



مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشان‌گرهای ISSR

یاسر بهادر^۱، محمدرضا محمدآبادی^۲، امین خضری^۳، مهدیه اسدی^۳ و لیلا مدحتی^۴

۱- ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- دانشیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، (نویسنده مسؤل: mmohammadabadi@yahoo.com)
۴- کارشناس اداره استاندارد و تحقیقات کبکلیویه و بویراحمد
تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی در جمعیت زنبورهای استان کرمان با استفاده از دو آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این طرح از ۳۰ زنبور در شش جمعیت (کرمان، جیرفت، راین، رابر، بردسیر و فلو) نمونه‌برداری شد. با استفاده از آغازگرهای (AC)₈G و (AGAC)₄GC تعداد ۱۶ قطعه DNA تکثیر شد که همه چند شکل بودند. تعداد قطعات تولید شده در پروفایل‌های DNA شهرهای مختلف از دو تا هشت قطعه، با اندازه‌هایی که از ۱۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز متغیر بود تغییر می‌کرد. میانگین شاخص شانون بر اساس نشانگر (AC)₈G برای جمعیت زنبور عسل جیرفت، کرمان، فلو (زنبور بومی جیرفت)، راین، رابر و بردسیر به ترتیب ۰/۵۲، ۰/۳۶، ۰/۵۰، ۰/۶۱، ۰/۴۲ و ۰/۱۹ در نظر گرفته شد و بر اساس نشانگر (AGAC)₄GC برای جمعیت زنبور عسل جیرفت، کرمان، فلو (زنبور بومی جیرفت)، راین، رابر و بردسیر به ترتیب ۰/۵۲، ۰/۵۱، ۰/۴۶، ۰/۳۹، ۰/۴۱ و ۰/۲۷ بود. آنالیز خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA انجام شد. دندروگرام رابطه ژنتیکی بین ۳۰ فرد در ۶ جمعیت به دست آمد. هاپلوتیپ‌ها محاسبه شد و فراوانی‌ها در هر جمعیت مقایسه شد. براساس نتایج کلیه معیارهای ژنتیکی انجام شده در این بررسی، می‌توان نتیجه گرفت که توده‌های زنبور عسل این استان دارای تنوع بوده، ولی این تنوع ژنتیکی متوسط است. هم‌چنین نتایج این پژوهش می‌تواند اطلاعات ملکولی پایه‌ای برای مطالعه بیشتر زنبورهای عسل بومی با نشان‌گرهای ISSR را فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: نشان‌گرهای ISSR، زنبور عسل بومی، چندشکلی، دندروگرام UPGMA، هاپلوتیپ

مقدمه

زنبور جانوری متعلق به دسته حشرات و از راسته پرده بالان است. بر خلاف اکثر موجودات زنده تعیین جنسیت در زنبور عسل به وسیله آلل‌های جنسی^۱ متفاوت (بیش از ۲۰ آلل) صورت می‌گیرد. تخم‌های تلقیح شده (2n) با دو آلل جنسی متفاوت به افراد ماده (ملکه و کارگر) و تخم‌های تلقیح نشده (n) به نر تبدیل می‌شوند. از تخم‌های تلقیح شده با دو آلل جنسی یکسان افراد نر دیپلوئیدی متولد می‌شوند که به دلیل عدم انجام نقشی مهم در آینده کنندو توسط کارگران حذف می‌شوند به این پدیده هموزیگوتی آلل‌های جنسی یا هم‌خونی^۲ می‌گویند که در واقع حاصل کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت است (۷). با بالا رفتن درصد هم‌خونی جمعیت زنبور عسل در مدت زمان کوتاهی دچار آسیب و کاهش نسل تا ۵۰ درصد می‌شود (۱). کاهش تنوع ژنتیکی در کندوهای زنبور عسل هم‌چنین باعث کاهش یا عدم مقاومت زنبورها در مقابل آفات و بیماری‌های مختلف کندو می‌شود. تارپی و همکاران (۸) ثابت کردند کندوهایی که دارای تنوع ژنتیکی بیشتری هستند در مقابل قارچ بیماری‌زای *Ascophaera apis* مقاومت بیشتری داشته و تلفات کمتری داده‌اند. این موضوع در مورد مقاومت

زنبورها به کنه واروا که یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین آفات کندو در دنیا و کشور ما می‌باشد نیز توسط ریندر و همکاران (۶) اثبات شد. از بین هفت زیر گونه زنبور که در خاورمیانه زندگی می‌کنند یک زیر گونه در ایران وجود دارد که نام علمی آن *Apis mellifera meda* می‌باشد. از نشان‌گرهای بین ریزماهواری (بین توالی‌های تکراری ساده)^۳ یا ISSR برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ استفاده شد (۱۲). نشانگرهای بین ریزماهواری واحدهای تکراری (۴ تا ۱۲ واحد تکراری) هستند و در یک انتهایشان دو تا چهار نوکلئوتید اختیاری (که anchor نامیده می‌شود) دارند. چنین پرایمرهایی امکان می‌دهند قطعاتی از DNA را تکثیر کنیم که بین دو توالی ریزماهواری به اندازه کافی نزدیک قرار گرفته‌اند (که معمولاً DNA منحصر به فرد است و در جای دیگری وجود ندارد) (۲). در نتیجه تعداد زیادی قطعه تکثیر می‌شوند که در الکتروفورگرام به صورت باندهای مجزایی دیده می‌شوند. الگوهای محصولات PCR به دست آمده برای هر گونه اختصاصی هستند (۴،۳). نشانگرهای ISSR جز نشانگرهای با توارث غالبیت هستند و چندشکلی آن‌ها با وجود و یا عدم وجود باند تست می‌شود. مشابه با RAPD و AFLP برای ساخت نشانگرهای ISSR نیازی

1- Sex Alleles

2- Inbreeding

3- Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

۹۴ درجه سلسیوس با یک چرخه تکرار، انجام سه گامه زیر با ۳۵ چرخه تکرار شامل تک رشته‌ای شدن DNA به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۵۵ درجه سلسیوس، بسط آغازگر به مدت ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس، سنتز نهایی به مدت ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس با یک چرخه تکرار. پس از تکمیل چرخه‌های دستگاه، نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج شده و در دمای 4°C نگهداری شدند. سپس فرآورده‌های تکثیر شده روی ژل آگارز با غلظت ۱٪ الکتروفورز شد. ژل به مدت ده دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (۱۰۲g/ml) رنگ‌آمیزی شد. سپس ژل را روی دستگاه U.V Transluminator قرار داده و پس از مشاهده باندها در زیر نور ماوراء بنفش از ژل عکس‌برداری شد. الگوی باندهای حاصل از نشانگر ISSR بر اساس وجود یا عدم وجود باند در نمونه‌ها امتیازدهی شد. سپس داده‌ها در نرم‌افزار Excel تنظیم و طبقه‌بندی شدند و با استفاده از نرم‌افزار POPGENE و NTSYS تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

با استفاده از دو آغازگر $(\text{AC})_8\text{G}$ و $(\text{AGAC})_4\text{GC}$ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد و محصولات PCR در ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۱ و ۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد باندهای حاصل (جایگاه‌های مربوط به این نشانگر) برای نشانگر $(\text{AC})_8\text{G}$ خیلی بیشتر از نشانگر $(\text{AGAC})_4\text{GC}$ می‌باشد. برای آغازگر $(\text{AC})_8\text{G}$ تعداد هشت دامنه باندی و برای آغازگر $(\text{AGAC})_4\text{GC}$ نیز تعداد هشت دامنه باندی در نظر گرفته شد که هر دامنه باندی به عنوان یک ژنوتیپ به حساب می‌آید. در مطالعه‌ای که روی زنبورهای لیتوانی با نشانگرهای ISSR انجام شده بود، (۵) برای نشانگر $(\text{AC})_8\text{G}$ تعداد هشت باند مشاهده شده بود که فقط دو باند چندشکل بودند و برای نشانگر $(\text{AGAC})_4\text{GC}$ تعداد هفت باند چند شکل گزارش شده بود. این امر نشان می‌دهد که برای این دو نشانگر جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان چندشکلی بالاتری نسبت به جمعیت زنبورهای لیتوانی دارند، که خود اهمیت آنها را به عنوان یک خزانه ژنتیکی خوب نشان می‌دهد. در جدول‌های (۱ و ۲) فراوانی‌های آلی نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود برای نشانگر $(\text{AC})_8\text{G}$ در کل جمعیت‌ها بیشترین فراوانی آلی مربوط به جایگاه یک به میزان ۰/۸۵ و برای نشانگر $(\text{AGAC})_4\text{GC}$ در کل جمعیت‌ها بیشترین فراوانی آلی مربوط به جایگاه هشت به میزان ۰/۸۸ می‌باشد. شاخص شانون، که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی است با آغازگر $(\text{AC})_8\text{G}$ برای

به دانستن توالی نوکلئوتیدی DNA مورد مطالعه از قبل نیست (۱۰). این روش تکرارپذیری خوبی دارد و همراه با AFLP می‌تواند برای کشف و نمایش تغییرپذیری بین و داخل نژادی و شناسایی گونه‌ها، جمعیت‌ها، لاین‌ها و در موارد زیادی برای تعیین ژنوتیپ فردی به کار رود. نشانگرهای ISSR همچنین می‌توانند برای تعیین نقشه ژنوم و نشان‌گذاری صفات اقتصادی استفاده شوند. تینگ جی و گوئونگ (۹) شش جمعیت زنبور عسل در شرق چین را با استفاده از ۲۱ نشانگر ریزماهوره بررسی کردند. تنوع ژنتیکی به دست آمده برای زنبورهای این منطقه نسبتاً بالا بود ولی فاصله ژنتیکی آنها نسبتاً پایین بود و کلیه جمعیت‌ها تشکیل یک خوشه دادند. جمعیت‌های ایران، به ویژه زنبورهای استان کرمان تاکنون با نشانگرهای ISSR مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، لذا هدف این پژوهش، مطالعه چندشکلی زنبورهای استان کرمان با نشانگرهای ISSR برای اولین بار بود.

مواد و روش‌ها

در این طرح از ۳۰ زنبور در ۶ جمعیت از استان کرمان (از هر جمعیت ۵ نمونه) نمونه‌برداری شد. این جمعیت‌ها شامل جمعیت کرمان، جیرفت، راین، رابر، بردسیر و فلو (بومی جیرفت) بودند. یک زنبور کارگر را از هر کندو به طور تصادفی انتخاب و به درون شیشه‌های مک کارتی که حاوی اتانول ۱۰۰٪ بودند منتقل کرده و برای نگهداری طولانی‌تر در فریز -20°C نگهداری شدند. استخراج DNA از سر و قفسه سینه زنبور کارگر با کیت DIATOM DNA PREP شرکت سینا ژن انجام شد. تعیین غلظت DNA استخراج شده به دو روش بارگیری DNA روی ژل آگارز (۱٪) در کنار DNA λ ، که اندازه آن و طولش مشخص است و استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر از روی جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد.

برای انجام واکنش‌های PCR، مواد مورد استفاده به جز DNA و آب مقطر، به صورت تیوب‌های آماده تجاری بودند که از شرکت ژن فن‌آوران تهیه شدند. در مطالعه‌ای که روی زنبورهای لیتوانی با نشانگرهای ISSR انجام شده بود (۵) تعداد ۱۱ نشانگر ISSR استفاده شده بود که از بین آنها ۲ آغازگری که بیشترین چندشکلی را در زنبورهای عسل نشان داده بودند انتخاب شدند. لذا، الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این پژوهش شامل ۲ آغازگر با توالی $(\text{AC})_8\text{G}$ و $(\text{AGAC})_4\text{GC}$ بود که توسط شرکت فن‌آوری سنتز شد. PCR با استفاده از کیت universal PCR انجام شد. برنامه حرارتی دستگاه PCR شامل: واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت دو دقیقه و دمای

میزان ۰/۱۹ می‌باشد. همچنین بیشترین مقدار این شاخص برای نشان‌گر GC₄(AGAC) در جمعیت جیرفت به میزان ۰/۵۲ و کمترین مقدار شاخص شانون در جمعیت بردسیر به میزان ۰/۲۷ برآورد شد. در پژوهشی که با استفاده از نشان‌گرهای ریزماهواره (SSR) روی زنبورهای عسل استان اردبیل انجام شد (۱۱)، میزان شاخص شانون بین ۰/۶۹ تا یک متغیر بود که نشان‌دهنده تنوع بالای این زنبورها بود.

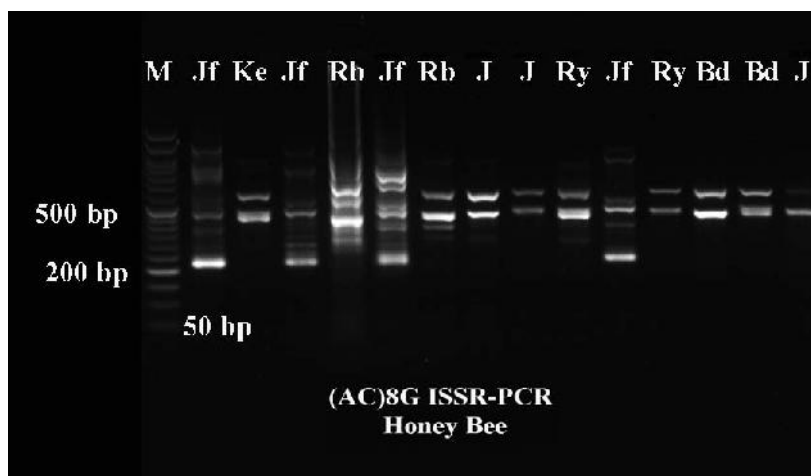
جمعیت‌های بردسیر، رابر، راین، فلو، کرمان و جیرفت به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۴۲، ۰/۶۱، ۰/۵۰، ۰/۳۶ و ۰/۵۱ (جدول ۳) و با آغازگر GC₄(AGAC) برای جمعیت‌های بردسیر، رابر، راین، فلو، کرمان و جیرفت به ترتیب ۰/۲۷، ۰/۴۱، ۰/۳۹، ۰/۴۶، ۰/۵۱ و ۰/۵۲ (جدول ۴) محاسبه شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین مقدار شاخص شانون (I) برای نشان‌گر GC₈(AC) در جمعیت راین به میزان ۰/۶۱ است. کمترین آن در جمعیت بردسیر به

جدول ۱- فراوانی‌های آللی برای آلل‌های ۸ جایگاه نشان‌گر GC₈(AC)

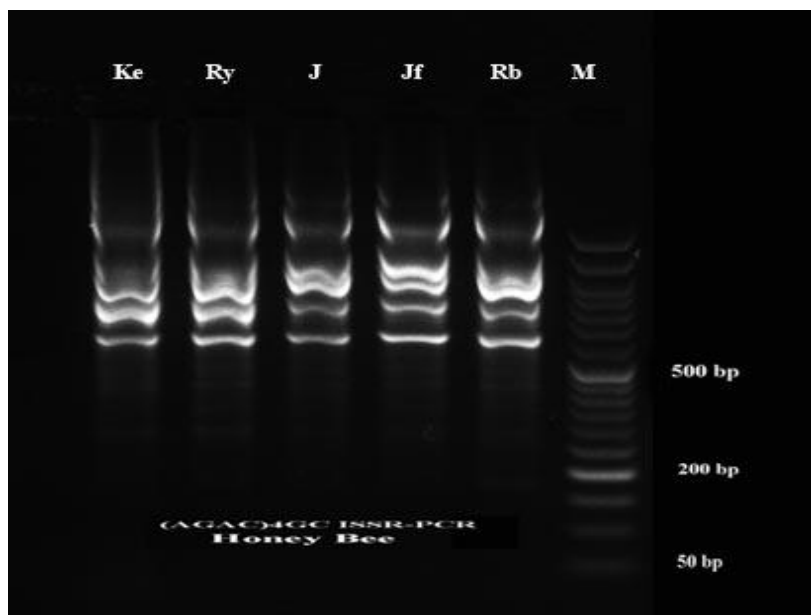
شهرستان	آلل	فراوانی آللی							
		جایگاه ۱	جایگاه ۲	جایگاه ۳	جایگاه ۴	جایگاه ۵	جایگاه ۶	جایگاه ۷	جایگاه ۸
جیرفت	+	۱	۰/۴۵	۰/۶۳	۰/۶۲	۰/۴۵	۰/۴۶	۰/۸۸	۰/۸۹
	-	۰	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۵۵	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۱۱
کرمان	+	۰/۸۹	۰/۹۰	۰/۸۹	۰/۷۷	۰	۰	۰/۶۳	۰/۶۲
	-	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۱	۰/۲۲	۱	۱	۰/۳۷	۰/۳۸
راین	+	۰/۷۷	۰/۷۸	۰/۷۶	۰/۷۷	۰/۴۴	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۴۴
	-	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۵۶	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۵۶
فلو جیرفت	+	۰/۷۷	۰	۰/۴۴	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۸۹	۰/۹۰
	-	۰/۲۳	۱	۰/۵۶	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۱۱	۰/۱۰
رابر	+	۰/۸۹	۰/۴۵	۰/۶۳	۰/۶۴	۰	۰	۰/۴۵	۰/۸۹
	-	۰/۱۱	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۳۶	۱	۱	۰/۵۵	۰/۱۱
بردسیر	+	۰/۷۷	۰	۰/۴۵	۰	۰	۰	۱	۰/۸۹
	-	۰/۲۳	۱	۰/۵۵	۱	۱	۱	۰	۰/۱۱
کل جمعیت‌ها	+	۰/۸۵	۰/۴۳	۰/۶۴	۰/۵۴	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۷۵	۰/۷۸
	-	۰/۱۵	۰/۵۷	۰/۳۶	۰/۴۶	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۲۵	۰/۲۲

جدول ۲- فراوانی‌های آللی برای آلل‌های ۸ جایگاه نشان‌گر GC₄(AGAC)

شهرستان	آلل	فراوانی آللی							
		جایگاه ۱	جایگاه ۲	جایگاه ۳	جایگاه ۴	جایگاه ۵	جایگاه ۶	جایگاه ۷	جایگاه ۸
جیرفت	+	۰/۸۹	۰/۷۷	۰/۷۸	۰/۴۵	۰/۶۳	۰/۷۸	۰/۷۷	۰/۹۰
	-	۰/۱۱	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۱۰
کرمان	+	۰/۷۷	۰/۷۸	۰/۶۳	۰/۶۴	۰/۷۸	۰/۶۳	۰/۷۷	۱
	-	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۲۲	۰/۳۷	۰/۲۳	۰
راین	+	۰/۷۷	۰/۴۵	۰	۰	۰	۰/۴۵	۰/۹۰	۰/۸۹
	-	۰/۲۳	۰/۵۵	۱	۱	۰/۲۲	۰/۵۵	۰/۱۰	۰/۱۱
فلو جیرفت	+	۰/۴۵	۰/۸۹	۰/۴۵	۰	۱	۰/۴۴	۰/۶۳	۰/۶۴
	-	۰/۵۵	۰/۱۱	۰/۵۵	۰	۰	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۶
رابر	+	۰/۷۷	۰/۷۸	۰/۴۴	۰	۰/۷۷	۰/۶۳	۱	۰/۸۹
	-	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۵۶	۱	۰/۳۳	۰/۳۷	۰	۰/۱۱
بردسیر	+	۱	۰/۶۳	۰/۶۴	۰	۰/۷۷	۰/۸۹	۱	۱
	-	۰	۰/۳۷	۰/۳۶	۱	۰/۲۳	۰/۱۱	۰	۰
کل جمعیت‌ها	+	۰/۷۷	۰/۷۲	۰/۴۹	۰/۱۸	۰/۷۹	۰/۶۴	۰/۸۵	۰/۸۸
	-	۰/۲۳	۰/۲۸	۰/۵۱	۰/۸۲	۰/۲۱	۰/۳۶	۰/۱۵	۰/۱۲



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد برای نشانگر $(AC)_8G$. M نشانگر اندازه M50 (اندازه قطعات از ۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) (molecular weight marker) شرکت ژن فن‌آوران)، Jf زنبور بومی جیرفت، Ke زنبور عسل کرمان، Rb زنبور عسل رابر، J زنبور عسل جیرفت، Ry زنبور عسل راین، Bd زنبور عسل بردسیر.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد برای نشانگر $(AGAC)_4GC$. M نشانگر اندازه M50 (اندازه قطعات از ۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) (molecular weight marker) شرکت ژن فن‌آوران)، Jf زنبور بومی جیرفت، Ke زنبور عسل کرمان، Rb زنبور عسل رابر، J زنبور عسل جیرفت، Ry زنبور عسل راین.

در جمعیت بردسیر نشان داد. در بیش‌تر ژنوتیپ‌ها تعداد آلل موثر کم‌تر از آلل واقعی است، که دلیل کاهش تعداد آلل موثر در جمعیت وجود تعداد آلل با فراوانی مساوی در هر ژنوتیپ است و در ژنوتیپ‌هایی که تفاوت بین این دو مقدار زیاد باشد، به دلیل وجود فراوانی‌های آلی با

نتایج نشان داد که در آنالیز نشانگر $(AC)_8G$ بالاترین تعداد آلل موثر در جمعیت جیرفت (۲ آلل) و کمترین آن در جمعیت بردسیر (۱/۵۰ آلل) است. آنالیز مربوط به نشانگر $(AGAC)_4GC$ بالاترین تعداد آلل را در جمعیت فلو (بومی جیرفت) و کمترین تعداد آلل را

هم‌چنین کمترین سطح تنوع ژنتیکی برای نشان‌گر $(AC)_8G$ مربوط به جمعیت بردسیر با مقدار ۰/۱۳ و نشان‌گر $(AGAC)_4GC$ مربوط به جمعیت بردسیر به میزان ۰/۱۸ بود.

درخت فیلوژنتیکی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر روش UPGAM (با نرم‌افزار POPGENE) برای جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس نشان‌گر $(AGAC)_4GC$ و نشان‌گر $(AC)_8G$ در شکل (۴ و ۵) نشان داده شد.

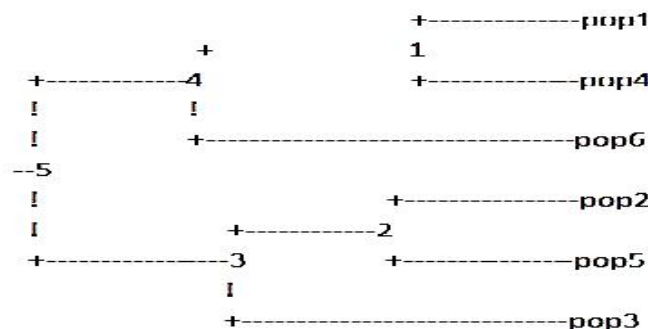
پراکندگی بالا در آن ژنوتیپ‌هاست. ژنوتیپ‌هایی که فراوانی آلی در آنها تقریباً برای تمام آلل‌ها مشابه می‌باشد، تعداد آلل موثر کمتری نشان خواهد داد. برای میانگین شاخص نی (Nei)، که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی چند گروه یا جمعیت را نشان می‌دهد بالاترین سطح تنوع ژنتیکی آنالیز شده با نشان‌گر $(AC)_8G$ (جدول ۳) مربوط به جمعیت راین با مقدار ۰/۴۲ و برای نشان‌گر $(AGAC)_4GC$ (جدول ۴) مربوط به جمعیت کرمان به میزان ۰/۳۵ مشاهده بود.

جدول ۳- مقادیر شاخص نی (Nei) و شانون برای جمعیت‌های مطالعه شده بر اساس نشانگر $(AC)_8G$

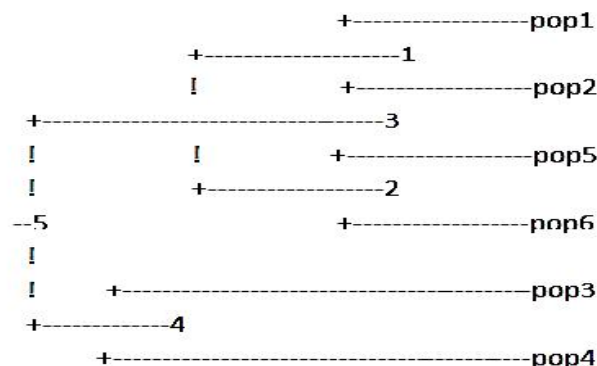
شاخص	شهرستان					
	جیرفت	کرمان	راین	فلو جیرفت	رابر	بردسیر
نی (Nei)	۰/۳۵	۰/۲۳	۰/۴۲	۰/۳۴	۰/۲۹	۰/۱۳
شانون	۰/۵۱	۰/۳۶	۰/۶۱	۰/۵۰	۰/۴۲	۰/۱۹
کل						
	۰/۳۹					
						۰/۵۸

جدول ۴- مقادیر شاخص نی (Nei) و شانون برای جمعیت‌های مطالعه شده بر اساس نشانگر $(AGAC)_4GC$

شاخص	شهرستان					
	جیرفت	کرمان	راین	فلو جیرفت	رابر	بردسیر
نی (Nei)	۰/۳۴	۰/۳۵	۰/۲۶	۰/۳۳	۰/۲۷	۰/۱۸
شانون	۰/۵۲	۰/۵۱	۰/۳۹	۰/۴۶	۰/۴۱	۰/۲۷
کل						
	۰/۳۵					
						۰/۵۳



شکل ۴- درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر روش UPGAM بر اساس نشان‌گر $(AC)_8G$. pop1 جمعیت جیرفت، pop2 جمعیت کرمان، pop3 جمعیت راین، pop4 جمعیت فلو جیرفت، pop5 جمعیت رابر، pop6 جمعیت بردسیر.



شکل ۵- درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر روش UPGAM بر اساس نشانگر $(AGAC)_4GC$. pop1 جمعیت جیرفت، pop2 جمعیت کرمان، pop3 جمعیت راین، pop4 جمعیت فلو جیرفت، pop5 جمعیت رابر، pop6 جمعیت بردسیر.

عسل این استان، دلیلی بارز بر تفاوت درون جمعیتی بوده که این تفاوتها از همجواری با کلنیهای مختلف و شرایط حاکم بر زنبورستانهای موجود در هر جمعیت نشأت گرفته است.

براساس نتایج کلیه معیارهای ژنتیکی انجام شده در این بررسی، می توان نتیجه گرفت که توده های زنبورعسل این استان دارای تنوع می باشند، ولی این تنوع ژنتیکی متوسط است. نتایج حاصل از فاصله ژنتیکی به دست آمده در بین جمعیت های زنبورهای

منابع

1. Beekman, M., J. Komdeur and F.L.W. Ratnieks. 2003. Effect of inbreeding on Dorian Pritchard colonies. *Original Research Article Trend in Ecology & Evolution*, 5: 277-282.
2. Lord, E.A., G.H. Davis, K.G. Doods, H.M. Henry, J.M. Lumsden and G.W. Montgomery 1998. Identification of Booroola carries using microsatellit markers. 6th world congress of Genetics Applied to livestock production. Armidale, NSW, Australia, 27: 19-27.
3. Mohammad Abadi, M.R., T.A. Kovalenko, M.R. Nasiri and G.E. Sulimova. 2005. Inter simple Sequence Repeat (ISSR-PCR) for the identification of polymorphism in some native cattle breed. *Proceedings of 3rd Moscow internation congress Biotechnology*. Moscow Russia March, 14-18: 282.
4. Mohammadabadi, M.R. and N. Askari. 2012. Characterization of Genetic structure using ISSR-PCR markers cattle, goat and sheep populations. LAMBERT Publication, Germany. 120 pp.
5. Paplauskien , V., V. eksteryt , I. Pašakinskien , D. Tamašauskien and J. Ra ys. 2006. The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. *Biologija*, 3: 16-20.
6. Rinderer, T.E., J.H. Harris, G.J. Hunt and L.I. De Guzman. 2010. Breeding for resistance to Varroa destructor in North America. *Apidologie*, 32: 381-394.
7. Smit, M. 1990. The origin of inbreeding depression in honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 25: 146-153.
8. Tarpy, D.R. 2003. Genetic diversity within honey bee colonies prevents several infections and promotes colony growth. *Proceedings of the Royal Society of London*, 4: 99-103.
9. Ting Ji, L., Y. Ling and C. Guohong. 2011. Cenetic diversity and population structure of Chiese honeybee (*Apis mellifera*) under microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1712-1720.
10. Triapitsyna, N.V. and V.I. Glazko. 2005. Polymorphism of DNA. Fragments Flanked by microsatllite loci (ISSR-PCR) in Cattle reproduced under low-does irradiation condition *Tisitol-Genet*, 39: 41-50.
11. Zahri, S., A. Asghari and M. Dadkhah. 2013. Morphologic and microsatellite genetic variation of honeybee populations in Ardabil. *Cellular and Molecular Research Journal*, 26: 462-471.
12. Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers

Yaser Bahador¹, Mohammadreza Mohammadabadi², Amin Khezri³, Mahdieh Asadi³
and Leila Medhati⁴

1 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professor, Shahid Bahonar University of Kerman

2- Associate Professor, Shahid Bahonar University of Kerman

(Corresponding author: mmohammadabadi@yahoo.com)

4- Expert, Standard and Research Center of Kohkiloueh and Bouyerahmad

Received: August 12, 2014

Accepted: January 5, 2015

Abstract

The aim of this study was assessment of genetic diversity for honey bee populations in Kerman province using two inter simple sequence repeat (ISSR) primers. In this study, 30 samples from 6 populations (Kerman, Jiroft, Raein, Rabor, Bardsir and Flo) were collected. While using (AC)₈G and (AGAC)₄GC primers in PCR, DNA profiles of bees were found to possess 16 polymorphic fragments. The number of fragments produced in the DNA profiles of different bee cities varied from 2 to 8, with their sizes varying within 150-1000 bp. Means of Shanon Index based on (AC)₈G marker for Jiroft, Kerman, Flo (Native bee of Jiroft) Rayen, Rabor and Bardsir honey bee population were 0.51, 0.36, 0.50, 0.61, 0.42 and 0.19 respectively and based on (AGAC)₄GC marker in Jiroft, Kerman, Flo (Native bee of Jiroft) Rayen, Rabor and Bardsir honey bee population were 0.52, 0.51, 0.46, 0.39, 0.41 and 0.27 respectively. A cluster analysis was carried out using unweighed pair group method with arithmetic averages (UPGMA) and dendrogram illustrated genetic relationships among 30 individuals in six populations. Haplotypes were constructed computationally and frequencies were compared in each population. Based on all studied genetic criteria, we can conclude that honey bee populations in Kerman have moderate amount of genetic diversity. The results of this study can provide the basic molecular information for future research on native honey bees using ISSR markers.

Keywords: Haplotype, ISSR markers, Native Honey Bee, Polymorphism, UPGMA Dendrogram