

بررسی تعادل هاردی-وینبرگ و چندشکلی در جمعیت‌های زنبورعسل شمال غرب ایران با استفاده از آنالیز ریزماهواره
نعمت‌الله اسدی^۱، صابر خدرزاده^۲، سیروس امیری‌نیا^۳

چکیده

به منظور مطالعه درون جمعیتی کلنی‌های زنبورعسل نواحی شمال غربی ایران، با استفاده از نمونه‌های استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل، از ۹ نشانگر ریزماهواره استفاده گردید. پس از تکثیر هر جایگاه به وسیله تکنیک PCR و تعیین ژنوتیپ، با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف، آنالیزهای مربوطه انجام پذیرفت. در این تحقیق از بین نشانگرهای مورد مطالعه، جایگاه A7 دارای بیشترین تعداد آلل مشاهده شده و جایگاه‌های A35 و B124 دارای کمترین تعداد آلل و جایگاه‌های A14 و A24 نیز مونومورف بودند. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در جایگاه‌های A107 و A7 و کمترین مقدار آن در جایگاه A35 نمایان شد. بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی در جایگاه A107 (به ترتیب ۰/۹۸۳ و ۰/۹۲۱) و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه A88 (۰/۱۰۱) و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار نأریب نی نیز در جایگاه A35 (۰/۴۸۱) مشاهده گردید. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون نیز به ترتیب در جایگاه‌های A107 (۲/۶۴۰) و A35 (۱/۰۱۸) دیده شد. در این جمعیت، جایگاه‌های A107 و A7 در تعادل هاردی-وینبرگ و بقیه جایگاه‌ها دارای انحراف معنی داری از وضعیت تعادل بودند.

واژه‌های کلیدی: زنبورعسل، تعادل هاردی-وینبرگ، چندشکلی، ریزماهواره‌ها

=====

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد زنبورعسل، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
- ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین
- ۳- عضو هیات علمی بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

مقدمه

امروزه با آشکار شدن نشانگرهای با تعداد آلل زیاد همچون ریزماهورها و ژنهای شناخته شده با توالی های آللی متفاوت که منجر به هاپلوتیپ های زیادی خواهند شد، برقراری تعادل هاردی-وینبرگ اهمیت ویژه ای در مطالعات ژنتیک جمعیت پیدا کرده است. این موضوع نشان می دهد که فراوانی های ژنوتیپی یک جایگاه را بعد از یک نسل آمیزش تصادفی، می توان با نسبت بی-نومیال (برای دو آللی) و مولتی-نومیال (برای چند آللی) براساس فراوانی های آللی نمایش داد. نسبت های ژنوتیپی به دلایل مختلف از تعادل هاردی-وینبرگ انحراف خواهند داشت. مهمترین فاکتورهای تأثیرگذار در این امر انتخاب، آمیزش های غیرتصادفی و جریان ژنی می باشند. مقادیر کم هر یک از این فاکتورها فقط اندکی نسبت های هاردی-وینبرگی را تغییر می دهد.

گاهی اوقات مشکلات موجود در بعضی از روش های مولکولی (همچون آلل های صفر^۱) باعث ایجاد انحراف از تعادل مذکور می شود (۸). اگر کلیه داده های یک مکان ژنی که در آن تمام ژنوتیپ ها قابل تشخیص هستند وجود داشته باشد، می توان مطابقت فراوانی های ژنوتیپی مشاهده شده را با فراوانی های مربوط به یک جمعیت در تعادل هاردی-وینبرگ مورد قیاس و آزمون قرار داد. برای آزمون تعادل هاردی-وینبرگ در یک جمعیت، روش های مختلفی از جمله آزمون مربع کای^۲، آزمون نسبت درست نمایی^۳، آزمون صحیح^۴ و آزمون لگاریتم خطی^۵ وجود دارد (۱۱). بررسی این قانون در جمعیت ها نیاز به ابزارهای ویژه ای داشته تا بتوان با دقت برقراری و یا عدم برقراری تعادل مذکور را برآورد نمود. با توجه به اینکه منشأ جنسیت زنبورعسل نر، زنبور دیپلوئید است و از طرفی جفت گیری ملکه زنبورعسل نیز به طور طبیعی و تصادفی با زنبورهای نر موجود در محوطه خارج از کنترل انسان انجام می پذیرد، لذا این امر عاملی در جهت افزایش تنوع و گسترش هرچه بیشتر خصوصیات نژادی زنبورعسل بوده (۲) و با توجه به تعریف قانون هاردی-وینبرگ و در صورت عدم وجود دخالت انسان که به عنوان مثال می توان به معرفی نمودن ملکه جدید و اصلاح شده و یا مهاجرت کلنی ها و غیره اشاره نمود، انتظار می رود که تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برقرار باشد. در این رابطه بر روی زنبورعسل مطالعات فراوانی صورت پذیرفته که می توان به مطالعات استاپ و همکاران (۱۹۹۵) اشاره نمود که با تحقیقی بر روی ۳ نژاد آفریقایی و ۴ نژاد اروپایی زنبورعسل معمولی، فرانک و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با تعیین تنوع زنبورعسل آفریقایی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورها و دلاروا و همکاران (۲۰۰۱، ۲۰۰۲، ۲۰۰۳) بررسی چندشکلی با استفاده از جایگاه های ریزماهورها و به ترتیب بر روی جمعیت های زنبورعسل جزایر قناری، کلنی های غیرمهاجر جنوب شرقی اسپانیا و جزیره بالیریک اشاره نمود. در این تحقیق نیز برقراری و یا عدم برقراری تعادل هاردی-وینبرگ و معیارهای چندشکلی موجود در کلنی های زنبورعسل شمال غرب ایران بررسی می گردد.

مواد و روش ها

در این تحقیق، زنبورستان های استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل برحسب ظرفیت و تعداد کلنی به صورت تصادفی انتخاب و از هر کلنی تعداد ۵ الی ۷ زنبور کارگر جوان به طور تصادفی نمونه گیری و در درون ظروف حاوی اتانول مطلق قرار داده شد. سپس نمونه ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگهداری گردیدند. انتخاب مناطق، زنبورستان ها و نمونه گیری از کلنی های زنبورعسل متعلق به هر جمعیت به نحوی صورت پذیرفت که نمونه ها بتوانند آلگوی مناسبی از آن جمعیت باشند. سپس، DNA نمونه ها به روش اصلاح شده CTAB استخراج (۱) و پس از ارزیابی های کمی و کیفی، با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، نمونه های DNA به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شدند.

^۱ Null alleles

^۲ Chi-square Test

^۳ Likelihood Ratio Test (G-square Test)

^۴ Exact Test

^۵ Log-Linear Test

سپس برای بررسی تنوع موجود در داخل جمعیت، از ۹ نشانگر ریزماهواره مهم زنبورعسل (نشانگرهای مشترک مورد استفاده در اکثر تحقیقات) با نام‌های A88، A107، A7، B124، A113، A35، A14، A24 و A43 استفاده گردید که توالی آغازگرهای آن از مقالات معتبر (۶) و سایت NCBI اخذ شد و پس از بهینه‌سازی شرایط PCR حاکم بر هر نشانگر از لحاظ غلظت مواد شرکت‌کننده در واکنش (جدول ۱) و چرخه‌های حرارتی (جدول ۲)، محصولات PCR هر کدام به‌طور مجزا بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز گردیدند. کلیه الکتروفورزها در طول شب (over night) انجام پذیرفت و دو چاهک هر ژل نیز به نشانگر وزن مولکولی اختصاص داده شد.

جدول ۱- غلظت اجزای واکنش PCR

غلظت نهایی	اجزای واکنش
۱X	بافر PCR
۱/۵mM	MgCl ₂
۰/۵μM	آغازگرها
۲۰۰μM	dNTPs
۰/۵unit/μl	آنزیم Taq پلی مرز
۱۰۰ng/μl	DNA الگو
متغیر	ddH ₂ O

جدول ۲- دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

مراحل PCR	درجه حرارت (°C)	زمان
۱	۹۴°C	۹ دقیقه
۲	۹۴°C	۳۰ ثانیه
۳	۵۵-۵۸°C	۳۰ ثانیه
۴	۷۲°C	۳۰ ثانیه
۵	-	-
تکرار مرحله ۲ الی ۴ (۳۵ مرتبه)	-	-
۶	۷۲°C	۹ دقیقه
۷	۴°C	-
نگهداری محصول در دستگاه PCR	-	-

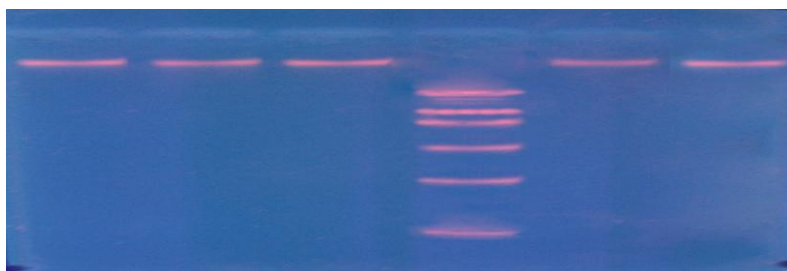
پس از رنگ‌آمیزی و اسکن نمودن ژل‌ها، با استفاده از برنامه Gel-Pro Analyzer 3.1، طول آلل‌ها براساس جفت‌باز اندازه‌گیری و سپس ژنوتیپ افراد تعیین گردید (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در راستای تعیین فاکتورهایی همچون معیارهای چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی جایگاه‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار نأریب نی، شاخص شانون و تعادل هاردی-وینبرگ (توسط آزمون مربع کای و نسبت درست‌نمایی) با استفاده از نرم‌افزارهای مختلفی همچون GenAIEx 6، POPGENE 1.31 و HET 1.8 برآورد گردید (۹، ۱۰ و ۱۲).

نتایج و بحث

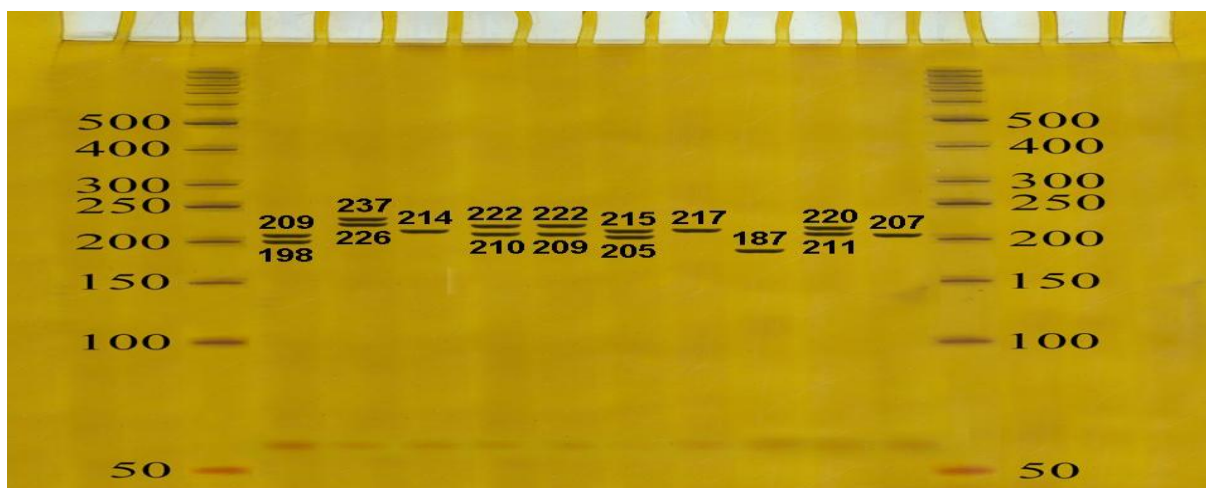
نتایج حاصله از جایگاه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که این نشانگرها براساس استفاده آنها در تحقیقات مختلف (۳، ۴، ۵ و ۶)، دارای کاربرد بالایی در تفکیک گونه‌ها، نژادها، توده‌ها و جمعیت‌های مختلف می‌باشند. ارزیابی‌های کمی و کیفی DNA حاصله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، نشان داد که جذب نوری نمونه‌های DNA بین ۲-۱/۸ است که نشان‌دهنده عدم آلودگی پروتئینی و RNA

نمونه‌ها بوده و مشاهدات بر روی ژل آگارز نیز، نتایج حاصله از فقدان آلودگی نمونه‌ها که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد را تأیید نمود (شکل ۱).



شکل ۱- کیفیت باندهای حاصل از DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

در این تحقیق، ۸ جایگاه A24، A14، A35، A113، B124، A7، A107، A88، A43، A43 علیرغم تغییرات مختلف در بهینه‌سازی شرایط PCR آن، تکثیر نگردید که این نتیجه با نتایج استاپ و همکاران (۱۹۹۵) مطابقت نداشت. تکثیر ایده‌آل جایگاه‌ها حاکی از بهینه‌بودن شرایط PCR از لحاظ غلظت اجزاء و چرخه‌های حرارتی (از نظر تعداد سیکل، دمای اتصال و زمان) است (شکل ۲) و عدم تکثیر در جایگاه A43 نشأت گرفته از اختلاف نژادی است.



شکل ۲- الگوی آلی مشاهده شده بر روی ژل آکريل آمید ۸ درصد (نشانگر وزن مولکولی ۱۳ شرکت Roche)

در این پژوهش دامنه آلی در جایگاه‌های تحت بررسی با وجود اختلافات اندکی، نزدیک به محدوده آلی مطالعات انجام شده توسط استاپ و همکاران (۱۹۹۵) بود.

در بین جایگاه‌های تحت مطالعه، جایگاه A7 دارای بیشترین تعداد آلل مشاهده شده و جایگاه‌های A35 و B124 دارای کمترین تعداد آلل و جایگاه‌های A14 و A24 نیز مونومورف بودند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر نیز به ترتیب در جایگاه‌های A107 و A35 مشاهده شد (جدول ۳) و با نتایج سایر محققین مطابقت نداشت. در تحقیقات دلارو و همکاران (۲۰۰۲) بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب در جایگاه‌های A35 و A88 و در تحقیقات استاپ و همکاران (۱۹۹۵) نیز به ترتیب در جایگاه‌های A7 و A24 مشاهده شده است. اختلاف موجود در بین تعداد آلل مشاهده شده این پژوهش با مطالعات صورت گرفته بر روی نژادهای مختلف زنبورعسل سایر کشورها نشأت گرفته از طبیعت تغییرپذیر و متنوع نشانگرهای ریزماهوره در نژادها و جمعیت‌های مختلف است.

بیشترین و کمترین میانگین ارزش PIC در جایگاه‌های A107 و A35 مشاهده گردید که با توجه به تعداد آلل مؤثر این جایگاه‌ها (جایگاه A107 ۱۲/۱ و جایگاه A35 ۱/۹)، این روند منطقی است (جدول ۳). بالابودن ارزش PIC خصوصاً در جایگاه‌های A7 و

A107 و سپس به میزان کمتری در جایگاه‌های A88، B124 و A113 دلیلی مشهود بر چندشکلی زیاد این جایگاه‌ها و از طرفی بیانگر کارآمدی بالای آنها در تمایز ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت‌ها می‌باشد.

با منظور شدن کلیه جایگاه‌ها در جمعیت شمال غرب، با آزمون مربع کای و آزمون نسبت درست‌نمایی، جایگاه‌های A107 و A7 در تعادل هاردی-وینبرگ و جایگاه‌های A88، B124، A113 و A35 انحراف معنی‌داری را از این تعادل نشان دادند. کوچ‌های مختلف کلنی‌ها، اشتراک نقاط مختلف کوچ و تأثیرپذیری از کندوهای موجود در مرز مشترک دارای نقش به‌سزایی در امر این انحرافات هستند و از طرفی وجود آل‌های صفر در جایگاه‌های مذکور نیز می‌تواند در راستای عدم تعادل هاردی-وینبرگ در این جایگاه‌ها تأثیرگذار باشند.

بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه A107 (۰/۹۸۳) و کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه A88 (۰/۱۰۱) بود (جدول ۳) که در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) به ترتیب در جایگاه‌های A35 (۰/۸۶۷) و A88 (۰/۰۶۷) مشاهده گردیده است. بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناآریب نی نیز در جایگاه A107 (۰/۹۲۱) و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناآریب نی در جایگاه A35 (۰/۴۸۱) مشاهده گردید که به دلیل تفاوت نژادی، این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت ندارد. در تحقیقات دلاروآ و همکاران (۲۰۰۲) بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناآریب نی به ترتیب در جایگاه‌های A35 (۰/۸۱۶) و A88 (۰/۱۲۹) مشاهده شده است. با در نظر گرفتن کلیه جایگاه‌ها، بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه A107 (۲/۶۴۰) و کمترین مقدار آن در جایگاه A35 (۱/۰۱۸) مشاهده گردید که با نتایج حاصله از مقادیر هتروزیگوسیتی نیز مطابقت دارد (جدول ۳). همانگونه که مشاهده می‌شود هتروزیگوسیتی موجود دارای دامنه بالایی بوده و نمایانگر تنوع زیاد موجود در این جمعیت است که در اثر جفتگیری غیرقابل کنترل ملکه زنبور عسل با زنبورهای نر کلنی‌های مختلف حاصل گردیده و نتایج حاصله از عدم تعادل هاردی-وینبرگ نیز مؤید آن بوده و از طرفی تداخلات ژنتیکی به وجود آمده باعث کاهش هموزیگوسیتی و همخونی شده و یکی از عوامل تولید میزان عسل بالا در جمعیت‌های زنبور عسل شمال غرب کشور است.

جدول ۳- معیارهای آماری بررسی درون جمعیتی مربوط به هر جایگاه

	Na	Ne	PI	I	Ho	He
A88	۱۱/۰۰۰	۵/۶۴۷	۰/۶۷۰	۱/۸۵۵	۰/۱۰۱	۰/۸۲۶
A107	۱۹/۰۰۰	۱۲/۱۴۴	۰/۸۹۰	۲/۶۴۰	۰/۹۸۳	۰/۹۲۱
A7	۲۲/۰۰۰	۱۰/۷۰۴	۰/۸۹۰	۲/۶۰۷	۰/۸۰۱	۰/۹۱۰
B124	۸/۰۰۰	۵/۶۴۴	۰/۶۱۵	۱/۸۸۶	۰/۲۱۴	۰/۸۳۲
A113	۱۰/۰۰۰	۳/۷۵۲	۰/۶۵۵	۱/۵۶۰	۰/۱۱۱	۰/۷۳۸
A35	۸/۰۰۰	۱/۹۱۹	۰/۳۹۰	۱/۰۱۸	۰/۱۹۶	۰/۴۸۱
SE میانگین	۱۳/۰۰۰±۶/۰۰۰	۶/۶۳۵±۳/۹۸۵	۰/۶۸۵±۰/۱۸۸	۱/۹۲۸±۰/۶۲۲	۰/۴۰۱±۰/۳۸۷	۰/۷۸۵±۰/۱۶۳

Na: تعداد آل مشاهده شده، Ne: تعداد آل مؤثر، PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، I: شاخص شانون، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناآریب نی

منابع

- اسدی، ن.، اسماعیل خانیان، س.، نجاتی جوارمی، ا.، قره‌داغی، ع.، ا.، طهماسبی، غ. ح. و میرهادی، ا. ۱۳۸۲. استخراج DNA ژنوم زنبور عسل با استفاده از اصلاح تکنیک استاندارد در ایران. خلاصه مقالات پنجمین سمینار پژوهشی زنبور عسل ایران، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، او ۲ بهمن ۱۳۸۲، صص ۱۳.
- عبادی، ر. ۱۳۶۷. مقایسه عملکرد پنج نژاد و هیبرید خارجی زنبور عسل با نژاد بومی ایران در منطقه اصفهان. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۱۹، شماره ۳: ۲۲ - ۱۱.

3- Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A. 2001. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*. 10:1733-1742.

- 4- Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A. 2002. Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. *Zoology*, 40:164-168.
- 5- Delarua, P., Galian, J., Serrano, J. and Moritz, R. F. A. 2003. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genetics*, 35:339-350.
- 6- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, J. 1995. Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera*) population. *Apidologie*, 140:679-695.
- 7- Frank, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. and Cornuet, J.-M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and Mitochondrial Data. *Heredity*. 86:420-430.
- 8- Hedrick, P. W. 1999. *Genetics of population*. Second edition, Jones and Bartlett publishers, Sudbury, MA, USA.
- 9- Ott, J. 2001. Program HET version 1.80, utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York, NY, USA.
- 10- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Note*, 6:288-295.
- 11- Weir, B. S. 1996. *Genetics data analysis: methods for discrete population genetic data*. Sinauer associations, INC.
- 12- Yeh, F. C., Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.