



"مقاله پژوهشی"

تفکیک زنبورهای عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) از زیرگونه‌های تجاری زنبورعسل با استفاده از ژن‌های ND1 و ND5

همین سلطانی^۱، جواد ناظمی رفیع^۲ و بهروز حریقی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه کردستان

۲- استادیار، دانشگاه کردستان (نویسنده مسوول: j.nazemi@uok.ac.ir)

۳- دانشیار، دانشگاه کردستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱۹

صفحه: ۱۵۷ تا ۱۶۸

چکیده

نمونه‌های زنبور عسل کارگر از ۲۶ ناحیه از ایران جمع آوری شد. هدف از این تحقیق ارزیابی ژن‌های (۶۳۰ bp) ND1 و (۶۳۰ bp) ND5 در تفکیک زنبورهای عسل ایرانی (*A. m. meda*) از زیرگونه‌های تجاری زنبورعسل (*A. m. carnica*، *A. m. ligustica*، *A. m. caucasica* و *A. m. mellifera*) بود. توالی‌های دو ناحیه ژنی ND1 و ND5 زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل با استفاده از روش‌های بی‌بی (Bayesian) و پارسیمونی (Parsimony) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ژن‌های ND1 و ND5 به ترتیب هشت و پنج هاپلوטיפ را در جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی نشان دادند. درخت فیلوژنی حاصل از ژن ND1، نمونه‌های زنبور عسل ایرانی را با استفاده از روش بی‌بی به چهار گروه (clade) تقسیم کرد. گروه اول شامل هاپلوטיפ ۱ (گلستان، خراسان جنوبی، کردستان، لرستان و مازندران)، گروه دوم شامل هاپلوטיפ ۲ (سیستان و بلوچستان)، گروه سوم شامل هاپلوטיפ ۳ (یزد و ایلام) و گروه چهارم شامل هاپلوטיפ‌های ۴ (اردبیل)، ۵ (کرمان)، ۶ (زنجان)، ۷ (کرمانشاه) و ۸ (بوشهر، آذربایجان غربی، چهارمحال و بختیاری، قزوین، قم، همدان، هرمزگان، خراسان رضوی، خراسان شمالی، کهکویه بویر احمد، خوزستان، مرکزی، سمنان، فارس) بودند. درخت‌های فیلوژنی حاصل از دو روش بی‌بی و پارسیمونی، توانایی بالاتر ناحیه ژنی ND1 را نسبت به ناحیه ژنی ND5 به اثبات رساندند به طوری که درخت‌های فیلوژنی حاصل از ژن ND1 توانستند زیر گونه‌های تجاری زنبورعسل را از نمونه‌های زنبورعسل ایرانی تفکیک کنند. همچنین با استفاده از روش پارسیمونی، تعداد بیشتری از مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک (informative sites) در ND1 نسبت به ND5 شناسایی شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، نتایج درخت‌های فیلوژنی ND1 حاصل از روش‌های بی‌بی و پارسیمونی و درخت فیلوژنی ND5 حاصل از روش بی‌بی را تأیید کرد. همچنین نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به اثبات رساند که ژن ND1 نسبت به ژن ND5 کارایی بیشتری در تفکیک گروه‌های تکاملی زنبورعسل (*Z*-subgroup، *A*، *M* و *C*) داشت.

واژه‌های کلیدی: زنبورعسل ایرانی، ژن میتوکندری، فیلوژنی، ND1، ND5

مقدمه

زیر گونه زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) در سرتاسر ایران پراکنده شده است (۱۴۶۴). Ruttner (۴۶) شش جمعیت زنبورعسل ایرانی (*A. m. meda*) را از شمال ایران (مازندران)، شمال شرقی ایران (مشهد)، غرب ایران، جنوب شرقی ایران (کرمان)، عراق و جنوب شرقی ترکیه جمع‌آوری کرد. ورود ملکه‌های زنبورعسل خارجی می‌تواند باعث هیبریداسیون جمعیت‌های بومی زنبور عسل شود به طوری که ورود تعداد زیادی از این ملکه‌ها باعث کاهش تنوع جمعیت‌های محلی و همچنین کاهش خلوص ژنتیکی زیرگونه‌های بومی زنبور عسل می‌شود (۱۸،۵۵).

زنبور عسل ایرانی با شرایط اقلیمی و پوشش گیاهی ایران سازگار است و شرایط سخت زمستان‌های مناطق سردسیر ایران را به خوبی تحمل کرده و در پایان زمستان خود را آماده تکثیر می‌کند. اما نژادهای خارجی زنبور عسل این ویژگی را در ایران ندارند. همچنین زنبور عسل ایرانی به خوبی در مراتع، عسل تولید می‌کند در حالی که نژادهای خارجی چنین خصوصیتی ندارند. یکی دیگر از ویژگی‌های نژاد زنبورعسل ایرانی این است که خود را در برابر بیماری‌ها و آفات که سال‌ها با آن‌ها درگیر بوده سازگار کرده و مقاومت خوبی در برابر آن‌ها نشان می‌دهد. بنابراین حفاظت از زنبورهای عسل بومی ایران اهمیت زیادی دارد زیرا خصوصیات مفید این زنبورهای عسل بومی را می‌توان در مراکز تحقیقاتی مورد

زنبورعسل از نظر اقتصادی در تولید عسل و گرده‌افشانی گیاهان نقش مهمی دارد. زنبور عسل یکی از مهم‌ترین حشرات اجتماعی شناخته شده در جهان است که نقش مهمی در زمینه کشاورزی و پزشکی دارد (۲). استفاده از زهر زنبور عسل در درمان برخی بیماری‌ها، تولید ژل رویال، استفاده از پروتئین‌های ژل رویال در درمان انواع سرطان‌ها و افزایش سیستم ایمنی بدن انسان اهمیت زنبورعسل را بیشتر آشکار می‌کند (۴۹). همچنین زنبورعسل به‌عنوان شناساگر بیولوژیک^۱ برای شناسایی مناطق آلوده به فلزات سنگین و آلاینده‌های زیست محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۹). زنبورهای عسل (*Apis mellifera*) در سراسر اروپا، آفریقا و آسیا پراکنده شده‌اند. حدود ۳۱ زیر گونه *A. mellifera* در دنیا گزارش شده است (۱۱،۲۹،۴۶). بر اساس داده‌های مولکولی پنج گروه تکاملی (*A. m. litorea*، *A. m. jemenitica*، *A. m. monticola*، *A. m. intermissa*، *A. m. scutellata*، *A. m. carnica*، *A. m. ligustica*، *A. m. meda*، *A. m. anatoliaca* و *A. m. caucasica*)، *M* (*A. m. mellifera*)، *Z*-subgroup (*A. m. iberiensis* و *A. m. jemenitica*)، *Y* (*A. m. lamareckii* و *A. m. syriaca*) و *C* (*A. m. jemenitica* از ایتوپیی) گزارش شده‌اند (۳،۱۰،۵۱).

آلوزیمها (۲۳،۲۷،۴۸) در مطالعه جمعیت‌ها و زیرگونه‌های زنبور عسل استفاده شده‌اند.

به‌علاوه محققان تغییرات ژنتیکی زنبورهای عسل ایرانی (*A.m. meda*) را با استفاده از ژن‌های COII و ناحیه بین ژنی (۲۵،۳۱)، ND₂ (۳۲)، نشانگرهای ریزماهوره (۴۷،۴۳،۶) و آلوزیمها (۲۴) مورد بررسی قرار داده‌اند. تفکیک زنبورهای عسل ایرانی از زیرگونه‌های تجاری اهمیت زیادی دارد زیرا این موضوع باعث شناسایی نواحی استقرار زنبورهای عسل بومی و در نتیجه حفاظت بیشتر از آن‌ها می‌شود. هدف از این تحقیق، ارزیابی کارایی ژن‌های ND₁ و ND₅ در تفکیک جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m. meda*) از زیرگونه‌های تجاری زنبور عسل بود.

مواد و روش‌ها

۲۶ ناحیه از ایران برای جمع‌آوری نمونه‌های زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) انتخاب شد (جدول ۱). از هر ناحیه ده کلنی و از هر کلنی هشت زنبورعسل کارگر (۸۰ عدد زنبور عسل از هر ناحیه) جمع‌آوری شد. زنبورهای عسل جمع‌آوری شده به‌وسیله اتیل استات کشته شدند و به داخل اتانول مطلق منتقل شدند. نمونه‌های زنبورهای عسل ایرانی به‌کار رفته در این تحقیق، از نمونه‌های زنبور عسل ایرانی تحقیق Modaber و همکاران (۳۱) به‌دست آمد. بنابراین زیرگونه نمونه‌های زنبورعسل ایرانی (*A. m. meda*) تأیید شده بود. نمونه‌ها در دمای ۲۰- نگهداری شدند.

ارزیابی و مطالعه قرار داد (۲۲). حدود سال ۱۳۳۵ اولین ملکه خارجی وارد ایران شد. ملکه‌های وارداتی معمولاً نژاد خالص نبوده بلکه مخلوطی از دو یا چند نژاد بودند که مهم‌ترین آن‌ها میدنایت، استارلاین و تعداد اندکی از ملکه‌های نژاد خالص مانند زنبورعسل قفقازی (*A. m. caucasica*) و ایتالیایی (*A. m. ligustica*) وارد ایران شدند. اما خوشبختانه در سال ۱۳۶۵ واردات ملکه زنبورعسل به ایران متوقف شد (۱۴). بنابراین ارزیابی انواع مارکرهای ژنتیکی برای تمایز زیر گونه‌های تجاری زنبورعسل (*A. m. carnica*، *A. m. caucasica* و *A. m. mellifera digustica*) از زیر گونه زنبورعسل ایرانی اهمیت زیادی دارد (۸). روش‌های مولکولی، ابزارهای دقیقی برای شناسایی زیرگونه‌های زنبور عسل هستند (۲۷). نشانگرهای مختلفی از قبیل DNA میتوکندریایی و ریزماهوره‌ها در مطالعه زیرگونه‌ها و جمعیت‌های زنبورعسل به‌کار گرفته شده‌اند (۹) اما DNA میتوکندریایی به دلایلی از قبیل سرعت نوترکیبی پایین، نسخه‌های متعدد در سلول و استخراج آسان توجه زیادی را در بین محققان به خود جلب کرده است (۴،۳۳). محققان چندین ژن میتوکندریایی از قبیل COII و ناحیه بین ژنی (۳۴،۳۱،۲۸،۱۹،۱۲)، ND₂ (۴)، ND₄-ND₆ (۵۲)، ND₅ (۷)، COI (۷)، 16S rRNA (۱، ۸، ۳۸) و Cyt b (۱۷) را برای مطالعه زیرگونه‌ها و جمعیت‌های زنبور عسل به‌کار برده‌اند. نشانگرهای مولکولی دیگری از قبیل ریز ماهوره‌ها (۱۵،۳۶) و

جدول ۱- طول و عرض جغرافیایی نواحی نمونه‌برداری زنبورعسل ایرانی و شماره‌های دسترسی ژن‌های ND5 و ND1 ثبت شده در بانک ژن
Table 1. Longitude and latitude of sampled areas of Iranian honeybees and accession numbers of registered genes of ND1 and ND5 in GneBank

شماره دسترسی ND1	شماره دسترسی ND5	طول و عرض جغرافیایی	نام منطقه
MT897955	MT897929	34°24' N 45°52' E	کرمانشاه
MT897949	MT897923	33°65' N 46°43' E	ایلام
MT897956	MT897930	32°08' N 48°34' E	خوزستان
MT897940	MT897914	39°23' N 48°22' E	اردبیل
MT897946	MT897920	37° 11' N 54°94' E	گلستان
MT897953	MT897927	30°82' N 50°56' E	کهکلوپه و بویراحمد
MT897960	MT897934	36°65' N 53°01' E	مازندران
MT897957	MT897931	35°31' N 46°99' E	کردستان
MT897947	MT897921	34°58' N 48°30' E	همدان
MT897958	MT897932	33°49' N 48°43' E	لرستان
MT897959	MT897933	34°06' N 49°78' E	مرکزی
MT897945	MT897919	34°56' N 50°93' E	قم
MT897951	MT897925	36°12' N 59°36' E	خراسان رضوی
MT897952	MT897926	37°20' N 56°50' E	خراسان شمالی
MT897961	MT897935	34°25' N 51°52' E	سمنان
MT897964	MT897938	31°45' N 54°12' E	یزد
MT897965	MT897939	36°22' N 48°23' E	زنجان
MT897943	MT897917	32°28' N 50°98' E	چهارمحال و بختیاری
MT897962	MT897936	28°81' N 52°60' E	فارس
MT897941	MT897915	38°63' N 44°88' E	آذربایجان غربی
MT897942	MT897916	29°29' N 51°21' E	بوشهر
MT897948	MT897922	27°25' N 57°11' E	هرمزگان
MT897944	MT897918	36°02' N 49°38' E	قزوین
MT897950	MT897924	32°53' N 59°13' E	خراسان جنوبی
MT897963	MT897937	29°49' N 60°78' E	سیستان و بلوچستان
MT897954	MT897928	32°55' N 59°29' E	کرمان

الگوریتم TBR^۱ در رسم درخت استفاده شد. فواصل ژنتیکی بین زیر گونه‌های زنبورعسل و زنبورهای عسل ایرانی (*A. m. meda*) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 (۵۰) محاسبه شد. مکان‌های نوکلئوتیدی با اطلاعات مفید فیلوژنی (informative sites) به موقعیت‌های نوکلئوتیدی اطلاق می‌شود که قادر به تفکیک نمونه‌ها، زیرگونه‌ها و گونه‌ها می‌باشد (۳۵). تعداد مکان‌های نوکلئوتیدی با اطلاعات مفید فیلوژنی (informative sites) در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های ND1 و ND5 (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبورعسل) توسط نرم‌افزار PAUP 4.0 و روش پارسیمونی به‌دست آمد. جایگزینی‌های نوکلئوتیدی پورین با پورین را جایگزینی هم‌جنس و جایگزینی‌های نوکلئوتیدی پورین با پیریمیدین را جایگزینی ناهم‌جنس می‌نامند. مدل‌های تکامل مولکولی انواع فراوانی‌های جایگزینی‌های نوکلئوتیدی (جایگزینی هم‌جنس و ناهم‌جنس) را در ایجاد روابط فیلوژنتیک به‌کار می‌گیرند (۳۵). نسبت جایگزینی‌های هم‌جنس به ناهم‌جنس transition rate (transition-ratio) در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های ND1 و ND5 (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل) با استفاده از روش آماری Maximum likelihood، مدل HKY85، توزیع گاما و با نرم‌افزار MEGA 6.0 به‌دست آمد. به‌علاوه، پارامترهای تنوع ژنتیکی از قبیل تنوع نوکلئوتیدی و تعداد هاپلوتیپ‌های ژن‌های ND1 و ND5 در جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی و با استفاده از نرم‌افزار dnaSP5 محاسبه شد.

DNA از قفسه سینه و پاهای زنبورهای عسل کارگر بالغ با استفاده از روش CTAB استخراج شد (۱۶). پرایمرهای ژن ND1 طراحی شدند و پرایمرهای ژن ND5 از تحقیق Arias و همکاران (۵) بدست آمد. از هر کلنی یک زنبورعسل کارگر به‌طور تصادفی انتخاب و ژن‌های ND1 و ND5 با استفاده از پرایمرهای مورد نظر، به‌وسیله PCR تکثیر شدند (جدول ۲). توالی‌یابی محصول PCR با استفاده از روش Sanger و در شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. ژن‌های توالی‌یابی شده ND1 و ND5 در بانک ژن NCBI به ثبت رسیدند. به‌علاوه، توالی‌های نوکلئوتیدی زیرگونه‌های دیگر زنبورعسل برای مقایسه با زنبورهای عسل ایرانی از بانک ژن تهیه شدند. توالی‌های هر ژن وارد نرم‌افزار MEGA 6.0 (۵۰) شده و به صورت فایل با فرمت FASTA ذخیره شد. سپس توالی‌ها با استفاده از روش Muscle هم‌تراز شدند (۴۵). گروه‌های تکاملی (A, C, M و Z-subgroup) و زیر گونه‌های زنبورعسل با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و نرم‌افزار PAST 3.19 مورد مقایسه قرار گرفتند (۲۰). برای رسم درخت فیلوژنتیک با روش بیزی بهترین مدل با استفاده از نرم‌افزار Jmodel Test 2.1.7 انتخاب شد (۴۱). درخت‌های فیلوژنتیک ژن‌های ND1 (۶۳۰ bp) و ND5 (۶۳۰ bp) با استفاده از روش‌های بیزی و پارسیمونی به‌ترتیب با نرم‌افزارهای Mr Bayes 3.2 و PAUP 4.0 b10 ترسیم شد. در رسم درخت با روش بیزی از مدل جایگزینی HKY+G، توزیع گاما و ۱۰,۰۰۰,۰۰۰ تکرار استفاده شد. در روش پارسیمونی از روش bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار و

جدول ۲- چرخه‌های حرارتی واکنش PCR برای تکثیر نواحی ژنی ND5 و ND1

Table 2. The thermal cycles for amplification of ND1 and ND5 genes in PCR

(ND1) 5' TATTGAGGTGCAACAGTTAT 3' (forward) 5' AGGATCGTAAAGTTCCTAAT 3' (reverse)			
دما (C°)	زمان	مرحله	تعداد چرخه
۹۴	پنج دقیقه	واسرشت اولیه	۱
۹۴	یک دقیقه	واسرشت	} ۳۵
۴۸	۲۰ ثانیه	اتصال	
۶۴	۲ دقیقه	بسط	
۶۴	۱۰ دقیقه	بسط نهایی	۱
(ND5) 5' AATTATTATTATCATCATAG 3' (forward) 5' TTAATTGGGATAAATTCGIG 3' (reverse)			
دما (C°)	زمان	مرحله	تعداد چرخه
۹۴	پنج دقیقه	واسرشت اولیه	۱
۹۴	یک دقیقه	واسرشت	} ۳۵
۴۸	۲۰ ثانیه	اتصال	
۶۴	۲ دقیقه	بسط	
۶۴	۱۰ دقیقه	بسط نهایی	۱

نتایج و بحث

هاپلوتیپ را در جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی شناسایی کردند. به‌علاوه، تنوع نوکلئوتیدی نواحی ژنی ND1 و ND5 در جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی به‌ترتیب ۰/۰۰۲۲ و ۰/۰۰۱۵ بودند (جدول ۳).

پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن‌های ND1 و ND5 در جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) مورد مقایسه قرار گرفتند. ژن‌های ND1 و ND5 به‌ترتیب هشت و پنج

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی زنبورهای عسل ایرانی و برخی زیرگونه‌های زنبورعسل بر اساس ژن‌های ND5 و ND1
Table 3. Genetic diversity parameters of the Iranian honeybees (*A. m. meda*) and other honeybee subspecies based on ND1 and ND5

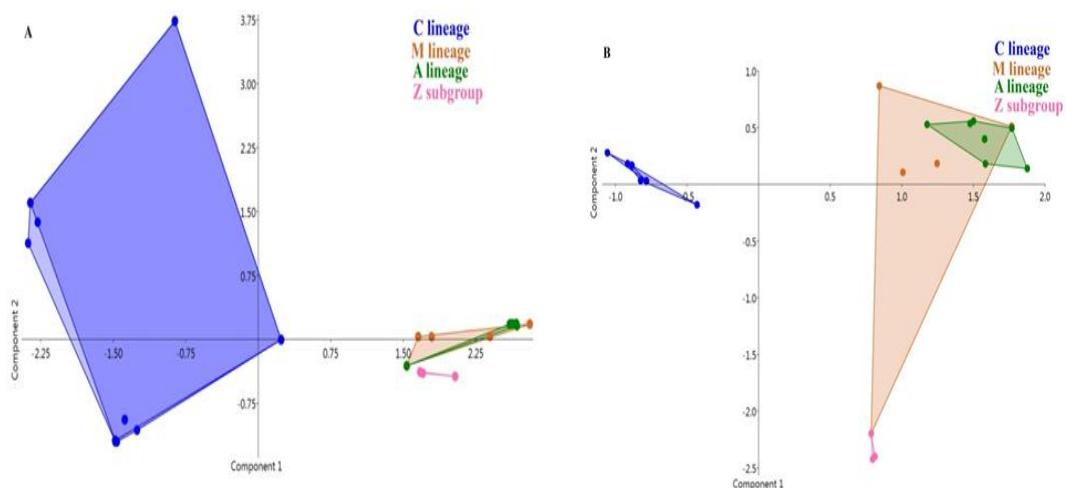
k^*	π^*	H^*	S^1	ژن ND1
۱/۴	۰/۰۰۲۲	۸	۶	زنبورهای عسل ایرانی
۵/۸	۰/۰۰۷۳	۵	۱۴	<i>A. m. scutellata</i>
۰/۴	۰/۰۰۰۵	۲	۱	<i>A. m. capensis</i>
۱۱	۰/۰۱۳۹	۴	۲۴	<i>A. m. mellifera</i>
k	π	H	S	ژن ND5
۰/۹۷	۰/۰۰۱۵	۵	۶	زنبورهای عسل ایرانی
۲/۶	۰/۰۰۴۱	۵	۵	<i>A. m. scutellata</i>
۱	۰/۰۰۱۵	۳	۲	<i>A. m. capensis</i>
۷/۰۶	۰/۰۱۱۲	۵	۱۶	<i>A. m. mellifera</i>

۱- تعداد مکان‌های متغیر نوکلئوتیدی (variable site)، ۲- تعداد هاپلوتیپ‌ها، ۳- تنوع نوکلئوتیدی، ۴- میانگین تفاوت‌های نوکلئوتیدی

مؤلفه‌های اصلی (PCA) ژن ND5 نشان داد که گروه تکاملی M با گروه‌های تکاملی A و Z subgroup هم‌پوشانی داشت (شکل ۱، B). درخت فیلوژنی حاصل از ژن ND1 نمونه‌های زنبور عسل ایرانی را با استفاده از روش بیزی، به چهار گروه (Clade) تقسیم کرد. گروه اول شامل هاپلوتیپ ۱ (گلستان، خراسان جنوبی، کردستان، لرستان و مازندران)، گروه دوم شامل هاپلوتیپ ۲ (سیستان و بلوچستان)، گروه سوم شامل هاپلوتیپ ۳ (یزد و ایلام) و گروه چهارم شامل هاپلوتیپ‌های ۴ (اردبیل)، ۵ (کرمان)، ۶ (زنجان)، ۷ (کرمانشاه) و ۸ (بوشهر، آذربایجان غربی، چهارمحال و بختیاری، قزوین، قم، همدان، هرمزگان، خراسان رضوی، خراسان شمالی، کهکلیوه و بویر احمد، خوزستان، مرکزی، سمنان، فارس) بودند. به علاوه با استفاده از روش بیزی، درخت فیلوژنی حاصل از ژن ND1 زیرگونه‌های تجاری زنبورعسل (*A. m. ligustica*، *A. m. carnica*، *A. m. mellifera*) را از نمونه‌های زنبورعسل ایرانی تفکیک کرد (شکل ۲، A). اما درخت فیلوژنی حاصل از ژن ND5 نتوانست زیرگونه‌های تجاری *A. m. carnica* و *A. m. caucasica* را از نمونه‌های زنبورعسل ایرانی (*A. m. meda*) تفکیک نماید (شکل ۲، B).

نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس (transition-transversion rate ratio) در توالی‌های ژن‌های ND5 و ND1 (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل) محاسبه شد. نتایج نشان داد که مقادیر نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس در ژن‌های ND5 و ND1 به ترتیب ۳/۶۴ و ۳/۲۲ بودند. با استفاده از روش پارسیمونی، تعداد مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک در ژن‌های ND5 و ND1 (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل) به دست آمد. نتایج نشان داد که تعداد مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک در ژن‌های ND5 و ND1 به ترتیب ۸۰ و ۶۲ بودند.

توانایی ژن‌های ND5 و ND1 در تفکیک گروه‌های تکاملی *A. mellifera* (A، C، M، Z subgroup) با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) ژن ND1 نشان داد که گروه‌های تکاملی A و M با یک‌دیگر هم‌پوشانی داشتند در صورتی که گروه‌های تکاملی C و Z subgroup از یک-دیگر تفکیک شدند (شکل ۱، A). همچنین نتایج تجزیه به

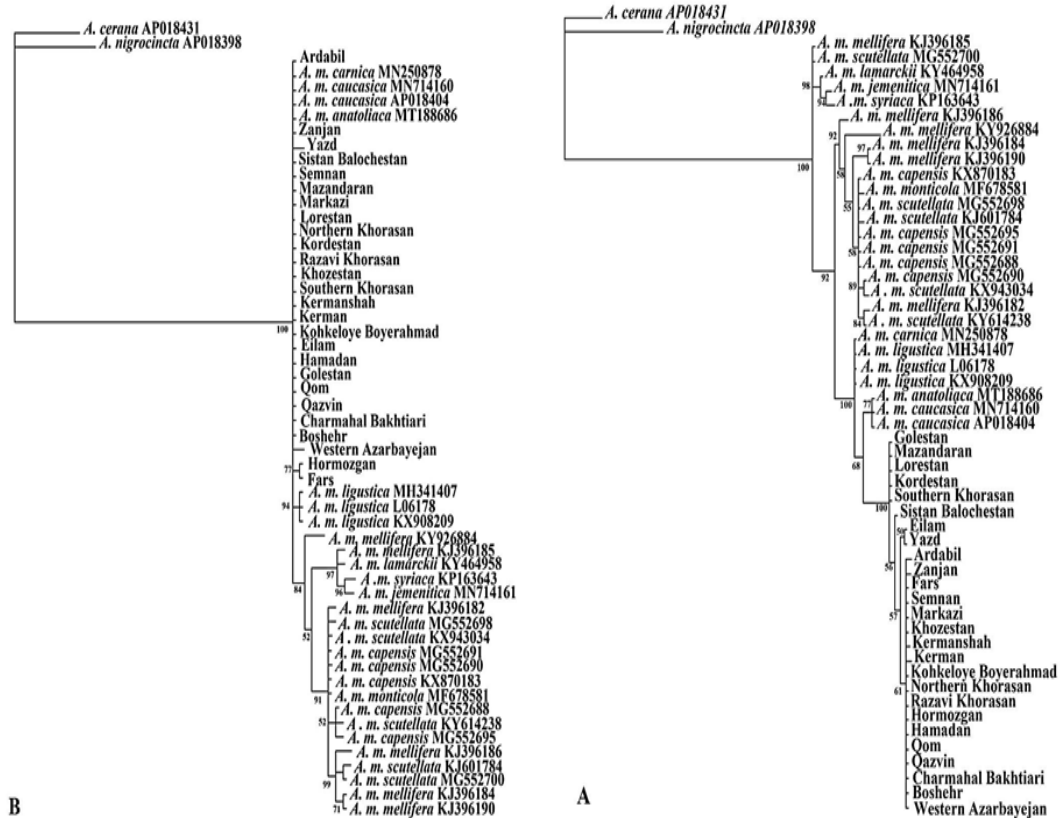


شکل ۱- مقایسه گروه‌های تکاملی زنبور عسل (*Apis mellifera*) با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) در ژن‌های ND1 (A) و ND5 (B)

Figure 1. Comparison of evolutionary lineages of *Apis mellifera* using principle component analysis in ND1 (A) and ND5 (B)

زنبور عسل *A. m. carnica* و *A. m. caucasica* و برخی از جمعیت‌های *A. m. mellifera* را از زنبورهای عسل ایرانی تفکیک کند بلکه *A. m. monticola*، *A. m. capensis* و برخی از جمعیت‌های *A. m. scutellata* را نیز نتوانست از زنبورهای عسل ایرانی تفکیک کند (شکل ۳، B).

با استفاده از روش پارسیمونی، درخت فیلوژنی حاصل از ژن ND1 نمونه‌های زنبور عسل ایرانی را به دو گروه تقسیم نمود و زیرگونه‌های تجاری زنبور عسل را از جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی تفکیک کرد (شکل ۳، A). اما درخت فیلوژنی حاصل از ژن ND5 نه تنها نتوانست زیرگونه‌های تجاری



شکل ۲- درخت فیلوژنی زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های زنبورعسل (*Apis mellifera*) در ژن‌های ND1 (A) و ND5 (B) با استفاده از روش بی‌زی. گونه‌های *Apis cerana* و *Apis nigrocincta* به‌عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شدند.

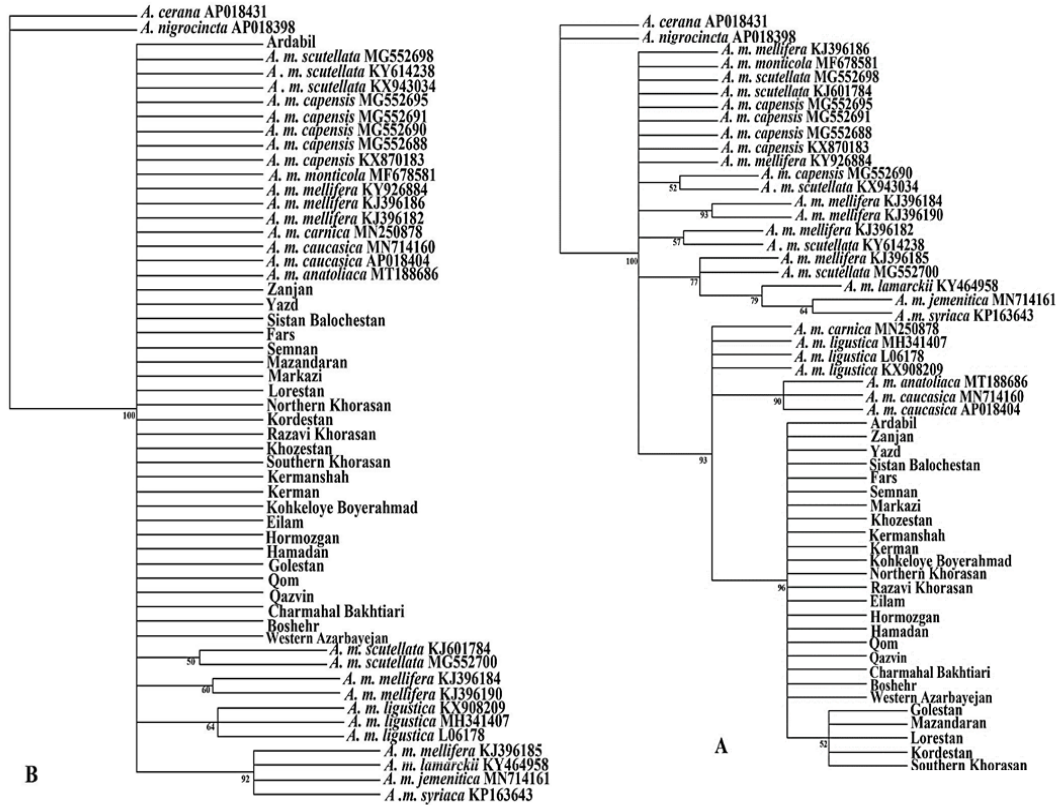
Figure 2. The phylogenetic tree of Iranian honeybees and subspecies of *Apis mellifera* in ND1 (A) and ND5 (B) genes using Bayesian method. *Apis cerana* and *A. nigrocincta* were considered as outgroups.

syriaca و نمونه‌های زنبورعسل ایرانی مشاهده شد (۰/۰۳۶ تا ۰/۰۴۵). (جدول ۴).
درخت‌های فیلوژنی حاصل از دو روش بی‌زی و پارسیمونی، توانایی بالاتر ناحیه ژنی ND1 را نسبت به ناحیه ژنی ND5 به اثبات رساندند به‌طوری که درخت‌های فیلوژنی حاصل از ژن ND1 نتوانستند زیرگونه‌های تجاری زنبور عسل را از نمونه‌های زنبور عسل ایرانی تفکیک کنند. همچنین نتایج مطالعه حاضر به اثبات رساند که ND1 نسبت به ND5 تفکیک بهتری را در گروه‌های تکاملی زنبورعسل (*Z*, *M*, *C*, *A*) ایجاد نمود زیرا در نواحی ژنی ND1 و ND5 به ترتیب دو (*M* یا *A*) و سه گروه تکاملی (*M* با *A* و *Z*-subgroup) با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند. مطالعه Dwivedi and Gadagkar (۱۳) نشان دادند که از

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، نتایج درخت‌های فیلوژنی ND1 حاصل از روش‌های بی‌زی و پارسیمونی و نتایج درخت فیلوژنی ND5 حاصل از روش بی‌زی را تأیید کرد به‌طوری که PCA ژن ND1 زیرگونه‌های تجاری *A. m. caucasica*، *A. m. carnica*، *A. m. ligustica*، *A. m. mellifera* و *A. m. monticola* را از نمونه‌های زنبور عسل ایرانی (*meda*) متمایز کرد (شکل ۴، A)؛ اما PCA ژن ND5 نشان داد که زیرگونه‌های تجاری *A. m. carnica* و *A. m. caucasica* با *A. m. mellifera* نمونه‌های زنبور عسل ایرانی هم‌پوشانی داشتند (شکل ۴، B). با استفاده از ژن ND1 مقایسه‌ای بین فواصل ژنتیکی زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل انجام شد. بیشترین فواصل ژنتیکی بین *A. m.*

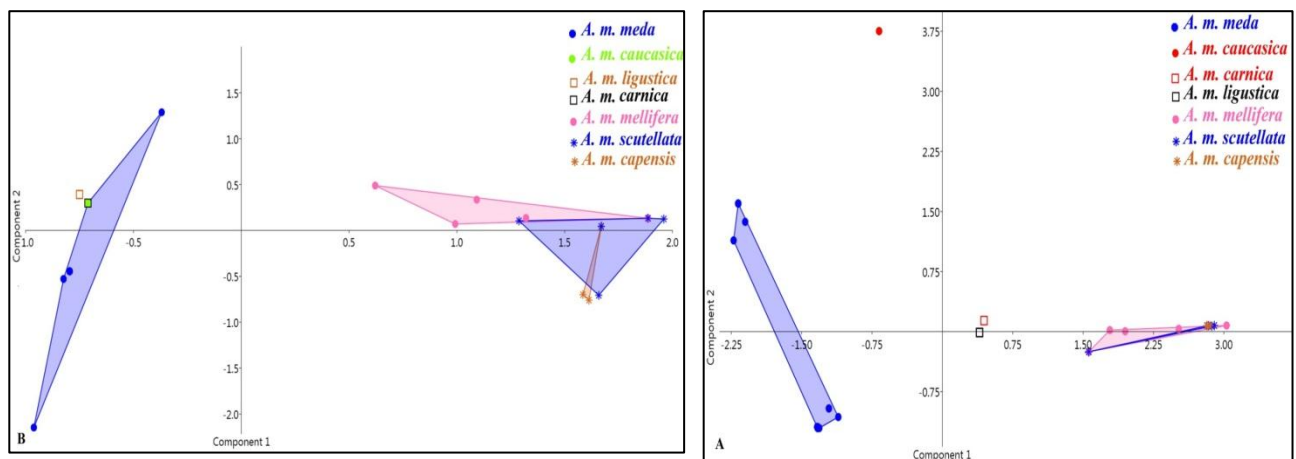
بر دقت روابط فیلوژنتیک داشت. به طوری که هرچقدر نسبت این جایگزینی نوکلئوتیدی بیشتر بود، روابط فیلوژنتیک دقیق‌تری بین تاکسون‌ها در درخت فیلوژنی ایجاد می‌شد.

بین پارامترهایی مثل طول توالی، ترکیب بازهای نوکلئوتیدی و نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس، پارامتر جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس تأثیر بیشتری را



شکل ۳- درخت فیلوژنی زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های زنبورعسل (*Apis mellifera*) در ژن‌های ND1 (A) و ND5 (B) با استفاده از روش پارسیمونی. گونه‌های *Apis cerana* و *A. nigrocincta* به‌عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شدند.

Figure 3. The phylogenetic tree of Iranian honeybees and subspecies of *Apis mellifera* in ND1 (A) and ND5 (B) genes using Parsimony method. *Apis cerana* and *A. nigrocincta* were considered as outgroups.



شکل ۴- مقایسه زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های تجاری زنبورعسل (*A. m. caucasica*, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* و *A. m. meda*) با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) در ژن‌های ND1 (A) و ND5 (B).

Figure 4. Comparison of Iranian honeybees with commercial honeybee subspecies (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica* and *A. m. mellifera*) using principle component analysis (PCA) in ND1 (A) and ND5 (B).

جدول ۴- فواصل ژنتیکی بین زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های زنبور عسل با استفاده از ژن ND1

Table 4. Genetic distances among Iranian honeybees and subspecies using ND1 gene

Iranian honey bees and subspecies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1-Ardabil																
2-Western Azarbayejan	۰/۰۰۲															
3-Boshehr	۰/۰۰۲	.														
4-Charmahal Bakhtiari	۰/۰۰۲	.	.													
5-Gazvin	۰/۰۰۲	.	.	.												
6-Qom	۰/۰۰۲											
7-Golestan	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵										
8-Hormozgan	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	.	۰/۰۰۰	.	.	۰/۰۰۵									
9-Eilam	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲								
10-Razavi Khorasan	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۲							
11-Northern Khorasan	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۲	.						
12-Kohkeloye Boyerahmad	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۲	.	.					
13-Kerman	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲				
14-Kermanshah	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳			
15-Khozestan	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۲	.	.	.	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲		
16-Kordestan	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	
17-Lorestan	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	.
18-Markazi	۰/۰۰۲	.	.	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	.	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	.	.	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	.	۰/۰۰۵
19-Mazandaran	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	.
20-Semnan	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۲	.	.	.	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	.	۰/۰۰۵
21-Shiraz	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	.	۰/۰۰۲	.	.	.	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	.	۰/۰۰۵
22-Sistan Balochestan	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲
23-Yazad	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	.	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳
24-Zanjan	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۷
25-A. m. caucasica MN714160	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۳
26-A. m. carnica MN250878	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۵
27-A. m. ligustica KX908209	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۵
28-A. m. mellifera KJ396182	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۷
29-A. m. jemenitica MN714161	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۴۲
30-A. m. lamarckii KY464958	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۸
31-A. m. syriaca KP163643	۰/۰۰۴۰	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۴۰	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۴۰	۰/۰۰۴۰	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۴۵
32-A. m. capensis KX870183	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۲
33-A. m. scutellata MG552700	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۲۶	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۳۶

ادامه جدول ۴- فواصل ژنتیکی بین زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های زنبور عسل با استفاده از ژن ND1

Table 4. (continued)- Genetic distances among Iranian honeybees and subspecies using ND1 gene

Iranian honey bees and subspecies	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1-Ardabil																
2-Western Azarbayejan																
3-Boshehr																
4-Charmahal Bakhtiari																
5-Gazvin																
6-Qom																
7-Golestan																
8-Hormozgan																
9-Eilam																
10-Razavi Khorasan																
11-Northern Khorasan																
12-Kohkeloye Boyerahmad																
13-Kerman																
14-Kermanshah																
15-Khozestan																
16-Kordestan																
17-Lorestan																
18-Markazi	./0.05															
19-Mazandaran	./0.00	./0.05														
20-Semnan	./0.05	.	./0.05													
21-Shiraz	./0.05	.	./0.05	.												
22-Sistan Balochestan	./0.02	./0.03	./0.02	./0.03	./0.03											
23-Yazad	./0.03	./0.02	./0.03	./0.02	./0.02	./0.02										
24-Zanjan	./0.07	./0.02	./0.07	./0.02	./0.02	./0.05	./0.03									
25-A. m. caucasica MN714160	./0.13	./0.19	./0.13	./0.19	./0.19	./0.15	./0.17	./0.17								
26-A. m. carnica MN250878	./0.15	./0.13	./0.15	./0.13	./0.13	./0.13	./0.12	./0.12	./0.05							
27-A. m. ligustica KX908209	./0.15	./0.13	./0.15	./0.13	./0.13	./0.13	./0.12	./0.12	./0.05	.						
28-A. m. mellifera KJ396182	./0.37	./0.34	./0.37	./0.34	./0.34	./0.34	./0.32	./0.32	./0.25	./0.19	./0.19					
29-A. m. jemenitica MN714161	./0.42	./0.35	./0.42	./0.35	./0.35	./0.40	./0.38	./0.33	./0.31	./0.24	./0.24	./0.23				
30-A. m. lamarkii KY464958	./0.28	./0.31	./0.38	./0.31	./0.31	./0.36	./0.34	./0.20	./0.27	./0.21	./0.21	./0.19	./0.03			
31-A. m. syriaca KP163643	./0.45	./0.38	./0.45	./0.38	./0.38	./0.42	./0.40	./0.26	./0.33	./0.26	./0.26	./0.25	./0.05	./0.05		
32-A. m. capensis KX870183	./0.32	./0.30	./0.32	./0.30	./0.30	./0.30	./0.28	./0.28	./0.21	./0.15	./0.15	./0.03	./0.23	./0.19	./0.25	
33-A. m. scutellata MG552700	./0.26	./0.30	./0.36	./0.30	./0.30	./0.34	./0.32	./0.28	./0.25	./0.19	./0.19	./0.17	./0.07	./0.03	./0.08	./0.17

ژن COII و روش PCR-RFLP نتوانستند زنبور عسل ایرانی را از زیر گونه *A. m. anatoliaca* تفکیک کنند. در صورتی که تحقیق حاضر با استفاده از ناحیه ژنی ND₁ و روش PCR زیرگونه *A. m. anatoliaca* را از زنبورهای عسل ایرانی متمایز کرد. Rahimi (۴۲) جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی جنوب کشور را با استفاده از روش PCR-RFLP و ناحیه بین ژنی COI-COI مورد مقایسه قرار داد. نتایج او تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی جنوب کشور را به اثبات نرساند. اما تحقیق حاضر با استفاده از ژن ND₁، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی جنوب کشور را به اثبات رساند. این موضوع نشان می‌دهد که روش PCR نسبت به روش PCR-RFLP، روش مؤثرتر و کارآمدتری در ارزیابی تغییرات ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی است.

نتایج مطالعه حاضر به اثبات رساند که نواحی ژنی ND₁ و ND₅ نتوانستند گروه‌های تکاملی A (زیر گونه‌های زنبور عسل آفریقایی) و Z-subgroup را از یکدیگر متمایز کنند. بنابراین یافته‌های این مطالعه، نتایج Alburaki و همکاران (۳) را در تمایز گروه‌های تکاملی A و Z-subgroup به اثبات رساندند. مطالعات دیگر نیز با استفاده از COII به همراه ناحیه بین ژنی، ND₄ و ND₆ نتوانستند این دو گروه تکاملی را از یکدیگر جدا کنند (۳۱، ۵۲).

درخت‌های فیلوژنی حاصل از دو روش بی‌زی و پارسیمونی، توانایی بالاتر ناحیه ژنی ND₁ را نسبت به ناحیه ژنی ND₅ به اثبات رساندند به طوری که درخت‌های فیلوژنی حاصل از ژن ND₁ نتوانستند زیر گونه‌های تجاری زنبور عسل را از نمونه‌های زنبور عسل ایرانی تفکیک کنند. همچنین با استفاده از روش پارسیمونی، تعداد بیشتری از مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک در ND₁ نسبت به ND₅ شناسایی شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)، نتایج درخت‌های فیلوژنی ND₁ حاصل از روش‌های بی‌زی و پارسیمونی و درخت فیلوژنی ND₅ حاصل از روش بی‌زی را تأیید کرد. همچنین نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ND₁ نسبت به ND₅ تفکیک بهتری را در گروه‌های تکاملی زنبور عسل (A, Z-subgroup, M و C) ایجاد کرد.

در تحقیق حاضر و در بین تمام توالی‌های نوکلئوتیدی (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل)، مقدار نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس ND₁ بیشتر از ND₅ بود به طوری که در این مطالعه به اثبات رسید که ND₁ نسبت به ND₅ از کارایی بیشتری در حل روابط فیلوژنتیک و تفکیک زنبورهای عسل ایرانی از زیرگونه‌های تجاری زنبور عسل و حتی زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل برخوردار بود. ولی ND₅ نتوانست تفکیک مناسبی را بین زنبورهای عسل تجاری و زنبورهای عسل ایرانی ایجاد نماید. به علاوه، روش پارسیمونی نیز به اثبات رساند که تعداد مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک (۳۵) در ژن ND₁ بیشتر از ND₅ بود که این موضوع نشان‌دهنده مناسب‌تر بودن ND₁ در حل روابط فیلوژنتیک بود.

با توجه به اینکه هدف از این تحقیق ارزیابی تفکیک نمونه‌های زنبور عسل ایرانی از زیرگونه‌های تجاری زنبور عسل بود، باید تعداد مکان‌های متغیر نوکلئوتیدی (variable sites یا segregating sites) در درون جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی نیز مورد توجه قرار گیرد. زیرا هر چقدر تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین نمونه‌های یک جمعیت یا زیر گونه در ژن‌های مورد بررسی کمتر باشد، کارایی تفکیک این جمعیت‌ها یا زیر گونه از جمعیت‌ها و زیر گونه‌های دیگر افزایش می‌یابد (۲۶، ۵۳، ۵۴). با توجه به اینکه تعداد مکان‌های متغیر نوکلئوتیدی ژن‌های ND₁ و ND₅ در درون جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی یکسان بود (S=۶)، بنابراین نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس در بین تمام توالی‌های نوکلئوتیدی (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل) مورد بررسی قرار گرفت.

در تحقیق اخیر و با استفاده از PCR، ژن‌های ND₁ و ND₅ به ترتیب هشت و پنج هاپلوتیپ را در جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی شناسایی کردند. Ozdil و همکاران (۳۷) یک هاپلوتیپ را در جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی با استفاده از ژن ND₅ و روش PCR-RFLP پیدا کردند. به علاوه با استفاده از روش PCR-RFLP، سه و دو هاپلوتیپ در جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی به ترتیب در ژن‌های COII و 16S rRNA شناسایی شدند (۴۰، ۴۴). مطالعه Jabbari و همکاران (۲۱) با استفاده از

منابع

1. Alajmi, R., R. Abdel-Gaberl and L. Alfozana. 2019. Molecular insights of mitochondrial 16S rDNA genes of the native honey bees subspecies *Apis mellifera carnica* and *Apis mellifera jementica* (Hymenoptera: Apidae) in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 18: 1-17.
2. Al-Buraki, M. and A. Al-Buraki. 2008. Morphometrical study on Syrian honeybee (*Apis mellifera syriaca*). *Emir Journal Food Agriculture*, 20(1): 89-93.
3. Alburaki, M., S. Moulin, H. Legout, A. Alburaki and L. Garnery. 2011. Mitochondrial structure of Eastern honey bee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42: 628-641.
4. Arias, M.C and W.S. Sheppard. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 557-566.
5. Arias, M.C., D. Silvestre, F.O. Francisco, R. Weinlich and W.S. Shepard. 2008. An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome. *Apidologie*, 39: 475-480.
6. Bahador, Y., M. Mohammadabadi, A. Khezri, M. Asadi and L. Medhati. 2016. Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. *Research on Animal Production*, 7(13): 186-192 (In Persian).

7. Bouga, M., P.C. Harizanis, G. Kiliyas and S. Alahiotis. 2005. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, 36: 335-344.
8. Bouga, M., C. Alaux, M. Bienkowska, R. Büchler, N. Carreck, E. Cauia, R. Chlebo, B. Dahle, R. Dall'Olio, P. De la Rúa, A. Gregorc, E. Ivanova, A. Kence, M. Kence, N. Kezic, H. Kiprijanovska, P. Kozmus, P. Kryger, Y. Conte, M. Lodesani, A.M. Murilhas, A. Siceanu, G. Soland, A. Uzunov and J. Wilde. 2011. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*, 50: 51-84.
9. Charistos, L., F. Hatjina, M. Bouga, M.D. Mladenovic and A. Maistros. 2014. Morphological discrimination of Greek honey bee populations based on geometric morphometrics analysis of wing shape. *Journal of Apicultural Science*, 58: 75-84
10. Chavez-Galerza, J., L. Garnery, D. Henriques, C.J. Neves, W. Loucif-Ayad, S. Jonhston and M. Alice-Pinto. 2017. Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNA_{Leu-cox2} intergenic region. *Apidologie*, 48: 533-544.
11. Chen, C., Z. Liu, Q. Pan, X. Chen, H. Wang, H. Guo, S. Liu, H. Lu, S. Tian, R. Li and W. Shi. 2016. Genomic analyses reveal demographic history and temperate adaptation of the newly discovered honey bee subspecies *Apis mellifera sinixinyuan* n. spp. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1337-1348.
12. De la Rúa, P., Y.J. Ruiz, J. Galián and J. Serrano. 2004. Evaluation of the biodiversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from eastern Spain. *Journal of Apicultural Research*, 43: 162-166.
13. Dwivedi, B. and S.R. Gadagkar. 2009. The impact of sequence parameter values on phylogenetic accuracy. *Biology and Medicine*, 1(3): 50-62.
14. Ebadi, R. and A. Ahmadi. 2016. Honeybee culture. *Honeybee culture*. Arkan Danesh press, Tehran, Iran, 616pp (In Persian).
15. Estoup, A., M. Solignac, M. Harry and J.M. Cornuet. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21: 1427-1431.
16. Evans, D.J., R.S. Schwarz, Y.P. Chen, G. Budge, R.S. Cornman, P. Delarua, J. Miranda, S. Foret, L. Foster, L. Gauthier, E. Genersch, S. Gisder, A. Jarosch, R. Kocharski, D. Lopez, D.M. Lun, R. Moritz, R. Maleszka, I. Munoz and M.A. Pinto. 2013. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52: 8-15.
17. Ferreira, K.M., O.L. Silva, M.C. Arias and M.A.D. Lama. 2009. Cytochrome-b variation in *Apis mellifera* samples and its association with COI-COII patterns. *Genetica*, 135: 149-155.
18. Frankham, R., J.D. Ballou, M.R. Dudash, M.D. Eldridge, C.B. Fenster, R.C. Lacy and O.A. Ryder. 2012. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*, 153: 25-31.
19. Garnery, L., M. Solignac, G. Celebrano and J.M. Cornuet. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structures of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49: 1016-1021.
20. Hammer Ø. and D.A.T. Harper. 2006. *Paleontological data analysis*. Wiley-Blackwell, Oxford. 368pp.
21. Jabbari, A., H. Farhoud and M. Kence. 2005. Morphometric and MtDNA analysis in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) of north and north-west Iran. In: 1th Balkan scientific conference of biology, Plovdiv, Bulgaria.
22. Jamshidi, M., A. Nejati, R. Ebadi and G.H. Tahmasebi. 2008. Estimating phenotypic correlation between several traits of honeybee population in Tehran, Markazi, Ghazvin and Isfahan provinces of Iran. *Animal science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 79: 36-44 (In Persian).
23. Kandemir, I. and A. Kence. 1995. Allozyme variation in a central Anatolian honey bee (*Apis mellifera* L.) population. *Apidologie*, 26: 503-510.
24. Kandemir, I., A. Ozkan and M. Moradi. 2004. A scientific note on allozyme variability in Persian honey bees (*Apis mellifera meda*) from the Elburz mountains in Iran. *Apidologie*, 35: 521-522.
25. Kence, M., F. Jabbari Farhoud and R. Ivgin Tunca. 2009. Morphometric and genetic variability of honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Northern Iran. *Journal of Apicultural Research*, 48: 247-255.
26. Meier, R., K. Shiyang, G. Vaidya and P. Ng. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 5: 715-728.
27. Meixner, M.D., W.S. Sheppard, A. Dietz and R. Krell. 1994. Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie*, 25: 188-202.
28. Meixner, M.D., M.C. Arias and W.S. Sheppard. 2000. Mitochondrial DNA polymorphism in honey bee subspecies from Kenya. *Apidologie*, 31: 181-190.
29. Meixner, M.D., M.A. Leta, N. Koeniger and S. Fuchs. 2011. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera simensis*. *Apidologie*, 42: 425-437.
30. Meixner, M.D., M.A. Pinto, M. Bouga, P. Kryger, E. Ivanva and S. Fuchs. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52: 1-28.
31. Modaber, M., J. Nazemi-Rafie and H. Rajabi-Maham. 2109. Population genetic structure of native Iranian population of *Apis mellifera meda* based on intergenic region and COX2 gene of mtDNA. *Insects Sociaux*, 66: 413-424.
32. Mohammadi P., J. Nazemi-Rafie and J. Rostamzadeh. 2018. Evaluation of phylogenetic characteristics of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) populations based on mitochondrial ND2 gene. *Research on Animal Production*, 9: 93-104 (In Persian).

33. Moritz R.F.A., C.F. Hawkins, R.H. Crozier and A.G. Mackinley. 1986. A mitochondrial DNA polymorphism in honey bees (*Apis mellifera* L.). Cellular and Molecular Life Sciences, 42: 322-324.
34. Muñoz, I., R. Dall'Olio, M. Lodesani and P. De La Rúa. 2009. Population genetic structure of coastal Croatian honey bees (*Apis mellifera carnica*). Apidologie, 40: 617-626.
35. Nazemi-Rafie, J. 2010. Tree, phylogenetics & models of molecular evolution. University of Kurdistan press, Kurdistan, Iran. 279 pp (In Persian).
36. Oleksa, A. and A. Tofilski. 2015. Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. Apidologie, 46: 49-60.
37. Ozdil, F., I. Aytakin, F. Ilhan and S. Boztepe. 2012. Genetic variation in Turkish honey bees *Apis mellifera anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. meda* (Hymenoptera: Apidae) inferred from RFLP analysis of three mtDNA regions (16S rDNA-COI-ND5). European Journal of Entomology, 109: 161-167.
38. Ozdil, F. and F. Ilhan. 2014. Diversity of *Apis mellifera* subspecies from Turkey revealed by sequence analysis of mitochondrial 16s rDNA region. Biochemical Genetics, 50: 748-760.
39. Perugini, M., M. Manera, L. Grotta, M.C. Abete, R. Tarasco and M. Amorena. 2011. Heavy metal (Hg, Cr, Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. Biological Trace Element Research, 140(2): 170-176.
40. Pish Jang, J., M. Yiliz, B. Fakhri and A. Nobakht. 2011. A Study of the diversity in COI-COII intergenic region of mitochondrial DNA in different Persian honey bee (*A. mellifera meda*). Journal of Basic and Applied Scientific Research, 1: 215-220.
41. Posada, D. 2008. JModeltest: Phylogenetic model averaging. Molecular Phylogenetics and Evolution, 25: 1253-1256.
42. Rahimi, A. 2015. Study of the genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations using the mtDNACOI-COII intergenic region. Biologija, 61: 54-59.
43. Rahimi, A., A. Mirahmadi, D. Kahrizi, L. Zarei and S. Jamali. 2016. Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. Cellular and Molecular Biology, 62: 52-58.
44. Rahimi, A., A. Mirmoayedi, D. Kahrizi, L. Zarei and S. Jamali. 2018. Genetic variation in Iranian honey bees, *Apis mellifera meda* Skorikow, 1829, (Hymenoptera: Apidae) inferred from PCR-RFLP analysis of two mtDNA gene segments (COI and 16S rDNA). Sociobiology, 65: 482-490.
45. Rose, R., O. Golosova, D. Sukhomlinov, A. Tiunov and M. Proserpi. 2019. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. Bioinformatics, 35: 1963-1965.
46. Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer, Berlin, Heidelberg.
47. Sahebzadeh, N., E. Rakhshani and N. Tajabadi. 2017. Genetic polymorphism of Iranian honey bee populations of *Apis mellifera meda* using microsatellite markers. Dissertation, Univrsity of zabol, Iran.
48. Sheppard, W.S., T.E. Rinderer, J.A. Mazzoli, J.A. Sletzer and H. Shimanuki. 1991. Gene flow between African- and European- derived honey bee populations in Argentina. Nature, 349: 782-784.
49. Su, S., S. Albert, S. Chen and B. Zhong. 2005. Molecular cloning and analysis of four cDNAs from the heads of *Apis cerana cerana* nurse honeybees coding for major royal jelly proteins. Apidologie, 36(3): 389-401.
50. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
51. Techer, M.A., J. Clemencet, S. Simiand, H.A. Preaduth, H. Abou Azali, B. Reynaud and D. Hélène. 2017. Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee *Apis mellifera* populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. BMC Genetics, 18: 1-21.
52. Veisi, H., J. Nazemi-Rafie, A. Azizi and H. Rajabi-Maham. 2020. Genetic characteristics of the Iranian honey bee, *Apis mellifera meda*, based on mitochondrial genes of ND4, ND4L and ND6 and their internal transcribed spacers. Insectes Sociaux, 67: 439-448.
53. Yang, L., Z. Tan, D. Wang, L. Xue, M. Guan, T. Huang1 and R. Li. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. Scientific Methods, 4: 1-11.
54. Zardoya, R. and A. Meyer. 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular Biology and Evolution, 13: 933-942.
55. Zayed, A. 2009. Bee genetics and conservation. Apidologie, 40(3): 237-262.

Differentiation of Iranian Honeybees (*Apis mellifera meda*) from Commercial Honeybee Subspecies using ND1 and ND5 Genes

Himan Soltani², Javad Nazemi-Rafie² and Behrouz Harighi³

1- Graduated M.Sc. Student, University of Kurdistan

2- Assistant Professor, University of Kurdistan (Corresponding author: j.nazemi@uok.ac.ir)

3- Associate Professor, University of Kurdistan

Received: 5 September, 2019

Accepted: 9 January, 2020

Abstract

The samples of honeybee workers were collected from 26 areas from Iran. The aim of this research was to evaluate the ND1 (630 bp) and ND5 (630 bp) genes for differentiation of Iranian honeybees (*A. m. meda*) from commercial subspecies (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica* and *A. m. mellifera*). The ND1 and ND5 sequences of Iranian honeybees and other honeybee subspecies were evaluated using bayesian and parsimony methods. ND1 and ND5 showed eight and five haplotypes in populations of Iranian honeybees. Using bayesian method, four clades were identified in Iranian honeybees of phylogenetic tree derived from ND1 gene. The first to fourth clades included haplotype 1 (Golestan, Southern Khorasan, Kordestan, Lorestan and Mazandaran), haplotype 2 (Siatan Balochestan), haplotype 3 (Yazd and Eilan), haplotype 4 (Ardabil), haplotype 5 (Kerman), haplotype 6 (Zanjan), haplotype 7 (Kermanshah) and haplotype 8 (Boshehr, Western Azarbayejan, Charmahal Bakhtiari, Qazvin, Qom, Hamadan, Hormozgan, Razavi Khorasan, Northern Khorasan, Kohkeloye Boyerahmad, Khozestan, Markazi, Semnan and Fars). The phylogenetic trees driven from bayesian and parsimony methods demonstrated more ability of ND1 gene in comparison with ND5 gene; ND1 gene differentiated Iranian honeybees from commercial honeybee subspecies. Furthermore, using parsimony method, more informative sites were identified in ND1 in comparison with ND5 gene. Principle component analysis (PCA) confirmed phylogenetic trees of ND1 driven from bayesian and parsimony methods and phylogenetic tree of ND5 driven from bayesian method. Moreover, PCA demonstrated more efficiency of ND1 in differentiation of evolutionary lineages (Z-subgroup, A, C and M) in comparison with ND5 gene.

Keywords: Iranian honeybees, Mitochondrial gene, ND1, ND5, Phylogeny