نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۵، زمستان ۱۳۹۳
ص‌ص: ۶۷~۸۰

# بررسی تنوع جایگاه‌های ژنی تعیین کننده صفت اولین سن جستجوگری در کلنی های زنبورعسل نژاد ایرانی (*Apis mellifera meda*) با استفاده از نشانگر AFLP

- **زهرا طهماسبی** (نویسنده مسئول)
کارشناس ارشد مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق.
- **غلامحسین طهماسبی**
استاد، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.
- **رحیم عصفوری ، علیرضا ترنگ**
استادیاران موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشور.
- **محمد بابایی**
مربی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.
- **رامین صیقلانی**
مربی موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشور.
- **سیدمحمد رسولی نژاد موسوی**
کارشناس میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد کرج.
- **پیام پتکی**
کارشناس موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشور.

تاریخ دریافت : خرداد ۹۲ تاریخ پذیرش : بهمن ۹۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۴۶۳۵۹۴۹

Email: Zahra_tahmasbi@yahoo.com

**چکیده**

**زنبورعسل با گرده افشانی در تولیدات کشاورزی و غذای انسان نقش اساسی دارد و بنابراین تحقیقات زیادی از جمله بیشترین تحقیقات اصلاح نژادی در مورد این حشره مفید انجام شده است. پیشرفت های اخیر در ژنتیک مولکولی زنبورعسل، راهی برای استفاده از نشانگرهای مولکولی در انتخاب و بهبود صفات دلخواه در این حشره می باشد. در این مطالعه، دو کلنی زنبورعسل کم تولید با طول عمر کم و پر تولید با طول عمر زیاد از نسل یازدهم طرح جامع اصلاح نژاد زنبور عسل ایران، از نظر اولین سن جستجوگری مورد بررسی قرار گرفته و کارگران با سن جستجوگری مشخص با استفاده از نشانگر ای.اف.ال.پی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در کلنی های پر تولید آغاز جستجوگری از سنین پائین تر و از ۹ روزگی شروع و تا ۳۳ روزگی ادامه داشت. طول دوره جستجوگری نیز در کلنی های پرتولید (۹-۳۳ روزگی) نسبت به کلنی های کم تولید (۱۲تا ۲۹ روزگی)، شامل بازه ی زمانی طولانی تری بود. دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از زنبورهای کارگر، با استفاده از ٤ جفت آغازگر ای.اف.ال.پی، تحت واکنش زنجیره-ایDNA پلیمراز قرار گرفت و محصولات این واکنش‌ها روی ژل پلی‌آکریلامید الکتروفورز شدند. در مجموع، ۲٦ آلل چندشکل مشاهده گردید. بیشترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به جایگاه E3M2-1 در جمعیت کم تولید (۰/٦۹۳) و نیز E3M3-4 در جمعیت پرتولید (۰/٦۹۳) و کمترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به جایگاه E6M3-5 در جمعیت کم تولید (۰/۱٥٦) بود. بیشترین تعداد آلل موثر در بین همه جایگاه های مورد مطالعه متعلق به جایگاه E3M3-4 در جمعیت پر تولید و کمترین آلل موثر مربوط به جایگاهE6M3-5 در جمعیت کم تولید است. دامنه هتروزیگوسیتی برای تمامی جایگاه ها در جمعیت مورد مطالعه بین (۰/۰٥۳) در جایگاه E6M3-5 تا ( ۰/٥) در جایگاه E3M2-1 است. میانگین هتروزیگوسیتی (He) در جمعیت کم تولید (۰/۳۲۱) و در جمعیت پرتولید (۰/۳۲٤) می باشد و میانگین شاخص اطلاعاتی شانون (I) نیز به ترتیب (۰/٤۹۰) و (۰/٤۹۱) محاسبه گردید. واریانس ژنتیکی بین دو جمعیت کم تولید و پر تولید، ۱۰ درصد می باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود عدم شباهت بین دو جمعیت از نظر میزان تولید، تنوع ژنتیکی بین افراد دو گروه زیاد نیست. البته تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق، می تواند ناشی از محدود بودن تعداد کلنی های بررسی شده در این مطالعه باشد.**

**واژه‌های کلیدی:** زنبورعسل ، نشانگر ، تنوع ، جایگاه ژنی ، اولین سن جستجوگری، ایران.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 105 pp: 67-80

**The study of Foraging initiation Trait loci gene Polymorphism in Iranian honey bee(*Apis mellifera meda*) colonies by using AFLP marker**.

By: ZahraTahmasbi[1*], GholamHosein Tahmasbi[2], Rahim Osfoori[3], Alireza Tarang[3] Mohammad Babaei[4], Ramin Saighalani[5], Seyed Mohammad Rassoli Nezhad Mosavi[6],Payam Potki[7]

*1. Former M.Sc. student of Agriculture Biotechnology, Tehran payam- noor University.Tel:+989124635949*
*2. Professor of Animal science research Institute of Iran (AREEO).*
*3. Assistant Professor of Biotechnology research Institute of Iran (AREEO).*
*4. Instructor of Animal science research Institute of Iran (AREEO).*
*5. Instructor of Biotechnology research Institute of Iran (AREEO).*
*6. Production expert of Cinagene pharmaceutical company.*
*7. Researcher of Biotechnology research Institute of Iran (AREEO).*

**Received:June 2013** **Accepted:February 2013**

Honeybee is a pollinator that has prominent role in agriculture products and nourishment for human. So, the most number of studies like genetic improvement were done on honeybee. Recent advances in knowledge of molecular genetics of bee emphasize the potential for using genetic markers to select favored traits. This research was done to determine polymorphism of loci of first foraging age (AFF) trait in Iranian honeybee (*Apis mellifera meda*). Two colonies with high production- long longevity and low production- short longevity were selected from 11th generation of "Iranian Breeding Honeybee Project". In the high production colony, foraging initiation had started sooner (age of 9-33 day).Also, the length of foraging initiation period in comparison with low production colony (age of 12-29 day) was longer. Genetic polymorphism of the loci was assessed by using 4 primer pairs. PCR products were detected using polyacrylamide gel. 26 polymorphic alleles were observed using AFLP markers. Totally, the most amount of Shanon Index is related to E3M2-1 locus in low production population (0.693) and also E3M3-4 position in high production population (0.693). Therefore, these two loci have shown most polymorphism. The least amount of Shanon Index is related to E6M3-5 locus in low production population (0.156). The highest effective allele was belong to E3M3-4 position in high production colony and the lowest was related to E6M3-5 position in low production population. Heterozygosity was diverse between (0.053) in E6M3-5 to (0.05) in E3M2-1. Mean of (He) in low production colony was (0.321) and in high production colony was (0.324).Mean of Shanon Index were (0.490) and (0.491) respectively.
Genetic variance between 2 populations was only ٪10.There was difference in production in the 2 populations but, genetic diversity is not very impressive. Genetic similarity in them may is because of using the small number of samples in this research.
.

**Key words:** Honey bee, Marker, Polymorphism, Loci, Age of first foraging, Iran.

## مقدمه

زنبورعسل با تولید محصولات مختلف و همچنین با دخالت در گرده افشانی گیاهان دگرگشن نقش عمده ای در تامین غذای انسان دارد. اثر گرده افشانی و پتانسیل تولید عسل به اندازه‌ی جمعیت جستجوگر کلنی و همچنین سن آغاز رفتار جستجوگری در زنبورهای عسل کارگر بستگی دارد. اصلاح نژاد زنبورعسل در جهت بهبود تولیدات و نیز کارایی بیشتر کلنی های زنبورعسل، در گرده افشانی و افزایش محصولات کشاورزی موثر می باشد. متغیرهای بسیار زیادی در میزان تولید عسل نقش دارند. از سال های پیش تاکنون، تحقیقات بسیاری در این رابطه صورت گرفته است. صفات ظاهری و بیولوژیکی مانند میزان شربت برداشتی، میانگین طول عمر، رفتار جستجوگری، مساحت سبد گرده، طول خرطوم، عرض وطول پاها و تعدادی صفات دیگر در تحقیقات مختلف، همبستگی هایی با صفت تولید عسل نشان داده اند. تخمین جمعیت جستجوگر کلنی های زنبورعسل با اهداف متفاوتی انجام می گیرد. رفتار جستجوگری در زنبورهای عسل کارگر، موضوع اصلی و مهمی از زندگی اجتماعی آن ها می باشد. اطلاعات مربوط به تعداد کلنی ها و متوسط تولید در نژادهای مختلف دنیا هر ساله توسط فائو در سایت رسمی آن "WWW.FAO.COM" منتشر می شود که بر اساس اطلاعات ارائه شده در این سایت میانگین تولید عسل در کلنی های

زنبورعسل ایران در طی سالهای گذشته از ۱۰ تا ۱۳ کیلوگرم در هر کلنی بوده که نسبت به متوسط تولید عسل در سال دنیا که ۱۷ کیلوگرم در کلنی بوده، کمتر است. از این رو در این تحقیق که بخشی از طرح اصلاح نژاد زنبورعسل ایرانی است، تعیین نقشه های ژنی صفات تولیدی و رفتاری مهم نظیر رفتارهای کاوش و جستجو مرتبط با غلظت شهد جمع آوری شده، مقدار گرده و عسل ذخیره شده در شان ها، طول عمر زنبورهای کارگر، رفتارهای تدافعی و غیره، امکان استفاده از نشانگرهای با پیوستگی مناسب را در برنامه های به نژادی فراهم خواهد نمود. این امر موجب خواهد شد، برنامه های اصلاح نژادی برای صفات کمی، که معمولا مشکل، پرهزینه و زمان بر هستند، آسانتر شده و به جای انجام گزینش ها و تلاقی های غیر مطمئن، با استفاده از انتخاب به کمک نشانگرها، برنامه های اصلاحی به صورت جهت دار دنبال گردد. به این ترتیب ضمن افزایش دقت انتخاب، زمان و هزینه ی کمتری برای برنامه های اصلاح نژادی صرف خواهد شد. امروزه نشانگرهای مولکولی DNA به عنوان ابزاری مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم و تعیین مکان‌های مقاومت به بیماری و تنش‌های محیطی و غیره در حشرات استفاده می‌شود. شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای برنامه‌های اصلاح نژادی هدفمند در آینده و به نتیجه رسیدن در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت تولید بیشتر گردد. یاراحمدی و همکاران (۱۳۸۸) طی۳ سال تحقیقات متوالی دریافتند که بین رفتار چراگری و تولید عسل در مزرعه در ۳ سال متوالی به تفکیک و در مجموع ، همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد ($P\leq0.05$) . صفت رفتارجستجوگری یکی از پیچیده ترین صفات فنوتیپی در سیستم های بیولوژیک بوده که به علت اثرات متنوع و متقابل خارجی و فاکتورهای فردی، سال های متمادی مورد توجه پژوهشگران این رشته قرار گرفته است. صفت جمع آوری غذا توسط کلنی قسمتی مهم و آشکار از رفتارهای قابل ارزیابی زندگی اجتماعی زنبورعسل است، از این رو جمعیت های جستجوگردر مطالعات رفتارشناسی مورد بررسی قرار می گیرد سیلی(۱۹۸۵) مارسین و همکاران (۱۹۹۰)، طهماسبی و همکاران (۱۳۹۰) همبستگی مثبت و معنی داری را بین تولید عسل و رفتار جستجوگری گزارش کردند. یاراحمدی و همکاران (۱۳۷۶)، طی مطالعاتی در تعیین همبستگی فنوتیپی بین تعدادی از صفات ظاهری و بیولوژیکی در توده ی زنبورهای عسل استان تهران، اعلام نمودندکه بین رفتار جستجوگری با میزان تولید عسل همبستگی مثبت و معنی دار دیده می شود. برای افزایش دقت و نیز افزایش تعداد زنبورهای شکار شده می توان گروه نمونه را علامت گذاری نمود. سکیگوچی و ساکاگامی (۱۹۶۶) وجی کاکس (۱۹۷۰) در تخمین تعداد کارگران جستجوگر از این روش بهره بردند. این عمل از میزان خطای ممکن در به دام افتادن زنبورهای جستجوگر با ورود اشتباهی نیز جلوگیری می کند. فعالیت پروازی در ورودی کندو، یک پارامتر معمول است که برای تخمین جمعیت جستجوگری مورد استفاده قرار می گیرد. لوندایی (۱۹۲۵)، بریتن (۱۹۳۳)، گری (۱۹۶۷)، بوریل و دیتز (۱۹۷۳)، اریکسون و همکاران (۱۹۷۳) و اسپانگلر (۱۹۸۴) این پارامتر را برای تخمین جمعیت جستجوگری مورد استفاده قرار دادند. شناسایی و انتخاب بهترین کلنی های زنبورعسل و استفاده از آن ها در تشکیل نسل های بعد و در جهت تولید ملکه هایی که کلنی های حاصل از آن ها دارای خصوصیاتی مانند تولید عسل زیاد، زمستان گذرانی خوب، بچه دهی مناسب، افزایش سریع جمعیت بهاره و مقاومت به آفات و بیماری ها باشد، از جمله اهدافی است که در طرح های اصلاح نژادی دنبال می شود. اصلاح برخی از این صفات ممکن است با استفاده از مهندسی بیوتکنولوژی، با صرف زمان و هزینه کمتری امکان پذیر باشد. راپل و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از ۴۰۰ نشانگر ای.اف.ال.پی در دو کلنی حاصل از تلاقی های برگشتی و استفاده از روش آماری اینتروال مپینگ، همچنین به کارگیری نرم افزارهای تخصصی، ۳ جایگاه ژنی موثر بر صفات جستجوگری مانند غلظت شهد جمع آوری شده و مقدار گرده و شهد بازگردانده شده به کندو را شناسایی کردند. هانت و همکاران (۱۹۹۵)، بااستفاده از نشانگر رپید و روش آماری اینتروال مپینگ، ۲ جایگاه ژنی موثر ( $Pln_1$ و $Pln_2$) را بر مقدار گرده حمل شده توسط جستجوگران را یافتند. پیج و

همکاران (۲۰۰۰) ، یک جایگاه ژنی دیگر($Pln_3$) ، موثر بر رفتارهای جستجوگری ، علاوه بر آنچه هانت گزارش داده بود را با استفاده از جمعیت حاصل از تلاقی های برگشتی و نشانگر رپید ، گزارش نمودند. در این تحقیق تلاش شد با تعیین تنوع نشانگرهای صفت اولین سن جستجوگری، زمینه لازم برای تعیین جایگاه های ژنی اولین سن جستجوگری و بهبود ژنتیکی این صفت فراهم گردد.

## مواد و روش‌ها:

برای تعیین اولین سن جستجوگری در کلنی هایی با بیشترین وکمترین تولید عسل، پس از بررسی کلنی های با تولید عسل زیاد و تولید عسل کم در نسل یازدهم طرح اصلاح نژاد زنبورعسل ایران، نهایتا ۹ کلنی با بیشترین تولید عسل و۳ کلنی با کمترین تولید عسل انتخاب شدند. در تحقیقات زنبورعسل، واحد زنده برای ما کلنی زنبورعسل است که شامل ملکه، تعدادی کارگر و تعدادی نر (در برخی زمان های سال) می باشد نه تک تک کارگران یا ملکه . لذا در ارزیابی طول عمر، زنبورهای کارگر یک کلنی که نتاج ملکه آن کندو می باشند، مورد بررسی قرار می گیرند. لازم به ذکر است، جهت تعیین طول عمر زنبورهای کارگر، بعد از انتخاب کلنی های پرتولید وکم تولید، ۹ کلنی پرتولید و ۳ کلنی کم تولید مذکور، برای ارزیابی طول عمر مورد استفاده قرارگرفتند.

برای ارزیابی نیمه عمر و طول عمر لازم است زنبورهای یک روزه تولید شود. برای تعیین طول عمرزنبورهای کارگرحدود ۱۰۰-۱۵۰ زنبور کارگر یک روزه از هر کندو به داخل قفسهای آزمایشگاهی وقفس ها به داخل انکوباتور(۳۴ درجه سانتیگراد و ۵۰٪ رطوبت) انتقال داده شدند. متوسط طول عمر زنبورهای کارگر عبارت است از مدت زمان طی شده از زمان تولد این زنبورها تا زمانی که نصف جمعیت آن ها تلف شوند. لذا تلفات موجود در قفس ها بطور روزانه شمارش و ثبت شد تا متوسط طول عمر زنبورهای کارگر محاسبه گردد. در نهایت یک کلنی با بیشترین تولید عسل و بالاترین طول عمر و نیز یک کلنی با کمترین تولید عسل و پایین ترین طول عمر، انتخاب و اولین سن جستجوگری در کلنی های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. پس از انتخاب کلنی با بیشترین و همچنین کلنی با کمترین تولید عسل، ملکه ی هرکدام از کلنی های مذکور توسط محبوس کننده قابی روی یک پوکه به رنگ قهوه ای قرار داده شد.

تخم ریزی ملکه در روی قاب های قهوه ای رنگ در کلنی کنترل شده و پس از اطمینان از تخم ریزی کافی ملکه در روی پوکه قهوه ای، تاریخ تخم ریزی روی پوکه های مذکور ثبت شد.

در روز بیستم پس از تخم ریزی و قبل از تولد شفیره های حاصل از تخم ریزی ملکه ها، قابهای مذکور در داخل محبوس کننده ی قابی پوشیده شده با توری ریز قرار داده شدند. در روز بیست ویکم پس از تخم ریزی، زنبورهای کارگر متولد شده داخل محبوس کننده، که همگی زنبورهای کارگر یک روزه بودند، شماره گذاری شدند(شکل ۱).

**شکل ۱: زنبورهای کارگر یک روزه شماره‌گذاری شده مورد استفاده برای ارزیابی اولین سن جستجوگری**

از هر کندو ۹۹ زنبور کارگر یکروزه با شماره‌های مخصوص ملکه که در پشت قفسه سینه آنها نصب می شد، شماره گذاری شده و به یک کندوی غیرمرتبط معرفی شدند. در بروز صفت اولین سن جستجوگری در کارگران تحت بررسی، ژنوتیپ و عوامل محیطی، هر دو دخیل می باشند. در این تحقیق و تحقیقات مشابه، راپل و همکاران (۲۰۰۴) و راپل (۲۰۰۹) دو کلنی غیرمرتبط با شرایط کاملا یکسان از نظر جمعیت، ذخیره عسل و گرده و جمعیت نوزادان، به تاریکخانه منتقل می شوند و کارگران یکروزه کلنی

های پرتولید و کم تولید به آنها معرفی می شوند. در واقع تلاش می شود شرایط محیطی و مدیریتی مذکور حتی المقدور یکسان سازی شده و سپس رفتار جستجوگری کارگران مذکور ارزیابی گردد، تا ژنوتیپ آنها دقیق تر مورد بررسی قرار گیرد. به عبارت دیگر تلاش شد، تاثیر عوامل تاثیرگذار دیگر مانند محیط به حداقل رسانده شده و اثر عامل موردنظر مورد بررسی قرار گیرد. از روز پنجم بعد از معرفی، بررسی رفت وآمد و رفتار جستجوگری زنبورهای شماره گذاری شده از طریق راهروهای شیشه ای جلوی هر کندو شروع شد. در تاریکخانه، کندو از طریق یک راهروی شیشه ای با محیط خارج درارتباط بود و زنبورهای کارگر از طریق این راهروی شیشه ای به محیط خارج راه می یافتند. دراین وضعیت، امکان مشاهده و بررسی زنبورهای در حال رفت وآمد وجود داشت. از روز پنجم معرفی زنبورهای شماره دار، راهروهای شیشه ای هر روز به مدت ۹۰ دقیقه تحت نظرقرار گرفتند. بررسی رفت وآمد زنبورهای شماره دار با تاریک کردن داخل اتاق و استفاده از لامپ قرمز انجام گرفت تا رفتار زنبورها درراهروی شیشه ای تحت تاثیر قرار نگیرد.

بررسی رفتاری کارگران شماره گذاری شده تا روز سی و پنجم پس از معرفی ادامه یافت. خروج و پرواز زنبورهای شماره دار در هر کندو به دقت در مدت مذکور مورد مطالعه قرار گرفت و رفت وآمد زنبورهای شماره دار ثبت گردید(شکل ۲). پروازهای کوتاه چند دقیقه ای (یک تا پنج دقیقه‌ای) زنبورهای کارگر به عنوان پرواز شناسایی تلقی گردید و پروازهای طولانی تراز ۱۵ دقیقه زنبورهای کارگر به عنوان پرواز جستجوگری در نظر گرفته شد. خروج زنبورهای شماره دارتوسط شخص مستقر در تاریکخانه به همکار مستقر درجلوی دریچه ی پرواز کندو اطلاع داده می شد تا زنبور مدنظر در جلوی دریچه ی پرواز بازیابی شود. با استفاده از شبکه ملکه که ورود و خروج زنبورها را کندتر می کرد، شکار و بازیابی مجدد زنبورهای شماره دار مورد نظر فراهم می شد. زنبورهای شماره دار مورد نظر توسط پنس شکار و داخل قفس ملکه قرار داده شده و قفس بلافاصله به فریزر منتقل می شد. این کار تا روز سی و پنجم ادامه یافت تا تمام زنبورهای شماره دار فرصت انجام پرواز جستجوگری را داشته باشند. تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده از مطالعات رفتارشناسی و تحلیل سری زمانی آنها با روش میانگین متحرک ۵ روزه و توسط نرم افزار اکسل انجام شد. استفاده از میانگین متحرک برای تطبیق بیشتر آمار طرح با شرایط حاکم بر طبیعت بود که در تحقیقات دیگر هم مورد استفاده قرار گرفته است.

**شکل۲: زنبورهای جستجوگرشماره دار درجلوی دریچه پرواز کندوها که برای انجام آزمایشات ژنتیکی بازیابی می شدند.**

برای استخراج دی.ان.ای، از کل بدن زنبور استفاده شد. استخراج دی.ان.ای با روش بهینه اشباع نمکی انجام شد.

**مراحل AFLP ( تفاوت طول قطعه های حاصل از تکثیر)**

این روش دارای سه مرحله‌ی مجزا است :

**۱- هضم دی.ان.ای ژنومی :** برای هضم دی.ان.ای ژنومی از دو نوع آنزیم برشیEcoR I و Mse I استفاده شد. برای اینکه آنزیم های فوق بیشترین فعالیت خود را داشته باشند از بافرتانگو نیز بهره برده شد. تمام مواد مورد نیاز را در میکروتیوب ها ریخته و میکروتیوب ها در دستگاه حمام خشک قرار داده شدند تا درجه حرارت مناسب برای شروع فعالیت هر آنزیم تامین گردد. دستگاه ۱/۵ ساعت روی ۳۷ درجه برای فعالیت بهینه آنزیم EcoRI و ۱/۵ ساعت روی ۶۵ درجه جهت عملکرد بهینه آنزیم MseI تنظیم شد. سپس نمونه ها را از دستگاه خارج کرده و ۱۰ میکرولیتر روی ژل آگارز برده، تا نمونه ها بعد از انجام هضم

آنزیمی کنترل شوند. در این مرحله به علت هضم آنزیمی صورت گرفته روی دی.ان.ای، به جای یک باند شارپ و متراکم، یک لکه که نشان دهنده وجود قطعات فراوان با طول های متفاوت است مشاهده خواهد شد.

**۲- اتصال سازگارسازهای دو رشته ای به انتهای قطعه های چسبنده :** پس از برش دی.ان.ای توسط آنزیم های محدودگر، سازگارسازهای الیگونوکلئوتیدی دو رشته ای به هر دو انتهای قطعه های برشی چسبنده اضافه می شود و جایگاه اتصال آغازگر برای تکثیر پی.سی.آر مهیا می گردد (جدول ۱).

**۳-تکثیر پیش از مرحله انتخاب :** ردیف های سازگارسازها و جایگاه های برشی به عنوان جایگاه های اتصال آغازگر برای تکثیر پی.سی.آر پیش از مرحله انتخاب است.

محصولات اولیه‌ی پی.سی.آر پیش از مرحله ی انتخاب، قطعه هایی هستند که در یک انتها با آنزیم ۴ بازبر و در انتهای دیگر با آنزیم ۶ بازبر برش داده شده اند. در حقیقت در این مرحله الگوهای دی.ان.ای مناسب برای مرحله ی تکثیر انتخابی فراهم می گردد.

**٤- تکثیر انتخابی:** در این مرحله از آغازگرهایی که دارای دو نوکلئوتید انتخابی در انتهای ´۳ هستند، برای تکثیر قطعه های الگو استفاده می شود. از نوکلئوتیدهای انتخابی در انتهای ´۳ آغازگرها برای کاهش بیشتر قطعه های تکثیر شونده استفاده می گردد، زیرا تکثیر فقط برای قطعه هایی انجام می گیرد که ۲ نوکلئوتید مجاور جایگاه برشی آنها دقیقا با نوکلئوتیدهای انتخابی آغازگر هماهنگ باشند.

**جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر**

| توالی آغازگر | نام آغازگر |
|---|---|
| 5´- AGA CTG CGT ACC AAT TC -3´ | E |
| 5´- GAT GAG TCC TGA GTA AC -3´ | M |
| 5´-AGA CTG CGT ACC AAT TCA C -3´ | E2 |
| 5´- AGA CTG CGT ACC AAT TCA G - 3´ | E3 |
| 5´- AGA CTG CGT ACC AAT TCC G -3´ | E6 |
| 5´- GAT GAG TCC TGA GTA ACA C -3´ | M2 |
| 5´- GAT GAG TCC TGA GTA ACA G -3´ | M3 |
| 5´- GAT GAG TCC TGA GTA ACA T -3´ | M4 |

**الکتروفورز فرآورده های PCR :**

به منظور آشکار کردن باندهای دی.ان.ای، نمونه ها باید روی ژل الکتروفورز تزریق شوند. برای مشخص کردن باند ها روی ژل اکریل آمید، از رنگ آمیزی نقره استفاده شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از مطالعات مولکولی و تعیین تنوع ژنتیکی پس از امتیازدهی باندها با استفاده از نرم افزار جین آلکس( Gene Alex ) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

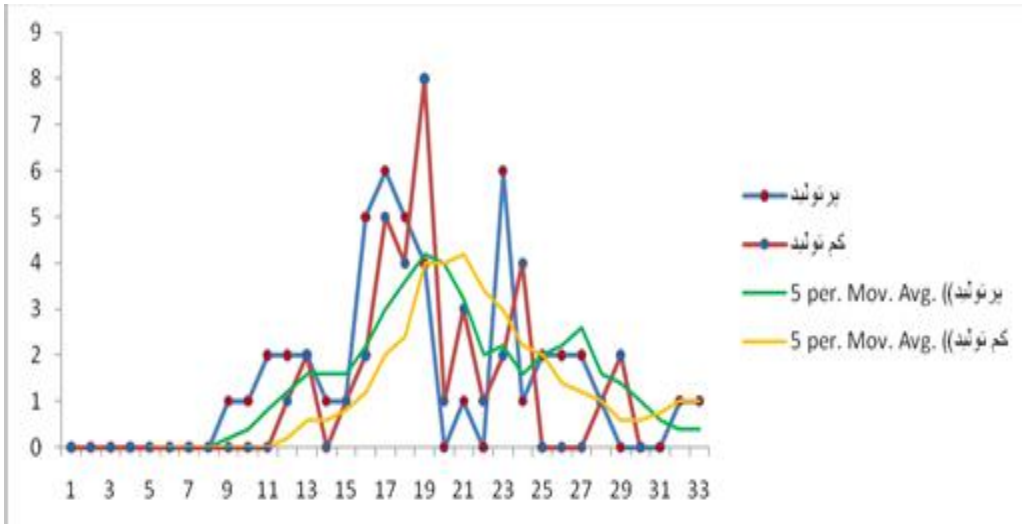
**نتایج:**

همان طور که در شکل۳ مشاهده می شود، در کلنی های پر تولید،

آغاز جستجوگری از سنین پائین تری صورت گرفته و طول دوره جستجوگری نیز نسبت به کلنی های کم تولید، شامل بازه زمانی طولانی تری می باشد.

تعدادی از افراد کلنی پر تولید در ۹ روزگی فعالیت جستجوگری خود را آغاز نموده و بقیه افراد تا ۳۳ روزگی هر کدام در تاریخ معینی شروع به فعالیت جستجوگری نمودند.

در حالیکه در کلنی های کم تولید، آغاز فعالیت جستجوگری توسط تعدادی از افراد کلنی از ۱۲ روزگی صورت گرفت و این روند تا ۲۹ روزگی ادامه داشت به این معنی که هر کدام از افراد در این بازه ی زمانی فعالیت جستجوگری خود را آغاز نمودند. راپل و همکاران (۲۰۰۴)، نیز در مطالعات خود نتایج مشابهی را اعلام کرده بودند.




**شکل ۳: میانگین متحرک اولین سن جستجوگری در کلنی های پرتولید و کم تولید**

اگر نمودار اولین سن جستجوگری با استفاده از روش میانگین متحرک (منحنی های سبز و زرد) در چهارمقطع زمانی مقایسه شوند، درمقاطع زمانی اول و دوم سطح زیرمنحنی یا تعداد زنبوران کارگر با اولین سن جستجوگری در کلنی های پرتولید بیشتر از کلنی های کم تولید میباشد. در مقطع زمانی سوم تعداد زنبوران با اولین سن جستجوگری در کلنی های کم تولید بیشتر از کلنی های پرتولید می باشد.

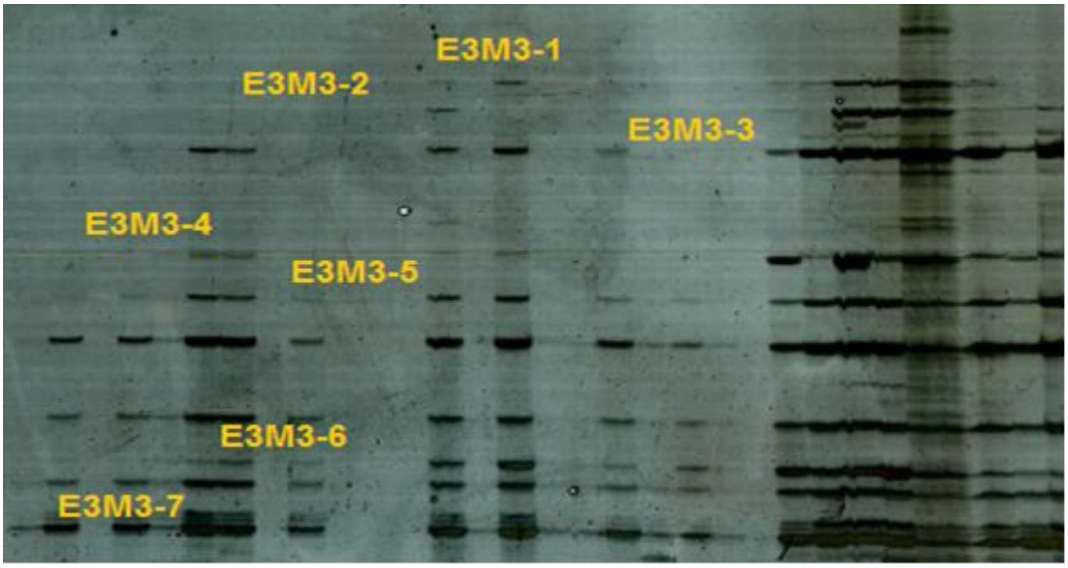
به علاوه، همانطور که درشکل ۳ مشاهده میشود، پیک آغاز جستجوگری (ثلث بالایی نمودارهای معمولی در دو کلنی) نیز در کلنی های پر تولید زودتر بوده و طولانی تر از کلنی های کم تولید می باشد. به این ترتیب که در کلنی پر تولید، دوره ی پیک رفتار جستجوگری از ۱۶ روزگی (۱۰/۶٪) آغاز و تا ۲۳ روزگی (۱۲/۲۷٪) ادامه داشت در حالیکه دوره ی پیک جستجوگری در کلنی های کم تولید از۱۷ روزگی (۱۳/۵۰٪) آغاز و در ۲۱ روزگی (۸/۱٪) خاتمه یافت. بنابراین طول پیک فعالیت جستجوگری در کلنی پر تولید، ۸ روز و در کلنی کم تولید، ۵ روز می باشد که نشان دهنده طولانی تر بودن بازه زمانی اوج جستجوگری در کلنی های پرتولید می باشد. طولانی بودن پیک جستجوگری سبب افزایش جستجوگران در کلنی می گردد و در نتیجه سبب افزایش تولید می شود. نتایج تحقیقات یاراحمدی و همکارن (۱۳۸۸) و نیز طهماسبی و همکاران (۲۰۱۲) که نشان دهنده افزایش تولید عسل در کلنی های با جستجوگری بیشترمی باشد ، نتایج این تحقیق را تایید می نماید.

شروع جستجوگری زنبوران کارگر به طور مطلق، در مقاطع زمانی اولیه یا ده روز اول ونیز در پیک جستجوگری در کلنی های پرتولید زودتر می باشد. درمطالعات راپل و همکاران (۲۰۰۴) نیز شروع جستجوگری در کلنی های پرتولید زودتر از کلنی های کم تولید بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در این مطالعه

میانگین سن آغاز جستجوگری در کلنی پر تولید حدود ۱۹/۱۴روزگی و در کلنی های کم تولید حدود ۱۹/۶۵ روزگی می باشد.

نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات راپل (۲۰۰۹) و طهماسبی و همکاران (۱۳۹۱) مطابقت دارد. این محققان میانگین سن آغاز جستجوگری را برای جمعیت پرتولید(۱۶/۱)، کمترازجمعیت کم تولید(۲۶/۷) بدست آورده بودند.

تفاوت مولکولی بین دو جمعیت کم تولید و پر تولید، ۱۰ درصد می باشد این در حالی است که تفاوت مولکولی بین افراد یک جمعیت تا ۹۰ درصد می باشد. استفاده از ۴ جفت آغازگر به عنوان ابزار ارزیابی تنوع ژنتیکی بر روی ۸۴ نمونه ی جمع آوری شده از کندوهای طرح جامع اصلاح نژاد زنبورعسل ایران صورت گرفت. از ۴جفت آغازگر آزمایش شده، هر ۴ جفت با موفقیت درجمعیت مورد بررسی، تکثیر شده و قابل امتیازدهی بودند.




**شکل ٤: باندهای حاصل از تکثیر با جفت پرایمر E3M3 روی ژل اکریلامید**

اطلاعات حاصل از امتیازدهی باندها با استفاده از نرم افزار جین آلکس( Gene Alex ) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت وجدول (۲) به دست آمد.

**جدول ۲: اطلاعات حاصل از تجزیه امتیازها توسط نرم افزار جین آلکس**

| Pop | Locus | Band Freq. | p | q | N | Na | Ne | I | He | Hue |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pop1 | E3M3-1 | 0.216 | 0.115 | 0.885 | 37.000 | 2.000 | 1.255 | 0.356 | 0.203 | 0.206 |
| | E3M3-2 | 0.162 | 0.085 | 0.915 | 37.000 | 2.000 | 1.183 | 0.290 | 0.155 | 0.157 |
| | E3M3-3 | 0.432 | 0.247 | 0.753 | 37.000 | 2.000 | 1.591 | 0.559 | 0.372 | 0.377 |
| | E3M3-4 | 0.730 | 0.480 | 0.520 | 37.000 | 2.000 | 1.997 | 0.692 | 0.499 | 0.506 |
| | E3M3-5 | 0.162 | 0.085 | 0.915 | 37.000 | 2.000 | 1.183 | 0.290 | 0.155 | 0.157 |
| | E3M3-6 | 0.243 | 0.130 | 0.870 | 37.000 | 2.000 | 1.293 | 0.387 | 0.226 | 0.229 |
| | E3M3-7 | 0.324 | 0.178 | 0.822 | 37.000 | 2.000 | 1.414 | 0.468 | 0.293 | 0.297 |
| | E3M4-1 | 0.844 | 0.605 | 0.395 | 32.000 | 2.000 | 1.916 | 0.671 | 0.478 | 0.486 |
| | E3M4-2 | 0.094 | 0.048 | 0.952 | 32.000 | 2.000 | 1.101 | 0.193 | 0.091 | 0.093 |
| | E3M4-3 | 0.344 | 0.190 | 0.810 | 32.000 | 2.000 | 1.444 | 0.486 | 0.308 | 0.313 |

| Pop | Locus | Band Freq. | p | q | N | Na | Ne | I | He | Hue |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | E3M4-4 | 0.313 | 0.171 | 0.829 | 32.000 | 2.000 | 1.395 | 0.457 | 0.283 | 0.288 |
| | E3M4-5 | 0.700 | 0.452 | 0.548 | 30.000 | 2.000 | 1.982 | 0.689 | 0.495 | 0.504 |
| | E3M4-6 | 0.433 | 0.247 | 0.753 | 30.000 | 2.000 | 1.593 | 0.559 | 0.372 | 0.379 |
| | E3M4-7 | 0.200 | 0.106 | 0.894 | 30.000 | 2.000 | 1.233 | 0.337 | 0.189 | 0.192 |
| | E6M3-1 | 0.324 | 0.178 | 0.822 | 37.000 | 2.000 | 1.414 | 0.468 | 0.293 | 0.297 |
| | E6M3-2 | 0.324 | 0.178 | 0.822 | 37.000 | 2.000 | 1.414 | 0.468 | 0.293 | 0.297 |
| | E6M3-3 | 0.973 | 0.836 | 0.164 | 37.000 | 2.000 | 1.379 | 0.447 | 0.275 | 0.279 |
| | E6M3-4 | 0.243 | 0.130 | 0.870 | 37.000 | 2.000 | 1.293 | 0.387 | 0.226 | 0.229 |
| | E6M3-5 | 0.054 | 0.027 | 0.973 | 37.000 | 2.000 | 1.056 | 0.126 | 0.053 | 0.054 |
| | E6M3-6 | 0.486 | 0.283 | 0.717 | 37.000 | 2.000 | 1.684 | 0.596 | 0.406 | 0.412 |
| | E3M2-1 | 0.735 | 0.486 | 0.514 | 34.000 | 2.000 | 1.998 | 0.693 | 0.500 | 0.507 |
| | E3M2-2 | 0.618 | 0.382 | 0.618 | 34.000 | 2.000 | 1.894 | 0.665 | 0.472 | 0.479 |
| | E3M2-3 | 0.794 | 0.546 | 0.454 | 34.000 | 2.000 | 1.983 | 0.689 | 0.496 | 0.503 |
| | E3M2-4 | 0.265 | 0.143 | 0.857 | 34.000 | 2.000 | 1.323 | 0.409 | 0.244 | 0.248 |
| | E3M2-5 | 0.794 | 0.546 | 0.454 | 34.000 | 2.000 | 1.983 | 0.689 | 0.496 | 0.503 |
| | E3M2-6 | 0.618 | 0.382 | 0.618 | 34.000 | 2.000 | 1.894 | 0.665 | 0.472 | 0.479 |
| Pop2 | E3M3-1 | 0.452 | 0.260 | 0.740 | 42.000 | 2.000 | 1.625 | 0.573 | 0.385 | 0.389 |
| | E3M3-2 | 0.262 | 0.141 | 0.859 | 42.000 | 2.000 | 1.319 | 0.407 | 0.242 | 0.245 |
| | E3M3-3 | 0.524 | 0.310 | 0.690 | 42.000 | 2.000 | 1.747 | 0.619 | 0.428 | 0.433 |
| | E3M3-4 | 0.738 | 0.488 | 0.512 | 42.000 | 2.000 | 1.999 | 0.693 | 0.500 | 0.506 |
| | E3M3-5 | 0.071 | 0.036 | 0.964 | 42.000 | 2.000 | 1.075 | 0.156 | 0.070 | 0.071 |
| | E3M3-6 | 0.381 | 0.213 | 0.787 | 42.000 | 2.000 | 1.505 | 0.518 | 0.335 | 0.340 |
| | E3M3-7 | 0.214 | 0.114 | 0.886 | 42.000 | 2.000 | 1.252 | 0.354 | 0.201 | 0.204 |
| | E3M4-1 | 0.952 | 0.782 | 0.218 | 42.000 | 2.000 | 1.518 | 0.525 | 0.341 | 0.345 |
| | E3M4-2 | 0.595 | 0.364 | 0.636 | 42.000 | 2.000 | 1.862 | 0.656 | 0.463 | 0.468 |
| | E3M4-3 | 0.619 | 0.383 | 0.617 | 42.000 | 2.000 | 1.896 | 0.665 | 0.473 | 0.478 |
| | E3M4-4 | 0.524 | 0.310 | 0.690 | 42.000 | 2.000 | 1.747 | 0.619 | 0.428 | 0.433 |
| | E3M4-5 | 0.690 | 0.444 | 0.556 | 42.000 | 2.000 | 1.975 | 0.687 | 0.494 | 0.500 |
| | E3M4-6 | 0.286 | 0.155 | 0.845 | 42.000 | 2.000 | 1.355 | 0.431 | 0.262 | 0.265 |
| | E3M4-7 | 0.143 | 0.074 | 0.926 | 42.000 | 2.000 | 1.159 | 0.264 | 0.137 | 0.139 |
| | E6M3-1 | 0.778 | 0.529 | 0.471 | 45.000 | 2.000 | 1.993 | 0.692 | 0.498 | 0.504 |
| | E6M3-2 | 0.089 | 0.045 | 0.955 | 45.000 | 2.000 | 1.095 | 0.185 | 0.087 | 0.088 |
| | E6M3-3 | 0.222 | 0.118 | 0.882 | 45.000 | 2.000 | 1.263 | 0.363 | 0.208 | 0.211 |
| | E6M3-4 | 0.400 | 0.225 | 0.775 | 45.000 | 2.000 | 1.537 | 0.534 | 0.349 | 0.353 |
| | E6M3-5 | 0.156 | 0.081 | 0.919 | 45.000 | 2.000 | 1.175 | 0.281 | 0.149 | 0.151 |
| | E6M3-6 | 0.178 | 0.093 | 0.907 | 45.000 | 2.000 | 1.203 | 0.310 | 0.169 | 0.171 |
| | E3M2-1 | 0.682 | 0.436 | 0.564 | 44.000 | 2.000 | 1.968 | 0.685 | 0.492 | 0.497 |
| | E3M2-2 | 0.182 | 0.095 | 0.905 | 44.000 | 2.000 | 1.209 | 0.315 | 0.173 | 0.175 |
| | E3M2-3 | 0.727 | 0.478 | 0.522 | 44.000 | 2.000 | 1.996 | 0.692 | 0.499 | 0.505 |
| | E3M2-4 | 0.114 | 0.059 | 0.941 | 44.000 | 2.000 | 1.124 | 0.223 | 0.110 | 0.111 |
| | E3M2-5 | 0.886 | 0.663 | 0.337 | 44.000 | 2.000 | 1.808 | 0.639 | 0.447 | 0.452 |
| | E3M2-6 | 0.636 | 0.397 | 0.603 | 44.000 | 2.000 | 1.919 | 0.672 | 0.479 | 0.484 |

Na = تعداد آلل های مختلف

Ne = تعداد آلل های موثر = 1 / (p^2 + q^2)

I = شاخص شانون = -1* (p * Lon (p) + q * Lon(q))

He = هتروزیگوزیگوسیتی مورد انتظار = 2 * p * q

Hue = هتروزیگوسیتی مورد انتظار بدون خطا = (2N / (2N-1)) * He

تعادل هاردی- وینبرگ, q = (1 - Band Freq.)^0.5 and p = 1 - q.

Band Frequency= فراوانی باندها

**جدول ۳: میانگین و انحراف معیار هتروزیگوسیتی و شاخص اطلاعاتی شانون در دو کلنی**

| Population | Pop1 | Pop2 |
|---|---|---|
| No. Bands | 26 | 26 |
| Mean He | 0.321 | 0.324 |
| SE of Mean He | 0.027 | 0.030 |
| Mean I | 0.490 | 0.491 |
| SE of Mean I | 0.033 | 0.036 |

همانطور که در جدول۳ مشاهده می شود، میانگین هتروزیگوسیتی (He) در جمعیت کم تولید (۰/۳۲۱) و در جمعیت پرتولید (۰/۳۲۴) می باشد . میانگین شاخص اطلاعاتی شانون (I) نیز به ترتیب (۰/۴۹۰) و (۰/۴۹۱) محاسبه گردید.

## بحث

یکی از رایج‌ترین دستاوردهای نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع آللی، هتروزیگوسیتی می‌باشد. مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده در جایگاه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

با توجه به جدول ۱ بیشترین هتروزیگوسیتی مربوط به جایگاه E3M2-1 درجمعیت کم تولید (۰/۵) وجایگاه E3M3-4 (۰/۵) در جمعیت پر تولید است وکمترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به جایگاه E6M3-5 در جمعیت کم تولید (۰/۵۳) می باشد. نتایج حاکی از آن است که در جایگاه‌های با تعداد آلل موثر بیشتر، میزان هتروزیگوسیتی بیشتری دیده می‌شود. رویان (۱۳۸۳) در جمعیت‌های شمال ایران میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را (۰/۲۵۴ تا ۰/۳۲۸) تا (۰/۲۲۹ ± ۰/۵۱۹) گزارش کردند و و عنوان کردند که جمعیت‌های شمال ایران دارای تنوع ژنتیکی پایینی می‌باشند.

موسوی (۱۳۸۹) در جمعیت‌های شمال ایران میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۱۶۴ تا ۰/۲۴۳ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را (۰/۷۸۶ تا ۰/۷۹۹) گزارش و بیان کرد که جمعیت‌های شمال ایران دارای سطح پایینی از تنوع ژنتیکی می‌باشند.

بیشترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به جایگاه E3M2-1 در جمعیت کم تولید(۰/۶۹۳) و نیزE3M3-4 در جمعیت پرتولید(۰/۶۹۳) بوده وکمترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به جایگاه E6M3-5 در جمعیت کم تولید (۰/۱۵۶) می باشد. بیشترین تعداد آلل موثر در بین همه جایگاه های مورد مطالعه متعلق به جایگاه E3M 3-4 در جمعیت پر تولید و کمترین آلل موثر مربوط به جایگاه E6M3-5 در جمعیت کم تولید است.

در استفاده از پرایمر E3M2 در جمعیت کم تولید، میانگین

هتروزیگوسیتی برابر ۰/۴۴۶ ومیانگین شاخص شانون ۰/۶۳۵می باشد در حالیکه در جمعیت پر تولید، میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۳۶۶ و میانگین شاخص شانون ۰/۵۳۷ می باشد. بنابراین میزان چند شکلی در جمعیت کم تولید بیشتر می باشد.

در استفاده از پرایمر در جمعیت کم تولید، میانگین هتروزیگوسیتی ها در جایگاه های مختلف برابر ۰/۲۷۱ ومیانگین شاخص شانون ۰/۴۳۴بوده، درحالیکه در جمعیت پر تولید، میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۳۰۸ و میانگین شاخص شانون ۰/۴۷۴می باشد. بنابراین میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت پر تولید بیشتر بوده است.

در استفاده از پرایمر E3M4 در جمعیت کم تولید، میانگین هتروزیگوسیتی در جایگاه های مختلف برابر ۰/۳۱۶ ومیانگین شاخص شانون ۰/۴۸۴ بوده و در جمعیت پر تولید، میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۳۷۱و میانگین شاخص شانون ۰/۵۴۹ می باشد. با استناد به اطلاعات ذکر شده، میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت پر تولید بیشتر میباشد.

درجمعیت اول (کم تولید) در استفاده از جفت پرایمر E3M3، درجایگاه E3M3- 4 (شکل ۴)، بالاترین شاخص شانون (۰/۶۹۲) و بیشترین میزان هتروزیگوسیتی (۰/۴۹) دیده شد و درجایگاه های E3M3 -2 و همچنین E3M3 -5 کمترین میزان شاخص شانون (۰/۲۹) و در نتیجه کم ترین میزان چند شکلی (۰/۱۵۵) مشاهده گردید.

در استفاده از پرایمر E6M3 در جمعیت کم تولید، میانگین هتروزیگوسیتی در جایگاه های مختلف برابر ۰/۲۵۷و میانگین شاخص شانون برابر با ۰/۴۱۵ بوده اما در جمعیت پر تولید میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۲۴۳ ومیانگین شاخص شانون ۰/۳۹۴ می باشد. در نتیجه میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت کم تولید بیشتر می باشد.

در استفاده از همین جفت پرایمر در جمعیت دوم (پرتولید) ، در جایگاه E3M3 -4، بالاترین مقدار شاخص شانون (۰/۶۹۳) و بیشترین میزان چند شکلی (۰/۵) مشاهده گردید و در جایگاه E3M3 -5، کمترین مقدار شاخص شانون (۰/۱۵۶) و در نتیجه کمترین هتروزیگوسیتی (۰/۰۷) دیده شد. بنابراین دو جمعیت در تکثیر با استفاده از جفت پرایمر E3M3 با هم متفاوت هستند .

در استفاده از جفت پرایمر E3M4، در جمعیت کم تولید، در جایگاه E3M4 – 5، بیشترین شاخص شانون (۰/۶۸۹) ودر نتیجه بالاترین هتروزیگوسیتی (۰/۴۹۵) مشاهده شد و در جایگاه E3M4 – 2، کمترین شاخص شانون (۰/۱۹۳) و درنتیجه کمترین چند شکلی (۰/۰۹۱) دیده شد.

در جمعیت پر تولید، در جایگاه E3M4 – 5، بیشترین مقدار شاخص شانون (۰/۶۸۷) و بالاترین هتروزیگوسیتی (۰/۴۹۴) و در جایگاه E3M4 – 7، کمترین مقدارشاخص شانون (۰/۲۶۴) و کمترین چند شکلی (۰/۱۳۷) مشاهده گردید.

در تکثیر به کمک پرایمر E3M4، در مجموع ۷ الل چند شکلی نشان دادند. همانطور که از نتایج برمی آید در استفاده از این جفت پرایمر، چند شکلی در دو جمعیت به چشم می خورد. در تکثیر انجام شده به کمک جفت پرایمر E6M3، در مجموع، ۶ الل چند شکلی نشان دادند.

در استفاده از این پرایمرها در جمعیت کم تولید، در جایگاه های E6M3 – 1 و همچنین E6M3 – 2، بالاترین شاخص شانون (۰/۴۶۸) و در نتیجه بالاترین هتروزیگوسیتی (۰/۲۶۳) و در جایگاه E6M6 -5، کمترین شاخص شانون (۰/۱۲۶) و کمترین میزان چند شکلی (۰/۰۵۳) دیده شد.

در حالیکه در جمعیت پر تولید، جایگاه E6M3 - 1، بالاترین مقدار شاخص شانون (۰/۶۹۲) و بالاترین هتروزیگوسیتی (۰/۴۹۸) و در جایگاه E6M3- 2، کمترین مقدارشاخص شانون (۰/۱۸۵) و کمترین میزان هتروزیگوسیتی (۰/۰۸۷) دیده شد.

بنابراین در تکثیر توسط این آغازگر نیز دو جمعیت تفاوت هایی را نشان دادند. در تکثیر به کمک آغازگر E3M2، ۶ الل چند شکلی نشان دادند.

در جمعیت کم تولید، در جایگاه E3M2- 1، بالاترین مقدار شاخص شانون (۰/۶۹۳) و بیشترین چند شکلی (۰/۵) و در جایگاه E3M2- 4، کمترین شاخص شانون (۰/۴۰۹) و پائین ترین هتروزیگوسیتی (۰/۲۴۴) دیده شد، در حالیکه در جمعیت پرتولید در جایگاه E3M3- 3، بالاترین مقدار شاخص شانون ( ۰/۶۹۲)

و بالاترین هتروزیگوسیتی (۰/۴۹۹) ودر جایگاه E3M3- 4، کمترین مقدار شاخص شانون (۰/۲۲۳) و در نتیجه کمترین میزان چند شکلی (۰/۱۱) مشاهده شد.

پس این دو جمعیت درتکثیر با استفاده از جفت پرایمر مذکور نیز با هم اختلاف دارند.

به طورکلی بیشترین مقدارشاخص شانون مربوط به جایگاه E3M2- 1 در جمعیت کم تولید و همچنین جایگاه E3M3- 4 در جمعیت پر تولید می باشد، بنابراین، این دو جایگاه بیشترین چند شکلی را نشان می دهند. کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه E6M3- 5 است، بنابراین کمترین میزان چند شکلی در بین تمامی جایگاه ها مربوط به این جایگاه می باشد.

نتایج حاصل با مطالعات راپل و همکاران (۲۰۰۴) و راپل (۲۰۰۹) همخوانی دارد. با توجه به چندشکلی نسبتاً بالا در جایگاه های ژنی E3M2- 1در جمعیت کم تولید و همچنین جایگاه E3M3- 4 در جمعیت پر تولید، این جایگاه ها برای سایر مطالعات با استفاده از نشانگر AFLP توصیه می‌شود. قابل ذکر است که جایگاه‌هایی که چند شکلی بیشتری را نشان دادند جهت مطالعات آتی مناسب-تر می‌باشند.

لازم به ذکر است، تعیین پلی مورفیسم جایگاه های ژنی صفت اولین سن جستجوگری در زنبورعسل ایرانی در مطالعه حاضر، اولین بررسی انجام شده با استفاده از نشانگر AFLP در ایران می باشد و با هدف تنظیم تلاقی های بعدی بین والدین و نسل اول (بک کراس ها) جهت یافتن جایگاه های ژنی (QTL ) مرتبط با صفت مذکور و در نهایت تهیه نقشه های ژنی انجام شد.

امید است با تلفیق نتایج مطالعه حاضر و مطالعات آینده بتوان با در دست داشتن رکوردها و اطلاعات کمی از چندشکلی‌های جایگاه ها، در جهت شناسایی و تعیین محل جایگاه‌های موثر بر صفت کمی (QTL) اولین سن جستجوگری، استفاده نمود.

استفاده از نشانگرهای با پیوستگی مناسب با صفت مورد نظر در برنامه های به نژادی موجب خواهد شد برنامه های اصلاح نژادی برای صفات کمی ، که معمولا مشکل، پرهزینه و زمان بر هستند، آسانتر شده و به جای انجام گزینش ها و تلاقی های غیر مطمئن، با استفاده از انتخاب به کمک نشانگرها، برنامه های اصلاحی هدفمند به صورت جهت دار دنبال گردد. به این ترتیب ضمن افزایش دقت انتخاب، زمان و هزینه ی کمتری برای برنامه های اصلاح نژادی صرف خواهد شد.

استفاده از روشهای مولکولی سبب افزایش دقت در عملیات اصلاح نژادی می شود و در بهبود صفت جستجوگری نیز بهره گیری از این روش ها در سرعت بخشیدن به تحقق اهداف اصلاح نژادی موثر خواهد بود.

**منابع:**


- رویان، م. ۱۳۸۳. بررسی تنوع ژنتیکی زنبورهای عسل سه استان گلستان، مازندارن و گیلان با استفاده از نشانگر ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندارن. ۸۹ صفحه.
- موسوی، م. ۱۳۸۹. تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل استان‌های گیلان و مازندران با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت.پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.۱۳۰صفحه.
- طهماسبی زهرا ، طهماسبی غ ، عصفوری ر، بابایی م، عبادی ر، ترنگ ع، صیقلانی ر و نژادمحمد ا. ۱۳۹۰. مطالعه رفتار جستجوگری زنبورهای کارگر و جمع‌آوری گرده(صفات مرتبط با تولید عسل) در کلنی‌های با تولید عسل بالا و تولید عسل پایین. خلاصه مقالات اولین جشنواره ملی علمی ترویجی عسل و سلامت جامعه .ص ۲۳-۲۶.
- طهماسبی زهرا ، طهماسبی غ، عصفوری ر، عبادی ر و نژاد محمد ا. ۱۳۹۱. بررسی اولین سن جستجوگری زنبورهای کارگر در کلنی های زنبورعسل ایرانی(*Apis mellifera* meda). بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شهریور ۱۳۹۱: ص ۷۵۷.

- یاراحمدی سیما ، آشتیانی م، عبادی ر و طهماسبی ،غ .۱۳۷۶. تعیین همبستگی فنوتیپی بین تعدادی از صفات ظاهری و بیولوژیک در توده زنبورهای عسل استان تهران. مجله علوم وفنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۵،شماره ۲،تابستان ۱۳۸۰. ۱۵۷-۱۶۷.
- یاراحمدی سیما، طهماسبی، غ. ۱۳۸۸.آزمون های آزمایشگاهی و ارتباط آن با تولید عسل در مزرعه. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. ۸۷/۵۸۱ ۶-۱۷.

-Brittain, W.H.1933. Apple pollination studies in the Annapolis Valley, N.S., Canada, 1928-32. Can. Dwp. Agric. Bull. 162: 119-125.

-Burrill, R.M.and A.Dietz. 1973. An automatic honey bee counting and recording device (Apicard) for possible systems analysis of standard colony. American.Bee.J. 113: 216-218.

-Erickson, E. H., L. O. Whitefoot and W. A .Kissinger. 1973. Honey bees: a method of delimiting the complete profile of foraging from colonies. Environ Entomology. 2: 531-535.

-WWW.FAO.COM

-Gary, N.E. 1967 . A method for evaluating honey bee flight activity at the hive entrance. J.Econ. Entomology. 60:102-105.

-Hunt, G. J., R. E. Page Jr, M. K. Fondrk, and C. J. Dullum. ۱۹۹۵. Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. Genetics 141: 1537- 1545.

-Jaycox , E.R. 1970. Honey bee queen pheromones and worker foraging behavior. Ann. Entomology. Soc. Am. 63: 222-228.

-Lundie, A.E. 1925. The flight activities of the honeybee. U.S.Dep. Agric. Bull. No. 1328.

-Marcean. J. Baily, R, and Perron, M. 1990. The relationship between hive productivity and honeybee flight activity. J. Apic .Res . 29:28-34.

-Page Jr, R. E. M. K. Fondrk, G. J. Hunt, E. Guzman-Novoa, M. A. Humphries, K. Nguyen, and A. S. Greene. 2000. Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera L.*) foraging behavior. J Hered. 91: 474 - 479.

-Ruppell, O., T. Pankiw, and R. E. Page Jr. 2004. Pleioropy, epistasis and new QTL: The gemetic architecture of honeybee foraging behavior. Journal of heredity: 95(6): 481-491.

- Ruppell, O.2009. Characterization of Quantitative Trait Loci for the Age of First Foraging in Honey Bee Workers. Springer Science+Business Media, LLC 200939:541–553

-Seeley, T. D. 1985. Honeybee ecology. Princeton Univ. Princeton, N.J.

-Sekiguchi, K. & S. F. Sakagami. 1966. Structure of foraging population and related problems in the honeybee, with cosiderations on the division of labour in bee colonies. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. Rep. No. 69.-

Spangler, H. G. 1984. Counting flying honeybees by detecting wing reflectance. Entomol. 9: 35-40.

- Tahmasbi, Z., Gh. Tahmasbi, R. Osfoori, and M.Ebrahimi. 2012. Comparison of foraging initiation in high and low performance of Iranian honeybee (*Apis mellifera* meda) colonies. 11th Asian Apicultural Association Conference, ApiExpo & Workshop. 28th Sep. - 2th Oct. 2012.