بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل

(Apis mellifera L.) شهرستان جیرفت با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

عطاالله رحیمی : دانشجوی دکتری حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Rahimi.ata.1@gmail.com
مهدیه اسدی : استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شهیدباهنر، کرمان
روح الله عبدالشاهی : استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شهیدباهنر، کرمان

چکیده

جهـت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل، ۵۰ زنبورکارگـر از دو زنبورستان در مناطق مختلف شهرستان جیرفت بـا استفـاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت.DNA ژنومـی استخراج شده از ۵۰ زنبورکارگر، با استفاده از ۵ جفـت آغازگر ریزماهواره، تحت واکنـش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفت و محصولات این واکنش‌هـا روی ژل پلی‌آکریلامید غیر واسرشته‌سـاز، الکتروفـورز شدند. در مجموع، ۲۱ آلل چندشکل مشاهده گردید. میانگین اطلاعـات چندشکلی (PIC) زنبورهای عسل این شهرستان، ۰/۵۷۲۸ محاسبـه شـد. نشانگر A۷ بیشترین (۳۱٪) و نشانگرهای A۲۸، A۴۳ کمترین(۱۲٪) مقـدار PIC را در جمعیت‌های این شهرستان نشان دادنـد. بیشتریـن و کمترین تعداد آلل بـه ترتیب در جایگاه‌هایژنـی A۷ و A۲۸، A۴۳ مشاهده شد. تمامی جایگاه‌ها انحـراف معنی‌داری از تعادل هـاردی واینبـرگ نشان دادند. میانگین تنوع ژنی‌نـی($\bar{H}$) و شاخص اطلاعاتی شانون نیز به ترتیـب (۰/۲۹۴۲) و (۰/۴۶۰۱) محاسبه گردید. بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در بین ۵ جایگاه متعلق به جایگاه‌ژنی A۷ (۶ آلل) و کمترین آن متعلق به جایگاه‌هایژنی A۲۸ و A۴۳ (۳ آلل) بود. دامنه هتروزیگوسیتی برای این جایگاه‌ها در جمعیت‌های زنبورعسل دو زنبورستان تحت مطالعه بین(۰/۴۸۹) در جایگاه‌های A۲۸ تا (۰/۷۴۰) در جایگاه‌ژنی A۷ متغییـر بـود. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفـاده از ماتریس تشابه محاسبه و دندروگرام حاصل با استفاده از روش UPGMA ترسیم گردیـد. نتایـج ایـن تحقیق نشان داد که با وجود عدم شباهت بین دو زنبورستان از نظر جغرافیایی، تنوع پایینی بین افراد وجود داشت. تشابه ژنتیکی بیـن جمعیت‌های زنبورعسل دو زنبورستان مورد مطالعـه در این تحقیق، می تواند ناشی از مهاجرت، داشتن قشلاق - ییلاق مشترک و تلاقی زنبورها از نقاط مختلف این شهرستان را با هم دانست.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، دو زنبورستان، جیرفت، جنوب ایران

مقدمه

زنبورعسل یکی از مهمترین حشرات اجتماعی شناخته شده در جهان می‌باشد که نقش مهمی در زمینه کشاورزی و پزشکی دارد(Alburaki et al., 2008). از بین ۹ گونه زنبورعسل گزارش شده در دنیا، سه گونه (زنبورعسل کوچولو، زنبورعسل بزرگ و زنبورعسل اروپایی) از ایران گزارش شده است(Trouve et al., 2000). سیستم تولید مثلی زنبورعسل مانند بسیاری از حشرات اجتماعی از نوع پلی‌اندری[1] است. یعنی هر ملکه با چندین زنبور نر جفت‌گیری می کند(Charlesworth, 2004). زمانی که در داخل یک نژاد تلاقی‌های مکرر با درصد خویشاوندی بالا انجام شود پس از مدتی تنوع ژنتیکی در داخل کلنی کاهش و آثار نامطلوب آن به تدریج ظاهر می شود. بنابراین حفظ تنوع ژنتیکی در این حشره اهمیت زیادی داشته و در واقع ضامن بقای کلنی‌های زنبورعسل و صنعت زنبورداری می‌باشد(Tarpy, 2003). اگرچه آنالیزهای مورفولوژیکی در جدا کردن جمعیت‌ها از یکدیگر بسیار قدرتمند است با این وجود ویژگی‌های مورفولوژیکی چندین ایراد از جمله عدم تعیین فیلوژنتیک زنبورهای عسل و تاثیرپذیری از محیط را دارا می‌باشند. امروزه نشانگرهای مولکولی DNA به عنوان ابزاری مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم و تعیین مکان‌های مقاومت به بیماری و تنش‌های محیطی و هم چنین رابطه بین گونه‌های وحشی و نژادهای اصلاح شده در حشرات استفاده می‌شود.

در این میان، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چندشکلی بالا(Condon et al., 2008)، توارث پذیری، همبارز بودن، توزیع آن در سراسر ژنوم و فراوانی در حشرات، نشانگرهای ایده‌آلی برای دامنه وسیعی از کاربردها از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گزینش به کمک نشانگر، مطالعات جمعیت و تکاملی، انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌نامه‌ها و مشخص کردن میزان تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم هستند(Kolliker et al., 2001; Bassam et al., 1993).

امروزه بحث‌هایی در مورد مدیریت ذخایر ژنتیکی حشرات اقتصادی درسطح جهانی و بین‌المللی شروع شده است این بحث‌ها عموماً بر روی استراتژی حفظ نژادهای کمیاب متمرکز شده است. از آنجا که ضرورت ارزیابی و حفظ منابع ژنتیکی به طور گسترده در بیشتر کشورها مورد توجه قرار گرفته است، حفظ توده‌های زنبورعسل بومی ایران سزاوار توجه جدی و فوری است.(Farshineh Adl et al., 2007)توفیق برنامه‌های اصلاح نژادی بستگی به میزان تنوع موجود در جمعیت دارد و فقدان تنوع، قدرت انتخاب‌های ژنتیکی را محدود می‌سازد. شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده و به نتیجه رسیدن در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت تولید بیشتر گردد. با توجه به اینکه نژادهای بومی در هر کشوری به عنوان یک سرمایه ملی و محصول استراتژیک مطرح می‌باشند، حفظ و تکثیر این نژادها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است، چرا که بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و گذر از موانع بسیار و غلبه بر تمامی ناملایمات و شرایط محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازیاد نسل

1. polyandry

Genetic diversity of honey bee (*Apis mellifera L.*) populations using The microsatellite markers in Jiroft

Abstract:

In order to evaluate genetic diversity in fifty worker bees collected from two apiaries of different locations in Jiruft, SSR markers were used. PCR of genomic DNA was done, using five pairs of microsatellite primers. Detection of PCR products was done by use of denatured polyacrylamide gel (l. 21), so we have found the existence of polymorphic alleles between above mentioned worker bees. The results obtained showed us that the mean polymorphism information content (PIC) was 28.57% A7 primer had the highest (31%) and A28 and A43 primers had the lowest PIC value (12%) between worker bees in jiruft. The mean of Nei's gene diversity and Shannon's information index for both populations were 0.2942 and 0.4601, respectively The maximum number of effective alleles belonged to A7 locus with 6 alleles, and the minimum belonged to A28 and A43 loci with three alleles.All the loci showed a significant difference from Hardy-weinberg equilibrium In one of the two populations, heterozygosity ranged from 0.489 at A28 locus to 0.740 at A7 locus. Genetic similarity was calculated using the similarity matrix, and dendrogram was drawn using UPGMA. The results of this research showed us that there are similarities between two ecotypes and low variations within each of the two populations, we conclude that the practices of summer-winter displacements of hives,by beekeepers from Jiruft to other regions plus intercross between bees of different apiaries inside Jiruft as factors and causes to be blamed.

Key words: microsatellite markers, Genetic diversity, two apiaries, Jiruft,South Iran.

نام آغازگر	توالی آغازگر	
	Forward	Reverse
A_{113}	5′GCAACAGGCGGGTTAGAG3′	5′CAGGATAGGGTAGGTAAGAG3′
B_{124}	5′GCAACAGGGGGGTTAGAG3′	5′CAGGATAGGGTAGGTAAGAG3′
A_{43}	5′CACCGAAACAAGATGCAAG3′	5′CCGCTCATTAAGATACTCCG3′
A_{28}	5′GAAGAGCGTTGGGTTGCAGG3′	5′GCCGTTCATGGTTACCACG3′
A_{7}	5′GTTAGTGCCCTCCTCCTTGC3′	5′CCCTTCCTCTTTCATCTTCC3′

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام جایگاه	A۷	A۲۸	A۴۳	A۱۱۳	A۱۲۴
دمای اتصال(درجه سانتی گراد)	۵۸	۵۸	۵۹	۵۹	۵۵

جدول ۲: دمای اتصال بهینه برای ۵ آغازگر مورد مطالعه

پرداخته‌اند. اندازه‌گیـری فاصله ژنتیکی در جمعیت‌های حشرات، اطلاعاتی را در مـورد خصوصیات نژادی ارائه می‌دهد و به حفظ نژادهای بومی کمک خواهد کـرد (Goldstein & Schlitterer, 2000). تینگ جی و همکارن[1] (۲۰۱۱) شش جمعیت زنبورعسل را در شرق چین با استفاده از ۲۱ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند، نتایج حاصله از این مطالعه نشان دادکه تنوع ژنتیکی بدست آمده برای زنبورهای این منطقه بالا، ولی فاصله ژنتیکی آنها نسبتا پایین بود و کلیه جمعیت‌ها تشکیل یک خوشه را دادند. موسوی (۱۳۸۹) تنوع موجود در درون و بین جمعیت‌های زنبورعسل استان گیلان و مازنـدران را بـا استفاده از شش جایگاه ژنـی ریزماهواره (A۱۱۳, A۷۶, A۴۳, A۲۹, A۲۸, A۲۴) مـورد بررسی قـرار داد. وی گزارش کرد که از بین جایگاه‌های مـورد مطالعه، جایگاه A۱۱۳ دارای بیشترین و جایگاهای A۲۹ و A۲۴ دارای کمتریـن تعداد آلل، و میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده و موثر در جمعیت مازندران بیشتر از جمعیت گیلان بود.

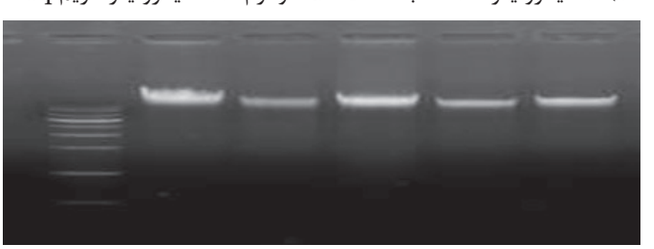
بـا توجه به این کـه منابع ژنتیکی هر کشـور ازگران‌بهاترین میراث‌های طبیعـی آن کشـور محسوب می شود و براساس آمـار منتشر شده در سال ۱۳۹۰، بـا توجه به راندمان پایین صنعت زنبورداری در ایران (متوسط ۹/۸ کیلوگرم) عسل برای هـر کندو(آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۰) در مقایسه بـا متوسط جهانی میـزان برداشت عسل از هر کندو (۱۵ تا ۱۷ کیلوگرم) و برداشـت متوسط ۶۰-۳۰ کیلوگرم عسـل از هر کندو در کشورهای چین، کانـادا و آلمان(سایت زنبور عسل ایران)، حفظ و نگهداری گنجینه ژنتیکی ایـن نژاد ارزشمنـد در درجه اول و اصلاح و مدیریـت ژنتیک آن در درجه دوم از اقدامـات اساسی و مهم در جهت پیشرفـت صنعت زنبوداری کشور محسـوب می‌شود. بـرای رسیدن به این اهداف اولیـن قدم مشخص کردن وضعیـت ژنتیکی توده‌های زنبورعسل درکشور اسـت تا بر اساس نتایج آن بتـوان در اقدامات بعدی برای اصـلاح نژاد این نژاد ایرانـی و جلوگیری از تغییـر صفات مطلـوب آن تصمیم‌گیری و چاره اندیشی کـرد. بنابراین، در این تحقیق تنوع ژنتیکی زنبورعسل شهرستان جیرفت برای اولین بار مورد بررسـی قرار گرفت تا بتوان با شناخت خصوصیات زیرجمعیت‌های این نژاد در این منطقه به اطلاعات موجود در خصوص ویژگی‌ها و وضعیت نژاد ایرانی در کشور افزود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌بـرداری :در تحقیق حاضر جهت بررسـی تنوع ژنتیکی زنبورهای عسـل شهرستان جیرفـت نمونه‌برداری از ۲ زنبورستـان دارای ۳۰۰ کلنی در تابستـان ۱۳۸۹ انجـام شد بدین ترتیب از هـر زنبورستان ۲۵ کندو به طورکامـلا تصادفی انتخـاب و از هر کندو ۱ زنبور کارگـر از روی قاب‌های حـاوی تخـم و لارو برداشته و به داخل لوله‌های مـک کارتی حاوی اتانول مطلق بود منتقل و در آزمایشگاه در داخل یخچال تا موقع استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA: استخراج DNA با روش بهینه یافته Salting-Out (Miller et al, 1988) انجـام شد. بـرای بررسی کمیت وکیفیت DNA از دستگـاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱٪ (شکـل ۱) استفاده شد. میزان جذب نـور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتـر اندازه گیری و از نسبت OD۲۶۰/OD۲۸۰ برای بررسی کیفیت DNA استفاده شد و همچنین از ژل آگـارز ۱٪ برای تایید نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. غلظت DNA مورد استفاده در PCR، ۵۰ نانوگرم بود.

غلظت مـواد PCR: ۲/۵ میکرولیتر بافـرX ۱۰PCR، ۱/۵ میکرولیتر بافر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدها(۱۰ میلی مـولار)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی(pmol/µl ۱۰)، ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq



شکل ۱: کیفیت *DNA* استخراج شده روی ژل آگارز، پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

1. Tong Ji et al

نام آغازگر	جایگاه ژنی	PIC	PI	D
Primer ۱	A۷	۰/۳۱	۰/۰۲۸	۰/۵۷۳
Primer ۲	A۲۸	۰/۱۲	۰/۴۳۷	۰/۲۴۵
Primer ۳	A۴۳	۰/۱۲	۰/۴۱۳۷	۰/۲۴۵
Primer ۴	A۱۱۳	۰/۲۱	۰/۱۳۷	۰/۴۱۲
Primer ۵	A۱۲۴	۰/۱۹	۰/۲۴۳/	۰/۳۸۷

جدول ۳: تعداد آلل و مقادیر PIC محاسبه شده برای هر آغازگر ریزماهواره در جمعیت زنبورعسل شهرستان جیرفت

DNA- پلی‌مراز(unit/µl ۵) و با آب مقطر استریل حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

برنامه PCR: انجام واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلرمدل T-Gradient ساخت شرکت Biometra و Eppendorf انجام گردید. مناسب‌ترین چرخه حرارتی برای تمامی آغازگرها به صورت غیر واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۷ چرخه غیر واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها طبق دمای جدول ۲ به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه به دست آمد.

DNA استخراج شده با ۵ جفت آغازگر SSR که توالی آن‌ها از بانک‌های اطلاعاتی به دست آمده بود تکثیر شدند(جدول ۱). فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل پلی‌آکریلامید غیر واسرشته ساز ۸٪ بارگذاری و الکتروفورز شده و نوارهای حاصل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها

پس از رنگ‌آمیزی، امتیازبندی باندها بصورت صفر(عدم وجود باند) و یک (وجود باند) و روش الفبای انگلیسی صورت گرفت. سودمندی یک نشانگر ژنتیکی به تعداد و فراوانی آلل‌ها مربوط می‌شود که در این مطالعه برای هر نشانگر مشخص شد. از معیارهای مهم سودمندی نشانگرها، محتوی اطلاعاتی چندشکلی (PIC)، احتمال یکسانی (PI) و قدرت تفکیک هر نشانگر (D) می‌باشد.

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از امتیاز دهی باندها از چند نرم افزار استفاده شد. اطلاعات بدست آمده از روش امتیاز بندی صفر و یک و الفبای انگلیسی وارد نرم افزار POPGENE (v. 1.31) شدند. برای بدست آوردن اندازه باندها از نرم افزار AlphaEaseFC و برای محاسبه تعادل هاردی واینبرگ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزایگوسیتی مورد انتظار، تعداد آلل موثر و تعداد آلل مشاهده شده، شاخص اطلاعات شانن، تنوع ژنی‌نی و فاصله ژنتیکی از نرم افزار POPGENE (v. 1.31) (Yeh et al., 1997) و برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار NTSYS (v. 2.02) (Roelfs et al ., 1988) استفاده شد.

نتایج و بحث

کیفیت و کیمیت DNA، با استفاده از ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت که از شرایط مطلوبی برای انجام PCR بر خوردار بود و هیچگونه آلودگی مشاهده نشد.

در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل شهرستان جیرفت با استفاده از ۵ جفت آغازگر، در مجموع ۲۱آلل چندشکل مشاهده گردید. با استفاده از فراوانی آللی، آمار PIC، PI و D برای هر آغازگر، به طور جداگانه محاسبه گردید، که نتایج در جدول ۳ ذکرشده است. نشانگر A۷ دارای بیشترین مقدار PIC (۳۱٪) و نشانگرهای A۲۸ , A۴۳ دارای کمترین مقدار PIC برای جمعیت‌های زنبورعسل این شهرستان (۱۲٪) بودند. بنابراین نشانگر A۷ با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر نشانگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. براساس نتایج برخی آزمایش‌ها، میزان PIC متفاوت بوده و نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد(Ozdil et al., 2009) . میزان PIC به عواملی مانند تعداد آلل هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شونده (که همبستگی مثبتی با میزان چندشکلی دارد) و طول توالی تکراری وابسته است .(Maudet et al., 2002)

در این بررسی بیشترین و کمترین محدوده اندازه باند به ترتیب در جایگاه ژنی A۱۱۳ (168-291bp) و در جایگاه‌ژنیA۷ (105-191bp) مشاهده گردید، بیشترین و کمترین تعداد آلل به ترتیب در جایگاه‌های‌ژنی A۷ و A۴۳،A۲۸ مشاهده شد(جدول ۴). همچنین میانگین تعداد آلل بالا در جایگاه ژنی A۷ توسط (Estoup et al., 1995; Delarua et al., 2003; Kandemir et al., 2006) و کمترین میانگین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه A۲۸ و A۴۳ (Delarua et al., 2003; Kandemir et al., 2006) گزارش کردند. محدوده اندازه باندهای بدست آمده در این تحقیق، با نتایج مطالعات ., Estoup et al., 1995; Delarua et al 2002; Chalin & Macavoy, 2002; Delarua et al ., 2003)، (رویان، ۱۳۸۳) و (موسوی، ۱۳۸۹) مطابقت کامل نداشت. مقایسه تعداد آلل و دامنه اندازه باندهای حاصل از این مطالعه با مطالعات قبلی نشان می‌دهد که جمعیت‌های زنبورعسل این شهرستان آلل‌های جدیدی را در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه دارا می‌باشند و برخی از آلل‌هایی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نگردید. تعادل هاردی _ واینبرگ تنها در جوامعی صادق است که شرایطی چون تعداد

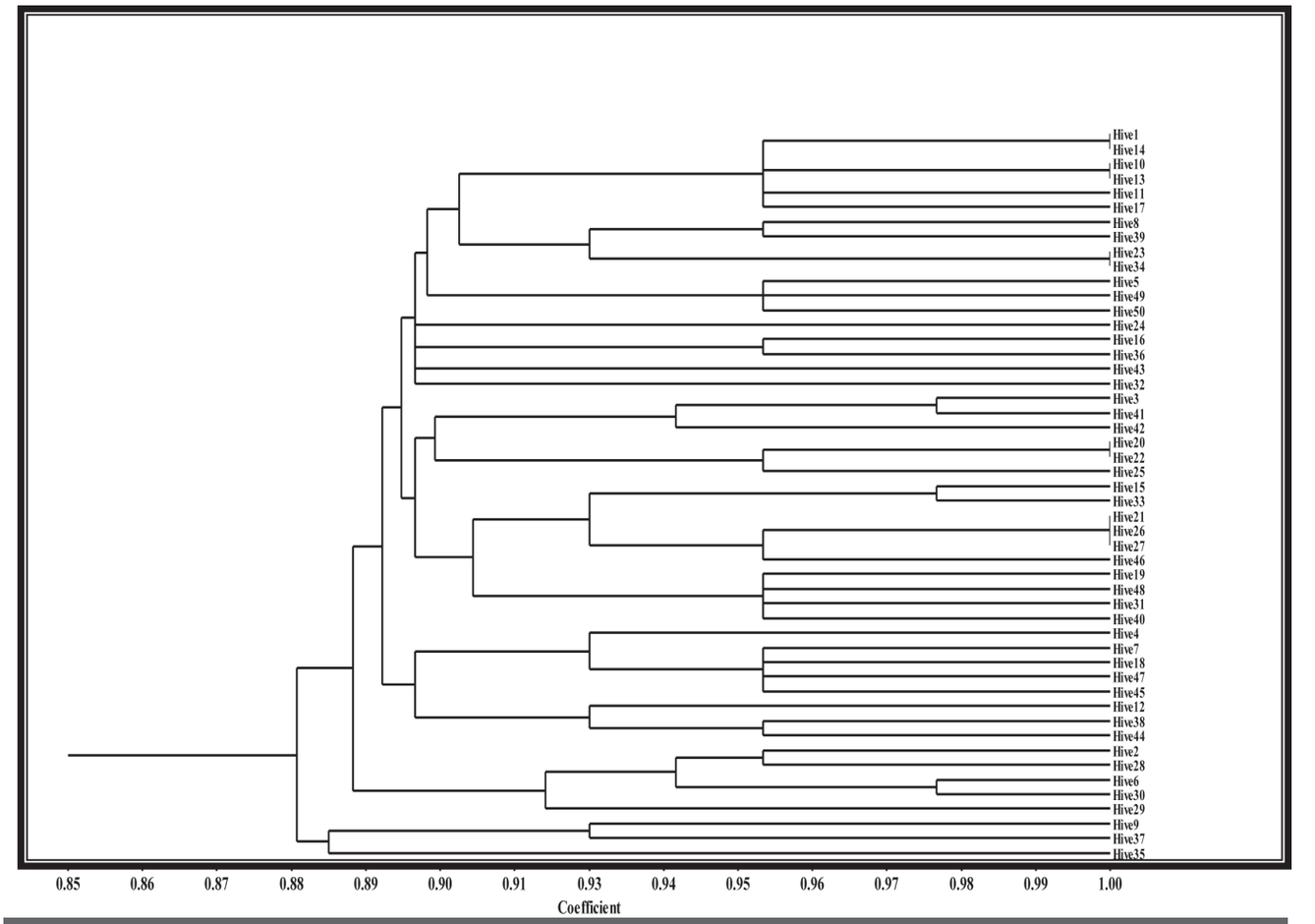
مکان ژنی	اندازه باند	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل موثر	شاخص اطلاعاتی شانون	تنوع ژنی‌نی(H)	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
A۷	۱۹۱-۱۰۵	۶	۱//۳۶۲۰	۰/۵۱۸۰	۰/۳۴۷۰	۰/۳۸۰	۰/۷۴۰
A۲۸	۱۹۷-۱۱۳	۳	۱/۴۷۳۷	۰/۳۵۰۳	۰/۲۵۹۸	۰/۲۲۰	۰/۴۸۹
A۴۳	۱۶۶-۱۲۲	۳	۱/۵۵۲۲	۰/۴۴۶۱	۰/۲۶۵۱	۰/۲۲۰	۰/۴۹۹
A۱۱۳	۲۹۱-۱۶۸	۵	۱/۵۹۷۸	۰/۴۸۷۷	۰/۳۲۲۶	۰/۳۴۰	۰/۷۱۵
A۱۲۴	۲۰۵-۱۶۲	۴	۱/۳۷۶۸	۰/۴۳۰۷	۰/۲۸۵۱	۰/۱۰۰	۰/۵۸۸
میانگین	-	۴/۲	۱/۴۶۴۵	۰/۴۶۰۱	۰/۲۹۴۲	۰/۲۵۲	۰/۶۱۴
انحراف معیار	-	۰/۲۲	۰/۱۶	۰/۱۵۳۰	۰/۳۱۲۸	۰/۱۱۱	۰/۱۲۸

جدول ۴- نتایج حاصل از تجزیه آماری به وسیله نرم افزار Popgene (v. 1.31)

افـراد جمعیت بـالا، جمعیت بسته، جفت‌گیری تصادفـی و احتمال جهش بسیـار کم در آنها حاکم باشند. تمامـی جایگاه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمـون (X^2) و (G^2) انحـراف معنی‌داری از تعـادل هاردی ـ واینبرگ را نشـان دادنـد. علت این انحرافـات را می‌توان به مهاجـرت، آمیزش‌های غیرتصادفـی، ورود ملکه‌های جدید و همچنین انتخاب ملکه توسط پرورش دهندگـان زنبورعسل و محدود بودن تعـداد نمونه‌های بررسی شده در این مطالعـه نسبـت داد. (Estoup et al., 1995; Garnery et al., 1998; Sittipraneed et al., 2001; Delarua et al ., 2002; Delarua et al ., 2003; Jabari Farhoud et al., 2006)، (رویـان، ۱۳۸۳)، (خدرزاده، ۱۳۸۶) و (موسوی، ۱۳۸۹) نیز چنین انحرافاتی از تعادل هادری ـ واینبرگ را گـزارش نمودند. همانطوری‌که مشاهده شد تمـام اندازه‌های آلل موثر از تعـداد آلل واقعی کمتر است. بیشترین تعـداد آلل واقعی در بین ۵ جایگاه متعلـق به جایگاه A۷ (۶ آلل) و کمتریـن آن مربوط به جایگاه‌های A۲۸ و A۴۳ (۳ آلـل) می‌باشـد. بیشترین و کمترین تعـداد آلل موثر به ترتیب مربـوط به جایگاه‌های ژنی A۷و A۲۸، A۴۳ بود. زیاد بودن مقادیر تعداد آلـل موثر و واقعی در جایگاه‌ژنـی A۷ را می‌توان به انحراف معیار زیاد بین فراوانـی آلل‌هـای مختلف در این جایگاه نسبـت داد. تفاوت‌های زیادی در رابطـه با تعـداد آلل و مقادیر PIC- value بیـن مطالعات قبلی و مطالعه حاضر مشاهده شد، این تفاوت را نمی‌توان با دلایل خاصی تفسیر نمود، چرا که از سویی روش‌های مطالعه در تحقیقات مختلف متفاوت است و از سویی دیگـر به دلیل اینکه با ریزماهواره‌هـا سر و کار داریم وجود چندشکلی زیاد در این نشانگرها بعید نیست. همچنین تفاوت‌ها و شباهت‌های گزارش شده در مطالعات مختلـف نیز بدلیل تفاوت در جمعیت‌های مورد بررسی بوده و تفـاوت در تعـداد و نوع آلل‌های حاصل از مطالعـات مختلف کاملا طبیعی می‌باشـد. لذا ارزش‌های PIC بایستی بـرای هر مطالعه، محاسبه و گزارش گـردد و مقادیر مربوطه خاص آن مطالعـه می‌باشند، ولی از مطالعات قبلی می‌توان به‌عنوان راهنمایی برای انتخاب جایگاه‌های دارای چندشکلی بالا و مفید برای مطالعات شجره‌ای مد نظر سود برد.

یکـی از رایج‌ترین دستاوردهای نشانگرهـای مولکولی برای ارزیابی تنوع آللـی، هتروزایگوسیتـی می‌باشد. مقادیـر هتروزایگوسیتی مـورد انتظار و مشاهده شـده در جایگاه‌های مختلف در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به اطلاعات جدول ۴ بیشترین و کمترین میزان هتروزایگوسیتی مورد انتظار، به ترتیب مربوط به جایگاه‌های ژنی A۷ (۰/۷۴۰) و A۴۳ (۰/۵۸۸) می‌باشد. نتایج حاکی از آن است که در جایگاه‌های با تعداد آلل بیشتر، میزان هتروزایگوسیتی بیشتری دیده می‌شود. تنوع درون جمعیتی برای جمعیت مـورد نظر ۰/۲۴ محاسبه شد که این مقدار تنـوع پایین ناشی از همخونی بالا در این جمعیت‌هـا می‌باشد. کندیمر و همکاران[1] (۲۰۰۶) در زنبورهای عسل شمال غربی- شرقی مدیترانه میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده به ترتیـب از (۰/۸۵۷ تا ۰/۲۸۵) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار را (۰/۹۱۵ ± ۰/۲۵۲) گـزارش کردنـد. رویان (۱۳۸۳) در جمعیت‌هـای شمال ایران میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده را (۰/۲۵۴ ± ۰/۳۲۸) تا (۰/۲۲۹ ± ۰/۵۱۹) گـزارش کردند و عنوان کردند که جمعیت‌های شمال ایران دارای تنوع ژنتیکی پایینـی می‌باشند. موسوی (۱۳۸۹) میانگین هتروزایگوسیتی مشاهـده شده‌ی جمعیت‌های شمال ایـران را ۰/۱۶۴ تا ۰/۲۴۳ و میانگین هتروزایگوسیتـی مورد انتظار را (۰/۷۸۶ تـا ۰/۷۹۹) گزارش کردند و بیان کردنـد جمعیت‌هـای شمال ایـران دارای سطـح پایینی از تنـوع ژنتیکی می‌باشنـد. بیشتریـن و کمترین مقدار شاخص اطلاعاتـی شانون به ترتیب برای جایگاه‌هـای A۷(۰/۵۱۸۰) و A۲۸(۰/۳۵۰۳) محاسبه شد. بیشترین و کمتریـن تنوع ژنی‌نی (H) به ترتیب بـرای جایگاه‌های A۷(۰/۳۴۷۰) و A۲۸(۰/۲۵۹۸) محاسبه شد. وجـود ۶ آلل در جایگاه‌ژنی A۷ و بیشترین

1. Kandermir et al



شکل۲: درخت فیلوژنی ترسیم شده برای زنبورهای عسل شهرستان جیرفت براساس روش UPGMA و ضریب شباهت نی با استفاده از نرم افزار NTSYS

میـــزان شاخص شانون و تنوع ژنی‌نی(H) می‌تواند بیانگر چند شکلی فراوان ایـــن جایگاه باشد و وجود ۳ آلل در جایگاه A۲۸ و کمترین میزان شاخص شانـــون و تنوع ژنی‌نی(H) در این جایگاه می‌تواند بیانگر چند شکلی پایین این جایگاه باشد. بنابراین کمترین و بیشترین میزان شاخص شانون و تنوع ژنی‌نی(H)در این جایگاه‌ها منطقی به نظر می‌رسد و نتایج شاخص اطلاعاتی شانون و تنوع ژنی‌نی(H) نتایج حاصل از هتروزایگوسیتی را تایید می‌کند.

پاییـــن بودن میـــزان هتروزایگوسیتی بدان معناست کـــه این جمعیت‌ها دارای پراکندگـــی ژنـــی کمی هستند و فراوانی ژنـــی آن رو به کاهش است. ایـــن مسئله از تعداد آلل‌هـــای مشاهده شده و میـــزانH (تنوع ژنی‌نی) در جمعیت‌های مـــورد بررسی، به خوبی قابل استنباط است. بنابراین می‌توان گفت که در جمعیت‌های زنبورعسل این شهرستان فراوانی ژنی و تنوع رو به کاهش است و به سمت هموزایگوسیتی پیش می‌رود. با توجه به چندشکلی نسبتاً بالا در جایگاه ژنی A۷ در جمعیت‌های مورد بررسی، این جایگاه برای سایر مطالعات با استفاده از ریزماهواره‌ها توصیه می‌شود. قابل ذکر است که جایگاه‌هایـــی که چنـــد شکلی بیشتری را نشان دادنـــد جهت مطالعات آتی مناسب‌تـــر می‌باشند. با تلفیق نتایج مطالعه حاضر و مطالعات قبلی می‌توان با در دســـت داشتن رکوردهـــا و اطلاعات کمـــی از چندشکلی‌های جایگاه ریزماهـــواره‌ای که تاکنون در ایـــن جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند در جهت شناسایـــی و تعیین محل جایگاه‌های موثر بـــر صفات کمی (QTL) استفاده نمود.

نتایج حاصل از درخت فیلوژنی در شکل (۲) نشان داد که کل زنبورهای عســـل این شهرستـــان با یکدیگر تشکیل یک جمعیـــت را داده و هیچ گونه تقسیم بنـــدی جمعیتی در بین آنها وجود ندارد که این امر نشانگر شباهت زیاد زنبورهای عسل این شهرستان می‌باشد.

در توضیـــح این نتایج باید گفت: در دهه اخیـــر به علت خشکسالی‌های مکـــرر استـــان و کاهش منابع شهد و گرده، تعـــداد کوچ‌ها در برخی مناطق افزایش یافته است. افزایـــش الگوی کوچ‌ها باعث افزایش تداخل جمعیت‌ها می‌شـــود. با توجه به خشکی استان و عدم وجود منابع طبیعی شهد و گرده در اکوسیستم طبیعی بسیاری از مناطق ییلاق-قشلاق این کوچ ها مشترک بـــوده و باعث تداخل بیشتر جمعیت‌ها، تبادل آلل‌ها، کاهش تنوع ژنتیکی و نهایتاً افزایش همخونی می‌شود. خشکسالی‌ها همچنین باعث افزایش تمایل زنبـــورداران شهرستان به استفاده تغذیه کمکـــی (شربت شکر) شده است،

در چنیـــن حالتی زنبورداران مناطق مختلف کلیه کندوهای خود را در یک منطقـــه (دارای اقلیم مناسب) و به صورت همجوار قرار می‌دهند. همجواری ایـــن کندوها و منبع تغذیه‌ای (شربت شکر) در این نواحی نیز باعث تداخل جمعیت و کاهش فاصله ژنتیکی آنها شده است. همچنین به دلیل بالا رفتن هزینه‌های کوچ در سال‌های اخیر زنبورداران تمایل دارند کندوهای خود را فقـــط در سطح استان کوچ دهند، بنابراین عملاً با استان‌های دیگر ارتباطی وجـــود نداشتـــه و خرید و فروش‌ها و تبادل ملکه هـــم فقط در سطح استان انجـــام می‌شـــود. همه این مـــوارد باعث شده است که میـــزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها کاهش یافته و هیچ گونه تقسیم بندی جمعیتی در آنها مشاهده نشود. که در این صورت می تواند زنگ خطری برای زنبورداران این منطقه باشـــد. نتایـــج به دست آمـــده از این تحقیق حاکـــی از آن است که علیرغم کاهـــش شدید ذخایرژنتیکی جمعیت زنبورعسل ایـــن دو زنبورستان، تنوع ژنتیکی هم در حد پایینی قرار دارد، پس امید است جهت حفظ این ذخایر ارزشمنـــد ژنتیکی که امروزه در جهان بسیـــار مطرح می باشند، تدابیری از طـــرف سیستم‌هـــای اجر ایی استـــان اندیشیده شود از طـــرف دیگر به نظر می‌رسد بیش از یک نژاد بومی در منطقه جیرفت وجود ندارد، پس بایستی در جهت حفظ و نگهداری این ذخایر ژنتیکی اقداماتی صورت پذیرد.

سپاسگزاری

نگارندگـــان، از جنـــاب آقـــای دکتر علی‌نقـــی میرمویـــدی دانشیار گروه گیاهپزشکـــی دانشگاه رازی که زحمت ویرایـــش علمی این مقاله را برعهده گرفتنـــد و همچنیـــن از مسئولیـــن گروه گیـــاه پزشکی مخصوصـــاً مسئول آزمایشگاه حشره شناسی و دفع آفات نباتی و گروه بیوتکنولوژی دانشکده‌ی کشـــاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمـــان که امکانات لازم بـــرای انجام این پژوهش فراهم کردند نهایت تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

۱. آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۰، جلد دوم سال ۱۳۹۰.

۲. اخبار زنبورعسل:زنبورداری:پرورش-زنبورعسل:زنبور-عسل/ ///:http 1432/www.mellifera.ir

۳. خـــدرزاده، ص. ۱۳۸۶. بررســـی تنوع ژنتیکـــی و روابط فیلوژنتیکی جمعیت‌هـــای زنبورعسل غـــرب ایران بـــا استفـــاده از نشانگرهای ریزماهـــواره. پایـــان نامه کارشناســـی ارشد علوم دامـــی، دانشکده علـــوم دامی و صنایع غذایـــی، دانشگاه کشـــاورزی و منابع طبیعی ورامین.۱۴۳صفحه.

۴. رویان، م. ۱۳۸۳. بررسی تنـــوع ژنتیکی زنبورهای عسل سه استان گلستـــان، مازندارن و گیلان با استفـــاده از نشانگر ریزماهواره. پایان نامـــه کارشناسی ارشد علـــوم دامی، دانشکده کشـــاورزی، دانشگاه مازندارن. ۸۹ صفحه.

۵. موســـوی، م. ۱۳۸۹. تعیین تنوع ژنتیکـــی جمعیت‌های زنبورعسل استان‌های گیلان و مازندران با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.۱۳۰صفحه.

6. Alburaki M and Alburaki A. 2008. Morphometrical study on Syrian honey bee (*Apis mellifera syriaca*). Emie.J.Food Agric. 20: 89-93

7. Bassam B J and Caetano-Anolles G. 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Applied Biochemistry and Biotechnology. 42: 181-188

8. Chalin N, Ratnieks F LW and Burke F L W. 2002. Anarchy in the UK: Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honey bee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites. Molecular Ecology. 11: 1795 – 1803

9. Charlesworth D. 2004. Sex determination, Balancing Selection in honey bee. Review Article Current Biology. 1: 568 -569

10. Condon F, Charles D, Rasmusson D and Kevin P S. 2008. Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. Crop Science. 48:1027-1036

11. Delarua P, Galiany, P J, Serrano J and Moritz R F A. 2002. Microsatellite analysis of non Migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south _ eastern Spain . Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 40: 164- 168

12. Delarua P, Galian J, Serrano J and Moritz F A. 2003. Genetic structure of Balearic honey bee populations based on microsatellite polymorphism. Genetics

Selection Evolution. 35: 339-350

13. Estoup A, Garnery L, Solignac M and Cornuet J M. 1995. Microsatellite Variation in Honey Bee (*Apis mellifera* L) Populations: Hierarchical Genetic Structure and Test of Infinite Allele and Stepwise Mutation Models. Genetics Socity of America. 140: 679 – 695
14. Farshineh Adl M B, Vasfi Hencer H, Firatli C and Bahreini R. 2007. Morphometric chatacterization of Iranian (*Apis mellifera*), Central Anatolia (*Apis mellifera anatolica*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. Journal of Apicultural Research. 46: 225-231
15. Garnery L, Franck P, Baudry E, Vautrin D, Cornuet J M and Solignac M. 1998. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*) I. mitochondrial DNA. Genetics Selection Evolution. 30: 31-47
16. Goldstein D B and Schltterer C. 2000. Microsatellites evolution and application. Oxfor university press.
17. Jabari Farhoud H and Kence M. 2005. Morphometric and MtDNA analysis in honeybee populations (*Apis mellifera*) of north and northwest Iran. Proceedings of the Balkan scientific conference of biology in Plovdiv (Bulgaria) from 19th tills 21th of May. 594-597
18. Kandemir L, Mexixner M D, Ozkan A and Shappard W S. 2006. Genetic characterization of honey bee (*Apis mellifera cypria*) populations in northern Cyprus. Apidologie. 37: 547–555
19. Kolliker R, Jones E S, Dryton M C, Dupal M P and Forster J M. 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) marker for white clover (*Trifolium repens* L.). Theoretical and Applied Genetics. 102: 416-424
20. Maudet C, Luikart G and Taberlet P. 2002. Genetic diversity and assignment teste among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. Journal Animal science. 80: 942 – 950
21. Miller S A, Dykes D D and Polesky F. 1988. A Simple Salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 16: 12-15
22. Ozdil F, Fakhri B, Meydan H, Yildiz M A and Hall H I. 2009. A microsatellite map of honey bee. Genetics. 149: 2007-2023
23. Roelfs A P, Singh R P and Saari E E. 1988. NTSYS-pc numerical Taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02. Exeter Publications Setauket, New York.
24. Sittioraneed S, Laoaroons S, Klinbubga S and Wongsiri S. 2001. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand: evidence from microsatellite polymorphism. Journal of Apicultural Research. 40: 9-16
25. Tarpy D R. 2003. Genetic diversity within honey bee colonies prevents sever infections and promotes colony growth, proc. Proceedings of the Royal Society of London. 4: 99-103
26. Tong Ji L, Ling Y and Guohong C. 2011. Genetic diversity and population structure of Chiese honeybee *(Apis mellifera)* under microsatellite markers. African Journal of biotechnology. 10: 1712-1720
27. Trouve S, Degen L, Meuntien C, Tirads C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Goudet J F and Renaud F. 2000. Microsatelltes in the hermaphroditic snail,*Lymnaea truncatula*,intermediate host of the liver fluke,*Fasiola hepatica*. Molecular ecology. 9: 1661-1686
28. Yeh F C, Yang R C, Boyil T B J and Mao J X. 1997. POPGENE, th Uswe-friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta.