Associated Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University,
* Corresponding E-mail address:Mahdi Mokhber (m.mokhber@urmia.ac.ir)

Received: March 2025 **Accepted: August 2025**

Honeybee (*Apis mellifera*) rank among ecologically significant insects, providing critical pollination services that maintain ecosystem stability. These pollination services substantially enhance global food security and contribute to agricultural economics. Consequently, optimizing beekeeping practices and enhancing colony productivity remain key research priorities. We investigated polymorphisms in the tyrmine receptor gene (*AmTYR1*) and their potential association with pollen-foraging performance in 125 honey bee colonies. This study recorded the pollen production of 125 honeybee colonies with high genetic diversity (derived from different queens) in an apiary located in Urmia County over five consecutive weeks (July to early August 2024) using standard pollen traps and a digital scale. Three to four pupal per colony were collected from the monitored colonies for genetic analysis. Pupal samples were preserved in 70% ethanol and subsequently flash-frozen in liquid nitrogen for homogenization. Genomic DNA was isolated using a modified CTAB protocol. A 526-bp fragment of *AmTYR1* was PCR- amplified, with polymorphism screening performed via single-strand conformation polymorphism (SSCP) electrophorsis on 12% poacrylamide-gels. The mean pollen collected per session was 51.59 grams (range: 5–201 grams), highlighting significant functional diversity in pollen-foraging performance. While obtaining high-quality DNA from honey bee larvae presented technical challenges, we successfully optimized the extraction protocol. Target loci demonstrated robust amplication, and SSCP analysis showed consistent detection sensitivity. SSCP profiling revealed monomorphisms at the examined *AmTYR1* locus across all Iranian *Apis mellifera* samples. This monomorphism may reflect population-specific genetic conservation or intrinsic stability of examined locus. Although we recorded substantial pollen production variation, the monomorphic *AmTYR1* locus precluded genotype-phenotype association analysis. Our finding highlight the need to explore additional determinant of pollen-foraging behavior, and understudied aspect of honey bee functional genomics.

Key words: Polymorphism, Pollen-Foraging Behavior, *Apis mellifera meda*, *AmTYR1*.

مقدمه

زنبورعسل (*Apis mellifera*) به‌عنوان یکی از کلیدی‌ترین عوامل گرده‌افشانی در جهان شناخته می‌شود که حدود ۷۵ درصد از محصولات کشاورزی جهان (شامل ۸۷ گونه از ۱۱۵ محصول اصلی غذایی) به گرده‌افشانی توسط این حشرات وابسته است (Klein و همکاران، ۲۰۰۷ ؛ Osterman و همکاران، ۲۰۲۱). بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد(FAO ، ۲۰۲۳)، ارزش اقتصادی گرده‌افشانی زنبورعسل در سطح جهانی سالانه بین ۲۳۵ تا ۵۷۷ میلیارد دلار برآورد شده است که معادل ۱۰–۱۵ درصد از ارزش کل تولیدات کشاورزی جهان است. این نقش حیاتی، سهم مستقیمی در ۳۵ درصد از حجم کل تولیدات غذایی جهان دارد و به حفظ تنوع زیستی ۸۰ درصد از گونه‌های گیاهی گلدار کمک می‌کند (IPBES، ۲۰۱۶). در سطح ملی، مطالعات نشان می‌دهند که در کشورهایی مانند ایالات متحده، ارزش اقتصادی گرده‌افشانی زنبورعسل برای تولید محصولاتی مانند بادام، سیب و گیلاس به ۱۵ میلیارد دلار در سال می‌رسد (USDA، ۲۰۲۱). در اتحادیه اروپا نیز این رقم ۱۴/۲ میلیارد یورو

در سال تخمین زده شده است (European Commission، ۲۰۲۰).

از منظر امنیت زیستی، زنبورعسل به‌عنوان یک شاخص کلیدی سلامت اکوسیستم عمل می‌کند. داده‌های منتشرشده نشان می‌دهد که کاهش ۴۰ درصد جمعیت زنبورهای عسل در برخی مناطق جهان طی دو دهه اخیر، منجر به کاهش ۲۵-۳۰ درصد عملکرد محصولات وابسته به گرده‌افشانی شده است (Aizen و همکاران، ۲۰۱۹؛ IPCC ، ۲۰۲۱). مطالعات نشان می‌دهد که زنبورعسل در حفظ تنوع زیستی گیاهی و پایداری اکوسیستم‌های طبیعی نقشی کلیدی ایفا می‌کند (Millard و همکاران، ۲۰۲۳). این ویژگی‌ها، زنبور عسل را به یکی از ارکان اصلی امنیت غذایی و زیستی کشور تبدیل کرده است (Mokhber وGhaffari ، ۲۰۱۹). بنابراین، مطالعات ژنومی روی زنبورعسل مانند بررسی ژن‌های مرتبط با گرده آوری (*AmTYR1*) نه تنها برای حفظ تنوع زیستی، بلکه برای تضمین رشد ۱/۵-۲ درصد سالانه تولید ناخالص داخلی کشورهای وابسته به کشاورزی ضروری است (World Bank، ۲۰۲۲). با توجه به نقش حیاتی زنبورعسل در پایداری اکوسیستم‌ها و تامین ۳۵ درصد از غذای بشر، سرمایه‌گذاری در تحقیقات زنبورعسل ضرورتی انکار ناپذیر است. مطالعات نشان می‌دهد که تداوم خدمات گرده‌افشانی مستلزم توجیه اقتصادی پرورش زنبورعسل برای زنبورداران است. بر این اساس بهبود عملکرد کلنی‌ها از طریق برنامه‌های اصلاح نژادی که همزمان بهره‌وری و تنوع ژنتیکی را مد نظر قرار دهند، به الویتی کلیدی در سیاست‌گذاری‌های علمی تبدیل شده است (Lotfi و همکاران، ۲۰۱۴).

ترکیبات و اهمیت گرده

گرده یکی از غنی‌ترین منابع تغذیه‌ای برای زنبورهای عسل است که ترکیب پیچیده‌ای از پروتئین‌ها، آمینواسیدها، ویتامین‌ها (مانند ویتامین‌های B وC)، مواد معدنی (از جمله کلسیم، منیزیم و آهن)، چربی‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را شامل می‌شود. این ترکیب نه تنها برای رشد و توسعه زنبورها ضروری است بلکه به حفظ سلامت آن‌ها و توانایی تولید مثل نیز کمک می‌کند. گرده به عنوان یک منبع غذایی با ارزش برای انسان‌ها شناخته شده است و در تقویت سیستم ایمنی بدن، کاهش التهاب و بهبود عملکرد گوارشی نقش مهمی ایفا می‌کند. از سوی دیگر، گرده برای اکوسیستم‌های طبیعی و کشاورزی حیاتی است، زیرا نقش کلیدی در فرآیند گرده‌افشانی ایفا کرده و به بهبود عملکرد زراعی و تنوع زیستی گیاهی کمک می‌کند. با توجه به افزایش نیاز جهانی به محصولات کشاورزی، گرده‌افشانی توسط زنبورهای عسل به عنوان یکی از عوامل اصلی افزایش بهره‌وری محصولات زراعی و حفظ امنیت غذایی جهانی شناخته می‌شود (Klein و همکاران، ۲۰۰۷؛ Garibaldi و همکاران، ۲۰۲۱؛ Dolezal و همکاران، ۲۰۲۰).

عوامل موثر بر تولید و جمع‌آوری گرده

تولید و جمع‌آوری گرده توسط زنبورها تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار دارد که شامل شرایط محیطی، تنوع گیاهی، ویژگی‌های ژنتیکی و ویژگی‌های فردی زنبورها است. شرایط محیطی مانند دما، رطوبت، و کیفیت خاک بر رشد گیاهان و در نتیجه مقدار گرده تولید شده تاثیر می‌گذارد. همچنین، نوع و تنوع گیاهانی که در دسترس زنبورها هستند، بر میزان و کیفیت گرده تاثیرگذار است. به‌طور خاص، تنوع گیاهی بالاتر می‌تواند به زنبورها امکان انتخاب منابع غذایی متنوع‌تری را بدهد که در بهبود کیفیت تغذیه و سلامت کلنی‌ها موثر است. از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده‌اند که ژنتیک زنبورها نیز نقش مهمی در توانایی آن‌ها برای جمع‌آوری گرده ایفا می‌کند. برخی از نژادهای زنبور عسل توانایی بیشتری در جمع‌آوری گرده دارند و این ویژگی به‌طور مستقیم با سازگاری ژنتیکی آن‌ها به شرایط محیطی و منابع غذایی موجود در نواحی مختلف مرتبط است (Potts و همکاران، ۲۰۱۶؛ Schneider و همکاران، ۲۰۱۷). به همین دلیل، انتخاب نژادهای مقاوم و ژنتیکی بهینه شده می‌تواند موجب افزایش بهره‌وری در جمع‌آوری گرده و بهبود عملکرد کلنی‌ها شود.

ژن گیرنده تیرامین زنبورعسل (*AmTYR1*)

در حشرات، چهار آمین بیوژنیک اصلی شامل دوپامین[1] (DA)،

[1] - Dopamine

سروتونین[۲] (HT)، تیرامین[۳] (TA) و اکتوپامین[۴] (OA) وجود دارند، که با مشارکت هم، طیف وسیعی از عملکردهای بیولوژیکی ضروری برای زندگی حشرات را کنترل و تعدیل می‌کنند (Neckameyer و همکاران، ۲۰۱۷). در سال‌های اخیر، تحقیقات نشان داده‌اند که اکتوپامین و تیرامین وظایف مهمی را به‌طور مستقل از یکدیگر انجام می‌دهند. این دو آمین در کنترل فرآیندهای مهمی مانند بویایی (Zhukovskaya، ۲۰۱۷)، حرکت (Hardie و همکاران، ۲۰۰۷)، لقاح و تولیدمثل (Wong، ۲۰۱۰) و متابولیسم (Roeder، ۲۰۲۰) نقش دارند. عملکردهای فیزیولوژیکی تیرامین و اکتوپامین از طریق تعامل و فعال‌سازی گیرنده‌های خاص خود انجام می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که حیواناتی که فاقد گیرنده‌های اکتوپامین و تیرامین هستند، در تنظیم بیولوژی، فیزیولوژی و رفتار بی‌مهرگان دچار اختلال می‌شوند. تیرامین همچنین به‌عنوان پیش‌ساز بیوسنتزی مستقیم اکتوپامین عمل می‌کند (Roeder، ۲۰۰۵)، که در فرآیندهای مختلفی از جمله یادگیری و تقویت اشتها به ساکارز در زنبورعسل نقش دارد (Hammer، ۱۹۹۳). علاوه بر این، اکتوپامین و تیرامین تأثیر قابل توجهی بر فعالیت‌های حرکتی زنبورهای عسل دارند (Fussnecker، ۲۰۰۶). با این حال، به‌نظر می‌رسد که این دو آمین بر گیرنده‌های سایر آمین‌های بیوژنیک مانند دوپامین و سروتونین تأثیر چندانی نداشته باشند؛ این آمین‌ها تأثیرات خاص خود را بر یادگیری بویایی و تحریک اشتها در زنبورها دارند (Wright و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین، افزایش سطح تیرامین در مغز زنبورها موجب تقویت پاسخ‌دهی آن‌ها به محرک‌های چشایی می‌شود (Scheiner و همکاران، ۲۰۰۶).

در مطالعه‌ای که توسط Scheiner و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، نقش گیرنده تیرامین زنبورعسل (*AmTYR1*) در تنظیم تقسیم کار و رفتارهای مرتبط با جمع‌آوری گرده و شهد به دقت مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که بیان ژن *AmTYR1* در گره عصبی زیرمری[۵]، که یکی از نواحی مهم عصبی در مغز زنبورها است، بین زنبورهای جمع‌آوری‌کننده گرده و شهد تفاوت قابل توجهی دارد. این تفاوت در بیان ژن، به‌ویژه در پاسخ‌های عصبی و رفتاری زنبورها، نقش اساسی این گیرنده را در تنظیم تقسیم کار و تخصیص منابع در جمع‌آوری غذا برجسته می‌کند. علاوه بر این، مطالعات نشان دادند که محتوای تیرامین مغزی به‌طور مستقیم با نقش اجتماعی زنبورها و الگوهای رفتاری آن‌ها مرتبط است. به‌طور خاص، زنبورهای پرستار که بیشتر مسئول مراقبت از لاروها هستند، نسبت به زنبورهای چراگر که وظیفه جمع‌آوری غذا را دارند، غلظت تیرامین کمتری در مغز خود دارند (Scheiner و همکاران، ۲۰۱۷). این تفاوت در میزان تیرامین مغزی نشان‌دهنده‌ی تمایز در وظایف اجتماعی و رفتارهای مرتبط می‌باشد.

علاوه بر این، زنبورهای چراگر به‌دلیل داشتن غلظت تیرامین بالاتر، نسبت به ساکارز واکنش‌های قوی‌تری نشان می‌دهند. مطالعات تجربی نشان دادند که افزایش مصنوعی سطح تیرامین در مغز زنبورهای پرستار منجر به افزایش ۴۰ تا ۶۰ درصدی پاسخ به محرک‌های قندی مانند ساکارز ۱ مولار می‌شود. این تغییرات نوروشیمیایی نه تنها باعث کاهش معنی دار ($p<0.01$) زمان واکنش به محرک‌های غذایی می‌گردد، بلکه می‌تواند الگوی رفتاری زنبورها را از حالت پرستاری به سمت رفتارهای گرده آوری تغییر دهد (Scheiner و همکاران، ۲۰۱۷). این یافته‌ها به وضوح نشان می‌دهد که تیرامین به عنوان یک تنظیم‌گر مرکزی در رفتارهای اجتماعی زنبورعسل عمل کرده و سطح این انتقال دهنده عصبی ارتباط مستقیمی با انعطاف پذیری رفتاری کلنی دارد. چنین کشفیاتی می-تواند کاربردهای علمی مهمی در مدیریت کلنی‌های زنبورعسل و بهبود عملکرد آن‌ها داشته باشد .

اصلاح نژاد زنبورعسل در سال‌های اخیر تحولی چشم‌گیر داشته است. در گذشته، این فرآیند عمدتاً مبتنی بر مشاهدات فنوتیپی و روش‌های کلاسیک ژنتیک کمی بود. اما امروزه با ظهور فناوری های نوین ژنتیک مولکولی انقلابی در این حوزه ایجاد شده است. تکنیک‌های پیشرفته‌ای مانند استفاده از نشانگرهای ژنومی، نقشه برداری دقیق ژنوم تحلیل‌های ترانسکریپتومی و توالی‌یابی کامل ژنوم، امکان شناسایی و انتخاب دقیق‌تر صفات مطلوب را فراهم

[2] - Serotonin
[3] - Tyramine
[4] - Octopamine
[5] - Subesophageal ganglion

کرده‌اند. این روش‌های نوین با ارزیابی جامع تنوع ژنتیکی در جایگاه‌های کلیدی مرتبط با صفات اقتصادی، به محققان اجازه می دهند تا در برنامه‌های اصلاح نژاد بلند مدت، صفات مفید را تقویت و صفات نامطلوب را حذف نمایند. در این راستا مطالعه حاضر با تمرکز بر ژن گیرنده تیرامین (*AmTYR1*) که نقش مهمی در تنظیم رفتارهای اجتماعی و عملکرد گرده‌آوری دارد به واکاوری تنوع ژنتیکی در جمعیت زنبور عسل ایرانی پرداخته است. این پژوهش می‌تواند گامی موثر در جهت توسعه برنامه‌های اصلاح نژادی هدفمند و بهبود بهره-وری کلنی‌های زنبورعسل کشور باشد.

مواد و روش ها

جمع‌آوری داده‌های مرتبط با جمع‌آوری گرده گل

این مطالعه به‌مدت پنج هفته از تیر تا مرداد ۱۴۰۳ در یک زنبورستان تحت رکورد در شهرستان ارومیه انجام شد. از میان ۳۵۰ کلنی موجود، ۱۲۵ کلنی با بیشترین تنوع ژنتیکی (ناشی از استفاده از ملکه‌های مختلف در سال‌های گذشته) و عملکردی برای مطالعه انتخاب گردیدند. پیش از شروع آزمایش، غربالگری اولیه بر روی تمام کلنی‌ها انجام شد و با استفاده از تله‌های گرده‌گیر استاندارد شرکت بهاران، داده‌های مربوط به تولید گرده به‌صورت هفتگی جمع‌آوری شد. وزن گرده‌های جمع‌آوری شده با ترازوی دیجیتال دقیق اندازه‌گیری و ثبت گردید. مزیت اصلی این مطالعه، کنترل کامل فرآیندهای مدیریتی و رکوردبرداری توسط محققان و تنوع ژنتیکی بالای کلنی‌های مورد بررسی بود که امکان انجام تحلیل‌های دقیق را فراهم می‌ساخت. ویژگی‌های روش اجرا شامل موارد ذیل بود:

۱. مدت زمان مشخص (۵ هفته)

۲. مکان دقیق اجرا (ارومیه)

۳. تعداد و مبنای انتخاب کلنی‌ها (۱۲۵ کلنی بر اساس تنوع ژنتیکی)

۴. روش استاندارد جمع‌آوری داده‌ها (تله‌های گرده‌گیر استاندارد)

۵. ابزار دقیق اندازه‌گیری (ترازوی دیجیتال)

۶. مزایای مطالعه (کنترل محققان و تنوع ژنتیکی)

نمونه گیری و استخراج DNA

در این پژوهش، تعداد ۱۲۵ نمونه زنبورعسل ا از زنبورستان تحت رکورد شهرستان ارومیه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله در الکل ۷۰ درصد فیکس شده و در ازت مایع نگهداری شدند.برای استخراج DNA، ابتدا نمونه‌ها با هاون چینی در محیط ازت مایع به صورت پودر درآمدند. پس از بررسی روش‌های مختلف استخراج DNA، روش اصلاح شده CTAB به‌دلیل تولید DNA با کیفیت مناسب برای واکنش‌های PCR و بازدهی بالا انتخاب گردید. در این روش، پس از استخراج DNA از تمام نواحی بدن لارو به جز ناحیه شکمی، کلاف DNA با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شده و دربافر TE حل گردید. نمونه‌های DNA استخراج شده.در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند کیفیت و کمیت DNA استخراجی در دستگاه نانودراپ و ژل اگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین کمیت DNA استخراجی از دستگاه اسپکتوفتومتری (نانودراپ) مدل Bio tek Epoch2 استفاده شد (شکل ۱).

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

یک جفت پرایمر با استفاده از توالی ژن گیرنده‌ی تیرامین موجود در پایگاه داده‌ی جهانی ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) طراحی و با بهره‌گیری از ابزار NCBI BLAST برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۲۶ جفت‌باز انتخاب شد. این پرایمرها توسط شرکت بیومجیک ژن (BMG) سنتز شدند. تکثیر قطعه هدف ژن گیرنده‌ی تیرامین از طریق تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام گرفت.

برای کاهش خطای آزمایش و تسریع در فرایند کار، از مسترمیکس 8X امپیکلون شرکت DNABiotec استفاده شد. در ابتدا، محلول مسترمیکس به همراه آب استریل و پرایمرهای رفت و برگشت آماده و در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری تقسیم گردید. سپس، نمونه‌های DNA به این میکروتیوب‌ها اضافه شده و در دستگاه ترموسایکلر تحت برنامه دمایی مشخص (مطابق جدول ۱) قرار گرفتند. برای ارزیابی صحت تکثیر قطعه هدف و

بررسی کیفیت محصول PCR، از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE و نشانگر مولکولی (Ladder 100 bp) استفاده شد.

جدول ۱ - برنامه دمایی-زمانی جهت تکثیر ژن *AmTYR1*

مرحله ۴	مرحله ۳-۱چرخه	مرحله ۲-۳۵ چرخه			مرحله ۱-۱ چرخه
	توسعه نهایی	توسعه	اتصال	واسرشت سازی	واسرشته سازی اولیه
۴ درجه	۷۲ درجه	۷۲ درجه	۶۲ درجه	۹۵ درجه	۹۵ درجه
	۷ دقیقه	۱ دقیقه	۴۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۵ دقیقه

شناسایی چندشکلی با استفاده از نشانگر چندشکلی فضایی رشته های منفرد (SSCP)

بررسی چندشکلی جایگاه تکثیر یافته مورد نظر، با استفاده از نشانگر SSCP روی ژل آکریل آمیل ۱۲ درصد به مدت ۵ ساعت و ۳۳۰ ولت انجام گرفت.

نتایج و بحث

جمع‌آوری گرده گل

در این مطالعه، میزان گرده جمع‌آوری شده توسط کلنی‌های زنبورعسل در ۵ نوبت رکوردگیری هفتگی از اوایل تابستان تا هفته اول مرداد مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۲، میانگین گرده جمع‌آوری شده در هر نوبت . ۵۹/۵۱ گرم به دست آمد که با یافته‌های مطالعات پیشین همخوانی دارد (Pernal و Currie، ۲۰۰۱؛ Free، ۱۹۹۳). Free (۱۹۹۳) در تحقیقات نشان داده بود که در مناطق غنی از منابع شهد و گرده میزان تولید گرده در هر نوبت بین ۵۰ تا ۱۰۰ گرم متغیر است. همچنین Pernal و Currie (2001) گزارش کرده بودند که کلنی‌های قوی در طول تابستان به‌طور متوسط ۴۰ تا ۸۰ گرم گرده در هر نوبت جمع‌آوری می‌کنند. این نتایج با با مطالعه حاضر که میانگین۵۱/۵۹ گرم را نشان می‌دهد همپوشانی قابل توجهی دارد. از سوی دیگر پژوهش Alaux و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر چشمگیر شرایط محیطی را بر عملکرد گرده‌آوری نشان داده بود، به‌طوری که کمبود منابع گرده می‌توانست تا ۳۰-۴۰ درصد از میزان تولید بکاهد این یافته‌ها به خوبی نشان می‌دهد که نتایج حاصل از این تحقیق در محدوده طبیعی تولید گرده در کلنی‌های زنبورعسل قرار داشته و شرایط محیطی زنبورستان مورد مطالعه از نظر منابع گرده در سطح مطلوبی بوده است. این یافته‌ها به خوبی نشان می‌دهد که نتایج حاصل از این تحقیق در محدوده طبیعی تولید گرده در کلنی‌های زنبورعسل قرار داشته و شرایط محیطی زنبورستان مورد مطالعه از نظر منابع گرده در سطح مطلوبی بوده است. مطالعات اخیر نیز نشان می‌دهند که تغییرات اقلیمی و الگوهای نامنظم بارندگی می‌توانند بر توزیع فصلی منابع گرده تأثیرگذار باشند، به‌طوری‌که در مناطق با نوسانات آب وهوایی شدید، مدیریت زنبورستان‌ها نیازمند تطبیق‌پذیری بیشتر با شرایط اکولوژیکی است (Zattara و Aize ، ۲۰۲۱). همچنین، پژوهش‌های مبتنی بر سامانه‌های اطلاعات جغرافیایی (GIS) تأیید کرده‌اند که تراکم گیاهان گلدار در شعاع ۱،۵ کیلومتری زنبورستان، نقش تعیین‌کننده‌ای در کارایی جمع‌آوری گرده دارد (Sponsler و همکاران، ۲۰۲۰). در این شرایط، بهینه‌سازی الگوی کشت گیاهان گلدار در اطراف زنبورستان‌ها می‌تواند پایداری منابع گرده را بهبود بخشد (Requier و همکاران، ۲۰۱۷). این موضوع به‌ویژه در مناطق با تنوع گیاهی فصلی اهمیت دارد، چرا که توالی گلدهی گیاهان مختلف می‌تواند از افت ناگهانی منابع گرده جلوگیری کند (Vaudo و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۲- آماره های توصیفی مربوط به صفت جمع اوری گرده در هر نصب (فواصل یک هفته‌ای) در زنبوران عسل

صفت	میانگین	انحراف معیار	کمینه	بیشینه	دامنه	ضریب تغییرات
جمع آوری گرده	۵۹/۵۱	۳۵/۶۱	۵	۲۰۱	۱۹۶	۵۹/۸۴

در این مطالعه ضریب تغییرات (CV) به میزان ۵۹/۸۴ درصد محاسبه شد که در مقایسه با محدوده استاندارد ۱۰ تا ۲۵ درصد گزارش شده در مطالعات مشابه (Smith و همکاران، ۲۰۲۰) به‌طور قابل توجهی بالاتر است. این میزان بالای تغییرپذیری عمدتاً ناشی از دو عامل اصلی می‌باشد: نخست، روش نمونه‌گیری هدفمند که به منظور بررسی ارتباط بین چند شکلی ژن *AmTYR1* و عملکرد گرده‌آوری انجام شد و به‌طور عمدی کلنی‌هایی با دامنه گسترده عملکردی (از ۵ تا ۲۰۱ گرم با بازه ۱۹۶ گرمی) را شامل می‌شد. دوم، تفاوت‌های ذاتی بین کلنی‌ها در توان جمع‌آوری گرده که می‌تواند تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و فیزیولوژیک باشد. این سطح از تنوع، اگرچه از محدوده معمول فراتر است، اما به‌دلیل طراحی مطالعه و اهداف پژوهشی آن کاملاً قابل توجیه بوده و امکان بررسی بهتر ارتباط بین تنوع ژنتیکی و عملکرد گرده‌آوری را فراهم می‌سازد. با این حال، پژوهش‌های دیگری نیز تغییرپذیری بالا در صفات رفتاری زنبوران را ناشی از تعامل پیچیده‌ی ژنتیک-محیط دانسته‌اند. به عنوان مثال، مطالعات ژنومیک جمعیتی نشان داده است که تنوع در ژن‌های مرتبط با حس بویایی مانند ژن *Orco* می‌تواند بر ترجیح گرده‌آوری زنبورها تأثیر بگذارد (Decourtye و همکاران، ۲۰۱۸). این یافته‌ها اهمیت در نظر گرفتن عوامل اپی‌ژنتیک را در تحلیل‌های آینده برجسته می‌کند. برای مثال، مطالعات ژنومی اخیر روی زنبورهای عسل نشان داده است که بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم انرژی از قبیل vitellogenin می‌تواند تحت تأثیر دسترسی به منابع گرده قرار گیرد و حتی رفتار جستجوی غذا را تعدیل کند (Ament و همکاران، ۲۰۲۲). این ارتباط پویا بین محیط و ژنتیک، لزوم یکپارچه‌سازی داده‌های اکوفیزیولوژیک و ژنومیک در پژوهش‌های آتی را آشکار می‌سازد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان گرده‌آوری در پنج نوبت رکوردگیری نوسانات قابل توجهی داشته است (۳۰، ۱۹، ۱۲۶، ۵۰ و ۵۹ گرم). این ضریب تغییر بالا (CV =۵۹/۸۴) عمدتاً ناشی از عوامل محیطی و مدیریتی بوده است. به ویژه، افزایش چشمگیر عملکرد در رکورد سوم (۱۲۶گرم) احتمالاً به‌دلیل شرایط مطلوب محیطی شامل وفور منابع گرده و آب و هوای مناسب بوده است. در مقابل، کاهش عملکرد در رکورد دوم (۱۹ گرم) می‌تواند نشان دهنده تأثیر منفی عوامل نامساعد جوی یا کاهش موقت منابع غذایی باشد. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین از جمله Alaux و همکاران، (۲۰۱۱) و Seeley (۱۹۹۵) که به ترتیب بر اهمیت دسترسی به منابع گرده و تأثیر تغییرات فصلی تأکید داشتند همخوانی دارد. اگرچه در این مطالعه تنوع عملکردی قابل توجهی در داده‌های گرده‌آوری مشاهده شد (۵ تا ۲۰۱ گرم)، اما عدم شناسایی چندشکلی در جایگاه ژنی *AmTYR1*، امکان استنباط ارتباط مستقیم ژنتیکی با این صفت را محدود ساخت. این یافته‌ها همسو با پژوهش‌های پیشین است که نشان می‌دهند اثرات ژنتیکی بر رفتارهای پیچیده‌ای مانند گرده‌آوری ممکن است در غیاب تعامل با عوامل محیطی یا نشانگرهای ژنتیکی مکمل، آشکار نشوند. به عنوان مثال، ژن *for* که در مطالعات مرتبط با جستجوی غذا نقش کلیدی دارد (Page و همکاران، ۲۰۱۲). از این رو، به نظر می‌رسد رویکردهای جامع‌تری مانند تحلیل چندژنی (مثلاً بررسی همزمان ژن‌های کاندیدای مرتبط با متابولیسم انرژی و حس بویایی) یا تحلیل QTL[6] که قادر به شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات کمی است، بتوانند در مطالعات آتی به کشف مکانیسم‌های پنهان کمک کنند (Wright و همکاران، ۲۰۲۱). افزون بر این، شواهد جدید به‌دست آمده از مطالعات ترنسکریپتومیکس حاکی از آن است که تفاوت‌های رفتاری در گرده‌آوری تنها مربوط به تنوع در توالی‌های کدکننده نبوده، بلکه از تنظیم تفاضلی ژن‌های مرتبط با مسیرهای نورونی مانند ژن‌های

[6] - Quantitative Trait Loci

کدکننده دوپامین و اکتوپامین، ناشی شود (Herb و همکاران، ۲۰۲۳). این فرضیه با پژوهش‌های دیگری نیز تقویت می‌شود که تغییرات در سطوح بیان ژن‌های مرتبط با نوروترانسمیترها را با انعطاف‌پذیری رفتاری زنبورها در محیط‌های پویا مرتبط دانسته‌اند (Scheiner و همکاران، ۲۰۲۰). بنابراین، حتی در نبود چندشکلی‌های ساختاری، تحلیل بیان ژن یا مطالعات اپی‌ژنتیک (مانند متیلاسیون DNA) می‌توانند پنجره‌ای به سوی مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده این رفتارها بگشایند. در مجموع، نتایج این مطالعه و شواهد پیشین، ضرورت توجه همزمان به تعاملات ژن–محیط و به‌کارگیری روش‌های ترکیبی (ژنومیکس، ترنسکریپتومیکس و اکوفیزیولوژیک) را برای درک جامع‌تر عوامل مؤثر بر عملکرد گرده‌آوری زنبورعسل تأکید می‌کنند.

نتایج آنالیز کمی و کیفی DNA استخراج شده

نتایج ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده نشان دهنده موفقیت آمیز بودن پروتکل به کار رفته بود. باندهای حاصل از الکتروفورز، واضح و متمایز بوده و فاقد هر گونه کشیدگی[۷] یا آثار آلودگی بودند. تمامی نمونه‌ها از کیفیتمطلوبی برخوردار بودند به‌طوری که غلظت و خلوص DNA استخراج شده برای انجام آزمایشات بعدی مانند PCR کاملاً مناسب تشخیص داده شد. یکنواختی و کیفیت بالای نمونه‌ها در این مطالعه، علاوه بر نشان دادن کارایی روش استخراج اصلاح شده (CTAB) حاکی از دقت بالای اجرای پروتکل آزمایشگاهی بود.

مطالعه حاضر نشان داد که روش بهینه شده CTAB با استفاده از نمونه‌های لاروی، نتایج بهتری نسبت به سایر روش‌های استخراج DNA ارائه می‌دهد. مقایسه با مطالعه Najafzadeh و Lalegani (۲۰۱۹) که چهار روش مختلف را بر روی بافت شکمی زنبورهای کارگر آزمایش کرده بودند، نشان داد روش مورد استفاده در این تحقیق از نظر وضوح باندها، خلوص DNA و یکنواختی نمونه‌ها برتری قابل توجهی دارد. این موفقیت عمدتاً ناشی از دو عامل کلیدی بود: نخست، انتخاب مناسب بافت بیولوژک (استفاده از لاور به جای زنبور بالغ) و دوم بهینه‌سازی پروتکل CTAB که منجر به حذف مراحل خطرناک و پرهزینه شد. نتایج حاکی از آن است که این روش اصلاح شده نه تنها کیفیت DNA استخراجی را افزایش داده، بلکه به عنوان یک پروتکل کارآمد، سریع و مقرون به صرفه می‌تواند برای تحقیقات ژنتیکی روی زنبورعسل توصیه شود. این یافته‌ها به ویژه برای مطالعاتی که نیاز به DNA با کیفیت بالاتر برای تکنیک‌های حساس مانند توالی‌یابی دارند، حائز اهمیت است.

مطالعات متعددی به بررسی روش‌های مختلف استخراج DNA پرداخته‌اند که هرکدام مزایا و محدویت‌های خاص خود را دارند. Issa و همکاران (۲۰۱۳) روشی سریع مبتنی بر آنزیم پروتئیناز K ارائه کردند که اگرچه در تکثیر PCR موفق عمل می‌کرد، اما فاقد داده‌های کمی درباره کیفیت DNAبود. از سوی دیگر، Yadróو همکاران (۲۰۲۳) با مقایسه چهار کیت تجاری، کیت QIAamp DNA Microkit را به‌دلیل داشتن RNAase و زمان انکوباسیون سه ساعته، مناسب‌ترین روش برای توالی‌یابی ژنومی معرفی کردند. در مقابل، روش بهینه‌شده CTAB مورد استفاده در این مطالعه، با مزایای قابل توجهی مانند: هزینه پایین، سادگی اجرا، کیفیت مطلوب برای PCR و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته همراه بود. جالب توجه اینکه ارزیابی کیفی بر روی ژل آگارز، در بسیاری از موارد می‌تواند بدون نیاز به انجام آزمون‌های اضافی اطلاعات کافی و معتبری ارائه دهد. این یافته‌ها به وضوح نشان می‌دهد که انتخاب روش استخراج باید مبتنی بر هدف مطالعه و امکانات آزمایشگاهی باشد، به‌طوری که برای اهداف معمول تحقیقاتی، روش‌های ساده و کم‌هزینه مانند CTAB اصلاح‌شده می‌توانند گزینه‌ای ایده‌آل محسوب شوند، در حالی که برای کاربردهای تخصصی‌تر مانند توالی‌یابی، ممکن است استفاده از کیت‌های تجاری پیشرفته ضروری باشد.

کمیت استخراج‌های صورت گرفته مطلوب بوده و نمونه‌های مورد بررسی غلظت‌های بالاتر ۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر داشتند. همچنین نمونه‌ها از لحاظ کیفی بر مبنای شاخص‌های نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ (OD260/280)، شاخصی برای آلودگی احتمالی مربوط به پروتئین، و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۳۰ (OD260/230)،

[۷] - Smearing

شاخصی برای آلودگی احتمالی مربوط به فنول، الکل و کربوهیدات‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطابق انتظار و با استناد به نتایج ژل آگارز، نمونه‌ها برای هر دو شاخص در دامنه‌ی مطلوبی قرار داشتند. این نسبت‌ها برای نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ در حدود ۱/۸ و برای نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۳۰ در حدود ۲ بودند. این مقادیر بیانگر کیفیت مطلوب برای نمونه‌های مورد بررسی است (شکل ۱).

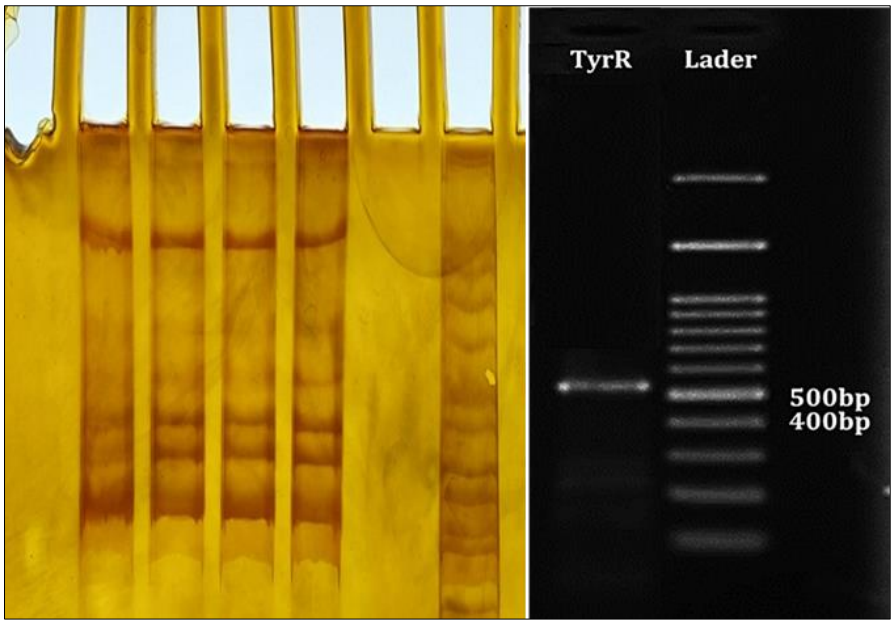
شکل ۱ ژل آگارز DNA استخراج شده از بافت زنبورعسل

نتایج حاصل از تکثیر ژن *AmTYR1* به روش PCR

برای حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعه‌ژن *AmTYR1* ، محصولات PCR به همراه نشانگراستاندارد DNA (Lader) با فواصل ۱۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. تصاویر مربوط به باندهای تکثیری ولدر (نشانگر) در شکل ۲ نمایش داده شده است. نکته حائز اهمیت، عدم مشاهده هیچ گونه باند غیراختصاصی یا آلودگی در فرایند تکثیر است، زیرا وجود چنین مواردی می‌تواند منجر به خطا در مراحل بعدی آزمایش و در نتیجه تفسیر نادرست داده‌ها شود.در این مرحله، تکثیر دقیق و اختصاصی هدف، تضمین کننده صحت نتایج نهایی است.

نتایج حاصل الکتروفورز عمودی با ژل پلی آکریل آمید

نشانگر مولکولی SSCP روشی حساس وکارآمد برای شناسایی چندشکلی‌های ژنتیکی در نواحی باتوالی‌های کوتاه است، ، به‌گونه‌ای که حتی تغییر یک نوکلئوتید (جهش نقطه‌ای) نیز با این تکنیک قابل تشخیص است. با این حال، SSCP تنها . الگوهای ژنتیک متفاوت را نشان می‌دهد و اطلاعاتی درباره ماهیت آلل‌های موجود در هر جایگاه ارائه نمی‌کند در صورت مشاهده چند شکلی، لازم است نمونه‌ها برای تعیین توالی‌یابی به آزمایشگاه‌های تخصصی ارسال شوندتا داده‌های دقیق‌تری درباره تغییرات ژنتیکی بدست آید. دراین پژوهش پس از انجام الکتروفورز عمودی SSCP و بررسی الگوی باندها (شکل ۲) مشخص شد که جایگاه مورد مطالعه در زنبورعسل ایرانی تک شکل (مونومورفیک) است، که نشان دهنده عدم وجود جهش در این ناحیه از ژنوم جمعیت مورد بررسی می‌باشد. با این حال، احتمال دارد با بررسی جمعیت-های دیگر زنبورعسل، تنوع ژنتیکی در این جایگاه مشاهده شود.



شکل ۲- تصاویر (سمت راست): مربوط به تکثیر قطعه ۵۲۶ جفت‌بازی ژن گیرنده‌ی تیرامین روی ژل اگارز ۱/۵ درصد: (سمت چپ): مربوط به الگوهای باندی شناسایی شده برای قطعه ۵۲۶ جفت‌بازی ژن گیرنده‌ی تیرامین روی ژل اکریلامید ۱۲ درصد

توالی ژن مربوط به ژن TyrR (گیرنده مربوط به ژن تیرامین) در مطالعات پیشین شناسایی شده بود (Reim و همکاران، ۲۰۱۷). این پژوهش با هدف بررسی احتمالی جایگاه ژنتیکی *AmTYR1* با صفت تولید گرده در زنبورعسل طراحی شد، چرا که مطالعات قبلی ارتباط این ژن را با رفتار چراگری و جمع‌آوری گرده نشان داده بودند. مبنای این تحقیق بر دو اصل استوار بود: نخست نتایج مطالعات GWAS که این ژن را به عنوان کاندیدای مؤثر در تولید گرده معرفی کرده بودند، و دوممسیر بیولوژیکی گیرنده تیرامنی که در فرآیندهای عصبی مانند یادگیری، تشخیص بو و رفتار چراگری نقش دارد (Latshaw و همکاران، ۲۰۲۳). گیرنده *AmTYR1* در سیستم عصبی زنبورعسل نه تنها به عنوان یک واسطه عصبی عمل می‌کند، بلکه احتمالاً در تنظیم رفتارهای چراگری نیز مؤثر است. مطالعات نشان داده‌اند که بیان و انواع پیرایش‌های ژن در عقده عصبی زیر مری زنبوران گرده‌آور و شهدآور متفاوت است (Scheiner و همکاران، ۲۰۱۴)، که نشان دهنده نقش احتمالی آن در تمایز عملکردی این دو گروه از زنبوران می‌باشد. زنبوران چراگر نسبت به پرستاران واکنش چشایی قوی‌تر و یادگیری بهتری در پاسخ به محرک‌های غذایی نشان می‌دهند (Scheiner و همکاران، ۲۰۱۷)، و سطح تیرامین مغزی و الگوی بیان *AmTYR1* در این دو گروه متفاوت است. این یافته‌ها اهمیت این گیرنده را در سازماندهی اجتماعی کلنی و رفتارهای یادگیری برجسته می‌سازد (Blenau و همکاران، ۲۰۰۰). با توجه به این شواهد، *AmTYR1* به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی مؤثر در رفتار جمع‌آوری گرده برای این پژوهش انتخاب شد. متأسفانه اطلاعات جامعی درباره چند شکلی‌های مؤثر این ژن در پایگاه‌های عمومی موجود نبود، بنابراین پرایمرهای مطالعه بر اساس توالی اگزون سوم طراحی شدند. این پژوهش اولین مطالعه بررسی چند شکلی‌های *AmTYR1* در زنبورعسل ایرانی محسوب می‌شود و می‌تواند پایه‌ای برای تحقیقات آینده در زمینه ژنتیک رفتار زنبورعسل و بهینه‌سازی تولید گرده باشد. ادامه تحقیقات در زمینه بررسی نواحی دیگر این ژن، مطالعه جمعیت‌های مختلف زنبورعسل و تحلیل ارتباط تنوع ژنتیکی *AmTYR1* با عملکرد کلنی ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه‌ی حاضر که با هدف بررسی ارتباط ژن *AmTYR1* با

صفت تولید گرده در زنبورعسل ایرانی (Apis mellifera meda) انجام شد، نمونه‌گیری از مزارع تحت پوششش در سال ۱۴۰۳ صورت گرفت و داده‌های عملکردی با تنوع قابل قبولی ثبت شدند. از نقاط قوت پژوهش می‌توان به موفقیت در طراحی پروتکل استخراج DNA با کیفیت از بافت لاروی، تکثیر مطلوب جایگاه‌های هدف و اجرای دقیق تکنیک SSCP اشاره کرد. یافته‌ها نشان داد جایگاه‌های بررسی شده در ژن AmTY1 در جمعیت مورد مطالعه تک شکل هستند که می‌تواند ناشی از محدویت تنوع ژنتیکی جمعیت یا ویژگی‌های ذاتی جایگاه‌های انتخابی باشد. با توجه به اهمیت حیاتی گرده‌افشانی، پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی با بررسی جمعیت‌های متنوع‌تر، سایر نواحی این ژن و ژن‌های کاندیدای مرتبط دیگر، و با بهره‌گیری ازتکنیک‌های پیشرفته‌تر مانند توالی‌یابی نسل جدید انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر می‌کنیم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافعی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

منابع

Abou-Shaara, H. F. (2014). The foraging behaviour of honey bees, Apis mellifera: A review. *Veterinary Medicine and Science*. 1(1): 1-12.

Aizen, M. A., Aguiar, S., Biesmeijer, J. C., Garibaldi, L. A., Inouye, D. W., Jung, C. and Seymour, C. L. (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global change biology*. 25(10), 3516-3527.

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. and Le Conte, Y. (2011). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*. 6(4): 562-565.

Ament, S. A., Corona, M., Pollock, H. S., & Robinson, G. E. (2022). Metabolic plasticity of honey bee workers is associated with vitellogenin and larval care. *Molecular Ecology*. 31(4): 1207–1221.

Blenau, W., Balfanz, S. and Baumann, A. (2000). *AmTYR1*: Characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *Journal of Neurochemistry*. 74(3): 900–908. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740900.x

Camazine, S. and Sneyd, J. (1991). A model of collective nectar source selection by honey bees: Self-organization through simple rules. *Journal of Theoretical Biology*. 149(4): 547-571.

Decourtye, A., Grimm, R., Devillers, J., Henry, M., Labarussias, M., & Arnold, G. (2018). Olfactory gene expression and foraging behavior in honey bees (Apis mellifera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 94: 1–9.

Dolezal, A. G., Toth, A. L. and Carrillo-Tripp, J. (2020). The role of pollen in the nutrition of honey bees. *Journal of Insect Physiology*. 123: 35-42.

FAO. (2023). The economic value of pollination services. *Retrieved from FAO Statistical Database*

Free, J. B. (1993). Insect pollination of crops. Academic Press.

Fussnecker, B. L., Smith, B. H. and Mustard, J. A. (2006). Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 52(10): 1083-1092.

Garibaldi, L. A., et al. (2021). Global importance of pollination services for agricultural production. *Science Advances*, 7(1), eaaz3437.

Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*. 366(6450): 59-63.

Hardie, S. L., Zhang, J. X. and Hirsh, J. (2007). Trace amines differentially regulate adult locomotor activity, cocaine sensitivity, and female fertility in Drosophila melanogaster. *Developmental Neurobiology*. 67: 1396–1405.

Herb, B. R., Shpigler, H. Y., Saul, M. C., Leask, M. P., Robinson, G. E., & Clayton, D. F. (2023). DNA methylation mediates plasticity in foraging behavior in honey bees. *Science Advances*. 9(2): eade4417.

IPBES. (2016). Thematic Assessment of Pollinators, *Pollination and Food Production*.

IPCC. (2021). Climate Change 2021: The Physical Science Basis.

Issa, M. R., Jaber, L. R. and Ahmed, H. M. (2013). A rapid method for DNA extraction from different parts of honeybee (*Apis mellifera*) and varroa mite. *Journal of Apicultural Research*. 52(4): 309-315.

Jones, M. and Brown, K. (2018). Seasonal variations in pollen foraging by Apis mellifera. *Bee Science Journal*. 45(2): 150-162.

Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. and Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274(1608): 303-313.

Latshaw, J. S., Mazade, R. E., Petersen, M., Mustard, J. A., Sinakevitch, I., Wissler, L. .. and Smith, B. (2023). Tyramine and its *AmTYR1* receptor modulate attention in honey bees (*Apis mellifera*). *eLife*. 12: e83348.

Lotfi, H., Mokhber, M. and Hashemi, A. (2024). Investigation of Mrjp1 gene polymorphism in Iranian honeybee (Apis mellifera meda). The Second National Conference of Agricultural Sciences Focusing on Abiotic Stresses, January 22, Payam Noor University (PNU), Urmia. (In Persian)

Millard, J., Outhwaite, C. L., Ceauşu, S., Carvalheiro, L. G., da Silva E Silva, F. D., Dicks, L. V. and Newbold, T. (2023). Key tropical crops at risk from pollinator loss due to climate change and land use. *Science Advances*. 9(41), eadh0756.

Mokhber, M. and Ghaffari, M. (2019). Economic value of pollination services of honeybee and solutions to conserve apiculture industry. *Honeybee Science Journal*. 9(17): 12-16. (In Persian)

Najafzadeh, M. and Lalegani, Z. (2019). Evaluation of four DNA extraction methods for honeybee (Apis mellifera) from different body parts. *Journal of Insect Science*. 19(4): 47–56.

Neckameyer, W. S. and Leal, S. M. (2017). Diverse functions of insect biogenic amines as neurotransmitters, neuromodulators, and neurohormones. *Hormones and Brain Behavior*. 2: 367–401.

Osterman, J., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Bosch, J., Howlett, B. G., Inouye, D. W. and Paxton, R. J. (2021). Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 322, 107653.

Page, R. E., Fondrk, M. K., Hunt, G. J., Guzmán-Novoa, E., Humphries, M. A., & Nguyen, K. (2012). Genetic architecture of pollen hoarding in honey bees. *Journal of Experimental Biology*. 215(4): 609–614.

Pernal, S. F. and Currie, R. W. (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (Apis mellifera L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 51(1): 53-68.

Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J. and Vanbergen, A. J. (2016). Pollinators and food security. *Food Security*. 8(3): 509-521.

Reim, T., Balfanz, S., Baumann, A., Blenau, W., Thamm, M. and Scheiner, R. (2017). *AmTAR2*: Functional characterization of a honeybee tyramine receptor stimulating adenylyl cyclase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 80: 91-100.

Requier, F., Odoux, J. F., Henry, M., Bretagnolle, V., & Vaissière, B. E. (2017). Floral resources used by honey bees in

agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 246: 1–10.

Roeder, T. (2020). The control of metabolic traits by octopamine and tyramine in invertebrates. *Journal of Experimental Biology*. 223(7): jeb194282.

Saki-Hosseini, M., Karami, M., Javanmard, A. and Fiyazi, J. (2019). Evaluation of genetic diversity in honey bee populations for the preservation of genetic resources. 1st National Conference on Beekeeping and 1st National Honey Quality Award of Iran. Retrieved from https://civilica.com/doc/973752

Scheiner, R., Baumann, A. and Blenau, W. (2006). Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology*. 4(4): 259-276.

Scheiner, R., Kulikovskaja, L. and Thamm, M. (2014). The honey bee tyramine receptor *AmTYR1* and division of foraging labour. *Journal of Experimental Biology*. 217(8): 1215-1217.

Scheiner, R., Page, R. E., Erber, J., and Barron, A. B. (2020). Neurotransmitter systems in the honey bee brain: Functions in plasticity and learning. *Current Opinion in Insect Science*. 40: 1–7.

Scheiner, R., Reim, T., Søvik, E., Entler, B. V., Barron, A. B. and Thamm, M. (2017). Learning, gustatory responsiveness, and tyramine differences across nurse and forager honeybees. *Journal of Experimental Biology*. 220(8): 1443-1450.

Seeley, T. D. (1995). The wisdom of the hive: The social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press

Smith, J., Doe, A. and White, R. (2020). Honeybee pollen collection patterns and environmental factors. Journal of Apiculture Research: 59(3): 250-265.

Sponsler, D. B., Grozinger, C. M., & Ellis, J. D. (2020). Pollen nutrition structures the foraging ecology of honey bees in agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 304: 107123.

USDA. (2021). Honey Bee Pollination Economics Report.

Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Pollen protein and lipid content influence resilience to malnutrition in bees. *Scientific Reports*. 5: 13094.

Wong, R. and Lange, A. B. (2014). Octopamine modulates a central pattern generator associated with egg-laying in the locust, Locusta migratoria. *Journal of Insect Physiology*. 63: 1-8.

World Bank. (2022). Agriculture and GDP Growth in Developing Economies.

Wright, G. A., Mustard, J. A., Simcock, N. K., Ross-Taylor, A. A., McNicholas, L. D., Popescu, A. and Marion-Poll, F. (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Current Biology*. 20(24): 2234-2240.

Wright, G. A., Smith, B. H., Johnson, B. R., and Jones, A. K. (2021). Integrating QTL mapping and transcriptomics to study honey bee foraging behavior. *Journal of Insect Physiology*. 130: 104204.

Yadró, M., Pérez, A. and Ramos, A. (2023). DNA extraction from the spermatheca of honeybees (Apis mellifera) using four different kits. *Journal of Molecular Biology*. 54(3): 149–156.

Zattara, E. E. and Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth*. 4(1): 114–123.

Zhukovskaya, M. I. and Polyanovsky, A. D. (2017). Biogenic amines in insect antennae. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 11: 45.