نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۴، پاییز ۱۳۹۳
ص‌ص: ۳~۱۶

ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) در شمال‌غرب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و خصوصیات مرفولوژیکی

- **لطفعلی دولتی** (نویسنده مسئول)
  استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
- **مصطفی ملایی**
  دانش‌آموخته‌ی کارشناسی‌ارشد حشره شناسی کشاورزی گروه گیاهپزشکی دانشگاه زنجان
- **غلامحسین طهماسبی**
  استاد پژوهشی بخش تحقیقات زنبور عسل مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

تاریخ دریافت : بهمن‌ماه ۹۱ تاریخ پذیرش : مهرماه ۹۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۲۴۲۶۱۸۷

Email: l.dolatti@znu.ac.ir

چکیده

در مجموع، ۳۲۰۰ زنبور کارگر جوان از نظر مرفولوژیکی و ۳۲۰ زنبور از لحاظ مولکولی بررسی شدند. مطالعه چهار جایگاه ریزماهواره‌ای مهم زنبور عسل (A24, A28, A29, A113) **نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌های زنبور عسل شمال‌غرب ایران وجود دارد و از نظر میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه (۳/۲۵-۵/۷۵) و میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار (۰/٤٤٥-۰/۷۰۱) دارای سطح بالایی از تنوع می‌باشند. همچنین، براساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی** (AMOVA)**، تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ۷۰ درصد و تنوع ژنتیکی بین جمعیتی ۳۰ درصد برآورد گردید. علاوه بر آن، آنالیز آماری داده‌های مرفولوژیکی با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی** (PCA) **نشان داد که جمعیت زنبور عسل شمال‌غرب ایران حداقل به سه گروه قابل تفکیک است. نظر به تنوع بالای ژنتیکی زنبور عسل شمال‌غرب ایران، ایجاد ایستگاه‌های پرورش ملکه و اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی مختص توده زنبور عسل شمال‌غرب کشور، لازم و ضروری بنظر می‌رسد. همچنین با توجه به چندشکلی بالای نشانگرهای مورد مطالعه، این نشانگرها برای مطالعات بعدی از جمله برای نقشه‌یابی صفات کمی** (QTL mapping) **و استفاده از آنها برای انتخاب به کمک نشانگر** (MAS) **و سایر مطالعات توصیه می‌شود.**

واژه‌های کلیدی: زنبور عسل، *Apis mellifera meda* ، ریزماهواره‌ها، تنوع ژنتیکی، شمال‌غرب ایران.

Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 104 pp: 3-16

Genetic Diversity Assessment of Iranian Honey Bee Population in Northwest Iran Using Microsatellite Markers and Morphological Characteristics

Mostafa Mollaei,[1] Lotfali Dolatti,[2] Gholamhosein Tahmasbi,[3]

1-M.Sc. in Entomology, Zanjan University, Faculty of Agriculture, Zanjan, Iran.

2-Assistant Professor of Entomology, Zanjan University, Faculty of Agriculture, Zanjan, Iran.3-Professor of Honeybee Research Department, Animal Science Research Institute of Iran.

**Corresponding Author, l.dolatti@znu.ac.ir,Tel.: +989122426187*

Received: February 2013 **Accepted: October 2013**

Totally, 3200 and 320 young worker bees were investigated morphologically and molecularly respectively. The four important honey bee microsatellite loci, A24, A28, A29, A113, indicated a considerable level of genetic diversity among the nation's northwest honey bee populations and, considering average number of alleles per locus (3.25-5.75) and, average expected heterozygosity (0.445-0.701) high level of variability was shown. Moreover, according to molecular analysis of variance (AMOVA), intra-population and inter-population genetic diversity were estimated to be 70% and 30% respectively. In addition, statistical analysis of morphological characteristics using Principle Component Analysis (PCA) revealed that northwestern honey bee population of Iran could be divided into, at least, three groups. Considering the high genetical diversity of honey bee in northwest Iran, establishing queen rearing stations and executing interbreeding programs for honey bee population in northwest Iran seems to be necessary. Furthermore, considering the high level of polymorphism in the studied markers, they are recommended to be applied for Quantitative Trait Loci (QTL) mapping, Marker Assisted Selection (MAS) and, other related investigations.

Key words: Honey bee, Apis mellifera meda, microsatellites, genetic diversity, northwest Iran.

مقدمه

زنبور عسل ایرانی، *Apis mellifera meda* یکی از ۲۴ نژاد زنبور عسل موجود در دنیاست که علاوه بر ایران، در شمال عراق، جنوب‌شرقی ترکیه و حتی در شمال سوریه وجود دارد (۱۵). این نژاد از نظر خصوصیات مرفولوژیکی ظاهراً شبیه نژاد ایتالیایی است و از نظر خصوصیات بیولوژیک نیز نژادی است با تمایل به بچه-دهی زیاد، قدرت جمع‌آوری بره‌موم زیاد، قدرت زمستان‌گذرانی خیلی خوب و رفتار تهاجمی بالا که مجموعاً این نژاد را از سایر زیرگونه‌های منطقه متمایز می‌سازد (۱۶). در راستای اهمیت حفظ تنوع در نژادها و شناسایی ذخایر ژنتیکی و با توجه به اینکه اولین گام برای نیل به اصلاح نژاد هدفمند، مشخص نمودن میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌هاست، مطالعه حاضر انجام شد. پس از تعیین میزان تنوع موجود، می‌توان برای اصلاح نژاد جمعیت‌ها برنامه‌ریزی و در طی برنامه‌های بلندمدت و هدفدار، صفات اقتصادی موردنظر را در آن جمعیت متمرکز و صفات نامطلوب را حذف نمود. Estoup و همکاران (۱۹۹۵) با تحقیقی بر روی سه نژاد آفریقایی و چهار نژاد اروپایی زنبور عسل معمولی با استفاده از هفت جایگاه ریزماهواره‌ای، نشان دادند که میانگین هتروزایگوسیتی و میانگین تعداد آلل در زیرگونه‌های آفریقایی، به طور معنی‌داری بیشتر از زیرگونه‌های اروپایی است و همچنین نشان دادند که ریزماهواره‌ها در زنبور عسل فراوان بوده و توسط آنها دامنهٔ وسیعی از تنوع ژنی (بین ۷ تا ۳۰ آلل به ازای هر جایگاه) می‌تواند مشخص گردد (۱۱). Garnery و همکاران (۱۹۹۸) تنوع ژنتیکی و تمایز بین جمعیت‌های زنبور عسل اروپای غربی (*A. m. mellifera* و *A. m. iberica*) را با استفاده از ۱۱ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی کردند. در این دو زیرگونه تنوع ژنتیکی پایین‌تری نسبت به بیشتر زیرگونه‌های دیگر مطالعه شده مشخص گردید (۱۵). Segura (۲۰۰۰) با استفاده از ریزماهواره‌ها سطح بالایی از تنوع را در زنبورهای آفریقایی شده کاستاریکا

نشان داد (۲۶). همچنین Franck و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با تعیین تنوع ژنتیکی ۷۳۸ کلنی زنبور عسل از ۶۴ منطقهٔ قارهٔ آفریقا با استفاده از ریزماهواره‌ها، نشان دادند که فراوانی آللی جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مربوط به هشت جمعیت زنبور عسل آفریقایی یکسان بوده و با هم اختلاف معنی‌داری ندارند (۱۴). De La Rua و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل شبه‌جزایر بالریک با استفاده از چندشکلی موجود در هشت جایگاه ریزماهواره‌ای، نتیجه گرفتند که از لحاظ ساختار ژنتیکی، جمعیت‌های زنبور عسل این جزایر توسط ورود ملکه‌های بیگانه مورد تهدید قرار گرفته و جمعیت‌های موجود باید مورد حمایت نژادی قرار گیرند و همچنین نتایج این محققین نشان داد که در جمعیت‌های زنبور عسل شبه‌جزایر بالریک تنوع ژنتیکی پایینی وجود دارد و آنالیزهای فیلوژنتیک بیانگر منشأ ایبریایی زنبورهای عسل بالریک بود (۹). Ting و همکاران (۲۰۰۸) تنوع ژنتیکی دو گونه زنبور عسل *A. cerana* و *A. m. ligustica* را در چین با استفاده از ۲۱ جایگاه ریزماهواره‌ای مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که تمام ۲۱ جایگاه تحت بررسی دارای پلی‌مورفیسم بالایی با میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ۰/۷۱۷۵ بودند که نشان دهندهٔ میزان بالایی از تنوع ژنتیکی و پتانسیل انتخاب نسبتاً بالا در این جمعیت‌ها می‌باشد (۲۹). Wei (۲۰۰۱) با بررسی‌های ریزماهواره‌ای نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین زنبورهای عسل کنیا وجود دارد (۳۰). Bourgeois و همکاران (۲۰۰۸) در ارتباط با تنوع ژنتیکی کلنی‌های تجاری زنبور عسل ایتالیایی در ایالات‌متحده و ایتالیا با استفاده از شش جایگاه ریزماهواره‌ای نتیجه گرفتند که در مجموع، تنوع آللی و تنوع ژنی بین دو گروه، اختلاف معنی‌داری ندارد (۷). Royan و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی بر روی تنوع ژنتیکی زنبور عسل شمال ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، نشان دادند که تنوع ژنتیکی مشهودی در بین زنبورهای عسل سه استان گیلان، مازندران و گلستان وجود نداشته و زنبورهای شمال ایران از نظر تعداد آلل به ازاء هر جایگاه و هتروزایگوسیتی، دارای سطح پایینی از تنوع می‌باشند و فاصلهٔ ژنتیکی پایینی در بین زنبورهای این سه استان موجود است (۲۱). در یک تحقیق توسط حلفی مسبوبی و همکاران (۱۳۹۱) تنوع ژنتیکی زنبوران عسل خوزستان با استفاده از هشت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت و تنوع درون جمعیتی ۹۲ درصد و تنوع بین جمعیتی ۸ درصد برآورد گردید (۳). مطالعات Kence و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از زنبور عسل شمال‌غرب ایران با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی، DNA میتوکندریایی (mtDNA) و ریزماهواره‌ها تنوع قابل ملاحظه‌ای را نشان داد و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین ۰/۵۹۶ تا ۰/۶۹۵و میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه ۴/۴ تا ۸/۰ بود (۱۷). خدرزاده (۱۳۸۶) در بررسی‌های خود بر روی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل غرب ایران (استان‌های کرمانشاه، کردستان، آذربایجان‌غربی و آذربایجان شرقی) با استفاده از نه نشانگر ریزماهواره نتیجه گرفت که بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی در بین جمعیت‌های آذربایجان‌غربی و کردستان و کمترین فاصلهٔ ژنتیکی در میان جمعیت‌های کردستان و آذربایجان‌شرقی موجود است. در این مطالعه همچنین تنوع درون جمعیتی ۹۲ درصد و تنوع بین جمعیتی ۸ درصد برآورد گردید (۴). Farshineh Adl و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعات خود، خصوصیات مرفولوژیکی سه نژاد زنبور عسل ایرانی، آناتولی و قفقازی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج تجزیه تابع تشخیص نشان داد که این سه نژاد در گروه‌های مجزا قرار می‌گیرند. البته در این بررسی، نمونه‌های زنبور عسل ایرانی مربوط به شهرهای ارومیه، تهران و تبریز همپوشانی زیادی باهم داشتند و همگی در یک گروه قرار گرفتند (۱۳). همچنین مطالعات Kandemir و همکاران (۲۰۰۴) (۱۶)، Farhoud and Kence (۲۰۰۵) (۱۲) و Moradi and Kandemir (۲۰۰۴) (۱۸) از دیگر بررسی-های انجام شده در مناطقی از شمال‌غرب ایران هستند که به تنوع ژنتیکی زنبور عسل با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی، آلوزایم‌ها و DNA میتوکندریایی پرداخته‌اند. با توجه به اینکه چهار استان آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، زنجان و کردستان در شمال‌غرب ایران، مجموعاً با ۱۳۳۹۷۱ کیلومترمربع مساحت و

۱۸۱۰۷۰۵ تعداد کلنی، ۵۰/۶۳ درصد از تولید عسل کشور را به خود اختصاص می‌دهند (۵)، مطالعه حاضر بر این استان‌ها متمرکز گردید. جهت تعیین وضعیت ژنتیکی و برنامه‌ریزی اصولی برای عملیات اصلاح نژادی، مطالعهٔ تنوع ژنتیکی در زنبور عسل ضروری به‌نظر می‌رسد. پلی‌مورفیسم آنزیمی در زنبور عسل به دلیل سیستم هاپلودیپلوئیدی چندان زیاد نیست، در نتیجه نمی‌توان از آن برای مطالعهٔ تنوع ژنتیکی استفاده کرد. استفاده از آلل‌های جهش یافته نیز به دلیل پایین‌بودن احتمال حفظ این آلل‌ها و همچنین غیرقابل کنترل بودن آمیزش در زنبور عسل (بجز در موارد تلقیح مصنوعی)، کاربرد زیادی ندارد. لذا در این تحقیق برای بررسی تنوع ژنتیکی حقیقی، همزمان از نشانگرهای مولکولی و مرفولوژیکی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

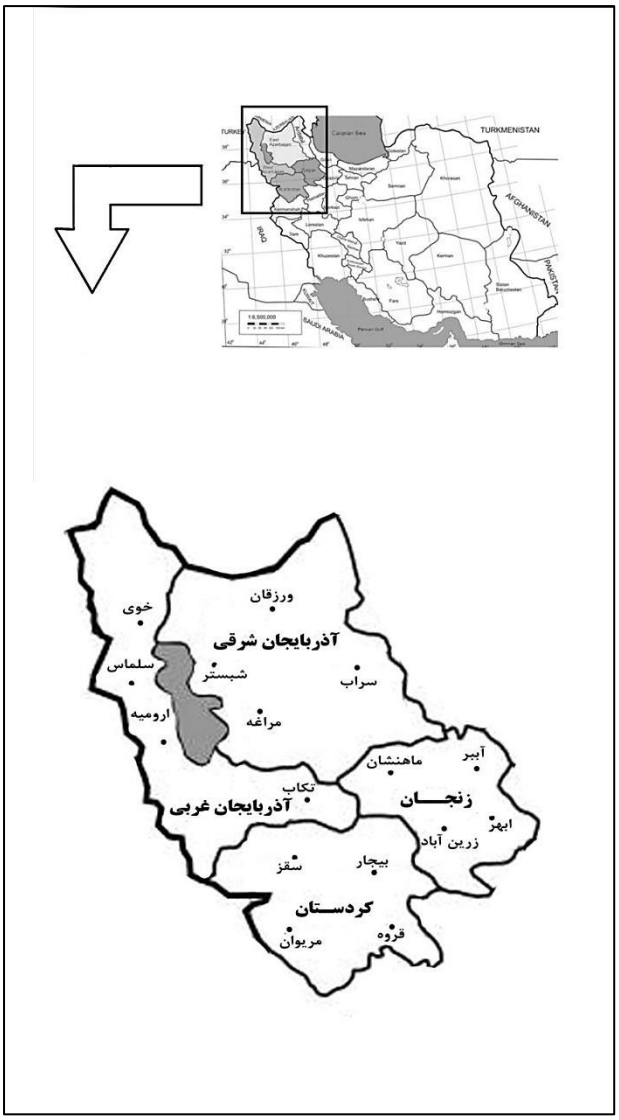
نمونه‌برداری:

نمونه‌ها در تیرماه و مردادماه سال ۱۳۹۰ از چهار استان زنجان، کردستان، آذربایجان‌غربی و آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شدند. در این نمونه‌برداری از هر استان چهار شهرستان (شکل۱) و از هر شهرستان چهار زنبورستان و از هر زنبورستان پنج کلنی و از هر کلنی ۲۰ تا ۳۰ زنبور کارگر جوان برداشت شد. سپس ۱۰ نمونه از نظر مرفولوژیکی و یک نمونه از نظر مولکولی از هر کلنی مورد بررسی قرار گرفت (در مجموع ۳۲۰۰ زنبور کارگر جوان از نظر مرفولوژیکی و ۳۲۰ زنبور از لحاظ مولکولی). نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت بررسی‌های مولکولی، تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹۶ درصد و در دمای ۲۰°c- نگهداری شدند. همچنین جهت حفظ خصوصیات مرفولوژیکی، نمونه‌های مربوطه تا زمان اندازه‌گیری در محلول پامپل (۳۰ قسمت آب مقطر، ۶ قسمت فرمالدئید ۴۰ درصد، ۱۵ قسمت اتانول ۹۶ درصد و ۲ قسمت اسید استیک) قرارگرفتند (۴).

استخراج DNA: استخراج به روش CTAB و بر اساس دستورالعمل Doyle and Doyle (۱۰) با کمی تغییر انجام شد و در تمامی موارد از بخش قفسه سینه زنبور عسل استفاده گردید.

جایگاه‌های مورد مطالعه، شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و الکتروفورز محصولات PCR:

چهار جایگاه ریزماهواره‌ای مهم زنبور عسل (جدول ۱) بر اساس مطالعات قبلی (۹) انتخاب و پس از سنتز توسط شرکت سیناژن، استفاده گردید.



شکل ۱- مناطق مورد مطالعه و تحت نمونه برداری در این پژوهش

جدول ۱- مشخصات جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد مطالعه و آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Locus	Core sequence	Primers	Tm°C	$MgCl_2$ (mM)
A28	$(CCT)_3GCT(CCT)_6$ $(CT)_5TT(CT)_4$	5'GAAGAGCGTTGGTTGCAGG3' 5'GCCGTTCATGGTTACCACG3'	54	1.7
A1 13	$(TC)_2C(TC)_2TT(TC)_5$ $TT(TC)_8TT(TC)_5$	5'CTCGAATCGTGGCGTCC3' 5'CCTGTATTTTGCAACCTCGC3'	60	1.5
A24	$(CT)_{11}$	5'CACAAGTTCCAACAATGC3' 5'CACATTGAGGATGAGCG3'	55	1.5
A29	$(GT)_{24}$	5'AAACAGTACATTTGTGACCC3' 5'CAACTTCAACTGAAATCCG3'	54	1.2

واکنش در طی ۳۵ چرخه انجام گردید و حجم نهایی هر واکنش ۱۵ میکرولیتر شامل DNA ۱۰ تا ۲۰ نانوگرم، یک میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول از mix dNTP، ۱/۲ تا ۱/۷ میلی مول $MgCl_2$ و یک واحد Taq DNA polymerase بود. سیکل حرارتی بصورت واسرشته سازی اولیه در ۹۴°c به مدت ۹ دقیقه، واسرشته‌سازی در ۹۴°c به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای اختصاصی هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲°c به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷۲°c به مدت ۹ دقیقه انجام شد. فرآورده-های PCR بر روی ژل‌های پلی اکریل آمید غیرواسرشته ساز ۸ درصد به مدت ۳ ساعت و با ولتاژ ۱۸۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از آن، جهت نمایان کردن قطعات DNA از نیترات نقره جهت رنگ‌آمیزی استفاده گردید.

اندازه‌گیری خصوصیات مرفولوژیکی: اندازه‌گیری نه صفت ظاهری شامل طول بال جلو، عرض بال جلو، شاخص کوبیتال، طول خرطوم، طول پای عقب، طول ترژیت سوم و چهارم (قد زنبور)، شاخص استرنیت ششم (ضریب لاغری)، رنگ سپرچه و رنگ ترژیت سوم بر اساس روش بین المللی Ruttner (۱۹۸۵ و ۱۹۸۸) (۲۳ و ۲۲) و با استفاده از استریومیکروسکوپ مجهز به عدسی مدرج (گراتیکول) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای بدست آوردن اندازه آلل‌ها و وزن مولکولی آنها از نرم‌افزار UVIDOC استفاده شد. سپس انواع آلل‌ها در هر جایگاه تعیین گردید. چون ریزماهواره‌ها توارث هم‌بارز دارند، هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن هر فرد، با توجه به مشاهده یک یا دو باند مشخص شد. ژنوتیپ هر فرد با توجه به نوع آلل‌های وی تعیین و سپس فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه گردید. فراوانی آللی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_O)، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (H_E) ، شاخص اطلاعات شانون (I)، احتمال همسانی (PI)، آماره F_{ST} و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و بررسی تعادل هاردی _ وینبرگ با استفاده از نرم افزار GenAlEx ver 6.3 (۲۰) انجام گرفت. برای محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در موارد انحراف از تعادل هاردی- وینبرگ از رابطه $PIC = 1 - \sum_i pi^2 - \sum_{ij} pi^2 pj^2$ استفاده گردید و در موارد برقراری تعادل هاردی-وینبرگ، میزان PIC با هتروزایگوسیتی مورد انتظار برابر فرض شد. همچنین دندروگرام بر اساس ضریب تشابه Nei (۱۹) به روش NJ (۲۴) با ۱۰۰۰ بوت استراپینگ، توسط نرم افزار SplitsTree ver 4.10 (۲۷) ترسیم شد. در آنالیز داده‌های مرفولوژیکی نیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار SAS ver 9.1 (۲۵) و رسم نمودار بای‌پلات و همچنین تجزیه خوشه‌ای با نرم افزار SPSS ver 20 (۲۸) انجام شد.

نتایج و بحث

DNA استخراج شده: میانگین غلظت DNA استخراج شده (برحسب نانوگرم بر میکرولیتر) برابر با ۶۲±۴۲۵ و خلوص آن (بر اساس نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰) برابر با ۰/۰۶۰±۱/۷۱ بود. در یک مطالعه کارآیی چهار روش مختلف استخراج DNA از زنبور عسل مقایسه گردید و نتایج نشان داد که با روش Chelex بیشترین مقدار DNA و حداکثر خلوص حاصل می‌گردد (۲) ولی در این تحقیق روش CTAB به عنوان روشی سریع و کم هزینه و در عین حال کارآمد مورد استفاده قرار گرفت.

دامنه آللی جایگاه‌های مورد مطالعه: هر چهار جایگاه در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شدند. دامنه اندازه آلل ها در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- دامنهٔ آللی جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت‌های زنبور عسل شمال‌غرب ایران

جایگاه	A29	A28	A113	A24
دامنهٔ آللی(bp)	۱۳۰-۱۶۶	۱۲۰-۱۵۵	۲۰۰-۲۴۸	۹۸-۱۵۱

میانگین آللی جایگاه‌ها:

بیشترین تعداد آلل در جایگاه A29 و کمترین تعداد در جایگاه A28 مشاهده گردید (به ترتیب ۵/۷۵ و ۳/۲۵). همچنین، میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر در جمعیت زنبوران عسل زنجان بیشتر از سایر جمعیت‌ها بود که حاکی از تنوع بیشتر این جمعیت بوده و نشأت گرفته از جایگاه A29 می‌باشد. از طرفی میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر در جمعیت زنبوران عسل آذربایجان غربی کمتر از سایر جمعیت ها بود که دلیلی مشهود بر کاهش تنوع در جمعیت مذکور است که از جایگاه A29 ناشی شده است.

تنوع ژنی یا هتروزایگوسیتی موجود در جمعیت‌ها:

با لحاظ شدن میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار کلیهٔ جایگاه‌ها به ازای جمعیت‌ها، میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار در جمعیت زنجان بیشتر از میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار سایر جمعیت‌ها بود که حاکی از بالا بودن تنوع ژنتیکی این جمعیت است (جدول۳). همچنین میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار در جمعیت آذربایجان غربی کمتر از میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار سایر جمعیت ها بود که حاکی از پایین بودن تنوع ژنتیکی این جمعیت است.

شاخص اطلاعاتی شانون:

با لحاظ شدن جایگاه‌ها به ازای جمعیت‌ها، بیشترین میزان شاخص شانون مربوط به جایگاه A29 جمعیت آذربایجان شرقی و کمترین میزان آن مربوط به جایگاه A113 آذربایجان غربی بود.

با توجه به وجود ۶ آلل در جایگاه A29 جمعیت آذربایجان-شرقی و وجود ۳ آلل در جایگاه A113 آذربایجان‌غربی، وجود بیشترین و کمترین میزان شاخص شانون در جمعیت‌های مذکور منطقی به نظر می رسد.

میانگین شاخص شانون در جمعیت زنجان، بیشتر از سایر جمعیت‌ها بود که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالاتر در این جمعیت است. همچنین میانگین این شاخص در جمعیت آذربایجان غربی کمتر از سایر جمعیت‌ها بود که حاکی از پایین بودن تنوع ژنتیکی این جمعیت است.

همانگونه که ملاحظه می‌شود، نتایج شاخص اطلاعاتی شانون، نتایج حاصل از هتروزایگوسیتی را تایید می‌کند. همچنین با توجه به میانگین شاخص شانون جایگاه‌ها، جایگاه A29 دارای بیشترین میزان شانون است که میتواند بیانگر چندشکلی فراوان این جایگاه باشد.

جدول ۳- فراوانی آللی و اشتباه معیار، تعداد آلل مشاهده شده، تعدادآلل مؤثر، مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و میزان شاخص اطلاعاتی شانون در جایگاه‌های مورد مطالعه و جمعیت‌های زنبور عسل استان‌های شمال‌غرب ایران

جمعیت	پارامتر	جایگاه			
		A29	A24	A28	A113
آذربایجان-شرقی	فراوانی اللی	۰/۳۲	۰/۱۶۸	۰/۲۵۵	۰/۲۴۹
	خطای معیار	±۰/۰۰۰۲	±۰/۰۰۱۹	±۰/۰۰۱۰۷	±۰/۰۰۱۲۱
	تعداد آلل (مشاهده شده)	۶	۳	۵	۵
	تعداد آلل مؤثر	۳/۲۶	۱/۸۶	۲/۹۹	۲/۰۸
	هتروزایگوسیتی مشاهده شده	۰/۰۲۶	۰/۵۷۱	۰/۵۸۸	۰/۱۱۴
	هتروزایگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۹۴	۰/۴۶۴	۰/۶۶۶	۰/۵۲۱
	شاخص اطلاعاتی شانون	۱/۳۹۱	۰/۷۰۳	۱/۲۱۷	۰/۹۹۴
آذربایجانغربی	فراوانی اللی	۰/۳۲۱	۰/۳۶۷	۰/۴۵	۰/۲۵
	خطای معیار	±۰/۰۰۳۲	±۰/۰۰۰۰۳	±۰/۰۰۰۰۱	±۰/۰۰۰۰۹
	تعداد آلل (مشاهده شده)	۶	۳	۲	۳
	تعداد آلل مؤثر	۳/۶۱	۲/۶۴	۱/۹۹	۱/۰۳
	هتروزایگوسیتی مشاهده شده	۰/۳۵۴	۰/۰۲۷	۰/۹۱۳	۰/۰۳۸
	هتروزایگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۲۳	۰/۶۲۱	۰/۴۹۹	۰/۰۳۷
	شاخص اطلاعاتی شانون	۱/۳۹۰	۱/۰۳۴	۰/۶۹۲	۰/۱۰۵
زنجان	فراوانی اللی	۰/۱۹	۰/۳۴۶	۰/۲	۰/۲۲۸
	خطای معیار	±۰/۰۰۱۵	±۰/۰۰۰۲۷	±۰/۰۰۰۱۱	±۰/۰۰۱۰۴
	تعداد آلل (مشاهده شده)	۶	۵	۴	۴
	تعداد آلل مؤثر	۳/۳۲	۳/۰۵	۳/۷۵	۳/۶۴
	هتروزایگوسیتی مشاهده شده	۰/۲۵۰	۰/۲۱۱	۰/۴۳۶	۰/۰۱۳
	هتروزایگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۰۰	۰/۶۷۳	۰/۷۳۳	۰/۷۲۶
	شاخص اطلاعاتی شانون	۱/۳۶۳	۱/۲۶۱	۱/۳۵۵	۱/۳۳۵
کردستان	فراوانی اللی	۰/۲۰۲	۰/۴۹۱	۰/۴۲۱	۰/۳۳
	خطای معیار	±۰/۰۰۲۱	±۰/۰۱۰۰۸	±۰/۰۰۰۱۱	±۰/۰۰۱۲۲
	تعداد آلل (مشاهده شده)	۵	۵	۲	۴

بررسی تعادل هاردی- وینبرگ: با آزمون مربع کای ($P<۰/۰۱$) جایگاه A28 در جمعیت کردستان، جایگاه A113 در جمعیت آذربایجان‌غربی و جایگاه A24 در جمعیت آذربایجان‌شرقی، انحراف معنی‌داری را از تعادل هاردی- وینبرگ نشان ندادند اما بقیه جایگاه‌ها دارای انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی- وینبرگ بودند (جدول ۴). در تحقیقی که توسط اسدی و همکاران (۱۳۸۷) انجام شد، با منظور شدن کلیه جایگاه‌ها در جمعیت شمال‌غرب ایران، جایگاه‌های A107 و A7 در تعادل هاردی- وینبرگ و جایگاه‌های A88، B124، A113 و A35 انحراف معنی‌داری را از این تعادل نشان دادند (۱). در بررسی انجام شده توسط حلفی مسبوبی و همکاران (۱۳۹۱) نیز در خوزستان، به جز جایگاه A107، تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه (A88, AP43, A24, A7 وA113) در عدم تعادل هاردی- وینبرگ بودند. کوچ‌های مختلف کلنی‌ها، اشتراک نقاط مختلف کوچ و تأثیرپذیری از کندوهای موجود در مرز مشترک، دارای نقش بسزایی در امر این انحرافات هستند و از طرفی وجود آلل‌های صفر در جایگاه‌های مذکور نیز می‌تواند در راستای عدم تعادل هاردی- وینبرگ در این جایگاه‌ها تأثیرگذار باشند.

فاصله ژنتیکی: کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های زنجان و آذربایجان شرقی و بیشترین فاصله بین جمعیت‌های زنجان وکردستان مشاهده گردید (جدول ۵). تبادلات کلنی و ملکه، اشتراک نقاط مختلف کوچ و در نتیجه تأثیرپذیری کلنی‌های موجود در مرز مشترک، می‌تواند عامل مهمی در راستای کاهش یا افزایش فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها باشد. به عقیده De La Rua و همکاران (۲۰۰۱) که تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل جزایر قناری را بررسی کردند، مقادیر پایین فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های زنبور عسل به دلیل فعالیت‌های انسانی است که می‌تواند زنبوران عسل را از نظر ژنتیکی شبیه یکدیگر سازد (۸). در جدول ۶ اختلاف دو به دو بین جمعیت‌های زنبور عسل استان‌های شمال‌غرب ایران بر اساس ارزش F_{ST} ارائه شده است.

جدول ۴- بررسی تعادل هاردی- وینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای در جمعیت‌های زنبور عسل استان‌های شمال‌غرب ایران ($P<۰/۰۱$)

معنی داری	احتمال	کای اسکور	جایگاه	جمعیت
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۵۰/۵۰۹	A29	زنجان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۷۹/۴۱۰	A24	زنجان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۰۸/۱۹۵	A28	زنجان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۲۲۱/۲۰۰	A113	زنجان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۶۱/۷۷۱	A29	کردستان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۶۲/۹۵۰	A24	کردستان
تعادل	۰/۴۷۳	۰/۵۱۵	A28	کردستان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۹۶/۴۰۰	A113	کردستان
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۹۷/۵۷۳	A29	آذربایجان غربی
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۳۸/۱۹۰	A24	آذربایجان غربی
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۵۴/۷۹۰	A28	آذربایجان غربی
تعادل	۰/۹۹۹	۰/۰۲۹	A113	آذربایجان غربی
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۳۳۹/۴۸۸	A29	آذربایجان شرقی
تعادل	۰/۱۵۰	۵/۳۱۶	A24	آذربایجان شرقی
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۸۹/۷۹۴	A28	آذربایجان شرقی
عدم تعادل	۰/۰۰۰	۱۸۲/۱۷۱	A113	آذربایجان شرقی

جدول ۵- فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های زنبور عسل استان‌های شمال‌غرب ایران بر اساس معیار استاندارد نی

جمعیت ۱	جمعیت ۲	D_s
کردستان	زنجان	۰/۴۴۵
آذربایجان‌غربی	زنجان	۰/۴۱۳
آذربایجان‌غربی	کردستان	۰/۳۹۵
آذربایجان‌شرقی	زنجان	۰/۲۸۸
آذربایجان‌شرقی	کردستان	۰/۴۰۸
آذربایجان‌شرقی	آذربایجان‌غربی	۰/۴۰۶

جدول ٦- اختلاف دو به دو بین جمعیت‌های زنبور عسل استان‌های شمال‌غرب ایران بر اساس ارزش F_{ST}

	زنجان	کردستان	آذربایجان‌غربی	آذربایجان‌شرقی
کردستان	۰/۱۴۴	۰/۰۰۰		
آذربایجان‌غربی	۰/۱۷۶	۰/۲۳۳	۰/۰۰۰	
آذربایجان‌شرقی	۰/۱۴۰	۰/۲۱۵	۰/۲۱۷	۰/۰۰۰

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و احتمال همسانی (PI): با احتساب میانگین PIC جایگاه‌های مورد مطالعه به ازای کل جمعیت‌ها، بیشترین و کمترین میانگین ارزش PIC در جایگاه‌های A29 (۰/۷۰۱) و A113 (۰/۵۷۰) مشاهده گردید که با توجه به تعداد آلل مؤثر این جایگاه‌ها (جایگاه A29 ۳/۳۴ و جایگاه A113 ۲/۱۸)، این روند منطقی است.

بالا بودن ارزش PIC در جایگاه A29 دلیلی بر چند شکلی زیاد و از طرفی بیانگر کارآمدی بالای آن در تمایز و تفکیک ژنوتیپ-های موجود در جمعیت‌ها می‌باشد. علاوه بر PIC، مقادیر PI جایگاه‌های مورد مطالعه نیز در جدول ۷ ارائه شده است. این معیار میزان احتمالی که یک نشانگر، دو جمعیت را از یکدیگر تفکیک می‌کند را نشان می‌دهد.

جدول۷- مقادیر PIC و PI جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت‌های زنبور عسل استان‌های شمال‌غرب ایران

جمعیت	پارامتر	A113	A28	A24	A29
کردستان	PIC	۰/۴۹۷	۰/۵۶۲	۰/۶۵۹	۰/۶۸۷
	PI	۰/۱۲۵	۰/۱۱۹	۰/۹۱۵	۰/۸۱۳
زنجان	PIC	۰/۷۲۶	۰/۷۳۳	۰/۶۷۳	۰/۷۰۰
	PI	۰/۳۵۸	۰/۵۲۱	۰/۱۶۶	۰/۱۵۸
آذربایجان شرقی	PIC	۰/۵۲۱	۰/۶۶۶	۰/۵۵۱	۰/۶۹۴
	PI	۰/۹۲۷	۰/۳۷۵	۰/۲۱۳	۰/۱۲۵
آذربایجان غربی	PIC	۰/۵۳۸	۰/۴۹۹	۰/۶۲۱	۰/۷۲۳
	PI	۰/۲۸۲	۰/۱۷۲	۰/۳۸۳	۰/۱۳۸

تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و بین جمعیتی: تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ۷۰ درصد و تنوع بین جمعیتی ۳۰ درصد بوده و تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها بطور معنی‌داری از تنوع درون جمعیتی منتج شده است (جدول ۸).

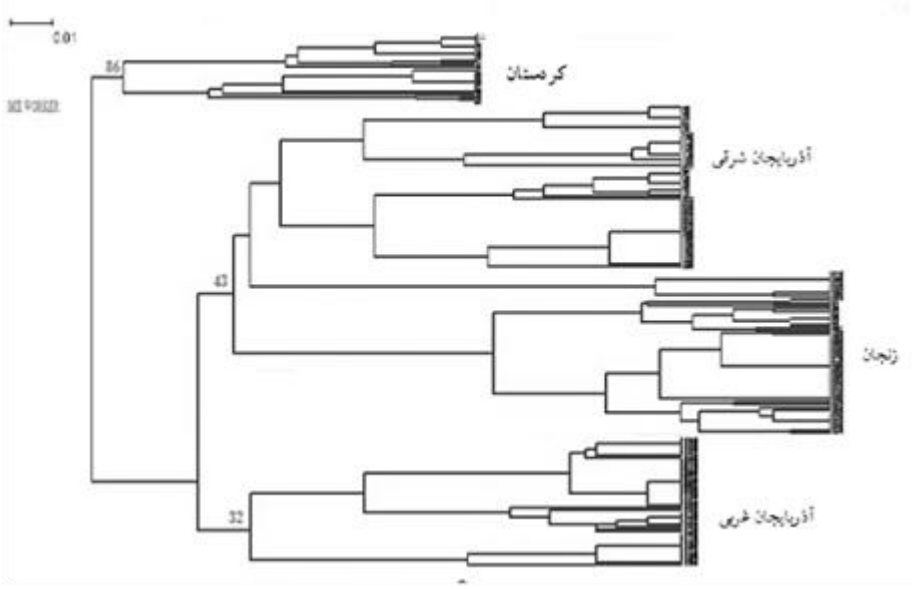
زنبورداری مهاجرتی و کوچ کلنی‌ها و در نتیجه جفتگیری تصادفی ملکه با نرهای کلنی‌های مختلف می‌تواند از عوامل مهم ایجاد تنوع درون جمعیتی زنبوران عسل باشد. از سوی دیگر، به نظر می‌رسد، ممنوعیت واردات ملکه در طول چند دهه اخیر یکی از عوامل مهم کاهش تنوع بین جمعیتی است.

جدول ۸- نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌های زنبور عسل شمال‌غرب ایران

منبع تغییرات	درصد واریانس ملکولی	Est. Var.*	MS**	SS***
بین جمعیت‌ها	٪۳۰	۰/۵۰۱	۸۱/۴۱۰	۲۴۴/۲۳۱
درون جمعیت‌ها	٪۷۰	۱/۱۸۲	۱/۱۸۲	۷۵۱/۷۸۱
کل	٪۱۰۰	۱/۶۸۳		۹۹۶/۰۱۳

*تخمین واریانس (Estimate of Variance) **میانگین مربعات (Mean Square) *** مجموع مربعات (Sum of Squares)

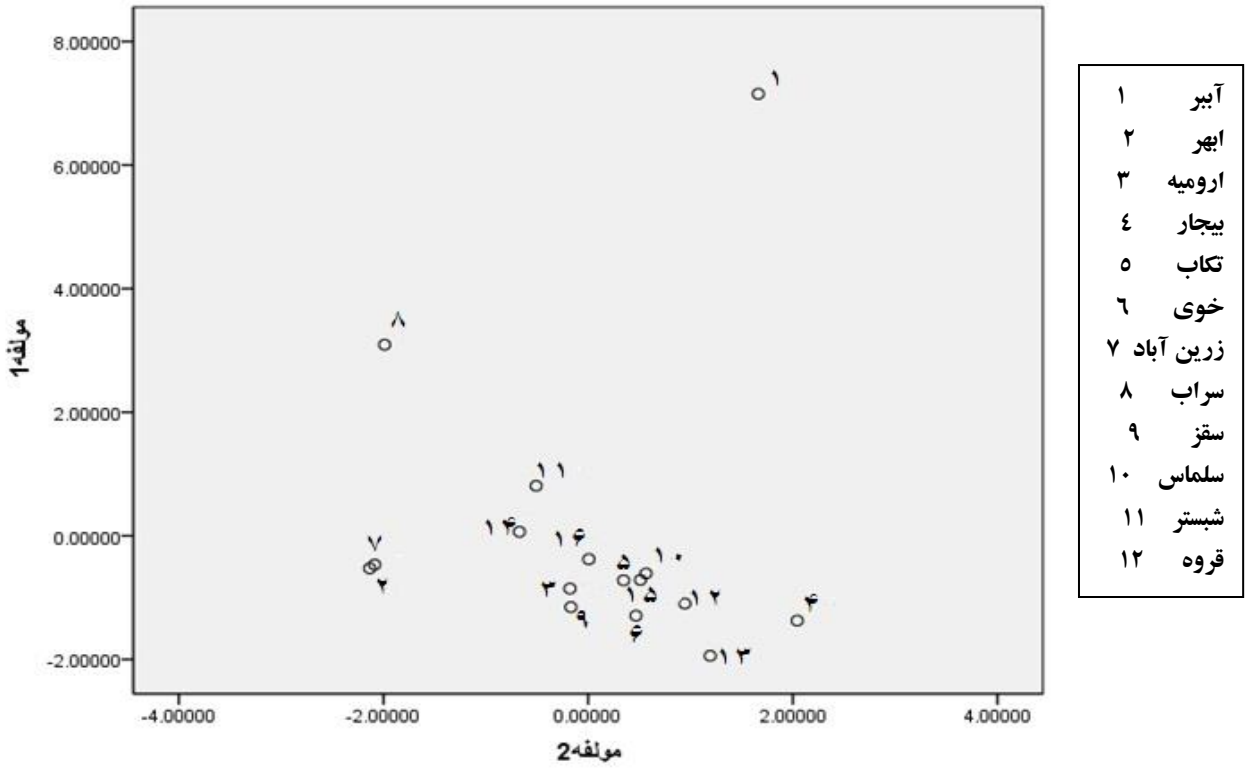
تجزیه خوشه‌ای بر اساس آنالیز ریزماهواره‌ها: تجزیه خوشه‌ای به روش NJ با ۱۰۰۰ بوت استراپینگ، انجام شد و نتایج نشان داد که جمعیت‌های زنبورعسل شمال‌غرب ایران حداقل به سه گروه قابل تفکیک است (شکل۲). چنانچه ملاحظه می‌شود، جمعیت‌های زنجان و آذربایجان شرقی بیشترین قرابت را با یکدیگر دارند که با توجه به فاصله ژنتیکی موجود، منطقی به نظر می‌رسد. در تحقیقی که توسط Moradi and Kandemir (۲۰۰۴) انجام شد، تجزیه خوشه‌ای براساس آنالیزهای آلوزایمی و مرفولوژیکی، شش جمعیت زنبور عسل از مناطقی از زنجان را در گروه‌های مختلفی قرار داد (۱۷). البته، با توجه به متفاوت بودن نشانگرهای مورد استفاده در مطالعات مختلف و متفاوت بودن جایگاه‌های مورد مطالعه و نیز روش‌های خوشه‌بندی (نزدیک‌ترین همسایه، دورترین همسایه، UPGMA و غیره) و تفاوت در اندازه نمونه، مقایسه خوشه‌ها باید با احتیاط صورت گیرد.



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده با روش NJ جهت گروه‌بندی جمعیت‌های زنبور عسل موردمطالعه

بررسی‌های مرفولوژیکی و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی: در بررسی تنوع ژنتیکی، هدف از تجزیه به مولفه‌های اصلی، ترسیم روابط افراد و نمایش آنها در یک ساختار مولفه‌های اصلی است و در واقع به طور عمده برای نمایش پراکنش دوبعدی افراد به کار می‌رود. در این تحقیق، پس از مشخص شدن مؤلفه‌ها، با استفاده از ترکیب‌های مختلف آنها تفاوت‌ها و شباهت‌های جمعیت‌های زنبور عسل مورد مطالعه، روی شکل مشخص شد. با استفاده از مؤلفه‌های اصلی اول و دوم که مجموعاً بیش از ۷۲ درصد تنوع جمعیت‌ها را شامل می‌شد، سعی در تمایز و تفکیک جمعیت‌ها گردید. بیشترین سهم را در مؤلفه اصلی اول، صفات طول خرطوم، طول بال جلو و قد زنبور با ضرائب مثبت و در مؤلفه اصلی دوم، طول پای عقب و شاخص کوبیتال نیز با ضرائب مثبت ایفا کردند. در شکل ۳ ملاحظه می‌شود شهرستان‌هایی که زنبور عسل آنها دارای طول خرطوم و طول بال جلوی بیشتر و قد بلندتری بوده‌اند در قسمت بالای نمودار قرار گرفته‌اند.

همچنین شهرستان‌هایی که زنبور عسل آنها دارای طول پای عقب و شاخص کوبیتال بیشتری بوده‌اند در سمت راست نمودار واقع شده‌اند. بدین ترتیب زنبوران عسل شهرستان های آب‌بر و سراب که در بالای نمودار قرار گرفته‌اند، در مجموع از قد بلندتر و طول خرطوم و طول بال جلوی بیشتری برخوردار بودند و زنبوران عسل شهرستان های بیجار و ماهنشان شاخص کوبیتال بزرگتر و پای عقب طویلتری داشتند.

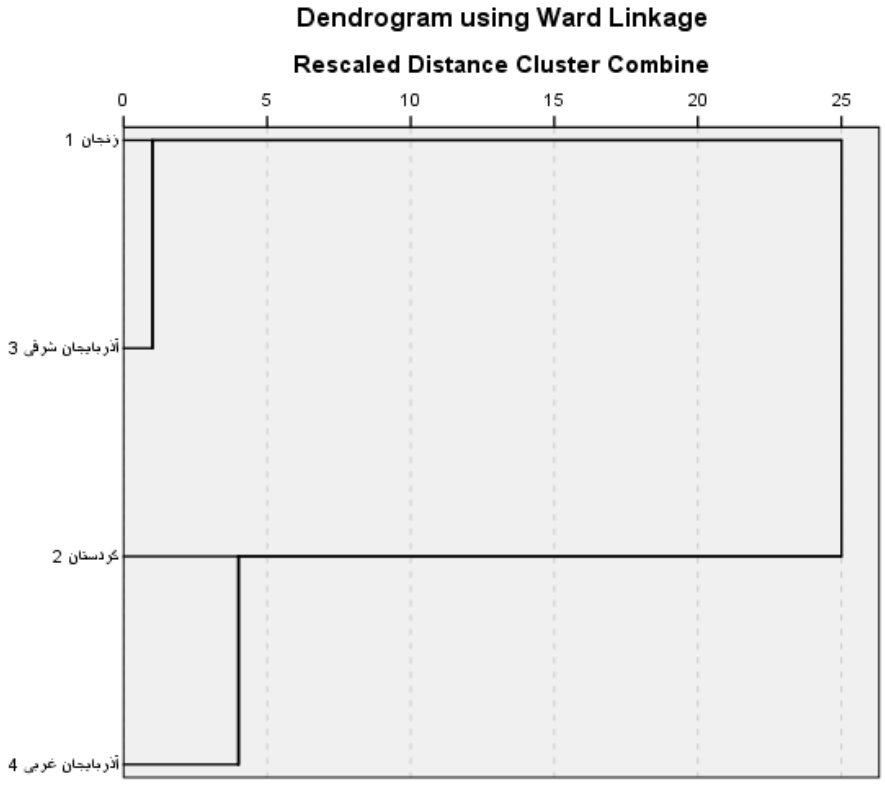


شکل ۳- مقایسه جمعیت‌های زنبور عسل شمال‌غرب ایران با استفاده از مؤلفه‌های اصلی اول و دوم

بر اساس مطالعات طهماسبی (۱۳۷۵) نژاد ایرانی در مناطق مرزی پراکنش خود تحت تأثیر نژادها و توده‌های کشورهای همجوار است (۶). مثلاً در شمال کشور خصوصیات ظاهری زنبوران عسل به نژاد قفقازی نزدیک است. توجه دقیق‌تر به شکل۴ نشان می‌دهد که زنبوران شهرستان‌های آب‌بر و سراب در همسایگی استان‌های شمالی کشور نیز از این قضیه مستثنی نبوده و بدلیل کوچ‌های متعدد زنبورداران به مناطق مذکور و همچنین تبادلات کلنی و ملکه، با زنبوران شمالی تداخل ژنتیکی داشته، لذا زنبوران این دو شهرستان از قد بلندتر و رنگ تیره‌تری برخوردارند.

تجزیه خوشه‌ای داده‌های مرفولوژیکی: تجزیه خوشه‌ای با روش Ward و بر اساس فاصله اقلیدسی انجام شد. تقسیم‌بندی در فاصله ۵ وارد صورت گرفت و جمعیت‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل دو جمعیت زنجان و آذربایجان‌شرقی و گروه دوم شامل کردستان و آذربایجان‌غربی بود (شکل ۴). بر اساس مطالعات Kence و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تنوع ژنتیکی زنبور عسل شمال‌غرب ایران، تجزیه خوشه‌ای داده‌های مرفولوژیکی، تمامی پنج جمعیت مورد مطالعه را در یک گروه قرار داد و فقط یک خوشه تشکیل شد (۱۶) که با مطالعات طهماسبی (۱۳۷۵) مطابقت دارد (۶).

ولی نتایج تحقیق حاضر بیشتر با نتایج Farhoud and Kence (۲۰۰۵) مطابق است که در آن پنج جمعیت مورد مطالعه از شمال و شمال‌غرب ایران به چهار گروه مجزا تفکیک می‌شوند (۱۲).



شکل ٤- دندروگرام ترسیم شده با روش Ward جهت گروه‌بندی جمعیت‌های زنبور عسل شمال‌غرب ایران

نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در جمعیت زنبور عسل شمال‌غرب ایران به ویژه در منطقه زنجان موجود است که می‌توان از این جمعیت به عنوان جمعیت پایه در اجرای طرح‌های اصلاح نژادی استفاده نمود. همچنین با توجه به چندشکلی بالای نشانگرهای مورد مطالعه، این نشانگرها برای مطالعات بعدی از جمله برای نقشه‌یابی صفات کمی (QTL mapping) و استفاده از آنها برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) و سایر مطالعات توصیه می‌شود. همچنین بررسی‌های مرفولوژیکی نشان داد، ضریب لاغری و اندازه بدن در زنبور عسل نژاد ایرانی نسبت به ۱۵ سال گذشته (مطالعات طهماسبی، ۱۳۷۵) کاهش یافته که در جهت حفظ و خلوص نژاد ایرانی بوده است. لذا پیشنهاد می‌شود اولاً بر روی جمعیت مذکور طرح‌های اصلاح نژادی پایه‌ریزی شود، ثانیاً با توجه به این که نژادهای بومی هر کشور از پتانسیل سازشی بسیار بالایی برخوردار هستند، به منظور جلوگیری از اختلاط ژنتیکی و احتمالاً انقراض ترکیب ژنتیکی، بهتر است کماکان از واردات نژادهای بیگانه جلوگیری کرده و از نژاد ایرانی استفاده شود.

منابع مورد استفاده

۱- اسدی، ن. ا.، خدرزاده، ص. و امیری نیا، س. ۱۳۸۷؛ بررسی تعادل هاردی- وینبرگ و چندشکلی در جمعیت‌های زنبور عسل شمال-غرب ایران با استفاده از آنالیز ریزماهواره. مجله دانش و پژوهش علوم دامی. شماره ۲: ۱- ۶.

۲- حسین پور، س.، دولتی، ل. ع.، ملایی، م. و سپهری، ر. ۱۳۹۱؛ بررسی کارآیی چهار روش مختلف استخراج DNA از زنبور عسل. خلاصه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ۲۵ و ۲۶ شهریور ماه ۱۳۹۱. مشهد. دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- حلفی مسبوبی، ز.، روشنفکر، ه. ا.، تقی‌بیگی نصیری، م. و بوجارپور، م. ۱۳۹۱؛ بررسی تنوع ژنتیکی زنبور عسل خوزستان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای. خلاصه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ۲۵ و ۲۶ شهریور ماه ۱۳۹۱. مشهد. دانشگاه فردوسی مشهد.

۴- خدرزاده، ص. ۱۳۸۶؛ بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل غرب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد علوم‌دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی رامین.

۵- دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۹؛ آمارنامه کشاورزی، جلد دوم.

۶- طهماسبی، غ. ح. ۱۳۷۵؛ بررسی مرفولوژیکی و بیوشیمیایی توده های زنبور عسل ایران. پایان نامه دکترای حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی.

7- Bourgeois, L., Sylvester, A., Danka, R. and Rinderer, T., 2008; Comparison of Italian microsatellite DNA diversity among commercial queen breeder stocks honey bees in the United States and Italy. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47: 93-98.

8- De La Rua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A., 2001; Genetic structure and distinctiveness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, 10: 1733–1742.

9- De La Rua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A., 2003; Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genetic Selection Evolution*, 35: 339–350.

10- Doyle, J. J. and Doyle, L. L., 1987; A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry*, 19: 11-15.

11- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, G. M., 1995; Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140: 679-695.

12- Farhoud, H. J. and Kence, M., 2005; Morphometric and mtDNA analysis in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) of north and northwest Iran. Proceedings of the Balkan scientific conference of biology in Plovdiv (Bulgaria) from 19th till 21st of May 2005, 2005, P: 594- 597.

13- Farshineh Adl, M. B., Gencer, H. V., Firatli, C and Bahreini, R., 2007; Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46: 225-231.

14- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M., et al., 2001; Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86: 420-430.

15- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J. M. and Solignac, M., 1998; Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*). II microsatellite loci. *Genetic Selection Evolution*, 30: 49-79.

16- Kandemir, I., Ozkan, A. and Moradi, M., 2004; A scientific note on allozyme variability in Persian honey bees (*Apis mellifera meda*) from the Elburz mountains in Iran. *Apidologie*, 35: 521–522

17- Kence, M., Farhoud, H. J. and Tunca, R. I., 2009; Remove from marked records morphometric and genetic variability of honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from northern Iran. *Journal of Apicultural Research*, 48: 247-255.

18- Moradi, M. and Kandemir, I., 2004; Morphometric and allozyme variability in Persian bee population from the Alburz mountains, *Iran*. *Iranian International* 5: 151-166.

19- Nei, M., 1978; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.

20- Peakall, R. and Smouse, P. E., 2006; GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6: 288-295.

21- Royan, M., Rahimi, G., Esmaeilkhanian, S. and Ansari, Z., 2007; A study on the genetic diversity of the *Apis mellifera meda* population in the south coast of the Caspian Sea using microsatellite markers. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46: 236-241.

22- Ruttner, F., 1988; *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Berlin: Springer-Verlag.

23- Ruttner, F., Pourasghar, D., and Kauhausen, D., 1985; Die Honigbienen Des Iran. *Apis mellifera meda* skorikow, Die Persische Biene. *Apidologie*, 16: 241-264.

24- Saitou, N., and Nei, M., 1987; The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 4: 406-425.

25- SAS/ STAT, CATMOD procedure (SAS version 9.1). SAS Institute Inc., Cary.

26- Segura, J. A. L., 2000; Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costarica. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 317-322.

27- SplitsTree ver 4.10, 2011; Available at: http://www.splitstree.org

28- SPSS (IBM SPSS Statistics) ver 20.0, 2008; SPSS Inc., Chicago, Ill.

29- Ting, J., Ling, Y., Min, L., Wen-bin, B. and Guo-hong, C., 2008; Study on genetic diversity of *Apis cerana* and *Apis mellifera ligustica* in China with microsatellite markers. *Research Journal of Animal Sciences*, 2: 178-182.

30- Wei, S., 2001; Genetic variation and colony development of honey bee (*Apis mellifera*) in Kenya. *Journal of Apicultural Research*, 29: 131-142.