دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ۴۶۶۸-۲۰۰۸
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۹، شماره ۲، سال ۱۳۹۶، (۱۴۳-۱۵۴)

تنوع باکتریایی جمعیت‌های زنبورعسل کوچک *Apis florea* F., (Hym., Apidae) در ایران

شبنم پری‌چهره[۱]، غلامحسین طهماسبی[۲]، علیمراد سرافرازی[۳]، سهراب ایمانی[۴]، ناصر تاج آبادی[۵]*

۱- دانشجوی دکترای حشره‌شناسی، گروه حشره‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲- استاد پژوهشی، بخش زنبور عسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
۳- استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران
۴- دانشیار، گروه حشره‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۵- محقق بخش زنبورعسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

چکیده

زنبورعسل کوچک *Apis florea* F. و زنبورعسل اروپایی *Apis melifera* L. دو گونه اصلی زنبورهای عسل ایران هستند. زنبورعسل کوچک *A. florea* در یک نوار گرمسیری از کرمانشاه تا سیستان و بلوچستان پراکنده شده و نقش مهمی در گرده‌افشانی گیاهان مناطق جنوبی کشور دارد. در این پژوهش ۱۴۰۰ زنبورعسل کارگر مربوط به ۱۴ کلنی از استان‌های سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، فارس، کهکیلویه و بویراحمد، بوشهر، خوزستان و ایلام جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در لوله‌های استریل حاوی نرمال سالین قرار داده شد، سپس جداسازی باکتری‌ها از دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک با استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی انجام گرفت. برای شناسایی باکتری‌های جدا شده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی استفاده شد. تشخیص مولکولی کلنی‌ها با روش تعیین توالی ژن 16S rRNA و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. پس از تعیین توالی و شناسایی نمونه‌ها، زنبورهای عسل کوچک در ایران از لحاظ باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در دستگاه گوارش به ۵ گروه زنبورهای ۱) رودان، بندرعباس، ایرانشهر، ۲) اهواز، دهلران، جیرفت، کهنوج و بوشهر ۳) گچساران ۴) جهرم، فسا و بهبهان و ۵) قشم گروه‌بندی شدند. نتایج نشان داد که تنوع گیاهی، تغییر منابع شهد و گرده و عرض جغرافیایی منطقه عامل مهمی در تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک همزیست دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زنبور عسل کوچک، باکتری‌های اسید لاکتیک، تنوع باکتریایی، ایران

*نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *tahmasbigholamhosein@yahoo.com*

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۷ – تاریخ پذیرش مقاله:۹۶/۶/۱۶

مقدمه

حشرات در گرده‌افشانی بسیاری از گیاهان مهم زراعی، نقش اساسی دارند. تقریبا یک سوم از کل غذای روزانه ما به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم به حشرات گرده‌افشان بستگی دارد (Mossadegh, 2014). زنبورعسل کوچک *Apis florea* یکی از حشرات گرده‌افشان مهم مناطق گرمسیری و خشک در ایران و سایر کشورهای زیستگاه این زنبورعسل است. پراکنش زنبورعسل کوچک در ایران در ۱۰ استان کشور شامل کرمانشاه، ایلام، لرستان، خوزستان، کهکیلویه و بویراحمد، بوشهر، فارس، هرمزگان، کرمان، سیستان و بلوچستان و در جزایر قشم، کیش، خارک، لارک، لاوان و سیری به ثبت رسیده است (Ruttner, 1985; Ruttner *et al*., 1995; Mossadegh, 1993). به‌طورکلی این زنبور در یک نوار گرمسیری به‌طور تقریبی ۲۰۰۰ کیلومتر که از قصرشیرین در غرب ایران شروع و تا سیستان و بلوچستان در جنوب شرقی کشور ادامه دارد، پراکنده است.

یکی از مهم‌ترین باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش زنبورهای عسل باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. این باکتری‌ها با تولید اسید لاکتیک و اسیدی کردن دستگاه گوارش مانع از رشد باکتری‌های مضر می‌شوند. بنابراین در حفظ سلامت دستگاه گوارش نقش مهمی ایفا می‌کنند. جنس‌های مختلف لاکتوباسیل و انتروکوکوس به‌عنوان باکتری‌های تولید-کننده اسید لاکتیک (پروبیوتیک) در صنایع غذایی کاربرد بسیاری داشته و از این باکتری‌ها در تولید بسیاری از مواد غذایی پروبیوتیکی استفاده می‌شود. همچنین این باکتری‌ها به دلیل تولید ترکیبات ضدمیکروبی فعال بی‌شمار، جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (Pattabhiramaiah *et al*., 2012) بنابراین، تحقیقات در مورد شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش زنبورعسل با هدف بهبود ایمنی و سلامت زنبور و همچنین تولید محصول عسل حاوی پروبیوتیک حایز اهمیت است

ایران، کشوری گسترده، با تنوع آب و هوایی زیاد و اکوسیستم‌های گوناگون است که از مجموع ۱۴ تنوع آب و هوایی دنیا دارای ۱۱ تنوع می‌باشد (Tajabadi *et al*., 2012). به‌همین دلیل می‌تواند بستری مناسب برای بررسی تنوع زیستی باشد. شرایط زیستی منحصر به فرد، تنوع، گستردگی و از همه مهم‌تر دست نخورده بودن این مناطق و عدم وجود سابقه بررسی‌های مشابه، بر لزوم انجام پژوهش‌های بیشتر برای یافتن باکتری‌های دارای پتانسیل صنعتی و همچنین تعیین تنوع باکتریایی جمعیت‌های زنبورهای عسل کوچک در این مناطق تاکید دارد.

مواد و روش‌ها

عملیات صحرایی

در این تحقیق با توجه به پراکنش زنبورعسل کوچک در ایران به‌منظور جمع‌آوری افراد گونه مورد مطالعه مسافرت‌های متعددی در ماه‌های فرودین، اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۴ به نقاط مختلف کشور از جمله استان‌های سیستان و بلوچستان (ایرانشهر)، کرمان (جیرفت، کهنوج)، هرمزگان (رودان، بندر عباس، قشم)، فارس (جهرم، فارس)، بوشهر (بندر کنگان، بوشهر)، کهکیلویه و بویراحمد (گچساران)، خوزستان (بهبهان، اهواز)، ایلام (دهلران) انجام گرفت (شکل ۱). نمونه‌گیری زنبورعسل کوچک از هر کندو ۱۰۰ عدد که با استفاده از وسایل مخصوص زنبورداری شامل کلاه و دستکش، شیشه‌های استریل شده حاوی نرمال سالین (برای شناسایی اجتماع باکتری‌های همزیست زنبورعسل کوچک)

انجام گرفت. در این بررسی لانه زنبورعسل کوچک در زیر سقف ایوان، داخل و سر چاه، داخل انبارها، زیر میل‌گردها، زیر شاخه درختان نارنج، لیمو، پرتقال، کنار، کهور، اکالیپتوس، درختچه گل کاغذی و گل مروارید، داخل بلوک سیمانی و شکاف باز کوه‌ها یافت شد.

شکل ۱- نقشه مناطق نمونه‌برداری از زنبورعسل کوچک *A. florea* در ایران (۱: ایرانشهر، ۲: جیرفت، ۳: کهنوج، ۴: رودان، ۵: بندرعباس، ۶:قشم، ۷: جهرم، ۸: فسا، ۹: بوشهر، ۱۰: کنگان، ۱۱: گچساران، ۱۲: بهبهان، ۱۳: اهواز، ۱۴: دهلران

Fig. 1- Sampling localities map of *Apis florea* F. in Iran (1. Iranshahr, 2. Jiroft, 3. Kahnuj, 4. Roudan, 5. Bandar Abbas, 6. Qeshm, 7. Jahrom, 8. Fasa, 9. Bushehr, 10. Kangan, 11. Gachsaran, 12. Behbahan, 13. Ahvaz, 14. Dehloran)

عملیات آزمایشگاهی

در این مرحله شیشه‌های حاوی زنبورعسل کوچک در یخ به آزمایشگاه منتقل شده و در یخچال در دمای ۳ تا ۴ درجه سلسیوس بالای صفر تا انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. سپس دستگاه گوارش ۳۰ عدد زنبورعسل کوچک از هر کلنی بر اساس روش (Audisio *et al*., 2011) جداسازی شد. پس از بیرون کشیدن دستگاه گوارش زنبورعسل و جدا کردن نیش آن، دستگاه گوارش زنبورها در تیوپ‌های ۱۵ میلی‌لیتر حاویی نرمال سالین ریخته شدند. نرمال سالین حاوی دستگاه گوارش زنبورها برای غنی‌سازی و رشد لاکتوباسیل‌ها به محیط MRS مایع (مرک آلمان) منتقل شدند. نمونه‌ها برای ۲ تا ۳ روز در دمای ۳۱ درجه سلسیوس و در اتاقک رشد دارای ۹ درصد CO2 کشت داده شدند (tajabadi *et al*., 2012).

پس از رشد باکتری‌ها در محیط براس، یک سری رقت از محلول حاصل تهیه شد. مثلا برای تهیه رقت 10^{-2}، ۱ میلی‌لیتر از رقت تهیه شده (10^{-1}) به ۹ میلی‌لیتر محلول براس اضافه و مخلوط شد سپس از رقت‌های مختلف روی

پلیت‌های ام‌آراس آگار یک میلی‌لیتر روی سطح پلیت ریخته شد و به آرامی با میله شیشه‌ای سر کج در سطح پلیت پخش شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در اتاقک رشد۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد.

برای به‌دست آوردن تک کلنی از پلیت‌های حاوی ام‌آراس آگار که باکتری‌ها در آن‌ها به‌صورت تک کلنی رشد کرده بودند با استفاده از یک آنس استریل شده مقداری از باکتری‌ها را به‌صورت جداگانه برداشته و در پلیت‌های حاوی ام‌آراس آگار تقسیم‌بندی شده (معمولا ۱۰ قسمت) به‌صورت خطی کشت داده شدند. از آن‌جایی که باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک کاتالاز منفی و گرم مثبت هستند در این آزمایش نمونه‌های باکتری کاتالاز منفی و گرم مثبت برای استخراج DNA انتخاب شدند. استخراج DNA توسط کیت استخراج (QIAGENE) انجام شد. نمونه‌های DNA استخراج شده در ۱۵۰ میکرولیتر آب ۲ بار تقطیر و در دمای ۲۴- درجه سلسیوس نگهداری شدند. کیفیت DNA استخراجی توسط ژل الکترفورز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. محلول PCR متشکل از ۲/۵ µl بافر PCR، ۲ µl Mgcl2، ۲/۵ µl پرایمر F، ۲/۵ µl پرایمر R، ۳ µl نمونه DNA، ۹/۶ µl آب ۲ بار تقطیر، ۰/۵ µl dNTP و ۰/۲ µl آنزیم Taq تهیه شده و برای انجام واکنش پی‌سی‌آر از دستگاه موجود در آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات علوم دامی کشور استفاده شد.

شرایط واکنش PCR شامل واسرشتگی اولیه [1]۹۵ سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و سپس سیکل اصلی با ۳۸ بار تکرار شامل واسرشتگی[2] در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها[3] در ۵۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵۵ ثانیه، تکثیر[4] در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در انتها تکثیر نهایی[5] در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از پایان یافتن زمان PCR برای مشاهده نتیجه کار از الکتروفورز با ژل آگاروز استفاده شد.

تشخیص مولکولی کلنی‌ها با روش تعیین توالی ژن 16S rRNA و با استفاده از پرایمرهای 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3') انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از نرم‌افزار MEGA4 (Tamura *et al*., 2007) برای ویرایش توالی‌ها استفاده شد. همچنین داده‌های حاصل مبنی بر باکتری‌های جداسازی شده از زنبورهای مناطق مختلف با ذکر نام استان و نام شهرستان در اکسل ثبت شد. در این مطالعه تجزیه خوشه‌ای برای تعیین جایگاه واقعی زنبورها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با روش "خوشه سلسله مراتب" انجام شد. در این روش توابع امتیاز دهنده، امتیازی را برای عضویت هر مشاهده در هر خوشه به آن نسبت می‌دهند. بنابراین برای هر مشاهده جدید با توجه به امتیازی که برای عضویت در هر گروه (خوشه) کسب کرده است، می‌توان عضویت آن را در یکی از گروه‌ها مشخص کرد. با این امتیاز تعلق مشاهده جدید به هر گروه بیشتر باشد ، مشاهده را به آن گروه نسبت می‌دهیم.

[1] .Initial Denaturation
[2] . Denaturation
[3] . Annealing
[4] . Extension
[5] . Final Extension

نتایج وبحث

در این آزمایش با تعیین توالی ۶۳ کلنی از باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک، سویه‌های مختلف باکتری متعلق به گونه‌های *Lactobacillus kunkeei*، *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus apis*، *Enterococcus faecalis*، *Enterococcus faecium* و *Enterococcus hirae* از مناطق جنوبی، جنوب شرقی و جنوب غربی کشور شناسایی شدند.

در مطالعه حاضر برای شناسایی تنوع باکتری‌های دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک و روابط تبارزایی بین آن‌ها از دو روش کشت و تعیین توالی ژن 16S rRNA استفاده شد. طی مقایسه بین اجتماع میکروبی زنبورعسل و پستانداران، مشخص شد که همه همزیست‌های باکتریایی موجود در معده گونه‌های مختلف زنبورعسل، قابل کشت در آزمایشگاه هستند (Kešnerová *et al*., 2016; Olofson *et al*., 2014; Engel *&* *Maran*, 2013; Kwong *&* *Maran*, 2013; Scardovi Trovatellion., 1968). بنابراین روش کشت باکتری یکی از روش‌هایی هست که می‌توان با استفاده از آن تمام گونه‌های باکتری همزیست زنبورعسل را شناسایی کرد با توجه به این نتایج در این بررسی از روش کشت و جداسازی برگرفته از (Gilliam, 1997) برای جداسازی باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک استفاده شد. در مطالعه حاضر، سویه‌های جدا شده از دستگاه گوارش زنبورها با استفاده از ژن 16S rRNA شناسایی شدند. به‌طور کلی در میکروارگانیسم‌های تک سلولی، ژن 16S rRNA به‌طور گسترده‌ای برای ترسیم درخت تباری میکروارگانیسم‌ها و در نهایت تمام گونه‌های متعلق به سه گروه، باکتری‌ها، آرکیاها و یوکاریوت ها به‌کار برده می‌شود (Rajendhran Gunasekaran, 2010). استفاده از این ژن در شناسایی باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش زنبورعسل مرسوم می‌باشد به‌طوری‌که جداسازی باکتری‌های *Enterococcus* از عسلدان و عسل تازه زنبورعسل *A. mellifera* با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شده است (Olofson *et al*., 2008)، در مورد دستگاه گوارش زنبور عسل هندی *A. cerana* در قسمت‌های مختلف کارناتاکا، باکتری‌های *Lactobacillus* spp. با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی و گزارش شدند (Pattabhiramaiah *et al*., 2010). و با استفاده از ژن 16S rRNA شناسایی باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش زنبور عسل *A. dorsata* در مالزی صورت گرفته است. (Yoshiyama *Kimura*, 2009) (Tajabadi *et al*., 2012)

به‌طور کلی نتایج نشان داد که عمده باکتری جداسازی شده از زنبورعسل کوچک از گروه باکتری‌های گرم مثبت هستند. داخل دستگاه گوارش زنبورعسل معمولی *A. mellifera* ۱٪ قارچ، ۲۹٪ باکتری‌های گرم مثبت و ۷۰٪ باکتری‌های گرم منفی یا باکتری‌های خنثی وجود دارد (Gilliam & Prest, 1987) در حالی‌که تنوع میکروبی روده زنبور عسل با توجه به شرایط زمانی و جغرافیایی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد میکروبیوتاهای جداسازی شده عمدتا از گروه باکتری‌های گرم مثبت هستند. (Hroncova *et al*., 2009) که با نتایج آنالیز فیلوژنی در تحقیق حاضر مشابه است.

آنالیز فیلوژنیک در تحقیق حاضر نشان داد که ۳ گونه مختلف از باکتری‌های لاکتوباسیل و ۳ گونه مختلف از باکتری‌های *Enterococuus* در دستگاه گوارش زنبورهای عسل کوچک نیمه جنوبی ایران پراکنده شده است. پنج سویه مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده متعلق به گونه *L. kunkeei*، دو سویه متعلق به گونه *L. plantarum* و یک سویه متعلق به *L. apis* بودند. همچنین سه سویه مختلف باکتری‌های انتروکوکوس متعلق به گونه *E. faecalis*، یک سویه متعلق به گونه *E. faecium* و یک سویه متعلق به گونه *E. hirae* بودند.

نتایج حاصل با نتایج به‌دست آمده از تحقیقات انجام شده روی زنبورعسل درشت *A. dorsata* (Tajabadi *et al*., 2011; 2012; 2013) و زنبورعسل *A. mellifera* (Vasquez *et al*., 2009) مقایسه و تجزیه و تحلیل گردید. نتایج نشان داد که تنوع باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک *A. florea* در ایران بسیار کم‌تر از تنوع باکتری‌های دستگاه گوارش زنبورعسل درشت و زنبورعسل *A. mellifera* می‌باشد که علت را می‌توان به پوشش گیاهی ضعیف‌تر مناطق جنوبی ایران نسبت به مناطق نمونه‌برداری محققین مذکور نسبت داد.

جدول ۱- پراکنش جغرافیایی باکتری‌های اسید لاکتیک در مناطق مختلف ایران با پوشش گیاهی متفاوت

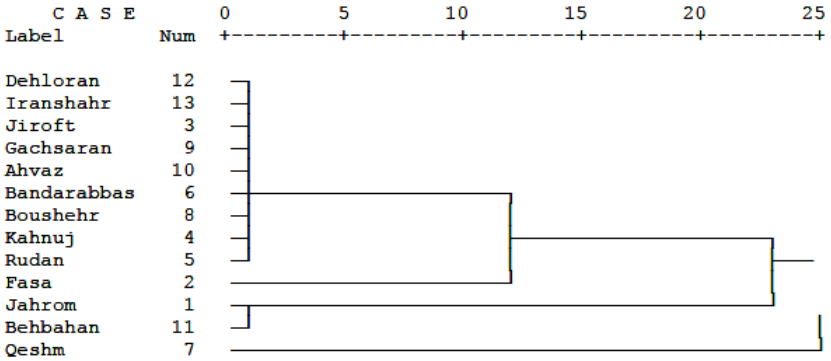
Table 1- Distribution of Lactic acid bacteria in different regions of Iran

Province	County	Vegetation	Longitude	Latitude	*L. plantarum*	*L. kunkeei*	*L. apis*	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. hirae*
Fars	Jahrom	Lemon	53.57742	28.51118	+					
Fars	Fasa	Lemon	53.6312	28.93781	+	+				
Kerman	Jiroft	Palm trees	57.72994	28.67324		+				
Kerman	Kahnuj	Prosopis	57.7004	28.94345		+				
Hormozgan	Rudan	Palm trees	55.9516	27.20405		+		+		
Hormozgan	Bandar abbas	Prosopis	56.41758	27.26094		+		+		
Hormozgan	Qeshm	Chet	55.99301	26.86196			+			+
Bushehr	Bushehr	Bougainvillea	50.8375	28.90736		+				
Kohgiluyeh-Boyer Ahmad	Gachsaran	Gum trees	50.80364	30.35784		+			+	
Khuzestan	Ahvaz	Conocarpus	48.83773	31.59649		+				
Khuzestan	Behbahan	Bitter orange	50.21789	30.60586	+					
Ilam	Dehloran	Oak	47.27399	32.68503		+				
Sistan-Baluchestan	Iranshahr	Thorn trees	60.68767	27.20847		+		+		

با توجه به نتایج به‌دست آمده زنبورهای عسل کوچک در ایران از لحاظ باکتری‌های لاکتوباسیلوس موجود در دستگاه گوارش به ۳ گروه زنبوران ۱) جیرفت، کهنوج، رودان، بندرعباس، بوشهر، اهواز، دهلران، ایرانشهر، گچساران ۲) جهرم، فسا و بهبهان و ۳) قشم گروه‌بندی شدند (شکل ۲) که زنبورهای گروه اول دارای باکتری *L. kunkeei*، گروه دوم باکتری *L. plantarum* و گروه سوم باکتری *L. apis* بودند.

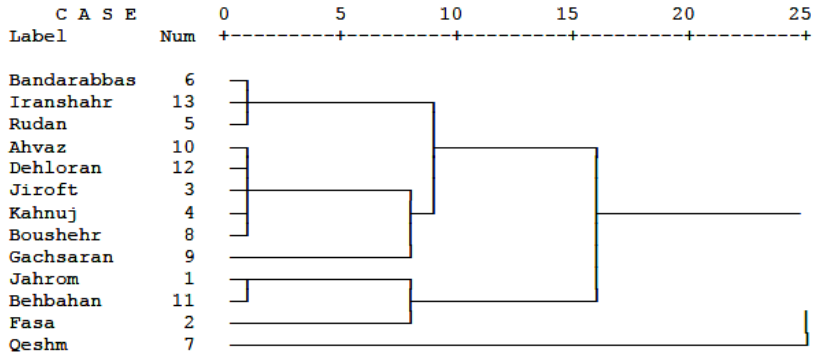
همچنین گروه‌بندی دیگری براساس باکتری‌های انتروکوکوس موجود در دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک انجام شد که بر این اساس زنبورها به ۴ گروه زنبورهای ۱) رودان، بندرعباس، ایرانشهر، ۲) بهبهان، دهلران، جهرم، بوشهر، اهواز، جیرفت، کهنوج، فسا ۳) گچساران و ۴) قشم گروه‌بندی شدند (شکل ۳). به طوری‌که باکتری *E. faecium* از سه منطقه رودان، بندرعباس و قشم جداسازی شد و باکتری *E. faecalis* و *E. hirae* به‌ترتیب تنها از زنبورهای منطقه گچساران و قشم جداسازی و شناسایی شدند. همچنین نتایج نشان داد که زنبورهای مناطق دیگر (گروه دوم) فاقد باکتری‌های انتروکوکوس می‌باشند. به‌طور کلی نتایج نشان داد که تنوع باکتری‌های انتروکوکوس در زنبورهای عسل کوچک ایرانی بسیار کم بوده و تنها از برخی از مناطق این گونه باکتری شناسایی شد.

در نهایت گروه‌بندی زنبورها بر اساس تمامی باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش انجام شد که بر این اساس زنبورهای به ۵ گروه زنبورهای ۱) رودان، بندرعباس، ایرانشهر، ۲) اهواز، دهلران، جیرفت، کهنوج و بوشهر ۳) گچساران ۴) جهرم، فسا و بهبهان (زنبورهای جهرم و بهبهان نزدیکی بیشتری با هم داشتند) ۵) قشم گروه‌بندی شدند. که نشان دهنده این است که ۴ توده مختلف زنبور عسل کوچک از لحاظ باکتری‌های همزیست در ایران وجود دارد (شکل ۴). نتایج این گروه‌بندی نشان داد که تقریبا مناطق با عرض جغرافیایی پایین‌تر در یک گروه (گروه اول) قرار گرفتند که از دستگاه گوارش این گروه از زنبورها باکتری *E. faecium* جداسازی شده بود، بنابراین با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که پراکنش باکتری‌های *E. faecium* همزیست دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک با عرض جغرافیایی منطقه همبستگی مثبتی دارد به‌طوری‌که فقط در مناطق با عرض جغرافیایی پایین سویه‌های مختلف مربوط به گونه باکتری مذکور از دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک جداسازی و شناسایی شد و زنبوران حاوی این باکتری در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند.



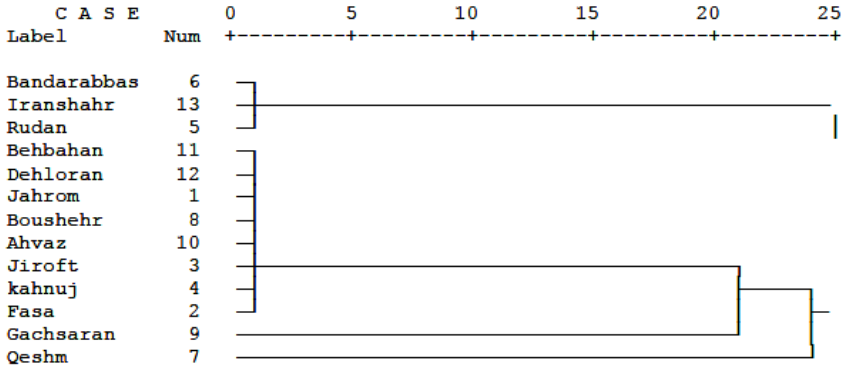
شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای جمعیت زنبورهای عسل کوچک با استفاده از تنوع باکتری‌های لاکتوباسیلوس همزیست

Fig 2- Dendrogram of cluster analysis based on *Lactobacillus* bacteria



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای جمعیت زنبورهای عسل کوچک با استفاده از تنوع باکتری‌های انتروکوکوس همزیست

Fig 3- Dendrogram of cluster analysis based on *Enterococcus* bacteria



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای جمعیت زنبورهای عسل کوچک با استفاده از تنوع تمام باکتری‌های اسید لاکتیک همزیست

Fig 4- Dendrogram of cluster analysis based on Lactic acid bacteria

زنبورهای عسل کوچک در نیمه جنوبی ایران از لحاظ خصوصیات مرفولوژیکی زنبورها را به دو گروه ۱) زنبورهای فارس، خوزستان و کهکیلویه و بویراحمد ۲) زنبورهای بوشهر، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، کرمان دسته‌بندی شده است (Parichehreh *et al*., 2013) همچنین با مطالعه خصوصیات مرفولوژیکی زنبورعسل کوچک در مناطق جنوبی کشور این زنبورها به دو گروه، ۱) زنبوران استان‌های غرب و جنوب غربی ایران با عرض جغرافیایی بالاتر و ۲) زنبورهای جنوب و جنوب شرقی ایران با عرض جغرافیایی پایین‌تر دسته‌بندی شده است (Tahmasebi *et al*., 2002) که این نتایج در مقایسه با تحقیق حاضر تقریبا مشابه می‌باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که زنبورهای جمع‌آوری شده از منطقه فارس و خوزستان که از باغ‌های مرکبات جمع‌آوری شده بودند دارای باکتری *L. plantarum* و مناطق مربوط به گروه اول که باکتری *L. kunkeei* داشتند دارای پوشش گیاهی غیر مرکبات بودند (جدول ۱). همچنین باکتری‌های *L. apis* و *E. hirae* تنها از جزیره قشم به‌دلیل متفاوت بودن شرایط آب و هوایی و پوشش گیاهی خاص و عرض جغرافیایی پایین‌تر نسبت به بقیه مناطق، جداسازی شدند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پوشش گیاهی و شرایط آب و هوایی و عرض جغرافیایی روی تنوع باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش زنبورعسل تاثیر به‌سزایی دارد (جدول ۱). باکتری *E. faecalis* نیز فقط از زنبورهای منطقه گچساران جداسازی شد (جدول ۱).

تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است به‌دلیل متفاوت بودن منابع شهد و گرده و یا وجود باکتری‌های مختلف روی گل‌ها در مناطق مختلف باشد. مثلا ممکن است که باکتری‌های اسید لاکتیک روی گل‌ها وجود داشته و از طریق شهد وارد دستگاه گوارش زنبور شده و فعال شوند. میکروارگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش زنبور در هنگام ذخیره گرده در شان کندو به آن اضافه می‌شوند و برخی باکتری‌ها هم در دستگاه گوارش زنبور باقی می‌مانند. علاوه بر آن باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در زنبورعسل با تغییر منطقه جغرافیایی و حتی در طول فصل‌های مختلف نیز تغییر می‌کنند.(Vasquez *et al*., 2009) محققین معتقدند که باکتری‌ها در حین جمع‌آوری غذا از طریق شهد و گرده وارد کلنی زنبورعسل می‌شوند. هنگامی که یک شکوفه گل تازه باز می‌شود عاری از میکروب است ولی در طول زمان توسط میکروارگانیسم‌های موجود در هوا و یا حشرات مختلف آلوده می‌شود. ترکیب و تعداد میکروارگانیسم‌ها ممکن است که در طول زمان و با تغییر منابع شهد و گرده، حشرات بازدیدکننده و همچنین تغییرات دما تغییر کنند. مطالعات زیادی باید انجام شود تا دقیقا مشخص شود که آیا اجتماع باکتری‌های دستگاه گوارش زنبورعسل در طول فصل‌های مختلف تغییر

می‌کند یا نه. تاثیر مناطق جغرافیایی، فصل، سن و نوع غذا روی پراکندگی باکتری‌های دستگاه گوارش زنبورهای عسل، زنبورهای وسپا (وحشی) و سوسری با استفاده از روش‌های ژنتیکی در مناطق مختلف کشور چک بررسی شده و با توجه به رژیم‌های غذایی متفاوت این حشرات مشخص شد که رژیم‌های غذایی اثر خیلی مهمی روی پراکندگی باکتری‌های داخل دستگاه گوارش این حشرات داشته است (Mrazek *et al*., 2008). مطالعه روی باکتری‌های همزیست لاروهای زنبور عسل اروپایی و آفریقایی نشان داد که باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش با توجه به نوع تغذیه، نوع اجتماع و فون تغییر می‌کنند (Vojvodic *et al*., 2013) که این نتایج تایید کننده نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مبنی بر تنوع باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک به علت تفاوت پوشش گیاهی مناطق و در نتیجه تفاوت رژیم‌های غذایی زنبورعسل در مناطق مختلف کشور می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داد که درجه حرارت، رطوبت، پتانسیل اسمزی محیط و اسیدیته شهد گل روی مجموعه باکتریایی روده زنبور عسل تاثیرگذار است (Anderson *et al*., 2013).

مطالعاتی در مورد سایر حرات و تک یاخته‌های همزیست با آن‌ها انجام شده است. برای مثال مطالعه‌ای روی همزیست‌های *Bemisia tabaci* در کشور هند انجام شده است که بر این اساس نمونه‌برداری‌ها از ۱۴ منطقه مختلف این کشور انجام شد. محققین با استفاده از 16Sr RNA توانستند همزیست‌های اولیه و ثانویه موجود در دستگاه گوارش *Bemisia tabaci* را شناسایی کنند. نتایج آنالیز خوشه‌ای نشان داد که بین پراکنش همزیست‌های *Bemisia tabaci* و گیاهان میزبان همبستگی معنی‌داری وجود دارد (Shalini *et al*., 2012). در تحقیقی که روی *Acyrthosiphon pisum* در ژاپن انجام شد، با استفاده از روش PCR موفق به جداسازی و شناسایی ۱۱۹ همزیست متعلق به ۸۱ منطقه شدند که ۳۸/۷ درصد متعلق به همزیست PASS، ۱۶ درصد PAUS، ۸/۴ درصد *Rickettsia*، ۳/۴ درصد *Spiroplasma* و ۳۳/۶ درصد *Buchnera* بودند (Tsuchida *et al*., 2002). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که همزیست‌های موجود در دستگاه گوارش *Acyrthosiphon pisum* در مناطق مختلف متفاوت می‌باشند و پراکنش همزیست‌های حشره مذکور در مناطق مختلف با پوشش گیاهی منطقه، دما و بارندگی ارتباط معنی‌داری دارد. به‌طور کلی نتایج این تحقیقات با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مبنی بر تفاوت همزیست‌های دستگاه گوارش زنبور به علت تفاوت پوشش گیاهی، شرایط جغرافیایی و آب و هوایی زیستگاه آن‌ها هم‌خوانی دارد.

References

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M. and Corby-Harris, V. 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). Plos One, 8(12): e83125.

Audisio, M. C., Torres, M. J., Sabaté, D. C., Ibarguren, C. and Apella, M. C. 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. Microbiological Research, 166(1): 1-13.

Engel, P. and Moran, N. A. 2013. The gut microbiota of insects–diversity in structure and function. FEMS Microbiology Reviews, 37(5): 699-735.

Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS microbiology letters, 155(1): 1-10.

Gilliam, M. and Prest, D.B. 1987. Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology, 49: 70-75.

Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Doskocil, I., Tyl, J., Kamler, M., Titera, D., Hakl, J., Mrazek, J., Bunesova, V. and Rada, V. 2015. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PloS one, 10(3): 0118707.

Kešnerová, L., Moritz, R. and Engel, P. 2016. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(1): 414–421.

Kwong, W. K. and Moran, N. A. 2013. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov. Orbales ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the Gammaproteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(6): 2008–2018.

Mossadegh, M. S. 2014. Know the dwarf honey bee *Apis florea* F. (Hymenoptera: Apidae). Pak Pendar Press, Karaj, Iran, 470 pp.

Mossadegh, M. S. 1993. New Geographical Distribution Line of *Apis florea* F. in IRAN, Asian Apiculture, Wicwas Press, Cheshire , U. S. A., PP: 64-66.

Mrazek, J., Strosova, L., Fliegerova, K., Kott, T. and Kopecny, J. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. Folia Microbiologica, l53: 229-233.

Olofsson, T. C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, E. and Vasquez, A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov. *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(9): 3109–3119.

Olofsson, T.C. and Vasquez, A. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial Flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. Curr Microbiol, 57:356-363.

Parichehreh, SH., Farshineh Adl, MB. and Fallahzadeh, M. 2013. Study and comparison of morphological characteristics of dwarf honey bees, *Apis florea* F. (Hymenoptera, Apidae) in Iran. Journal of Entomological Research, 5(4): 315-330.

Pattabhiramaiah, M., Reddy, M. S. and Brueckner, D. 2012. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus spp.* in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. International Journal of Environmental Sciences, 2(3): 1135-1143.

Rajendhran, J. and Gunasekaran, P. 2010. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. Microbiological Research, 166(2): 99-110.

Ruttner, F. 1985. Graded geographic variability in honey bee and environment. Pszczelnicze-Zeszyty-Naukowe, 29: 81-92.

Ruttner, F., Mossadegh, M. S. and Kauhausen-Keller, D. 1995. Distribution and variation of size of *Apis florea* V in Iran . Apidologie, 26(6): 477-486.

Scardovi, V. and Trovatelli, D. 1968. New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg**,** 123(1): 64–88.

Shalini, T., Natarajan, G., Jitendra, K., Vipin, S., Ellango, C., Adita, J., Garima, P. and Raman, R. 2012. Diversity and phylogenetic analysis of endosymbiotic bacteria from field caught *Bemisia tabaci* from different locations of North India based on 16S rDNA library screening. Infection, Genetics and Evolution, 12(2): 411–419.

Tahmasebi, G., Ebadi, R., Tajabadi, N., Akhondi, M. and Faraj, S. 2002. The effects of geographical and climatological conditions on the morphological variation and separation of Iranian small honeybee (*Apis florea* F.) populations. JWSS-Isfahan University of Technology, 6(2): 169-176.

Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M. Y. A. and Mustafa, S. 2013. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. Journal of Agicultural Research, 52(5): 235-241.

Tajabadi, N., Mardan, M., Mustafa, S., Feizabadi, F., Nateghi, L., Rasti, B. and Manap, M. Y. A. 2012. *Weissella sp.* Taj-Apis, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. Journal of Food, Agriculture and Environment, 10(2): 263-267.

Tajabadi, N., Mardan, M., Shuhaimi, M., Abdul Manap, M. Y. 2011. Isolation and Identification of *Enterococcus spp.* from Honey stomach of honeybee based on biochemical and 16S rRNA sequencing analysis. International journal of Probiotic and perbiotic, 6(2): 95-99.

Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T. and Fukatsu, T. 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. Molecular Ecology, 11(10): 2123-2135.

Vasquez, A., Olofsson, T. C. and Sammataro, D. 2009. A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA- A comparison with bees from Sweden. Apidologie, 40(1): 26-28.

Vojvodic, S., Rehan, S. and Anderson, K. 2013. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars, PloS One, 8(8): 1-9.

Yoshiyama, M. and Kimura, K. 2009. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology, 102(2): 91–96.

Journal of Entomological Research

Volume 9, Issue 2, pages: 143-154

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

Bacterial diversity of *Apis florea* F. (Hym., Apidae) in Iran

Sh. Parichehreh[1], G. H. Tahmasbi[2*], A. Sarafrazi[3], S. Imani[4], N. Tajabadi[5]

1- Ph. D Student, Department of Agricultural Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Professor, Honey bee Department, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Edcucation and Extention Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Insect Taxonomy Research, Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Edcucation and Extention Organization (AREEO), Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Agricultural Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5- Expert Researcher, Department of honeybee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Edcucation and Extention Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Apis florea F. and *Apis mellifera* L. are two honey bee species in Iran. Distribution of *Apis florea* starts from Paveh in Kermanshah province (located in west of Iran) and ends to Sistan-Baluchestan province (located in south east of Iran). The current study was carried out by collecting 1400 worker bees from 14 different colonies located in southern regions of Iran. The samples were kept in sterile test tubes containing normal saline. The specific media were used to isolate *Lactobacillus* bacteria from digestive tracts of the bees. Biochemical tests and DNA extraction were done to identify the colonies. In addition, the colonies were characterized by sequencing 16S rRNA gene using specific primers (27F and 1492R). Since bacterial diversity in digestive tracts is of the approaches for classifying insects from phylogenetic point stand, sequencing was done on 43 colonies of bacteria. The results showed that eight isolates were related to three species (*Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus apis*). Basis on the results, the dwarf honey bee in Iran phylogenetically clustered in five distinct clades in terms of bacterial diversity in digestive tracts. The clades were: 1): Roudan, Bandar-Abbas, Iranshahr 2) Jiroft, Kahnuj, Bushehr, Ahwaz, Dehloran 3) Gachsaran 4) Jahrom, Fasa, Behbahan and 5) Qeshm population. Furthermore, the results indicated that Lactic acid bacterias found in digestive tracts depends on nectar and pollen feeding by this wasp in the geographically different localities.

Key words: Dwarf honey bee, Lactic Acid Bacteria, Bacterial diversity, Iran

* Corresponding Author, E-mail*: Tahmasbigholamhosein@yahoo.com*
Received:25 Feb. 2017 – Accepted: 7 Sep. 2017