



"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- دانش آموخته 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. ligustica*, *A. m. carnica*, *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 بیزی (Bayesian) و پارسیمونی (Parsimony) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ژن‌های ND1 و ND5 به ترتیب هشت و پنج هاپلوتیپ را در جمعیت‌های زنبورعسل ایرانی نشان دادند. 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، چهار محال و بختیاری، قزوین، قم، همدان، هرمزگان، خراسان رضوی، خراسان شمالی، کهکویه بویر احمد، خوزستان، مرکزی، سمنان، فارس) بودند. 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 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 بیزی و پارسیمونی و درخت فیلوژنی ND5 حاصل از روش بیزی 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 (*A. m. Z-subgroup*، *A. m. C* و *A. m. M*) 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 به عنوان 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. A*، *A. m. litorea*، *A. m. C*، *A. m. intermissa*، *A. m. monticola*، *A. m. scutellata*، *A. m. A. m. carnica*، *A. m. ligustica*، *A. m. meda*)، *A. m. anatoliaca* و *A. m. caucasica*)، *A. m. mellifera* M، *A. m. jemenitica* Z-subgroup (*A. m. iberiensis* و *A. m. syriaca* و *A. m. lamareckii*) و Y (*A. m.*)، *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 ریزماهواره (۶،۴۳،۴۷) 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. mellifera digustica* و *A. m. caucasica*) 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 ریزماهواره‌ها 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 (۱۲،۱۹،۲۸،۳۱،۳۴)، ND₂ (۴)، ND₄-ND₆ (۵۲)، ND₅ (۷)، COI (۷)، 16S rRNA (۱)، Cyt b (۱۷) را برای مطالعه زیرگونه‌ها و جمعیت‌های زنبور عسل به‌کار برده‌اند. نشانگرهای مولکولی دیگری از قبیل ریز ماوهواره‌ها (۱۵،۳۶) و

جدول ۱- طول و عرض جغرافیایی نواحی نمونه‌برداری زنبورعسل ایرانی و شماره‌های دسترسی ژن‌های ND1 و ND5 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

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

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 transversion 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 هاپلوטיפ‌های 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 ۱,۰۰۰,۰۰۰ 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

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

نتایج و بحث

هاپلوטיפ 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 ND1 و ND5
Table 3. Genetic diversity parameters of the Iranian honeybees (*A. m. meda*) and other honeybee subspecies based on ND1 and ND5

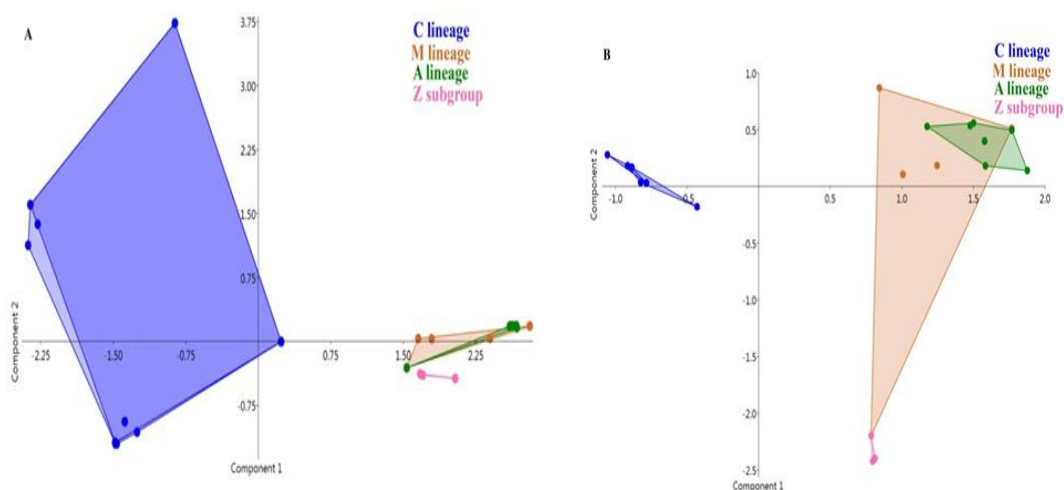
| ژن ND1 | S ^۱ | H ^۲ | π^3 | k ^۴ |
|-------------------------|----------------|----------------|---------|----------------|
| زنبورهای عسل ایرانی | ۶ | ۸ | ۰/۰۰۲۲ | ۱/۴ |
| <i>A. m. scutellata</i> | ۱۴ | ۵ | ۰/۰۰۷۳ | ۵/۸ |
| <i>A. m. capensis</i> | ۱ | ۲ | ۰/۰۰۰۵ | ۰/۴ |
| <i>A. m. mellifera</i> | ۲۴ | ۴ | ۰/۰۱۳۹ | ۱۱ |
| ژن ND5 | S | H | π | k |
| زنبورهای عسل ایرانی | ۶ | ۵ | ۰/۰۰۱۵ | ۰/۹۷ |
| <i>A. m. scutellata</i> | ۵ | ۵ | ۰/۰۰۴۱ | ۲/۶ |
| <i>A. m. capensis</i> | ۲ | ۳ | ۰/۰۰۱۵ | ۱ |
| <i>A. m. mellifera</i> | ۱۶ | ۵ | ۰/۰۱۱۲ | ۷/۰۶ |

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، کهکلوپه و بوی 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* و *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. caucasica* و *A. m. carnica* 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 ND₁ و ND₅ (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل) محاسبه شد. نتایج نشان داد که مقادیر نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌جنس به ناهم‌جنس در ژن‌های ND₁ و ND₅ به ترتیب ۳/۶۴ و ۳/۲۲ بودند. با استفاده از روش پارسیمونی، تعداد مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک در ژن‌های ND₁ و ND₅ (زنبورهای عسل ایرانی با زیرگونه‌های دیگر زنبور عسل) به دست آمد. نتایج نشان داد که تعداد مکان‌های نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید فیلوژنتیک در ژن‌های ND₁ و ND₅ به ترتیب ۸۰ و ۶۲ بودند.

توانایی ژن‌های ND₁ و ND₅ 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

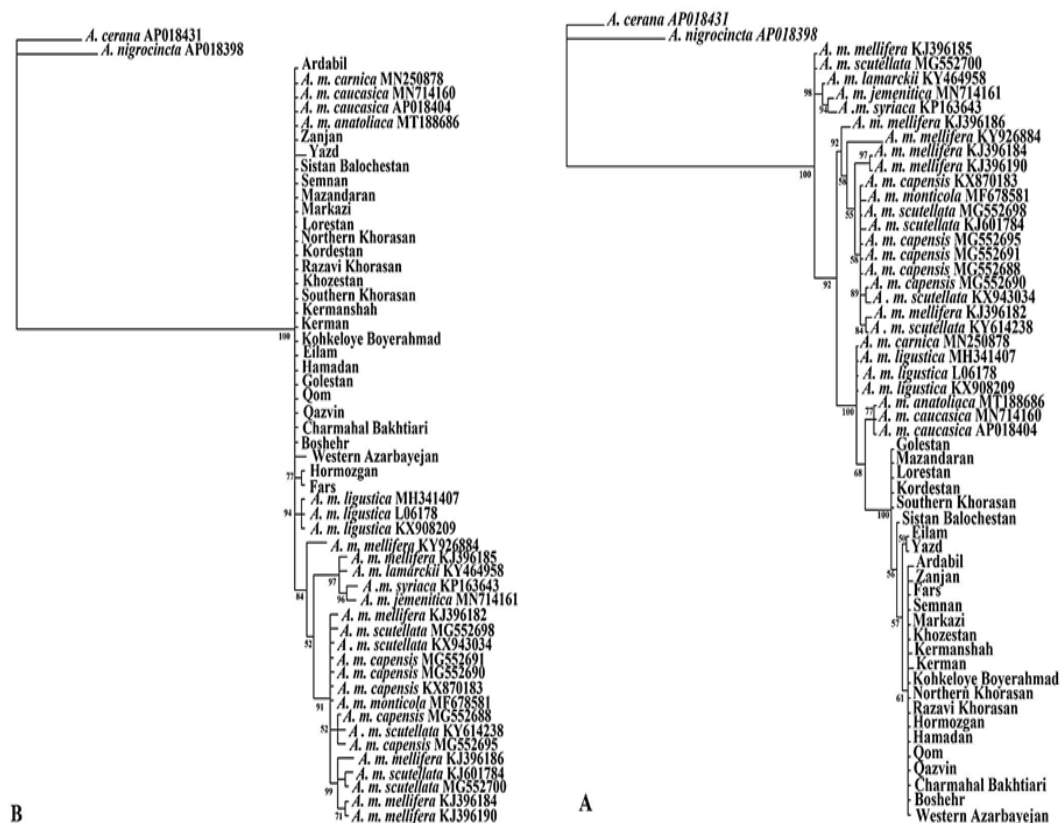


شکل ۱- مقایسه گروه‌های تکاملی زنبور عسل (*Apis mellifera*) با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) در ژن‌های ND1 (A) و ND5 (B)

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



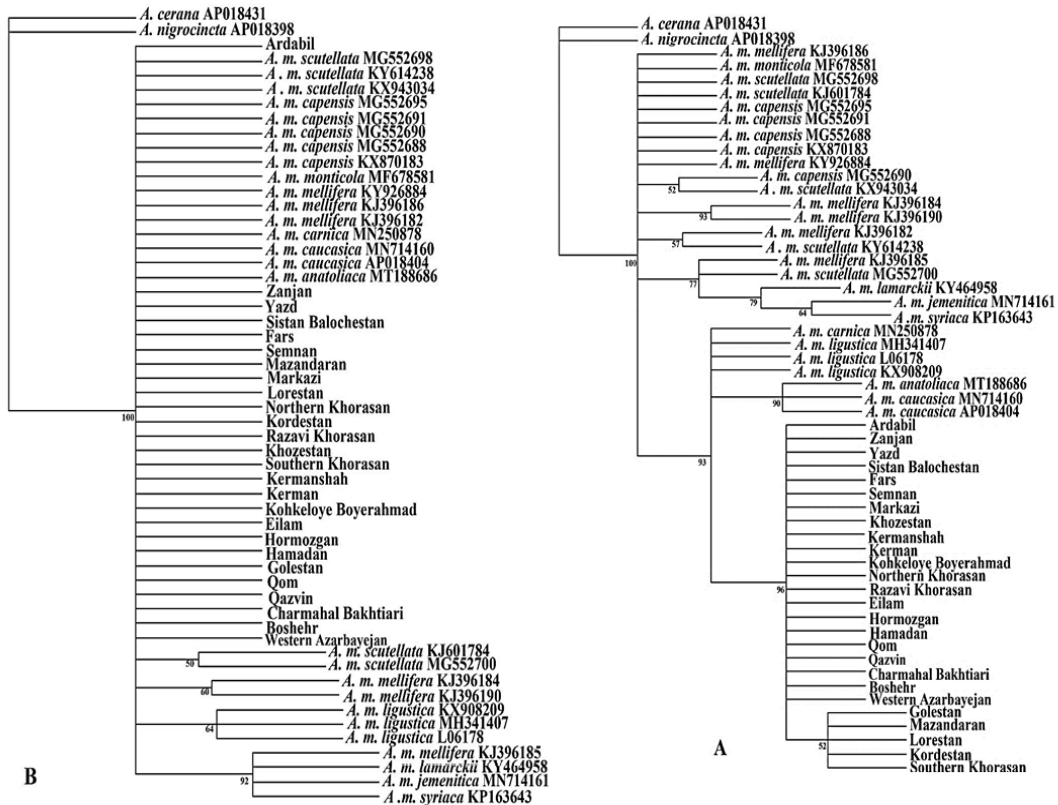
شکل ۲- درخت فیلوژنی زنبورهای عسل ایرانی و زیرگونه‌های زنبور عسل (*Apis mellifera*) در ژن‌های ND1 (A) و ND5 (B) با استفاده از روش بیزی. گونه‌های *Apis cerana* و *A. nigrocincta* به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شدند.
Figure 2. The phylogenetic tree of Iranian honeybees and subspecies of *Apis mellifera* in ND1 (A) and ND5 (B) genes using Bayesian method. *Apis cerana* and *A. nigrocincta* were considered as outgroups.

syriaca و نمونه‌های زنبور عسل 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 به طوری 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 زنبور عسل (*A*، *C*، *M*، *Z* subgroup) 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 به طوری که PCA ژن ND1 زیرگونه‌های تجاری *A. m. carnica*، *A. m. ligustica*، *A. m. mellifera* و *A. m. caucasica* را از نمونه‌های زنبور عسل ایرانی (*A. m. meda*) متمایز کرد (شکل ۴، A)؛ اما PCA ژن ND5 نشان داد که زیرگونه‌های تجاری *A. m. carnica* و *A. m. caucasica* با 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.*

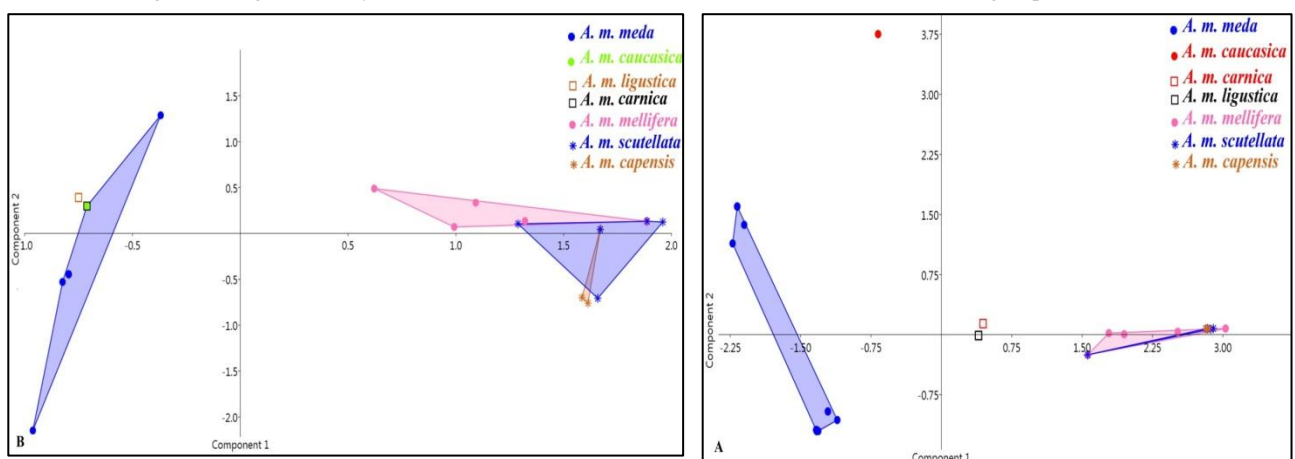
بر دقت روابط فیلوژنتیک داشت. به طوری که هرچقدر نسبت این جایگزینی نوکلئوتیدی بیشتر بود، روابط فیلوژنتیک دقیق‌تری بین تاکسون‌ها در درخت فیلوژنی ایجاد می‌شد.

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* به عنوان 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. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica* 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 | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۳ |
| 26-A. m. carnica MN250878 | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ |
| 27-A. m. ligustica KX908209 | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ |
| 28-A. m. mellifera KJ396182 | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۷ |
| 29-A. m. jemenitica MN714161 | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۴۲ |
| 30-A. m. lamarckii KY464958 | ۰/۰۳۳ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۳ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۸ |
| 31-A. m. syriaca KP163643 | ۰/۰۴۰ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۴۵ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۴۰ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۴۰ | ۰/۰۴۰ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۴۵ |
| 32-A. m. capensis KX870183 | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۲ |
| 33-A. m. scutellata MG552700 | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۶ |

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 | ۰/۰۰۵ | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19-Mazandaran | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۰۵ | | | | | | | | | | | | | | |
| 20-Semnan | ۰/۰۰۵ | * | ۰/۰۰۵ | | | | | | | | | | | | | |
| 21-Shiraz | ۰/۰۰۵ | * | ۰/۰۰۵ | * | | | | | | | | | | | | |
| 22-Sistan Balochestan | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۳ | | | | | | | | | | | |
| 23-Yazad | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۲ | | | | | | | | | | |
| 24-Zanjan | ۰/۰۰۷ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۷ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۵ | ۰/۰۰۳ | | | | | | | | | |
| 25-A. m. caucasica MN714160 | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۱۷ | | | | | | | | |
| 26-A. m. carnica MN250878 | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۰۵ | | | | | | | |
| 27-A. m. ligustica KX908209 | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۰۵ | * | | | | | | |
| 28-A. m. mellifera KJ396182 | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۲۵ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | | | | | |
| 29-A. m. jemenitica MN714161 | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۴۰ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۳ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۲۴ | ۰/۰۲۴ | ۰/۰۲۳ | | | | |
| 30-A. m. lamarkii KY464958 | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۱ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۲۷ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۰۳ | | | |
| 31-A. m. syriaca KP163643 | ۰/۰۴۵ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۴۵ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۴۰ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۳ | ۰/۰۲۶ | ۰/۰۲۶ | ۰/۰۲۵ | ۰/۰۰۵ | ۰/۰۰۵ | | |
| 32-A. m. capensis KX870183 | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۲۳ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۲۵ | |
| 33-A. m. scutellata MG552700 | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۲۵ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۹ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۰۷ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۸ | ۰/۰۱۷ |

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 توانستند 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 توانستند 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 به‌طوری که درخت‌های فیلوژنی حاصل از ژن ND₁ توانستند 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 (Z-subgroup، A، 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 به‌طوری 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 (۵۴، ۵۳، ۲۶). 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 16S rRNA و COII شناسایی شدند (۴۴، ۴۰). 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 Rua, 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 Rua, 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 Rua. 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. Aytekin, 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. Prosperi. 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, Heildelberg.
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. Sientific 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 (Sistan Baluchistan), haplotype 3 (Yazd and Eilan), haplotype 4 (Ardabil), haplotype 5 (Kerman), haplotype 6 (Zanjan), haplotype 7 (Kermanshah) and haplotype 8 (Boshehr, Western Azarbayejan, Chahmahal Bakhtiari, Qazvin, Qom, Hamadan, Hormozgan, Razavi Khorasan, Northern Khorasan, Kohgiluyeh Boyer-Ahmad, Chaharmahal, Markazi, Semnan and Fars). The phylogenetic trees derived 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 derived from bayesian and parsimony methods and phylogenetic tree of ND5 derived 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