دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) با استفاده از ژن *ND2* میتوکندریایی

پریناز محمدی[۱]، جواد ناظمی رفیع[۲] و جلال رستم‌زاده[۳]

۱- کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، (نویسنده مسوول: j.nazemi@uok.ac.ir)
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۳۱

چکیده

برای شناسایی خصوصیات فیلوژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل، نمونه‌برداری از تمام ۳۱ استان ایران در بهار و تابستان سال ۱۳۹٤ انجام شد. بررسی فیلوژنتیکی زنبورهای عسل بر اساس ژن *ND2* دی ان ای میتوکندریایی انجام شد. همچنین، نواحی بین ژنی واقع در بین ژن‌های *ND2* و *COI* در جمعیت‌های مختلف زنبور عسل مقایسه شدند. پس از توالی‌یابی و همترازی ژن مورد نظر، جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شده با نرم‌افزارهای MrBayes 3.2 و PAUP 4.0 b10 آنالیز شدند. مقایسه بین توالی‌های بخشی از ژن *ND2* نشان داد که بین جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m.meda*)، هشت تفاوت نوکلئوتیدی وجود دارد. پس از رسم درخت فیلوژنی، جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m.meda*) در چهار گروه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که علاوه بر اینکه نمونه‌های آذربایجان شرقی و یزد از بقیه جمعیت‌های زنبورعسل جدا شدند، این دو جمعیت دارای بلندترین ناحیه بین ژنی (*ITS2*) با ۷۰ نوکلئوتید) بودند. همچنین، جمعیت‌های چهارمحال و بختیاری، تهران، سیستان و بلوچستان، مازندران، لرستان، کردستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، خراسان جنوبی، ایلام، گلستان و قزوین که در یک گروه قرار گرفته بودند، تمامی دارای طول *ITS2* ٦۲ جفت باز بودند. *ITS2* به طور میانگین دارای تعداد نوکلئوتید بیش‌تری نسبت به *ITS1* و *ITS3* بود (۵۹ تا ۷۰ نوکلئوتید). تمام توالی‌های مورد بررسی *ITS1* به جز زیرگونه *syriaca* دارای ۲۰ نوکلئوتید بودند. کم‌ترین طول ناحیه بین ژنی مربوط به *ITS3* بود که از دو نوکلئوتید (A و T) تشکیل شده بود. نمونه‌های مربوط به اردبیل، زنجان و کرمان نیز با ساپورت ۹۱ در یک گروه قرار گرفتند. همچنین نمونه‌های مربوط به البرز، خراسان شمالی، خراسان رضوی، اصفهان، شیراز، سمنان، مرکزی، خوزستان، هرمزگان، همدان، قم، بوشهر و آذربایجان غربی در یک گروه قرار گرفتند. بررسی مقایسه‌ی جمعیت‌های نمونه‌برداری شده، به روش دو پارامتری کیمورا نشان داد که هیچ گونه تفاوت نوکلئوتیدی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از گیلان با زیرگونه کارنیکا (*A.m.carnica*) وجود نداشت. بنابراین، نمونه‌های جمع‌آوری شده از گیلان جزء زیرگونه *A.m.meda* نبودند و با بررسی‌های انجام گرفته در زیرگونه کارنیکا قرار گرفتند. زنبورعسل کارنیکا بومی ایران نیست؛ بنابراین، ملکه‌های این زیرگونه زنبور عسل توسط برخی از زنبورداران به صورت غیرقانونی وارد کشور شده است. زیرگونه‌های *A.m.intermissa* و *A.m.scutellata* بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۱) را با نمونه‌های جمع‌آوری شده از ایران داشتند. مقایسه نمونه‌های البرز، شیراز، سمنان، مرکزی، خوزستان، هرمزگان، همدان، قم، بوشهر و آذربایجان غربی نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت ژنتیکی بین این نمونه‌ها وجود ندارد. همچنین درخت فیلوژنی نشان داد که ژن *ND2* توانایی تفکیک زیرگونه‌های *syriaca*، *intermissa*، *scutellata* و *mellifera* را از زیرگونه‌های *carnica* و *meda* دارد. زیرگونه زنبور عسل ایتالیایی (*A.m.ligustica*) با یک جایگزین C→T از زیرگونه زنبورعسل کارنیکا (*A.m.carnica*) متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: زنبورعسل، خصوصیات ژنتیکی، میتوکندری، ژن *ND2*

مقدمه

در دنیا ده گونه زنبور عسل وجود دارد که گونه زنبورعسل کوچک *A. florea* F.، زنبورعسل بزرگ *A. dorsata* L. ، زنبورعسل هندی *A.cerana* F. و زنبورعسل معمولی *A. mellifera* L. در بیش‌تر نقاط دنیا انتشار دارند (۱). در میان این حشرات، دو گونه زنبورعسل معمولی *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) و زنبورعسل کوچک *Apis florea* در ایران وجود دارد که مهم‌ترین نقش را در گرده افشانی گیاهان در بین حشرات دارند (۳۲،۲۶). اعضای گونه *A. mellifera* L. تنها زنبورهایی هستند که در تمام نقاط جهان به جز مناطق قطبی یافت می‌شوند. طبق برآوردهای انجام شده، ارزش اقتصادی حاصل از دخالت زنبور عسل در گرده افشانی گیاهان ۹۰ برابر بیش‌تر از تولیدات مستقیم آن است. در ایران واردات ملکه‌های خارجی از سال ۱۳۴۰ باعث آمیخته شدن توده‌های بومی با زیرگونه‌های خارجی شد و از سوی دیگر به علت قطع واردات ملکه از دهه ۶۰، انتظار می‌رود تثبیت ژنتیکی نسبی در توده موجود صورت گرفته باشد (۱۴). در سال‌های گذشته مؤسسات مختلف، تعداد زیادی ملکه زنبورعسل هیبرید به نام میدنایت (مخلوطی از زیرگونه قفقازی و ایتالیایی)، استارلاین (مخلوطی از زیرگونه ایتالیایی و کارنیولان) را وارد کشور کردند. با توجه به اینکه این ملکه‌ها از زیرگونه بخصوصی نبوده و از اختلاط دو یا چند زیرگونه و یا انتخاب درون گونه‌ای حاصل شده‌اند، ادامه ورود این ملکه‌های آمیخته، به منزله یک خطر جدی برای زنبورعسل زیرگونه ایرانی است، زیرا ادامه این عمل به انحطاط زنبورعسل زیرگونه ایرانی منجر می‌شد که خوشبختانه در سال‌های اخیر از واردات آن‌ها جلوگیری به عمل آمد. متاسفانه ورود بسیار زیاد ملکه‌های زنبورعسل در گذشته، باعث ایجاد زنبورهای عسل دورگه حتی چند رگه در ایران شده است (۲۸). ورود انواع ملکه‌های خارجی با کارایی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

بالا می‌تواند در جمعیت‌های جدید منجر به هیبریداسیون گردد، اما تعداد زیاد ورود این ملکه‌ها به طور ویژه‌ای باعث کاهش تنوع جمعیت محلی و افزایش خلوص ژنتیکی می‌گردد (۳۵). رانش ژنتیکی (از بین رفتن ژن‌ها) منجر به افزایش همگنی و حذف آلل‌ها (بویژه آلل‌های مغلوب) می‌گردد که در نهایت منجر به کاهش تنوع و در پس آن کاهش توانایی جمعیت‌ها در تطابق با محیط و تغییرات محیطی می‌شود، که اغلب این اتفاق در جمعیت‌های کوچک‌تر و همگن‌تر رخ می‌دهد (۱۲). موانع جغرافیایی مانند فواصل، پستی و بلندی‌ها می‌توانند باعث جدایی جمعیت‌ها شوند. موانع جغرافیایی به نواحی اطلاق می‌شود که از جریان ژن در میان جمعیت‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. این طور تصور می‌گردد که گونه‌زایی جغرافیایی متداول‌ترین روند برای جداسازی گونه‌ها است (۱۸). جدایی جغرافیایی می‌تواند منجر به تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها و رانش ژنی شود و در نهایت باعث ایجاد گروه هایی شود که زیرگونه نامیده می‌شوند (۶). پراکنش جغرافیایی وسیع همراه با جدایی جغرافیایی باعث به وجود آمدن زیرگونه‌های مختلفی از زنبورعسل، در نتیجه انطباق با شرایط زیست محیطی شده است (۲۵). در حدود ۲۶ زیرگونه و اکوتیپ‌های (موجود سازش یافته با یک زیستگاه خاص) متعدد گونه *Apis mellifera* براساس رفتار، صفات ظاهری و شواهد مولکولی معرفی شده است. برخی زیرگونه‌ها، منطقه جغرافیایی وسیع و برخی دیگر مناطق کوچکی را اشغال می‌کنند (۳۰). در این میان نشانگرهای مبتنی بر DNA میتوکندریایی و ریزماهواره‌ها در مطالعه تکامل زنبور عسل و حل روابط بین جمعیت‌های این گونه بسیار مفید است (۱۵، ۲۲). سلول‌های جانوران دارای میتوکندری است. در جانوران مطالعه ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته به دلایلی از جمله نسخه‌های متعدد در سلول، سرعت نوترکیبی پایین، وراثت هاپلوئیدی و استخراج آسان ارجحیت دارد (۸). امروزه DNA میتوکندری یکی از منابع پرکاربرد در مطالعات زیست‌شناسی جمعیت جانوران و جغرافیای زیستی آن‌ها است (۲۱،۲). با استفاده از آنالیز DNA میتوکندری یک زنبور کارگر، اطلاعاتی در مورد اجداد مادری یک کلنی فراهم خواهد شد (۹،۵). متاسفانه به دلیل ورود ملکه‌های زیرگونه‌های مختلف زنبورعسل تا سال ۱۳۶۸ برخی از جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر مخلوط گردید که خوشبختانه بعد از این سال واردات ملکه‌های خارجی زنبورعسل متوقف گردید. ولی در سال‌های اخیر زنبورداران به طور غیرقانونی زیرگونه‌های مختلف زنبورعسل بخصوص زیرگونه کارنیکا (*Apis mellifera carnica*) را وارد کشور کرده‌اند که به مرور زمان با زیرگونه ایرانی زنبور عسل (*Apis mellifera meda*) اختلاط پیدا کرده و ذخایر ژنتیکی این زیرگونه بومی با خطر مواجه شده است. ۱۳ ژن کدکننده پروتئین در ژنوم میتوکندری با متابولیسم هوازی مرتبط هستند. ژنوم میتوکندری دارای ژن‌های سیتوکروم اکسیداز *Cox1*، *Cox2*، *Cox3*، *Cytb*، *Atpase6*، *Atpase8*، *NADH دهیدروژناز* (*ND1*، *ND2*، *ND3*، *ND4*، *ND4L*، *ND5* و *ND6*) است. برخی ژن‌ها با تولید ریبوزوم مرتبط هستند که در داخل اندامک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (زیر واحدهای کوچک و بزرگ *SsrRNA* یا *12SrRNA* و *1SrRNA* یا *16SrRNA*). میتوکندری فقط در ساخت پروتئین‌های مورد احتیاج و واکنش‌های ضروری مانند تنفس نقش دارند. کمپلکس تنفسی *NADH دهیدروژناز* که دروازه ورود به زنجیره انتقال الکترون است با انتقال یک جفت الکترون از NADH، زنجیره انتقال الکترون را شروع کرده و در نهایت ATP و مولکول آب را تولید می‌کند (۵). هدف از این تحقیق بررسی خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m.meda*) بر اساس ژن *ND2* و مقایسه با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل و شناسایی مناطق استقرار این زیرگونه بومی زنبور عسل در مناطق مختلف ایران بود. همچنین نواحی بین ژنی (*ITs*) واقع در بین *ND2* و *COI* در بین جمعیت‌های مختلف زنبورعسل و زیرگونه‌های دیگر زنبورعسل مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

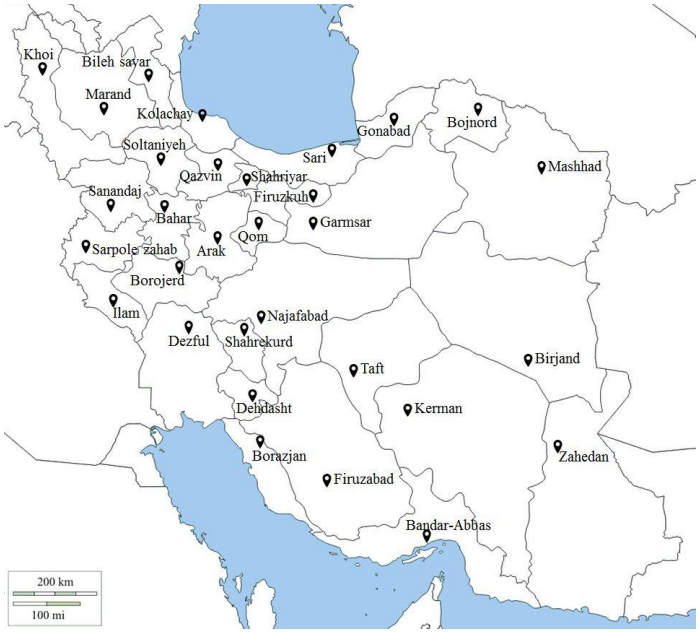
نمونه‌برداری از تمام استان‌های کشور شامل استان‌های کرمانشاه (سرپل ذهاب)، ایلام (ایلام)، خوزستان (دزفول)، بوشهر (برازجان)، هرمزگان (بندرعباس)، آذربایجان‌شرقی (مرند)، آذربایجان غربی (ارومیه)، اردبیل (بیله‌سوار)، گیلان (کلاچای)، مازندران (ساری)، گلستان (گنبدکاووس)، فارس (فیروزآباد)، قم (قم)، تهران (فیروزکوه)، البرز (شهریار)، مرکزی (اراک)، لرستان (بروجرد)، همدان (لالجین)، کرمان (کرمان)، سیستان و بلوچستان (زاهدان)، کهگیلویه و بویراحمد (ده دشت)، چهار محال و بختیاری (شهرکرد)، سمنان (گرمسار)، خراسان شمالی (بجنورد)، خراسان رضوی (مشهد)، خراسان جنوبی (بیرجند)، کردستان (سنندج)، قزوین (قزوین)، زنجان (سلطانیه)، اصفهان (نجف آباد) و یزد (تفت) در طی ماه‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۴ نمونه‌برداری شد (شکل ۱ و جدول ۱).

1- Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide

2-Ethylenediamine tetraacetic acid

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]



شکل ۱- مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های زنبورعسل از ایران

Figure 1. Collection areas of honeybee populations (*Apis mellifera*) from Iran

جدول ۱- طول و عرض جغرافیایی نواحی نمونه‌برداری شده جمعیت‌های زنبور عسل از ایران

Table 1. Longitude and latitude of sampled areas of honeybee populations (*Apis mellifera*) from Iran

نام منطقه	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	نام منطقه	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
سرپل ذهاب (کرمانشاه)	34° 24' N 45°52' E	۵۷۰	قزوین (قزوین)	36°02' N 49°38' E	۱۳۶۰
ایلام (ایلام)	33°84' N 45°60' E	۱۳۸۰	سلطانیه (زنجان)	36°22' N 48°23' E	۱۱۶۶
دزفول (خوزستان)	32°08' N 48°34' E	۱۳۲	شهرکرد (چهارمحال و بختیاری)	32°28' N 50°98' E	۲۰۵۲
مرند (آذربایجان شرقی)	38°24' N 45°47' E	۱۳۰۰	فیروزآباد (شیراز)	28°81' N 52°60' E	۱۵۸۰
گنبدکاووس (گلستان)	36°8' N 55°15' E	۲۱۱	ارومیه (آذربایجان غربی)	37°32' N 47°2' E	۱۳۲۵
ده دشت (کهگیلویه و بویراحمد)	30°82' N 50°56' E	۸۰۰	برازجان (بوشهر)	29°29' N 51°21' E	۷۱
نجف آباد (اصفهان)	32°63' N 51°36' E	۱۵۸۰	بندر عباس (هرمزگان)	27°25' N 57°11' E	۲۵۰
سنندج (کردستان)	35°31' N 46°99' E	۱۵۰۰	زاهدان (سیستان)	29°49' N 60°78' E	۱۳۹۰
لالجین (همدان)	34°58' N 48°30' E	۱۸۱۷	تفت (یزد)	31°45' N 54°12' E	۱۵۶۰
بروجرد (لرستان)	33°49' N 48°43' E	۱۴۹۸	گرمسار (سمنان)	34°25' N 51°52' E	۸۵۵
اراک (مرکزی)	34°06' N 49°78' E	۱۷۰۹	بجنورد (خراسان شمالی)	37°20' N 56°50' E	۱۲۰۵
قم (قم)	34°56' N 50°93' E	۹۴۶	مشهد (خراسان رضوی)	36°12' N 59°36' E	۱۰۲۰
فیروز کوه (تهران)	35°39' N 50°56' E	۲۲۸	بیرجند (خراسان جنوبی)	32°53' N 59°13' E	۱۴۸۰
شهریار (البرز)	28°81' N 52°60' E	۱۸۵	بیله‌سوار (اردبیل)	39°23' N 48°22' E	۹۵
ساری (مازندران)	36°26' N 56°19' E	۲۵۲	کرمان (کرمان)	32°55' N 59°29' E	۱۷۵۶
کلاچای (گیلان)	36°59' N 50°29' E	۱۰۰			

جمع‌آوری نمونه‌ها با استفاده از پنبه آغشته به اتیل استات جهت بیهوش کردن زنبورها انجام گرفت و سپس زنبورها به ظرف حاوی الکل مطلق منتقل شدند. در این تحقیق از قفسه سینه زنبورهای کارگر برای استخراج DNA استفاده شد (۱۹).

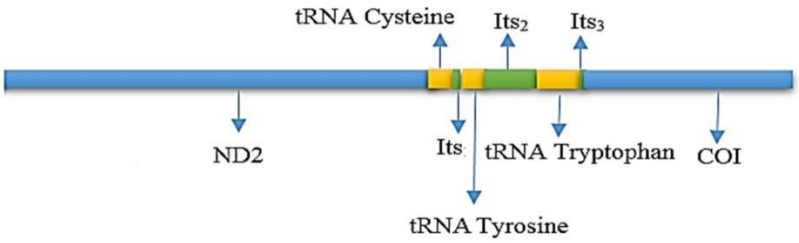
۸۰ نمونه زنبورعسل کارگر از هر منطقه جمع‌آوری شد و سه نمونه از هر منطقه برای توالی‌یابی ژن ND2 مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی، استخراج DNA با استفاده از محلول

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

CTAB (شامل: دو درصد CTAB[1]، mM Tris-Hcl ۱۰۰PH=8، ۱/۴M NaCl، ۲۰ mM EDTA[2]) انجام گرفت (۱۱). کیفیت نمونه‌های DNA با الکتروفورز و روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE 0/5X بررسی شد. به همین منظور پنج میکرولیتر از محلول DNA مربوط به هر نمونه با دو میکرولیتر محلول dye مخلوط شد. سپس محلول حاصل در چاهک‌ها بارگذاری شده و الکتروفورز ژل به مدت یک ساعت با ولتاژ ۷۰ ولت در دستگاه الکتروفورز انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نمونه‌ها به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شدند (جدول ۲) (۲۹). چرخه حرارتی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تکثیر ژن *ND2*، نواحی بین ژنی و بخشی از *COI* تنظیم شد (۲۰) (جدول ۳). پس از حصول اطمینان از استخراج و کیفیت DNA روی ژل آگارز، با استفاده از جفت آغازگرهای Forward:$^{5'}$ GCTAAATAAGCTAACAGGTTCAT$^{3'}$ Reverse:^{5}CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC^{3} ژن *ND2*، نواحی بین ژنی و بخشی از ژن *COI* در طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد (شکل ۲). پس از تکثیر قطعه مورد نظر با دستگاه ترموسایکلر، به‌منظور مشاهده قطعه تکثیریافته از ژل آگارز یک درصد استفاده شد (شکل ۳). برای این منظور از دستگاه الکتروفورز استفاده شد. سپس محصول واکنش PCR به شرکت Seqlab آلمان جهت تعیین توالی ارسال گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی بخشی از ژن *ND2* با کدهای MH208312، MH208313، MH208314، MH208315 .... و توالی‌های ژن‌های tRNA و نواحی بین ژنی با کدهای MH232094، MH232095، MH232096، MH232097 .... در بانک ژن NCBI به ثبت رسیدند.

بررسی و ویرایش توالی‌ها با نرم‌افزار Chromas 2.01 انجام شد (۱۰). برای تفکیک و بررسی خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل از بخشی از ژن *ND2* استفاده گردید و جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m.meda*) با زیرگونه‌های زنبورعسل *carnica*، *ligustica*، *syriaca*، *mellifera*، *intermissa* و *scutellata* مقایسه شدند. هم ردیف کردن توالی‌ها با نرم‌افزار تحت وب سایت MAFFT[1] انجام شد بدین صورت که ابتدا فایل توالی‌های نوکلئوتیدی با فرمت FASTA بارگذاری شد و توالی‌های مورد بررسی همتراز شدند و سپس به صورت فرمت nexus ذخیره شدند تا توسط نرم‌افزارهای فیلوژنتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. برای انجام بررسی‌های مولکولی از نرم‌افزار MrBayes 3.2، روش بیزی[2] و نرم‌افزار PAUP 4.0 b10، روش پارسیمونی استفاده و درخت فیلوژنی رسم شد. روش پارسیمونی می‌تواند سریع‌تر از برخی روش‌ها (مانند maximum likelihood) درخت مشابهی با همان تعداد داده ایجاد کند (۳۱). در رسم درخت با روش بیزی از مدل جایگزینی GTR، توزیع گاما و ۱/۰۰۰/۰۰۰ تکرار استفاده شد. در روش پارسیمونی از روش bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار و الگوریتم TBR[3] در رسم درخت استفاده گردید. روش TBR برای کاهش تعداد درخت‌های مورد بررسی است تا از بررسی تمام حالات ممکن درخت‌های فیلوژنی جلوگیری شود. در مقایسه فاصله بین توالی‌ها با نرم‌افزار MEGA 6.0 و روش دو پارامتری کیمورا[4] استفاده گردید. مدل دو پارامتری کیمورا مقادیر تفاوت جایگزینی نوکلئوتیدی همجنس (α) را با مقادیر جایگزینی نوکلئوتیدی ناهمجنس (2β) ترکیب می‌کند (۳۴).



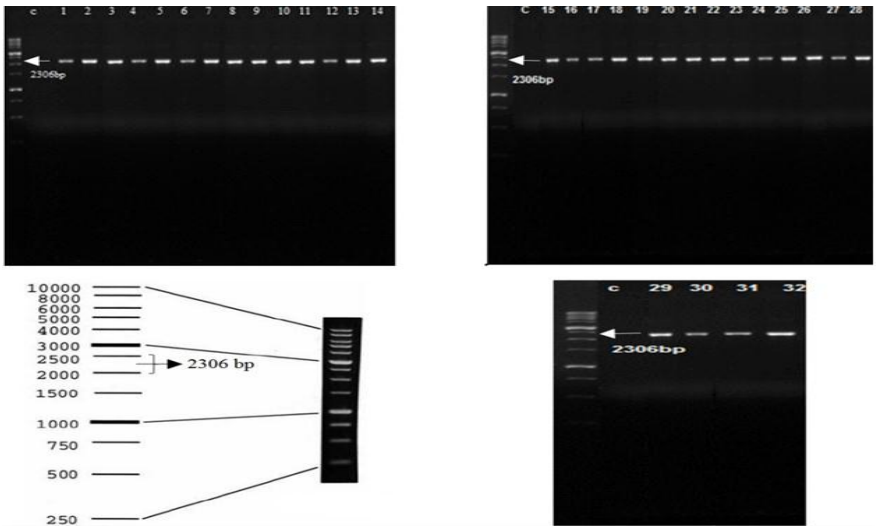
شکل ۲- الگوی نواحی ژنی تکثیر شده در فرآیند PCR

Figure 2. Schematic pattern of amplified genes in PCR

1-http://mafft.cbrc.Jp/alignment/server 2-baysian 3-tree bisection reconnection 4- K2P

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]



شکل ۳- عکس ژل حاصل از بارگذاری نتایج حاصل از تکثیر ژن *ND2-COI* جمعیت‌های زنبور عسل (*Apis mellifera*)

Figure 3. Gel picture of amplified *ND2-COI* in honeybee populations (*Apis mellifera*)

جدول۲- مقدار مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR

Table 2. Ingredients of each experimental reaction in PCR

اجزاء مورد نیاز	غلظت اولیه	غلظت نهایی	حجم (µl)
Buffer 10x	۱۰ X	۱ X	۲/۵
Primer Forward	۱۰۰ µm	۰/۴ µm	۱
Primer Reverse	۱۰۰ µm	۰/۴ µm	۱
dntp	۱۰ mM	۲۰۰µM	۰/۵
DNA	۱۰۰ ng	۱۰۰ng	۳
Taq polymerasie	۵ units/ µl	۵ units/ µl	۰/۲
$MgCl_2$	۲۵ mM	۲/۵ mM	۲
Double distilled water	–	–	۱۴/۸

جدول۳- چرخه‌های حرارتی واکنش PCR برای تکثیر ناحیه ژنی *ND2-COI*

Table 3.The thermal cycles for amplification of *ND2-COI* genes in PCR

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما(°C)
۱	واسرشت اولیه	پنج دقیقه	۹۴
	واسرشت	یک دقیقه	۹۴
۳۰	اتصال	۲۰ ثانیه	۵۴
	بسط	دو دقیقه	۶۴
۱۰	بسط نهایی	۱۰ دقیقه	۶۴



شکل ۴- مقایسه طول سه ناحیه بین ژنی (*ITs1*، *ITs2* و *ITs3*) در جمعیت‌های زنبور عسل (*Apis mellifera*) جمع‌آوری شده از ایران با برخی از زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل

Figure 4. Length comparison of intergenic regions (*ITs1*, *ITs2*, *ITs3*) of collected honeybee populations (*Apis mellifera*) from Iran with another honeybee subspecies.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

نتایج و بحث

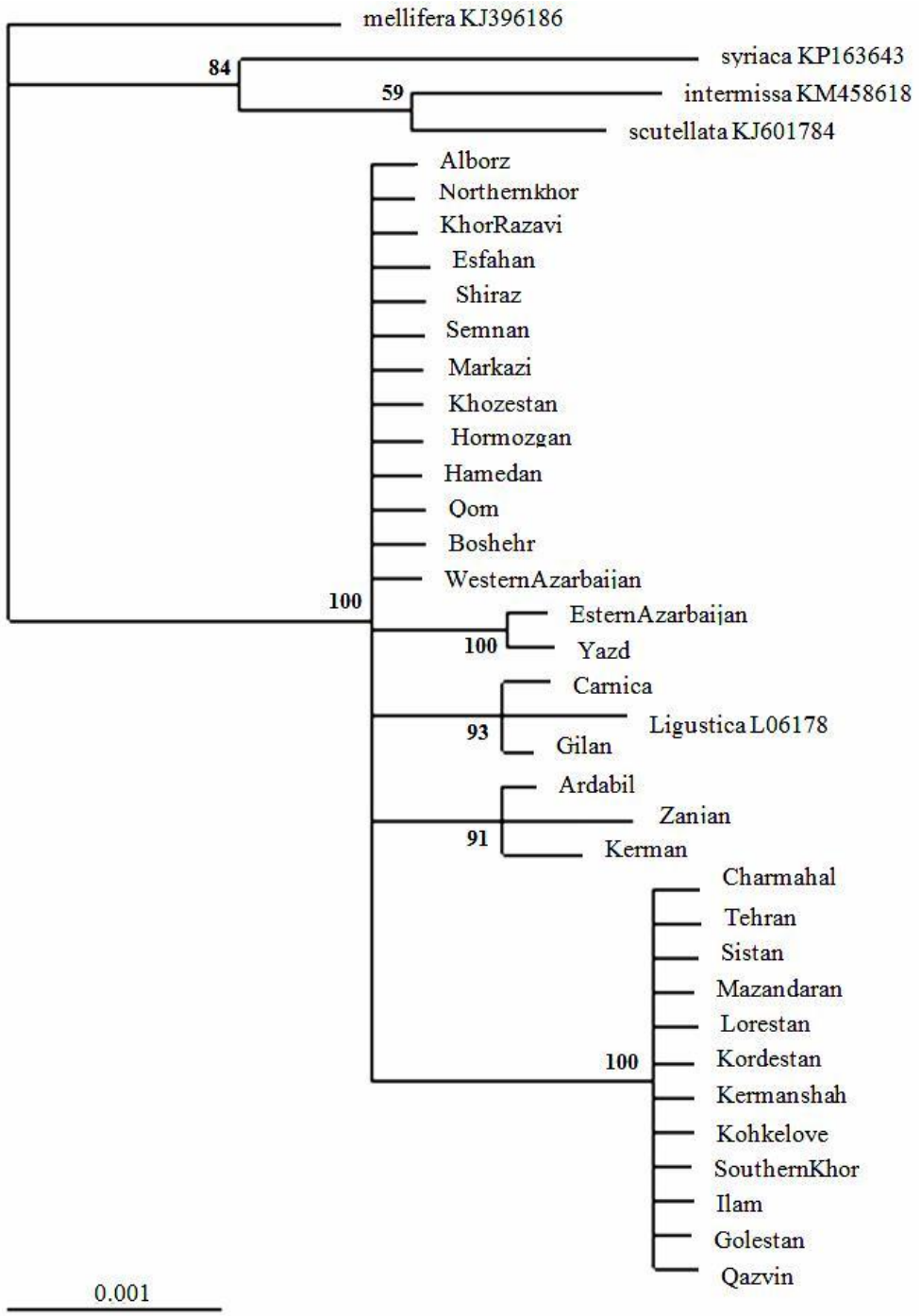
در این بررسی زیرگونه *mellifera* به‌عنوان گروه خارجی[1] در نظر گرفته شد. جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی (*A.m.meda*) در چهار گروه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نمونه‌های مربوط به گیلان و زیرگونه *A.m.carnica* با زیرگونه *A.m.ligustica* با ساپورت (پشتیبانی) ۹۳ در کنار هم در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین، نمونه‌های جمع‌آوری شده از گیلان جزء زیرگونه *A.m.meda* نبودند، بلکه در زیرگونه کارنیکا قرار گرفتند. نمونه‌های آذربایجان شرقی و یزد با ساپورت ۱۰۰ در یک گروه قرار گرفتند. همچنین نمونه‌های مربوط به اردبیل، زنجان و کرمان نیز با ساپورت ۹۱ در یک گروه قرار گرفتند. نمونه‌های مربوط به البرز، خراسان شمالی، خراسان رضوی، اصفهان، شیراز، سمنان، مرکزی، خوزستان، هرمزگان، همدان، قم، بوشهر و آذربایجان غربی در یک گروه قرار گرفتند. همچنین نمونه‌های مربوط به چهارمحال و بختیاری، تهران، سیستان، مازندران، لرستان، کردستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، خراسان جنوبی، ایلام، گلستان و قزوین با ساپورت ۱۰۰ در گروه دیگری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جمعیت‌های زنبورعسل زیرگونه ایرانی (*A.m.meda*) از زیرگونه‌های زنبورعسل *carnica* و *ligustica* جدا شدند (شکل ۵). توالی‌های بخشی از ژن *ND2* و برخی از توالی‌های موجود در پایگاه داده با استفاده از روش ماسل[2] هم ردیف شدند و تفاوت‌های بین توالی‌ها بررسی شد. ۳۰ تفاوت نوکلئوتیدی در سرتاسر توالی‌های مورد مقایسه جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی با توالی‌های پایگاه داده (*melliferra* KJ396186، ligusticaL06178، *syriaca* KP163643، *intermissa* KM458618، *scutellata* KJ601784) مشاهده گردید. در مقایسه بین توالی‌های جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی هشت تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده شد. به برخی از تفاوت‌های نوکلئوتیدی شامل جایگزینی T→C در نوکلئوتید شماره ۱۱۵ پس از پرایمر رفت در نمونه‌های گیلان، *A.m.carnica* و *A.m.ligustica*، T→A و T→C در نوکلئوتیدهای شماره ۳۲۳ و ۳۵۶ زیرگونه *A.m.mellifera*، جایگزینی نوکلئوتیدی T→C در نوکلئوتید ۵۳۹ در نمونه‌های اردبیل، زنجان و کرمان، جایگزینی T→A در نوکلئوتید ۸۸۱ در نمونه‌های آذربایجان شرقی و یزد می‌توان اشاره نمود. همچنین هیچگونه تفاوت نوکلئوتیدی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از گیلان و زیر گونه کارنیکا (*A.m.carnica*) وجود نداشت. نمونه‌های زنبورعسل گیلان و زیرگونه کارنیکا از زیرگونه زنبور عسل ایتالیایی (*A.m.ligustica*) با یک جایگزینی C→T در جایگاه نوکلئوتیدی ۳۱۲ از یکدیگر متفاوت بودند. دو زیرگونه آفریقایی (*A.m.intermissa* و *A.m.scutellata*) با حذف نوکلئوتید T در جایگاه ۱۲۸ از زیرگونه‌های دیگر زنبورعسل متمایز شدند (جدول ۴). همچنین سه ناحیه بین ژنی ITS_1، ITS_2 و ITS_3 واقع در بین ژن‌های *ND2* و *COI* که به طور متناوب بین *tRNACys*، *tRNATyr* و *tRNATrp* قرار گرفته‌اند در بین جمعیت‌های مختلف زنبورعسل جمع‌آوری شده از ایران و زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی‌های بین ژنی ITS_1 نشان داد که هیچ گونه تفاوتی بین توالی‌های نوکلئوتیدی جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m.meda*) جمع‌آوری شده از ایران وجود نداشت اما بین جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) و زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل تفاوت‌هایی مشاهده گردید. تمام توالی‌های مورد بررسی ITS_1 به جز زیرگونه *syriaca* دارای ۲۰ نوکلئوتید بودند. ITS_1 زیرگونه *syriaca* دارای ۱۵ نوکلئوتید بود (شکل ۴). هم‌ردیفی توالی‌های ITS_2 واقع در بین ژن‌های *ND2* و *COI* نمونه‌های زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) و زیرگونه‌های دیگر نشان داد که بیش‌ترین تنوع و تفاوت نوکلئوتیدی در این ناحیه نسبت به نواحی بین ژنی ITS_1 و ITS_3 وجود داشت. همچنین ITS_2 به طور میانگین دارای تعداد نوکلئوتید بیش‌تری نسبت به ITS_1 و ITS_3 بود (۵۹ تا ۷۰ نوکلئوتید). کم‌ترین طول ناحیه بین ژنی مربوط به ITS_3 بود که از دو نوکلئوتید (A و T) تشکیل شده بود. مقایسه بین طول ناحیه بین ژنی ITS_2 نشان داد که بیش‌ترین طول این ناحیه بین ژنی ITS_2 مربوط به آذربایجان شرقی و یزد (۷۰ نوکلئوتید) بود. همچنین زیرگونه *scutellata* دارای کوتاه ترین ناحیه بین ژنی در ITS_2 (۵۹ نوکلئوتید) بود (شکل ۴). نتایج مربوط به درخت فیلوژنی رسم شده با استفاده از ژن *ND2* نشان داد که آذربایجان شرقی و یزد از بقیه جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) جدا شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های مربوط به دو استان آذربایجان شرقی و یزد دارای بلندترین طول ناحیه بین ژنی در ITS_2 بودند. هچنین مقایسه بین درخت رسم شده ژن *ND2* و طول ناحیه ITS_2 نشان داد که تشابه و تطابق زیادی بین گروه‌بندی جمعیت‌های ایرانی زنبور عسل (*A. m. meda*) و طول ITS_2 وجود دارد، به عنوان مثال چهارمحال و بختیاری، تهران، سیستان و بلوچستان، مازندران، لرستان، کردستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، خراسان جنوبی، ایلام، گلستان و قزوین که در یک گروه قرار گرفته بودند، تمامی دارای طول ITS_2 ۶۲ جفت باز بودند. همچنین البرز، خراسان شمالی، خراسان رضوی، شیراز، سمنان، مرکزی، خوزستان، هرمزگان، همدان، قم، بوشهر و آذربایجان غربی که در یک گروه قرار گرفتند دارای طول ITS_2 ۶۹ جفت باز بودند. بررسی نواحی بین ژنی جمعیت‌های زنبور عسل جمع‌آوری شده از ایران نشان داد که اندازه مجموع نواحی بین ژنی (مجموع ITS_1، ITS_2، ITS_3) از ۸۴ تا ۹۲ نوکلئوتید متغیر بود. کوتاه‌ترین مجموع نواحی بین ژنی (۸۴ نوکلئوتید) مربوط به نمونه‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، تهران، سیستان، مازندران، لرستان، کردستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد، خراسان جنوبی، ایلام، گلستان، قزوین، *A. m. carnica*، گیلان و بلندترین مجموع نواحی بین ژنی (۹۲ نوکلئوتید) مربوط به نمونه‌های آذربایجان شرقی و یزد بودند.

1- Outgroup

2- Muscle

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]



شکل ۵- درخت فیلوژنی بخشی از توالی‌های ژن *ND2* زنبورهای عسل جمع‌آوری شده از ایران با توالی‌های برخی گونه‌های زنبورعسل (*Apis mellifera*) موجود در پایگاه داده. زیرگونه *mellifera* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است.

Figure 5. Phylogenetic tree of partial seqvences *ND2* gene of collected honeybee populations (*Apis mellifera*) from Iran with another honeybee subspecies. *A.m.mellifera* was considered as outgroup

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

جدول ۴- موقعیت تفاوت نوکلوئیدی در بخشی از ژن *ND2* در جمعیت‌های زنبورعسل از ایران و توالی‌های زنبورعسل (*A.mellifera*) موجود در پایگاه داده (شماره‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های نوکلئوتیدی از پرایمر رفت (forward) است).

Table 4. Position of nucleotide differences of in partial *ND2* gene in Iranian honeybee populations and some subspecies of *Apis melliefra* from data bank (numbers are nucleotide differences from forward primer)

شماره نوکلئوتید	۷۸	۱۱۵	۱۲۸	۱۴۲	۲۰۰	۲۵۲	۲۰۸	۳۱۲	۳۲۳	۳۲۶	۳۵۶	۴۰۵	۴۲۲	۴۳۷	۵۱۲	۵۲۳	۵۳۹	۵۸۷	۶۳۲	۶۵۹	۶۶۱	۷۰۷	۷۲۱	۷۷۰	۸۲۱	۸۸۱	۹۰۵	۹۴۷	۹۵۹	۹۶۵
Alborz	G	T	T	A	A	-	T	C	T	T	T	T	C	A	C	C	T	C	G	T	T	A	T	C	T	T	C	C	A	T
Northernkhor	A	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KhorRazavi	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Esfahan	G	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
Shiraz	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Semnan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Markazi	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Khozestan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hormozgan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hamedan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Qom	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Boshehr	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
WesternAzar	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EasternAzar	A	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
Yazd	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ardabil	G	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Zanjan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kerman	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Charmahal	A	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.
Tehran	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sistan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Mazandaran	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Lorestan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kordestan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kermanshah	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kohkeloye	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SouthernKhor	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ilam	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Golestan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Qazvin	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A. m. carnica	.	C	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.
Gilan	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ligusticaL06178	.	.	.	.	.	-	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
melliferraKJ396186	.	T	.	.	.	-	.	C	A	.	C	C	.	G	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
syriacaKP163643	.	.	.	.	.	T	C	.	T	C	T	.	T	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	T	.	.	.	C	G	.
intermissaKM458618	.	.	-	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	T	.	T	.	C	.	.	.	A	C
scutellataKJ601784	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	T	.	.	T	.	.

بررسی مقایسه دو به دو جمعیت‌های نمونه‌برداری شده، به روش دو پارامتری کیمورا نشان داد که هیچ گونه تفاوت نوکلئوتیدی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از گیلان با نمونه‌ی کارنیکا وجود ندارد. زیرگونه‌های *A.m.intermissa* و *A.m.scutellata* بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۱) را با نمونه‌های جمع‌آوری شده از ایران داشتند. زیرگونه *A.m.ligustica* کم‌ترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۰۱) را نسبت به نمونه‌های جمع‌آوری شده، به خصوص نمونه‌های گیلان و زیرگونه کارنیکا از خود نشان داد. مقایسه نمونه‌های البرز، شیراز، سمنان، مرکزی، خوزستان، هرمزگان، همدان، قم، بوشهر و آذربایجان غربی نشان داد که تفاوتی بین این نمونه‌ها وجود ندارد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ممانعت از واردات گسترده ملکه‌های زنبورعسل توانسته است خصوصیات ژنتیکی زنبورعسل بومی ایران را حفظ نماید. تصور ما در هنگام جمع‌آوری نمونه‌های زنبورعسل از یکی از زنبورستان‌های استان گیلان این بود که زنبورهای عسل جمع‌آوری شده از زیرگونه *A.m.meda* بودند ولی بررسی درخت فیلوژنی نشان داد که این زنبورهای عسل از زیرگونه *A.m.carnica* هستند. متاسفانه این زیرگونه کارنیکا بومی ایران نبوده و به صورت

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

غیرقانونی توسط برخی زنبورداران وارد ایران شده است. روش‌های مولکولی بررسی تنوع و مخصوصا تنوع DNA میتوکندری می‌توانند در بین جمعیت‌های زنبور عسل تفاوت‌ها را نشان دهند و روشی برای تمایز آن‌ها از هم باشند. در این پژوهش، ژن‌های مورد استفاده توانستند به خوبی باعث تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه از همدیگر شوند. نتایج نشان داد که بیش‌ترین تغییرات نوکلئوتیدی در بین نواحی بین ژنی مربوط به ITS_2 بود، همچنین پژوهش‌های پیشین نشان داده است که ناحیه بین ژنی به دلیل عدم نقش آن در تولید پروتئین، بیش‌ترین تغییرات نوکلئوتیدی را از خود نشان می دهد (۷). Kandemir *et al.* (۱۶) از بخشی از ژن *ND2* (با طول۶۳۴ جفت باز) برای مقایسه بین زیرگونه‌های زنبور عسل استفاده کردند. در این تحقیق زیرگونه *meda* از *carnica* تفکیک گردید. در تحقیق حاضر نیز بخشی از ژن *ND2* توانست زیرگونه‌های زنبور عسل *meda* و *carnica* را از یکدیگر تفکیک نماید. در این تحقیق، ناحیه ژنی *ND2* در بین جمعیت‌های نمونه‌برداری شده از ایران مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که این بخش از ژن *ND2* به خوبی توانست زیرگونه *A.m. carnica* و نمونه گیلان را از بقیه جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی جمع‌آوری شده از ایران از قبیل البرز، شیراز، سمنان، مرکزی، خوزستان، خراسان شمالی، خراسان رضوی، هرمزگان، همدان، گیلان، قم، بوشهر و آذربایجان غربی جدا نماید. بررسی‌های طهماسبی و همکاران (۳۳)، روی صفات مورفولوژیک زنبورعسل زیرگونه ایرانی (*A.m.meda*) نشان دهنده حفظ و تثبیت زنبور عسل زیرگونه ایرانی و پایداری این زیرگونه در ایران بود. ضمن اینکه صفائی (۲۷) گزارش کرد زنبورعسل زیرگونه ایرانی دارای سه جمعیت یا توده مختلف است که جمعیت زنبور عسل منطقه شمالی کشور با دو جمعیت دیگر تفاوت قابل توجهی داشت. بخشی از ژن ND2 توانست جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m.meda*) را به چهار گروه تقسیم نماید بنابراین این ناحیه ژنی نه تنها می‌تواند به خوبی زیرگونه‌های مختلف زنبور عسل را از یکدیگر تفکیک نماید بلکه توانایی تفکیک جمعیت‌های مختلف زیرگونه زنبورعسل ایرانی *A.m.meda* را از یکدیگر دارد. بهادر و همکاران (۴) با استفاده از نشانگرهای ISSR به این نتیجه رسیدند که این نشانگرها نیز می‌توانند جمعیت‌های مختلف زنبورعسل (*A.mellifera*) جمع‌آوری شده از استان کرمان را از یکدیگر تفکیک نمایند. همچنین مشخص شد که جمعیت زنبورعسل جمع آوری شده از استان گیلان زیرگونه *A.m.carnica* بودند که نشان‌دهنده ورود غیرقانونی این زیرگونه توسط برخی زنبورداران بود که این موضوع نشاندهنده این موضوع است که عدم نظارت بر ورود ملکه‌های زنبورعسل به طور غیرقانونی می‌تواند بر ذخایر ژنتیکی زنبورهای عسل بومی ایران تاثیر جدی و جبران ناپذیری بگذارد. زنبورهای کارنیولان (*A. m. carnica*)، به طور طبیعی متعلق به ناحیه‌ای در یوگوسلاوی سابق، جنوب اتریش و بخش‌هایی از مجارستان، رومانی و بلغارستان است. *A. m. carnica* از این محدوده طبیعی زیستگاه خود به کشورهای اروپای مرکزی و شمالی، کانادا، آمریکا و سایر نقاط جهان به‌دلیل صادرات این نوع زنبور عسل گسترش یافته است. از دلایل گسترش زیرگونه کارنیکا، رفتار آرام، ساخت سریع کلونی در بهار و تولید مناسب تابستانه را می‌توان نام برد (۲۴). در مطالعه‌ای ۸۵ نمونه زنبورعسل (*A.m. meda*) از استان‌های مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌ها در چهار گروه، گروه بندی شدند. بررسی اعضای هر گروه نشان داد که هر گروه محدود به منطقه خاصی از ایران نیست که دلیل این مسئله را می‌توان مهاجرت زنبورداران در ایران و تلاقی زنبوران از نقاط مختلف ایران دانست (۱۳). نتایج گروه‌بندی ما نیز نشان داد در گروه‌ها رابطه جغرافیایی بین پراکنش نمونه‌ها وجود ندارد و حتی نمونه‌هایی از شمال و مرکز کشور با نمونه‌های جنوبی در یک گروه قرار گرفته‌اند. Rahimi *et al.* (۲۳) در مطالعه خود که براساس ده صفت مورفومتریک و پنج جایگاه ریزماهواره صورت گرفت، سه جمعیت زنبور عسل (*A. m. meda*) واقع در جنوب ایران را که دارای فواصل ۵۰۰ کیلومتری از هم بودند را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که جمعیت‌های مزبور دارای تنوع ژنتیکی کمی بودند و گزارش نمودند که بین جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی پایینی وجود دارد حتی جمعیت‌های مورد بررسی با وجود فاصله زیاد، دارای تشابه بالایی بودند. در مطالعه حاضر نیز براساس جدول فواصل ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل، حداکثر فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از ایران ۰/۰۰۶ بود و حتی نمونه‌هایی که فاصله مکانی زیادی با هم داشتند (به‌عنوان مثال تهران و ایلام)، دارای تشابه بالا (فاصله ژنتیکی صفر) و در یک گروه قرار گرفتند. تنوع ناحیه ژنی *ND2* در شش جمعیت زنبور عسل (*A. m. cypria*) در شمال قبرس منشاء اروپایی جمعیت‌های زنبور عسل شمال قبرس را تایید نمود (۱۷). Jabbari and Kence (۱۳) جمعیت‌های زنبورعسل (*A.m. meda*) شمال و شمال‌غرب ایران را مورد مطالعه قرار داده و آن‌ها را در دو گروه متمایز قرار دادند. نتایج نشان داد که اطلاعات به دست آمده از آنالیز DNA میتوکندری، می‌تواند زیرگونه زنبور عسل ایرانی (*A.m.meda*) را شناسایی نماید. در مطالعه‌ای که روی ناحیه ژنی *ND2* و *tRNA* ایزولوسین صورت گرفت مشخص شد که DNA میتوکندریایی *A. m. ligustica* از آن چه که قبلا گزارش شده متنوع‌تر است و ممکن است زنبورهای عسل دورگه از تداخل بین *A. m. ligustica* و *A. m. mellifera* ایجاد شده باشد. نقش انسان و توسعه پرورش زنبور عسل در اروپا را نیز نباید نادیده گرفت. نتایج نشان داد که جریان ژنی بین دو زیرگونه وجود داشته است (۳).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بخشی از ژن *ND2* مورد بررسی توانایی تفکیک زیرگونه *A.m.carnica* را از جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی (*A.m. meda*) دارد. همچنین جمعیت‌های زنبور عسل ایرانی (*A.m.meda*) در چهار گروه قرار گرفتند. به‌طورکلی سه ناحیه بین ژنی (*ITs1*، *ITs2* و *ITs3*) در بین ژن‌های *ND2* و *COI* قرار گرفته بودند که *ITs2* و *ITs3* به ترتیب بلندترین و کوتاه‌ترین طول توالی نوکلئوتیدی را به خود اختصاص داد. نتایج به خوبی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

نشان داد که تشابه و تطابق زیادی بین گروه‌بندی جمعیت‌های ایرانی زنبورعسل (*A.m. meda*) و طول ITs_2 وجود دارد؛ به‌عنوان مثال چهارمحال و بختیاری، تهران، سیستان و بلوچستان، مازندران، لرستان، کردستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، خراسان جنوبی، ایلام، گلستان و قزوین که در یک گروه قرار گرفته بودند، تمامی دارای طول *ITs2* ۶۲ جفت باز بودند.

منابع

1. Ahmadi, A. and R. Ebadi. 2106. Rearing of Honeybee. 8rd edn., Arkan Danesh press, Tehran, Iran, 616pp (In Persian).
2. Arias, M.C. and W.S. Sheppard. 2005. Phylogenetic relationships of honeybees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 37(1): 25-35.
3. Arias, M.C. and W.S. Sheppard. 1996. Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution, 5(3): 557-566.
4. Bahador, Y., M. Mohammadabadi, K.H. 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).
5. Behura, S.K. 2007. Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome. Molecular Biology and Evolution, 24(7): 1492-1505.
6. Clarke, K.E., T.E. Rinderer, P. Frank, J.G. Quezada-Euan and P. Oldroyd. 2002. The africanization of the honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yukatan: A study of a massive hybridization event across time. Evolution, 56(7): 1462-1474.
7. Cornuet, J.M., L. Garnery and M. Solignac. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. Genetics, 128(2): 393-403.
8. Dawnay, N., R. Ogden, R. McEwing, G.R. Carvalho and R.S. Thorpe. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Science International, 173(1): 1-6.
9. De La Rua, P., R. Jaffe, R. DallOlio, I. Munoz and J. Serrano. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. Apidologie, 40(3): 263-284.
10. Dizkirici, A., Z. Kaya, E. Cabi and M. Dogan. 2010. Phylogenetic relationships of Elymus L. and related genera (Poaceae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. Turkish Journal of Botany, 34(6): 467-478.
11. 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(4): 8-15.
12. 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.
13. Jabbari Farhoud, H. and M. Kence. 2005. Morphometric and MtDNA Analysis in honeybee populations (*Apis melifera* L.) of north and northwest Iran. Proceedings of the Balkan scientific conference of biology in Plovdiv, Bulgaria, 5(2): 594-597.
14. 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. Pajouhesh and Sazandegi, 79: 36-44 (In Persian).
15. Jensen, A.B., K.A. Palmer, J.J. Boomsma and B.V. Pedersen. 2005. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, Apis mellifera mellifera, in northwest Europe. Molecular Ecology, 14(1): 93-106.
16. Kandemir, I., M. Kence, W.S. Sheppard and A. Kence. 2006. Mitochondrial DNA variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. Journal of Apicultural Research, 45(1): 33-38.
17. Kandemir, I., M.D. Meixner and W.S. Sheppard. 2003. Morphometric, allozymic, and mtDNA variation in honeybee (*Apis mellifera cypria*, Pollman 1879) populations in northern Cyprus. Final Program and Book of Abstracts. In 38th Apimondia International Apicultural Congress, 798 pp.
18. Mayer, E. and P.D. Ashlock. 1991. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill. New York, 475 pp.
19. Miguel, I., M. Baylac, M. Iriondo, C. Manzano, L. Garnery and A. Estonba. 2011. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. Apidologie, 42: 150-161.
20. Moretto, G. and M.C. Arias. 2005. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Neotropical Entomology, 34(3): 381-385.
21. Moritz, C., J.L. Patton, C.J. Schneider and T.B. Smith. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. Annual review of ecology and systematics, 31(1): 533-563.
22. Ozdil, F., M.A. Yildiz and H.G. Hall. 2009. Molecular characterization of Turkish honeybee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results. Apidologie, 40(5): 570-576.
23. Rahimi, A., A. Mirmoayedi, D. Kahrizi, R. Abdolshahi, E. Kazemi and K. Yari. 2014. Microsatellite genetic diversity of *Apis mellifera meda* skorikov. Molecular Biology Reports, 41(12): 7755-7761.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

24. Ruttner, F. 1988. Breeding techniques and selection from breeding of the honeybee British Isles Bee populations. Journal of Apicultural Reseach, 46(4): 225-231.
25. Ruttner, F. 1978. Biogeography and Taxonomy of honeybee. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 284 pp.
26. Ruttner, F., D. Pourasghar and D. Kauhausen. 1985. Die honigbienen des Iran 2. *Apis mellifera meda* Skorikow, die Persische Biene. Apidologie, 16(3): 241-264.
27. Safai, M. 2013. Genetic Diversity Assessment of Iranian honey bee population using microsatellite markers. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Isfahan, Iran, 156 pp (in Persian).
28. Shahrestani, N. 2012. Honeybee and rearing. 18rd edn., Sepehr press, Tehran, Iran, 455 pp (In Persian).
29. Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America, 87(6): 651-701.
30. Strange, J.P., L. Garnery and W.S. Sheppard. 2007. Morphological and molecular characterization of the landes honeybee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. Journal of Insect Conservation, 12: 527-537.
31. Swofford, D.L. 2003. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version, 4-10.
32. Tahmasebi, G.H., R. Ebadi, N. Tajabadi, M. Akhondi and S. Faraji. 2002. The Effects of Geographical and climatological Cconditions on the morphological variation and separation of iranian small honeybee (*Apis florea* F.) Populations. Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources, 2: 169-176 (In Persian).
33. Tahmasebi, G.H., R. Ebadi, M. Esmaili and J. Kambozia. 1998. Morphologic study of *Apis mellifera* in Iran. Journal of Agriculture and Natural Resource, 2: 89-101 (In Persian).
34. 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(12): 2725-2729.
35. Zayed, A. 2009. Bee genetics and conservation. Apidologie, 40(3): 237-262.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]

Evaluation of Phylogenetic Characteristics of Iranian Honeybee *(Apis mellifera meda)* Populations based on Mitochondrial *ND2* Gene

Parinaz Mohammadi[1], Javad Nazemi Rafie[2] and Jalal Rostamzadeh[3]

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan.
2- Assistant Professor form Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan. (Corresponding author: j.nazemi@uok.ac.ir).
3- Assistant Professor form Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan
Received: April 19, 2018 Accepted: July 22, 2018

Abstract

For the identification of phylogenetic characteristics of honeybee populations, sampling was conducted from 31 provinces of Iran in spring and summer 2016. Phylogenetic characteristics were evaluated based on mitochondrial *ND2* gene. The intergenic regions between *ND2* and *COI* genes were compared in different populations of honeybees. After sequencing and alignment of the genes, the relationships among populations were analyzed by MrBayes 3.2 and PAUP 4.0 b10 softwares. Eight nucleotide differences were found among Iranian populations of honey bee (*A. m.meda*). The phylogenetic tree was drawn and Iranian populations of honeybee (*A.m.meda*) were divided into four groups. The results showed that samples of East Azarbaijan and Yazd were separated from other honeybee populations. In addition, these two honeybee populations had the highest intergenic region (*ITS2* with 70 nucleotides). Not only, populations of Charmahal Bakhtiari, Tehran, Sistan and Blochestan, Mazandaran, Lorestan, Kordestan, Kermanshah, Kohkeloye and Boyerahmad, Southern Khorasan, Ilam, Golestan and Gazvin were grouped with each other but also, *ITs2* lengths of these populations were 62 bp. *ITs2* Lengths were 59 to 70 bp. *ITs1* lengths were 20 bp except *syriaca* subspecies. The shortest length of intergenic region was related with *ITs3* (with two nucleotides AT). Populations of Ardabil, Zanjan and Kerman were grouped with bootstrap of 91 percent. Additionally, populations of Alborze, Northern Khorasan, Razavi Khorasan, Esfahan, Shiraz, Semnan, Markazi, Khozestan, Hormozgan, Hamedan, Qom, Boshehr and Western Azarbayejan were grouped with each other. The honeybee populations were compared using two-parameter Kimura method. Results demonstrated that there was no nucleotide difference between Gilan population and *A. m.carnica* subspecies. The collected samples from Gilan were not *A.m.meda* subspecies and were grouped with A.m.carnica subspecies. *A.m.carnica* is not a native subspecies therefore honeybee queens have been imported illegally by some beekeepers. *A.m.intermissa* and *A.m.scutellata* showed the most genetic distance (0.01) in comparison with Iranian populations of honeybee (*A.m.meda*). Population comparisons of Alborz, Shiraz, Semnan, Markazi, Khozestan, Hormozgan, Hamedan, Qom, Boshehr and Western Azarbayejan showed that there was no genetic difference among populations. The phylogenetic tree could differentiate *syriaca*, *intermissa*, *scutellata* and *mellifera* subspecies from *carnica* and *meda* subspecies based on *ND2* gene. Moreover, *A.m.ligustica* was differentiated from *A.m.carnica* with a substitution C→T.

Keywords: Apis mellifera meda, Honeybee, Population, ND2 gene

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.93]