دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی ژن کاندیدای گیرنده دوپامین تیپ ۳ (DOP3) مرتبط با رفتارهای مقاومت بر علیه جرب واروا در زنبورعسل

بهزاد سپهری[۱]، صادق علیجانی[۲]، آرش جوانمرد[۳]، حسین جانمحمدی[۴] و کریم حسن پور[۳]

۱- دانشجوی دکترای اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: sad-ali@tabrizu.ac.ir)
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۴- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲
صفحه: ۱۴۸ تا ۱۵۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: آلودگی به جرب واروآ، جدی‌ترین تهدید و چالش برای صنعت پرورش زنبورعسل محسوب می‌شود. این انگلِ خارجی لزوماً در کلنی زنبوران عسل زندگی کرده و به کلنی‌ها و متعاقبا تولید عسل، زیان‌های جبران ناپذیری وارد می‌کند. در این راستا، از جمله راهکارهای مقابله پیشنهادی، استفاده از جرب‌کش‌ها می‌باشد که پیامدهای منفی بر سلامتی زنبورعسل و مصرف‌کنندگان عسل دارد. جهت اجتناب از این پیامدهای منفی، روش‌های جایگزین مطمئن‌تری برای مبارزه با این جرب نیاز است و آن هم استفاده از سویه‌های ژنتیکی مقاوم و برنامه‌های انتخاب اصلاحی برای ایجاد کلنی‌های با مقاومت نسبی بر علیه جرب واروا می باشد. در کلنی زنبورعسل چندین سازوکار فیزیولوژیکی و رفتاری برای مقاومت به جرب واروا وجود دارد که می‌توان با بررسی ارتباط آن‌ها با ژن‌های کاندیدای شناسایی شده در خصوص مقاومت، مبانی ژنتیکی مقاومت بر علیه جرب واروا در زنبورعسل را بهتر شناسایی نموده و در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن کاندیدای موثر بر رفتارهای دفاعی زنبورعسل در مقابل جرب واروا، یعنی ژن گیرنده دوپامین(DOP3) در نمونه‌ای از توده جمعیت زنبورعسل ایرانی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، در مجموع، تعداد ۱۰ شفیره زنبور نر از کلنی‌هایی که برای حساسیت و مقاومت به جرب واروا تعیین فنوتیپ و تعیین ژنوتیپ شده بودند، (۵ نمونه حساس و ۵ نمونه مقاوم) انتخاب و استخراج DNA ژنومی بر پایه روش آزمایشگاهی CTAB انجام شد و در ادامه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر اساس آغازگرهای اختصاصی ناحیه UTR ژن DOP3 انجام شد. پس از مشاهده تک باند (۹۰۰ جفت باز)، تخلیص محصول و توالی‌یابی (روش متداول سانجر) انجام شد. مشاهده خروجی‌ها و تعیین کیفیت توالی خام (شاخص Phred index) با نرم‌افزار FinchTV و همردیفی با BLAST و خوشه بندی با نرم افزار MAFTT صورت گرفت.

یافته‌ها: در این تحقیق، در چند ناحیه از توالی نوکلئوتیدی ناحیه UTR ژن DOP3، بین افراد تفاوت دیده شد، که مهمترین تفاوت در توالی نوکلئوتیدی بین افراد حساس و مقاوم مربوط به دو ناحیه است. یکی در ناحیه نوکلئوتیدی ۴۲۸ تا ۴۳۷ خوانش جلویی به اندازه ۹ جفت باز نوکلئوتید و دیگری در ناحیه نوکلئوتیدی ۷۱۵ تا ۷۲۰ خوانش جلویی به اندازه ۶ جفت باز نوکلئوتید، که در این دو ناحیه جهش از نوع حذف صورت گرفته است.

نتیجه‌گیری: بررسی نتایج نهایی وجود اختلاف معنی‌دار از نوع حذف/اضافه به ترتیب با اندازه های ۶ و ۹ جفت باز ، بین دو گروه (حساس و مقاوم به جرب واروا) را نشان داد که می‌تواند در شناسایی مولکولی کلنی‌های مقاوم به جرب واروا و برنامه‌های اصلاحی برای تولید کلنی‌های مقاوم به جرب واروا استفاده شود و تاکنون چنین حذف‌هایی مربوط به این ژن گزارش نشده است.

واژه‌های کلیدی: جرب واروا، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، مکانیسم‌های مقاومت، ژن کاندیدا، گیرنده دوپامین

مقدمه

امروزه، تهاجم جرب واروا، بیش از هر بیماری به زنبورداری زیان اقتصادی وارد کرده است. همچنین، یک تهدید قابل توجه برای امنیت غذایی جهان است، زیرا گرده‌افشانی توسط زنبورهای عسل در بسیاری از سیستم‌های کشت محصولات کشاورزی ضروری است (۸،۱۰).

جرب واروآ، به عنوان عامل اصلی بیولوژیکی تلفات اخیر در مقیاس وسیع در کلنی‌های زنبورعسل معمولی (*Apis mellifera*) در اروپا و آمریکای شمالی در نظر گرفته می‌شود. تعداد کلنی‌های وحشی در این نقاط جهان نیز کاهش یافته است (۹). جمعیت جرب واروا در کلنی‌های زنبورعسل که در آن‌ها مبارزه صورت نمی‌گیرد، به طور تصاعدی رشد می‌کند و در آب و هوای معتدل این کلنی‌ها معمولاً ۲تا۳ سال پس از آلودگی می‌میرند (۴۰). جرب واروآ با تغذیه از همولنف، زنبورهای کارگر را ضعیف کرده و تشکیل اندام‌ها را در شفیره‌های در حال رشد مختل می‌کنند (۸،۴۲). طبق مطالعات گسترده روزنکرانز و همکاران (۴۰)، فقدان همولنف در مرحله زاد و ولد منجر به کاهش وزن زنبوران متولد شده، طول عمر کوتاه‌تر، تغییر رنگ و کاهش توانایی‌های شناختی می‌شود. فروپاشی واقعی کلنی توسط عفونت‌های ویروسی منتقل شده توسط جرب‌ها ایجاد می‌شود که به عنوان ناقل‌های بیولوژیکی و مکانیکی چندین RNA ویروس زنبور عسل، عمل می‌کنند (۱۲،۱۷). از زمان ورود جرب‌های واروآ به اروپا، زنبورداران از طیف وسیعی از جرب‌کش‌ها برای محدود کردن اثرات مخرب جرب واروآ و ویروس‌هایی که ناقل آن هستند، استفاده کرده‌اند (۴۰). مقاومت واروآ در برابر جرب‌کش‌ها یک مشکل رو به افزایش است و مواردی در چندین کشور ثبت شده است (۳۹). استفاده از جرب‌کش‌ها برای صنعت زنبورداری نیز مشکل ساز است. زیرا اغلب اثرات جانبی منفی بر زنبورها داشته، گران هستند و ردپایی از این مواد در محصولات کندو قابل تشخیص است. بنابراین، اصلاح نژاد و دستیابی به زنبورهای مقاوم به جرب راه حل طولانی مدت و پایدارتری است (۳۷،۴۰).

بطور متناقض، تیمارهای جرب‌کش و سایر اعمال زنبورداری مانند ادغام کلنی‌های ضعیف فشارهای انتخابی را از بین می‌برد و در نتیجه توانایی ژنتیکی زنبورها، برای ایجاد مکانیسم‌های تحمل یا مقاومت ذاتی را مهار می‌کند (۲۷).

تحمل به‌عنوان توانایی میزبان برای کاهش اثر انگل و مقاومت میزبان به عنوان توانایی کاهش میزان تولیدمثل انگل

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

تعریف می‌شود، که موجب می‌شود آلودگی انگل در سطحی قرار بگیرد که پایین‌تر از سطح آسیب‌رسانی به میزبان است (۳۵،۳۷). با توجه به نظر ریندر و همکاران (۳۷)، سازوکارهای مقاومت در برابر واروآ را می توان به دو دسته رفتاری یا فیزیولوژیکی طبقه‌بندی کرد. سازوکارهای مقاومت فیزیولوژیکی به جذابیت لاروها، طول فاز فورتیک جرب‌ها یا مدت مرحله شفیرگی مربوط می‌شود. سازوکارهای مقاومت رفتاری کلاسیک شامل، رفتار بهداشتی مخصوص واروآ (VHS)، نظافت (حذف جرب فورتیک) به صورت گروهی و فردی می‌باشد. دو رفتار در سال‌های اخیر در مطالعات بیشتر مورد توجه است، رفتار بهداشتی مخصوص جرب واروا و رفتار ممانعت تولیدمثل جرب واروا (SMR) (۳۰).

رفتار بهداشتی مخصوص واروا (VSH)، به‌عنوان عاملی مهم در مقاومت به جرب واروا تعیین شده است (۳۴،۳۷). در طی این رفتار پس از تشخیص لاروهای آلوده، حذف لاروهای آلوده به دلیل حذف جرب‌های همراه سبب کاهش آلودگی در کلنی‌های مذکور شده و نهایتا سبب کاهش خسارت جرب واروا می‌شود (۱). رفتار بهداشتی مخصوص واروا یک صفت ارثی در زنبورعسل معمولی (*A.mellifera*) است و می تواند از طریق اصلاح انتخابی افزایش یابد (۷).

رفتار بهداشتی مخصوص واروا و رفتار ممانعت تولیدمثل جرب ارتباط تنگاتنگی با هم دارند. رفتارهای بهداشتی زنبوران عسل در نهایت منجر به اختلال در فعالیت تولیدمثلی جرب خواهد شد. رفتار ممانعت تولیدمثل نیز یک رفتار ارثی است. زنبوران دارای این صفت پس از ورود جرب به سلول‌های نوزاد بر جمعیت آنان اثر می‌گذارند و زنبوران در این خصوص رفتار حذف انتخابی از خود بروز می‌دهند، به طوری که جرب‌های مولد را به نسبت بیشتری از جرب‌های غیرمولد حذف می‌نمایند (۲۱). سازوکار دفاعی رفتار ممانعت تولیدمثل به نظر می‌رسد شامل هر دو صفت حذف شفیره آلوده (رفتار بهداشتی) و کاهش موفقیت تولیدمثلی جرب باشد (۲۲).

وراثت‌پذیری رفتار بهداشتی مخصوص واروا در مطالعات مختلف از ۰/۲ تا ۰/۶ محاسبه شده است (۸،۲۳) و وراثت‌پذیری رفتار ممانعت تولیدمثل جرب نیز ۰/۴۶ تعیین شده است (۲۰).

بنابراین، با توجه به وجود صفات مقاومت در برابر جرب واروا با پایه ژنتیکی پرورش زنبورهای عسل مقاوم به جرب واروآ به عنوان یک راهکار ارزشمند برای کنترل جرب واروآ در نظر گرفته می‌شود (۱۳). برای دستیابی به این هدف دو رویکرد در حال انجام است.

پرورش انتخابی زنبورهای عسل با بهبود مقاومت به واروآ، با کاهش وابستگی به جرب‌کش‌ها برای زنبورداری مفید خواهد بود. برای این منظور، آنالیزهای وراثت‌پذیری برای تعیین کمیت پتانسیل انتخاب صفاتی که رشد جمعیت واروآ را محدود می‌کند، انجام شده است و برای انتخاب زنبورهای مقاوم بر این اساس تلاش شده است (۷،۴۵). چندین برنامه اصلاح نژاد آمریکایی موفق به تولید سویه‌هایی شده‌اند که تولیدمثل جرب‌ها را سرکوب می‌کنند و در مقایسه با سویه‌های معمولی به درمان‌های کمتری نیاز دارند. یکی از امیدوارکننده‌ترین برنامه‌های اصلاحی از مواد ژنتیکی مبتنی بر ذخایر وارداتی با سطوح بالایی از مقاومت به واروآ از منطقه پریمورسکی در شرق روسیه استفاده می‌کند (۳۶،۳۷).

از سوی دیگر در برخی موارد کلنی‌ها بدون دخالت انسان بر اساس مقاومت یا تحمل طبیعی توسعه می‌یابند. انتخاب طبیعی برای انتخاب فنوتیپی کلنی مقاوم به واروآ در کشور فرانسه (۲۵)، ایالات متحده آمریکا (۴۳)، کشور سوئد (۲۸) و کشور کانادا (۲۳،۳۸) استفاده می‌شود. با این حال، انتخاب برای مقاومت به واروآ از طریق انتخاب طبیعی (بقای کلنی در غیاب تیمارهای جرب‌کش)، کار دشوار و فشرده‌ای است و به دلیل عدم درک سازوکار مقاومت زنبورعسل، به چندین سال تجزیه و تحلیل برای تعیین فنوتیپ‌های کلنی‌های مقاوم به آلودگی واروآ نیاز دارد. بنابراین، شناسایی ژن‌ها و نشانگرهای مولکولی که زمینه‌ساز مکانیسم مولکولی صفت مقاومت هستند یا به شدت با صفات مقاومت مرتبط هستند، در انتخاب سریع فنوتیپ‌های مقاومت در طی ماه‌ها به جای سال‌ها مفید خواهد بود. همچنین، ممکن است سازوکارهای بیولوژی احتمالی درگیر در صفات پیچیده مقاومت کننده واروآ را پیش‌بینی کند (۳۶،۳۷).

زمینه ژنتیکی برای رفتار مقاومت با مطالعاتQTL و بیان ژن مورد بررسی قرار گرفته است (۴،۲۶). چندین ژن در این خصوص شناسایی شده است. از بین ژن‌های شناسایی شده، ژن کاندیدای انتخاب شده برای تجزیه و تحلیل دقیق در این مطالعه، Receptor D2-like dopamine (DOP3)، GB14561 انتخاب شد. این ژن نزدیکترین نقطه به حداکثر امتیاز LOD (شاخص نرخ نوترکیبی) یافت شده در مطالعه تسوردا و همکاران (۴۹) بود. Dop3 کد کننده برای گیرنده دوپامین است (۲). دوپامین یک انتقال دهنده عصبی مهم است و در بسیاری از فرایندها در سیستم عصبی مرکزی از جمله کنترل حرکت، شناخت نقش دارد و بر ترشح عصب و غدد درون ریز تأثیر می گذارد (۱۶). در مطالعات پیشین نشان داده شد که Dop3 در حافظه و یادگیری بویایی نقش دارد (۴،۴۱). فرض بر این است که رفتار بهداشتی مخصوص واروا با بیان متفاوت ژن های موثر بر بویایی و ادراک آن ارتباط دارد (۲۴،۳۳). هدف از پژوهش حاضر، شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) تاثیرگذار بر رفتارهای دفاعی زنبورعسل در مقابل جرب واروا، در ژن کاندیدای DOP3 در توده زنبورعسل ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

با استفاده از نمونه‌های زنبورعسل موجود، نمونه برداری شده توسط علمی و همکاران (۱۴) مربوط به پژوهش ردیابی QTL برای صفت مقاومت به جرب واروآ در کلنی‌های زنبورعسل آذربایجان، تعداد ۵ شفیره زنبور نر از کندوهای حساس و ۵ شفیره زنبور نر از کندوهای مقاوم به واروا انتخاب شد. معیار انتخاب این کندوها با توجه به میزان آلودگی کندوها به جرب واروا، بر اساس درصد آلودگی شفیره‌های نر به جرب واروا و آنالیز آماری صورت گرفته توسط علمی و همکاران (۱۴) برای تعیین معنی‌داری اختلاف آلودگی کندوهای مناطق مختلف تعیین گردید.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

۱۰۰ × تعداد سلول بررسی شده / تعداد سلول آلوده = درصد آلودگی

بر این اساس هیبرید کارنیکا و کلنی‌های ایرانی که ۲ سال بدون استفاده از دارو زنده مانده بودند و در طی این دو سال، هر ساله ملکه‌های این کندوها با ملکه‌های باکره تولیدی از این کندوها که با نرهای گروه کندوهای تیمار نشده برای جرب واروا (توده مقاوم ایرانی) جفتگیری می‌کردند، تعویض می‌شدند، به‌عنوان کلنی مقاوم انتخاب شدند و کلنی‌های شهرستان عجب‌شیر که بیشترین میزان آلودگی و بالاترین شدت تولیدمثل جرب واروا را داشتند، به عنوان کلنی‌های حساس به جرب واروا انتخاب شدند.

نمونه‌ها در تیوب پلاستیکی حاوی ۹۶ درصد اتانل به آزمایشگاه منتقل شد و در آنجا با روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت. پس از استخراج DNA، کمیت و ارزیابی کیفیت DNA با دو روش ژل مونیتورینگ و نانودرآپ انجام شد و نمونه‌هایی که شاخص نسبت OD260 به OD280 آنها بین ۸-۱/۲ بود، برای انجام مرحله بعد یعنی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کاندید شدند. سپس توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای پیشرو و پسرو ناحیه UTR ژن کاندیدای Dop3 مستقر در کروموزم ۹، با توجه به مطالعات و نتیجه‌گیری موفق کورنلیسن(۱۱)، از تحقیق مربوطه انتخاب شدند. توالی آغازگرها به قرار زیر بود:

5'- CATCCCTCCCCGATCT CACAC -3'
5'- ATCCGCACCAAGAGAGGATTACT -3'

و سپس برای ساخت آغازگر به شرکت ژن اسکریپت کشور چین سفارش ارسال شد. تهیه محلول و برنامه سیکل ترموسایکلر با استفاده از روش‌های استاندارد موجود بهینه‌سازی شد. در جدول ۱ برنامه دمایی مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مشخص است. باندهای تکثیر شده مجدد در روی الکتروفورز افقی در ژل آگاروز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید رویت شد. با حصول نتایج شارپ و بدون باند غیراختصاصی و کاذب، نمونه‌ها برای انجام توالی‌یابی اتوماتیک سانجر به شرکت بیومجیک ارسال گردید. بعد از توالی‌یابی، برای هر نمونه ۳ فایل در اختیار قرار گرفت و بعد از کنترل کیفیت توالی‌ها با استفاده از شاخص فرد (phred index)، همه توالی‌ها پشت سر هم به یک فایل متنی انتقال داده شد و سپس توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی مانند BLAST، همردیفی صورت گرفته و وجود چندشکلی و نوع اسنیپ در بین دو گروه مقاوم و حساس با نرم‌افزار MAFFT بررسی گردید.

نتایج و بحث

انتخاب افراد مقاوم و حساس برای انجام PCR بعد از تعیین کمیت و کیفیت DNA افراد با استفاده از نانودراپ و ژل مونیتورینگ صورت رفت (شکل ۱ و ۲). با توجه به شکل ۳ کیفیت ناحیه تکثیر شده بر روی ژل آگارز، مطلوب تعیین گردید. همردیفی توالی‌ها با BLAST صورت گرفت و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار MAFFT تفاوت‌های نوکلوتیدی بررسی گردید و تفاوت‌های نوکلوتیدی مطابق شکل ۴ مشخص گردید. شکل ۵ نشان‌دهنده نمودار درختی ترسیمی با نرم‌افزار MAFFT برای زنبوران مقاوم و حساس که نشان‌دهنده قرارگیری افراد مقاوم و حساس در گروه‌های مختلف است. نتایج نشان‌دهنده تفاوت نوکلئوتیدی در چند ناحیه بین افراد است، ولی در نهایت یافته‌های ارزشمند این تحقیق نشان داد که در افراد حساس (۳ زنبور از ۴ زنبور حساس) در ناحیه UTR ژن DOP3 در دو ناحیه نوکلوتیدی ۴۲۸ تا ۴۳۷ (به اندازه ۹ جفت باز نوکلئوتید) و ۷۱۵ تا ۷۲۰ (به اندازه ۶ جفت باز نوکلئوتید) خوانش جلویی حذف صورت گرفته است و تنها در فرد شماره ۴ از گروه زنبوران مقاوم به واروا ناحیه حذفی ۴۲۸ تا ۴۳۷ دیده شد.

هدف منطقی برای برنامه اصلاح‌نژاد زنبورعسل، انتخاب زنبوران عسلی است که دارای سازوکارهای ارثی دفاعی در برابر این انگل باشند که به آن‌ها اجازه مقاومت بیشتر در برابر هجوم جرب قبل از هر درمان شیمیایی را بدهد (۴۴). با توجه به مشکلات انتخاب فنوتیپی در زنبورعسل از جمله شباهت کمتر کلنی‌های دختری به مادری به خاطر چندشوهری (جفتگیری با ۱۲ نر) ملکه مادر، نسبت به سایر حیوانات (۱۵،۴۸) و تحت تاثیر قرار گرفتن فنوتیپ‌های سطح کلنی ناشی از ترکیبات خاص ژنوتیپ انفرادی در یک کلنی، شامل ترکیبات ژنوتیپ کارگر یا ژنوتیپ‌های ملکه به اضافه کارگر (۵،۶،۵۰) و همراه شدن این‌ها با غالبیت و اثرات متقابل بین ژن‌ها که غیرقابل توارث هستند، و در نهایت عدم امکان تشخیص فنوتیپ‌های کارگری مطلوب در ملکه‌ها یا کارگران به صورت انفرادی، که موجب می‌شود کلنی کامل پرورش داده شود تا فنوتیپ سطح کلنی شناسایی شود، لذا جهت انتخاب و ارزیابی کلنی‌های مقاوم به جرب نیاز به اطلاعات ژنتیکی می‌باشد.

در ایران هم در خصوص مقاومت به جرب واروا بررسی‌های متعددی انجام شده است از جمله علمی و همکاران (۱۴)، ناجی و همکاران (۳۲)، امین منصوری و همکاران (۲۹)، طهماسبی و همکاران (۴۷)، که این مطالعات وجود تنوع فنوتیپی بین کلنی‌ها را برای مقاومت به جرب واروا نشان داده است. ولی تاکنون هیچ تحقیقی در مورد ژن‌های کاندیدای مقاومت به واروا و چندشکلی تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها در کلنی‌های ایرانی و تاثیر این چندشکلی‌ها بر رفتار مقاومت صورت نگرفته است و این دلیل متمایز بودن این تحقیق است.

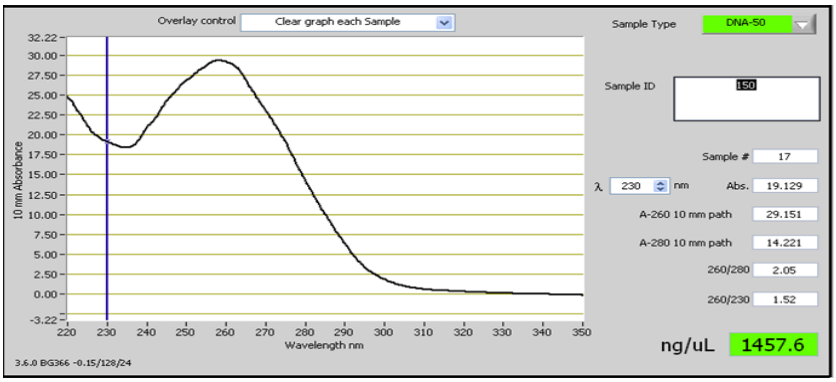
زنبورهای عسل دارای سه گیرنده دوپامین هستند (۳۱). DOP3 کد کننده گیرنده دوپامین است که به‌طور گسترده در مغز زنبور عسل بیان می‌شود، و بیان متفاوت قابل توجهی نسبت به DOP1 و DOP2 نشان می‌دهد (۲). توزیع mRNA مربوط به DOP3 در سلول‌های اطراف لوب‌های بینایی و شاخک در مغز زنبور عسل نیز نشان می‌دهد که این گیرنده دوپامین در پردازش اطلاعات حسی نقش دارد (۲،۳).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

جدول ۱- برنامه دمایی مورد استفاده برای واکنش PCR

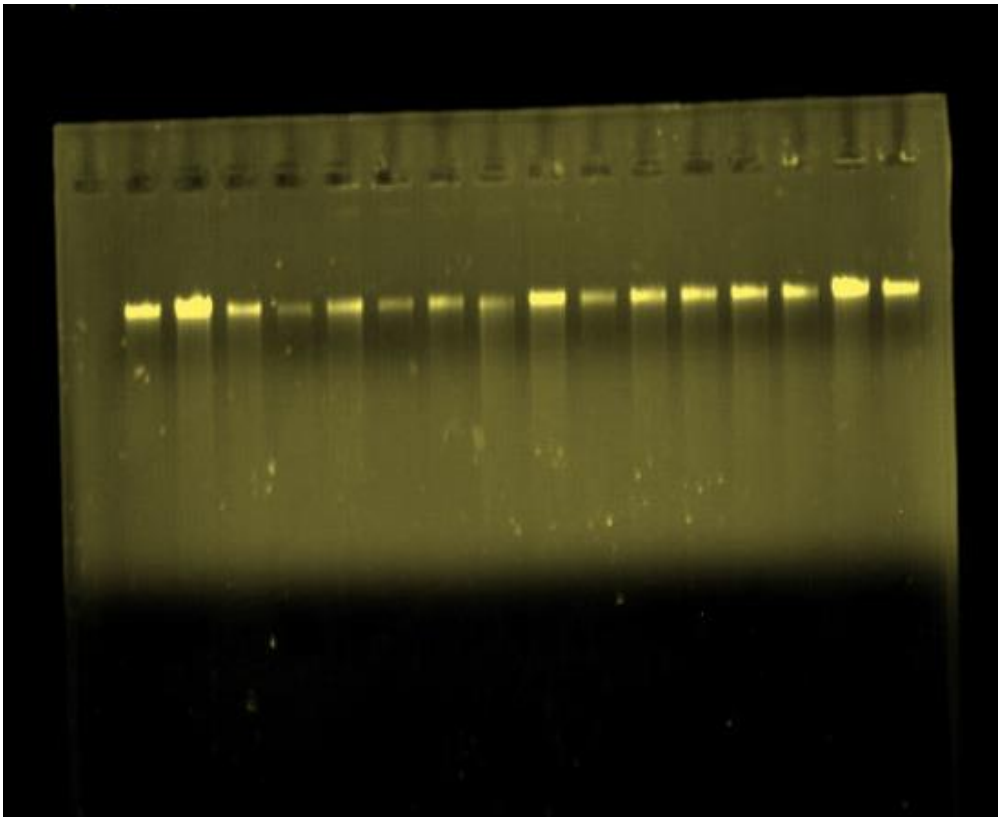
Table 1. Temperature program used for PCR reaction

مرحله واکنش	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱ سیکل
واسرشت شدن دوم	۹۴	۴۵ ثانیه	
اتصال آغازگر	۵۸	۴۵ ثانیه	۳۰ سیکل
بسط DNA	۷۲	۱ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱ سیکل



شکل ۱- تعیین کمیت DNA با نانودراپ

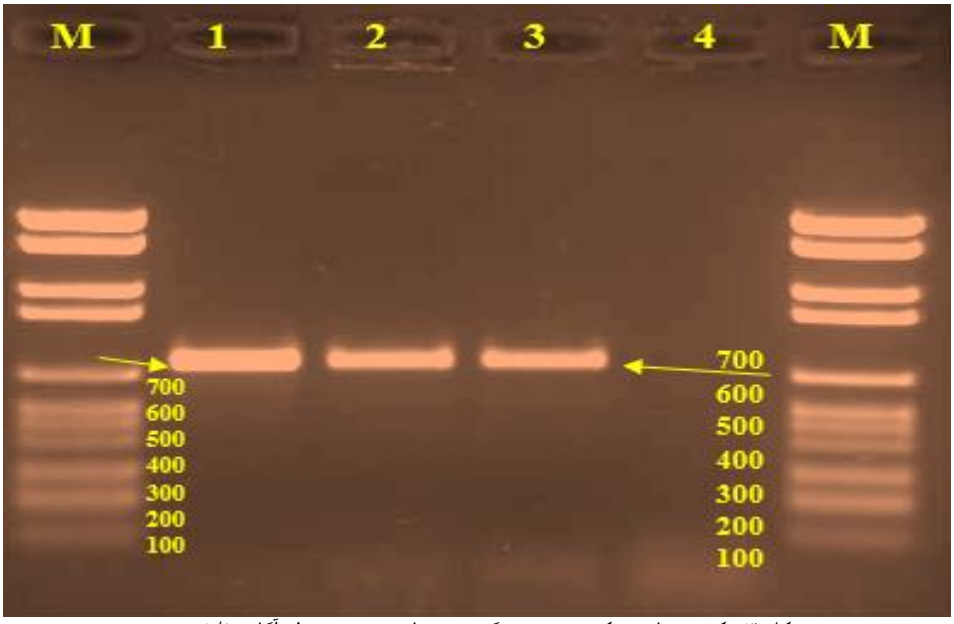
Figure 1. Quantification of DNA with nanodrops



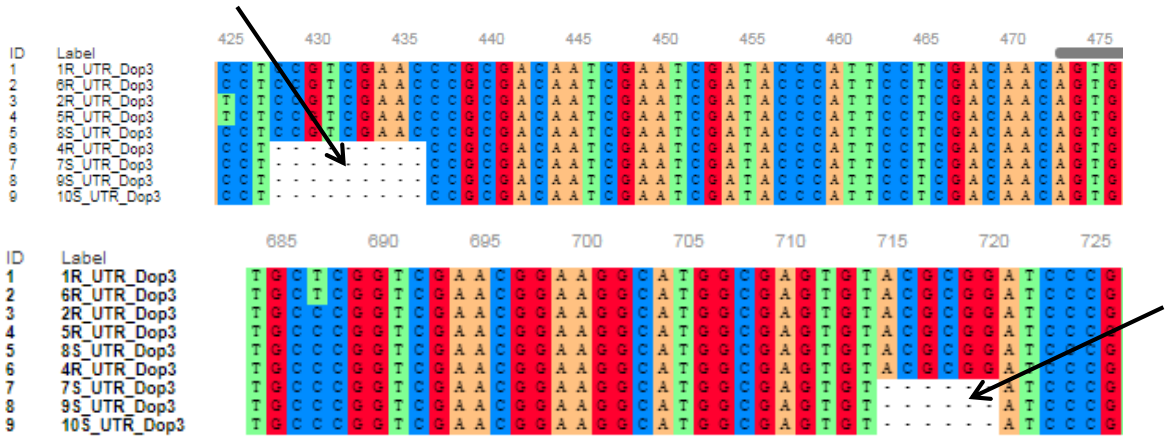
شکل ۲- تعیین کیفیت DNA از طریق الکتروفورز

Figure 2. Determination of DNA quality by electrophoresis

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

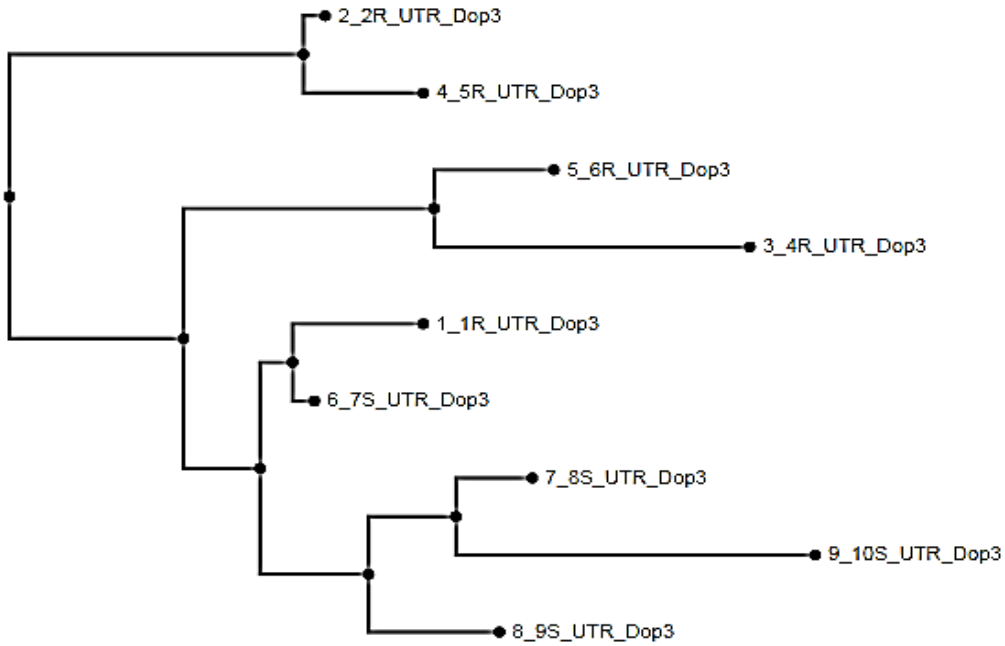


شکل ۳- کیفیت ناحیه تکثیر شده ژن گیرنده دوپامین بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
Figure 3. The quality of amplified PCR product of DOP3 gene in 1/5 % agarose gel



شکل ۴- نمایش تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده شده بین زنبورهای عسل حساس و مقاوم در ناحیه UTR ژن DOP3 افراد مقاوم(۱،۲،۳،۴،۶) و حساس(۵،۷،۸،۹)
Figure 4. Display of observed nucleotide differences between susceptible and resistant honeybees in DOP3 gene in UTR region

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]



شکل ۵- نمودار درخت فیلوژنی ناحیه UTR ژن DOP3. افراد مقاوم به جرب واروا (R) و افراد حساس (S)
Figure 5. Phylogenetic tree of the DOP3 gene between susceptible and resistant honeybees

نتایج تسوردا و همکاران (۴۹) نشان داد که نقش ژن‌های دخیل در بویایی در رفتار بهداشتی حساسیت به واروا قابل توجه هست، هر چند که نقش احتمالی ژن‌های غیر بویایی را نیز در مناطق QTL شناسایی شده را نادیده نگرفتند. از سوی دیگر مشخص است که رفتار VSH و رفتار SMR ارتباط تنگاتنگی با هم دارند (۲۱). پس با توجه به این موضوع که در انتخاب گروه‌های زنبوران نر مقاوم و حساس به جرب واروا برای این تحقیق معیار میزان شدت تولیدمثل جرب واروا نیز که توسط علمی و همکاران (۱۴) تعیین شده بود، نیز در نظر گرفته شده است و همچنین از ۴ زنبور نر حساس به جرب واروا در ۳ زنبور نر نسبت به گروه مقاوم در دو ناحیه حذف ۶ و ۹ نوکلئوتیدی مشاهده شده است. لذا می‌توان گفت به احتمال قوی این دو ناحیه می تواند در هر دو رفتار VSH و SMR نقش داشته باشد. در این تحقیق از شفیره زنبوران نر کندوهای مقاوم به جرب واروا استفاده شد و این نکته قوت تحقیق است. چون زنبوران نر مونوپلوئید هستند.

دو تحقیق مشابه در این خصوص در دسترس است. تحقیق حداد و همکاران (۱۸) و تحقیق کورنلیسن (۱۱). در تحقیق حداد و همکاران نژاد سیریکا(*Apis mellifera* syriaca) که از نژاد های گونه زنبورعسل معمولی می‌باشد، استفاده شد. این نژاد همچون زنبورعسل گونه هندی نسبت به جرب واروا از خود مقاومت نشان می‌دهد (۱۸). در این پروژه ژنوم کامل توالی‌یابی شد و تمام مناطق دارای چندشکلی با ژن‌های کاندیدای یافت شده در مطالعات دیگر مقایسه شدند و ۴۴ ژن شناسایی شد که به طور بالقوه در مقاومت به پاتوژن در *Apis melliferea syriaca* نقش دارند. هیچ چندشکلی تک نوکلئوتیدی در رابطه با ناحیه Dop3 مربوط به دخالت در مقاومت به جرب واروا در نژاد سریکا در مقایسه با ژنوم ثبت شده برای *Apis melliferea*درپایگاه NCBI یافت نگردید.

در تحقیق کورنلیسن (۱۱)، چند گروه زنبورعسل مورد مقایسه قرار گرفت، که جزئیات بیشتر این گروه‌ها اینگونه است. در یک گروه زنبوران کارگر مقاوم به جرب واروا که منشاء آن‌ها از کندوهای جزیره گوتلند بود که به هلند انتقال یافته بودند و هیچ مبارزه‌ای برای این کندوها صورت نمی‌گرفت، از سوی دیگر در مقابل زنبوران کارگر حساس به جرب از کلنی‌های شاهد که دو بار در سال با استفاده از اسید اگزالیک مبارزه می‌شدند، انتخاب شدند. و همچنین گروه دیگر با توجه به درصد شرکت نرهای دارای رفتار بهداشتی در تلقیح مصنوعی به عنوان گروه مقاوم و حساس (بدون تلقیح مصنوعی با زنبوران نر از کندوهای دارای رفتار بهداشتی)، انتخاب شدند. در این تحقیق چندین ژن کاندیدای مرتبط با رفتار مقاومت به جرب واروا همانند تحقیق حاضر، مورد بررسی قرار گرفت. در ناحیه اگزون ژن DOP3 هیچ چندشکلی تک نوکلئوتیدی دیده نشد. در خصوص ناحیه UTR در نواحی مختلف انواع مختلف چندشکلی در جمعیت‌های حساس و مقاوم دیده شد، ولی نتیجه‌گیری از این چندشکلی‌ها با تحقیقات کورنلسین (۱۱) برای شناسایی مولکولی جمعیت‌های حساس و مقاوم به جرب ممکن نشد.

با توجه به این که تکنیک‌های ریزآرایه، توالی‌یابی نسل آینده و توالی‌یابی RNA (RNA-seq) ابزارهای قدرتمندی هستند که می‌توانند کل ژنوم را برای تفاوت‌های بین کلنی‌های مقاوم و کلنی‌های حساس به جرب واروا و رمزگشایی معماری صفت مقاومت به جرب واروا تحت بررسی قرار دهند، لذا به‌عنوان تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود این تکنیک‌ها هم بر روی این جمعیت انجام شود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

همچنین اندازه جمعیت این مطالعه بر روی ۱۰-۱۲ زنبور هدف‌گذاری شده بود که اگر بتوان همین منطقه حاوی تنوع را در یک جمعیت بزرگ اعتبارسنجی کرد می‌تواند به قدرت مطالعه و دقت نتایج اضافه کند.

نتیجه‌گیری کلی

به‌عنوان جمع‌بندی و نتیجه‌گیری نهایی ذکر این نکته ضروری است که تاکنون در کشور ایران در خصوص ژن‌های کاندیدای رفتارهای مقاومت به جرب واروا هیچ تحقیقی صورت نگرفته است و بررسی نتایج نهایی این تحقیق وجود اختلاف معنی‌دار از نوع حذف/اضافه ۶ و ۹ جفت باز نوکلئوتیدی در مناطقی از توالی نوکلئوتیدی را بین دو گروه نشان داد که احتمالاً می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی در تشخیص کلنی‌های حساس و مقاوم به جرب واروا و در نهایت در برنامه‌های اصلاحی مربوط به تولید کلنی‌های مقاوم به جرب واروا مورد استفاده قرار گیرد. تاکنون چنین حذف‌هایی مربوط به این ژن گزارش نشده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله، از دانشگاه تبریز برای فراهم آوردن بودجه پژوهشی این مطالعه سپاسگزاریم. این مقاله مستخرج از یکی از سه مطالعه طراحی شده در رساله دکترای گروه علوم دامی دانشگاه تبریز می‌باشد. ضمناً، از آقای دکتر عباس رافت همکار گروه و آقای دکتر محسن علمی بابت کمک سخاوتمندانه در مقوله در اختیار نهادن اطلاعات جمعیت‌های حساس و مقاوم انتخاب شده ژنتیکی طی ۶ سال، تشکر ویژه داریم.

منابع

1. Abdullah, I., S. Gary and S. Marla. 2007. Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. Apidologie, 38(1): 67-76.
2. Beggs, K.T., I.S. Hamilton, P.T. Kurshan, J.A. Mustard and A.R. Mercer. 2005. Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35(8): 873-882.
3. Beggs, K.T. and A.R. Mercer. 2009. Dopamine receptor activation by honey bee queen pheromone. Current Biology, 19(14): 1206-1209.
4. Behrens, D., Q. Huang, C. Geßner, P. Rosenkranz, E. Frey, B. Locke, R.F.A. Moritz, F. B. Kraus. 2011. Three QTL in the honey bee *Apis mellifera L.* suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*. Ecology and Evolution, 1(4): 451-458.
5. Bienefeld, K. and F. Pirchner. 1991. Genetic correlations among several colony characters in the honey bee (Hymenoptera, Apidae) taking queen and worker effects into account. Annals of the Entomological Society of America, 84(3): 324-331.
6. Bienefeld, K., K. Ehrhardt and F. Reinhardt. 2007. Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects—a BLUP-animal model approach. Apidologie, 38(1): 77-85.
7. Boecking, O., K. Bienefeld, W. Drescher. 2000. Heritability of the varroa-specific hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Animal Breeding and genetics, 117(6): 417-424.
8. Boecking, O. and E. Genersch. 2008. Varroosis-the ongoing crisis in bee keeping. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 3(2): 221-228.
9. Büchler, R., S. Berg and Y. Le Conte. 2010. Breeding for resistance to *varroa destructor* in Europe. Apidologie, 41(3): 393-408.
10. Calderone, N.W. 2012. Insect pollinated crops, Insect pollinators and USA agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. PloS One, 7(5): e37235.
11. Cornelissen, M.A.M.C. 2015. Insight into the genetic basis of *varroa destructor* resistance in *Apis mellifera*. Laboratory of Genetics, Wageningen University, Wageningen, Nederland.
12. De Miranda, J.R. and E. Genersch. 2010. Deformed wing virus. Journal of Invertebrate Pathology, 103: S48-61.
13. Dietemann, V., J. pflugfelder, D. anderson, J.D. charrière, N. chejanovsky, B. dainat, J. de miranda and et al. 2012. Varroa destructor: research avenues towards sustainable control. Journal of Apicultural Research, 51(1): 125-132.
14. Elmi, M. 2019. QTL detection for varroa mite resistance trait in azerbaijani bee colonies. Ph.D. Thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran. 98 pp (In Persian).
15. Estoup, A., M. Solignac and J.M. Cornuet. 1994. Precise assessment of the number of patrilines and of genetic relatedness in honeybee colonies. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 258(1351): 1-7.
16. Fumagalli, F., S. Jones, R. Bossé, M. Jaber, B. Giros, C. Missale, R.M. Wightman and M.G. Caronl. 1998. Inactivation of the dopamine transporter reveals essential roles of dopamine in the control of locomotion, psychostimulant response, and pituitary function. In Advances in Pharmacology, 42: 179-82.
17. Genersch, E. and M. Aubert. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee *(Apis mellifera L.)*. Veterinary Research, 41(6): 54.
18. Haddad, N., A. Mahmud Batainh, O. Suleiman Migdadi, D. Saini, V. Krishnamurthy, S. Parameswaran and Z. Alhamuri. 2016. Next generation sequencing of *Apis mellifera syriaca* identifies genes for varroa resistance and beneficial bee keeping traits. Insect Science, 23(4): 579-90.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

19. Harbo, J.R. and J.W. Harris. 1999. Selecting honey bees for resistance to *varroa jacobsoni*. Apidologie, 30(2-3): 183-196.
20. Harbo, J.R. and J.W. Harris. 1999. Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). Journal of Economic Entomology, 92(2): 261-265.
21. Harbo, J.R. and J.W. Harris. 2005. Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. Journal of Apicultural Research, 44(1): 21-23.
22. Ibrahim, A. and M. Spivak. 2006. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *varroa destructor*. Apidologie, 37(1): 31-40.
23. Jiang, S., T. Robertson, M. Mostajeran, A. Robertson and X. Qiu. 2016. Differential gene expression of two extreme honey bee (*Apis mellifera*) colonies showing varroa tolerance and susceptibility. Insect Molecular Biology, 25(3): 272-282.
24. Lapidge, K.L., B.P. Oldroyd and M. Spivak. 2002. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. Naturwissenschaften, 89(12): 565-568.
25. Le Conte, Y., G. De Vaublanc, D. Crauser, F. Jeanne, J.C. Rousselle and J.M. Bécard. 2007. Honey bee colonies that have survived *varroa destructor*. Apidologie, 38(6): 566-572.
26. Le Conte Y., C. Alaux, J.F. Martin, J.R. Harbo, J.W. Harris, C. Dantec, D. Severac, S. Cros-Arteil and M. Navajas. 2011. Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behaviour. Insect Molecular Biology, 20(3): 399-408.
27. Locke, B. and I. Fries. 2011. Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in sweden surviving *varroa destructor* infestation. Apidologie, 42(4): 533-542.
28. Locke, B., Y. Le Conte, D. Crauser and I. Fries. 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of *varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. Ecology and Evolution, 2(6): 1144-1150.
29. Mansouri zalani, A., G.H. Tahmasbi, N. Emam Jomeh kashani, M. Amin Afshar and A. Ghazi Khani Shad. 2018. Study on the hygenic and grooming behaviours of iranain honey bee's colonies (*Apis mellifera meda*) in the third and fourth generation of breeding plan for resistance to *varroa destructor*. Journal of Entomological Research, 10(1): 65-76 (In Persian).
30. Mondet, F., A. Beaurepaire, A. McAfee, B. Locke, C. Alaux, S. Blanchard, B. Danka and Y. Le Conte. 2020. Honey bee survival mechanisms against the parasite *varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. International Journal for Parasitology, 50(6-7): 433-447.
31. Mustard, J.A., V. Vergoz, K.A. Mesce, K.A. Klukas, K.T. Beggs, L.H. Geddes, H.J. McQuillan and A.R. Mercer. 2012. Dopamine signaling in the bee. In: Galizia C.G., D. Eisenhardt, M. Giurfa (eds.). Honeybee neurobiology and behavior. 199-209 pp., Springer, Dordrecht, Netherlands.
32. NajiKhoei, A., C. Firatli, S. Alijani, Y. Kasko Arici and S. Khodaie. 2011. Behavioral defenses of iranian honey bees (*Apis mellifera meda*) against *varroa destructor*. Annals of Biological Research, 2(6): 510-516.
33. Oxley, P.R., M. Spivak and B.P. Oldroyd. 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). Molecular Ecology, 19(7): 1452-1461.
34. Peng, Y.S., Y. Fang, S. Xu and L. Ge. 1986. The resistance mechanism of the asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to anectoparasitic mite, *varroa jacobsoni* oudemans. Journal of Invertebrate Pathology, 49(1): 54-60.
35. Råberg, L., A.L. Graham and A.F. Read. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1516): 37-49.
36. Rinderer, T.E., L.I. De Guzman, G.T. Delatte, J.A. Steltzer, V.A. Lancaster, V. Kuznesov, L. Beaman, R. Watts and J.W. Harbo. 2001. Resistance to the parasitic mite *varroa destructor* in honey bees from far-eastern russia. Apidologie, 32(4): 381-394.
37. Rinderer, T.E., J.W. Harris, G.J. Hunt and L.I. de Guzman. 2010. Breeding for resistance to *varroa destructor* in north America. Apidologie, 41(3): 409-424.
38. Robertson, A.J., B. Trost, E. Scruten, T. Robertson, M. Mostajeran, W. Connor, A. Kusalik, P. Griebel and S. Napper. 2014. Identification of developmentally-specific kinotypes and mechanisms of varroa mite resistance through whole-organism, kinome analysis of honeybee. Frontiers in Genetics. 5: 139.
39. Rodríguez-Dehaibes, S.R., G. Otero-Colina, V. Pardio Sedas and J.A. Villanueva Jiménez. 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in *varroa destructor* populations from veracruz, mexico. Journal of Apicultural Research, 44(3): 124-125.
40. Rosenkranz, P., P. Aumeier and B. Ziegelmann. 2009. Biology and control of *varroa*
41. *destructor*. Journal of Invertebrate Pathology, 103: 96-119.
42. Sandoz, J.C. 2011. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. Frontiers in Systems Neuroscience, 5: 98.
43. Schneider, P. and W. Drescher. 1987. Einfluss der parasitierung durch die milbe *varroa jacobsoni* Oud. auf das schlupfgewicht, die gewichtsentwicklung, die entwicklung der hypopharynxdrüsen und die lebensdauer von *Apis mellifera*. Apidologie, 18(1): 101-110.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

44. Seeley, T.D. 2007. Honey bees of the arnot forest: a population of feral colonies persisting with *varroa destructor* in the northeastern United States. Apidologie, 38(1): 19-29.
45. Spivak, M. and G. Reuter. 2001. *Varroa destractor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: *Apidae*) coconies selected for hygienic behaviour. Journal of Economic Entomology, 94(2): 326-331.
46. Stanimirovic, Z., S. Jevrosima, M. Mirilovic and V. Stojic. 2008. Heritability of hygienic behavior in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). Acta Veterinaria, 58(5-6): 593-601.
47. Stanimirovic, Z., S. Jevrosima, A. Nevenka and V. Stojic. 2010. Heritability of grooming behavior in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). Acta Veterinaria, 60(2-3): 313-323.
48. Tahmasebi, G.H., S.B. Hosseini, M. Eskandari nasab. 2018. Evaluation of hygienic behaviors in iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) colonies and their relationship with infestation rate to *varroa destructor* mite. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 41(2) (In Persian).
49. Tarpy, D.R., R. Nielsen and D.I. Nielsen. 2004. A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. Insectes Sociaux, 51(2): 203-204.
50. Tsuruda, J.M., J.W. Harris, L. Bourgeois, R.G. Danka and G.J. Hunt. 2012. High-resolution linkage analyses to identify genes that influence varroa sensitive hygiene behavior in honey bees. Plos One, 7(11): e48276.
51. Yue, C., M. Schroder, K. Bienefeld and E. Genersch. 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. Journal of Invertebrate Pathology, 92(2): 105-108.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]

Single Nucleotide Polymorphism in the Dopamine Receptor Type 3 (DOP3) Candidate Gene Associated with Varroa Destructor Resistance in Honeybee

Behzad Sepehri[1], Sadegh Alijani[2], Arash Javanmard[3], Hossein Johnmohammadi[4] and Karim Hasanpur[3]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, (Corresponding Author: sad-ali@tabrizu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Received: 27 September, 2021 Accepted: 21 February, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Varroa infestation is undoubtedly the greatest threat and challenge facing Apiculture today. This external parasite inevitably lives in the bee colony and causes irreparable damage to its colony and the subsequent honey production. One of the proposed strategies in this regard is the use of pesticides, which have a negative impact on the health of bees and honey consumers. To avoid these negative consequences, safer alternative methods of controlling mites are needed, including the use of resistant genetic strains and breeding selection programs to establish colonies with relative resistance to mites. In honeybee colonies, there are several physiological and behavioral mechanisms for Varroa resistance that by examining their relationship with identified resistance genes, the genetic basis of Varroa mite resistance in honeybees is identified and can used in breeding programs. The aim of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), in a sample of the Iranian honeybee population, in the candidate gene (the dopamine receptor gene (DOP3)) effective on defense behaviors of honeybees against the varroa mite.

Material and Methods: For this purpose, a total of 10 drone bees (5 susceptible and 5 resistant) were selected and their DNA was then isolated using a CTAB-based method. The PCR was carried out based on specific primers in the UTR region sequence of the DOP3 gene. The quantity and quality were then determined using the nanometer method. After a single band (900 bp) of the expected size, product purification and sequencing (Sanger method) were performed. The display of the outputs and the determination of the quality of the raw sequence (phred index) took place with the FinchTV software and the alignment with BLAST and clustering with the MAFTT software.

Results: In this study, differences were observed in several regions of the nucleotide sequence of the UTR region of DOP3 gene, the most important difference in the nucleotide sequence between sensitive and resistant individuals in the two regions. One is in the nucleotide region of 428 to 437 forward readings as many as 9 bp nucleotides and the other is in the nucleotide region of 715 to 720 forward readings as many as 6 bp nucleotides, which in both, mutations of the deletion type have been performed.

Conclusion: Evaluation of the final results showed significant difference, in type of deletion/addition with the size of 6 and 9 bp between two groups (sensitive and resistant to Varroa), respectively which can be used in the molecular identification of resistant colonies and breeding programs to produce Varroa mite resistant colonies. No such deletions from this gene have been reported so far.

Keywords: Candidate Gene, Dopamine Receptor, Resistance Mechanism, Single Nucleotide Polymorphism, Varroa destructor

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-12-22]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.37.7.7]
[DOI: 10.52547/rap.13.37.148]