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

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۷ ، شماره ۳، سال ۱۳۹۴، (۲۰۹-۲۱۸)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در مناطق کردستان، خوزستان و اصفهان

ندا پالوانه[1*]، ابراهیم سلیمان نژادیان[2]، روح الله رجبی[3]، فروغ یاقوت نژاد[1]

۱- گروه حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
۲- دانشیار، گروه حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول

چکیده

با استفاده از نشانگر ریزماهواره ISSR به منظور جداسازی جمعیت‌های زنبور عسل (*Apis mellifera* L.)، سه استان کردستان، خوزستان و اصفهان مقایسه شدند. استخراج DNA از زنبورهای کارگر با استفاده از روش بهینه نمکی صورت گرفت. تکثیر با چهار جفت آغازگر ISSR صورت گرفت. باندهای حاصل با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل رویت گردید. الگوی باندی بر اساس حضور باند (یک) یا عدم حضور(صفر) نمره‌دهی شد. پس از تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۵ باند تولید شد. از این تعداد، ۸ باند با میزان (۸۴/۵۲) درصد چند شکل بودند. دندروگرام این جمعیت‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و روش تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی با استفاده از نرم افزار NTSYS رسم شد و جمعیت‌ها در دو گروه مشخص قرار گرفتند. جمعیت‌های کردستان و خوزستان در یک گروه و جمعیت اصفهان در یک گروه مجزا قرار گرفتند .دو استان کردستان و خوزستان بیشترین شباهت را دارا بودند.

واژه‌های کلیدی: ریزماهواره، زنبور عسل، تنوع ژنتیکی، **ISSR**

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *nedapalvaneh@gmail.com*
تاریخ دریافت مقاله (۹۲/۸/۲۱) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۳/۹/۲۶)

مقدمه

تولید عسل و گرده‌افشانی از بهترین بازده اقتصادی فعالیت زنبوران عسل به شمار می‌روند. هدف اصلی اجرای برنامه‌های اصلاح نژاد زنبور عسل، افزایش تولید محصولاتی مانند عسل، گرده، ژله رویال است. در ضمن آرام بودن و تمایل به بچه دادن، از ویژگی‌های یک کلنی خوب زنبور عسل است که این امر با استفاده از منابع ژنتیکی و تنوع موجود در آن میسر می‌گردد. استفاده از خصوصیات مرفولوژیک برای تفکیک نژادها و توده‌های زنبورعسل از زمان‌های دور رایج بوده است (Ruttner, 1988). تا کنون اطلاعات موجود درباره ژنوتیپ‌های مختلف زنبورعسل در ایران از طریق بررسی صفات مرفولوژیکی به‌دست آمده است. اگرچه چنین اطلاعاتی به جای خود ارزشمند می‌باشد. اما به دلیل تاثیر شرایط اقلیمی مرفولوژی حشره تعیین شباهت‌ها چندان معتبر نیست. برای از بین بردن چنین مشکلاتی شناسایی دقیق‌تر ژنوتیپ‌های زنبورعسل الزامی بوده و در این راستا و به‌منظور رسیدن به این هدف روش کلاسیک به تنهایی کافی نبوده و به نشانگرهای مولکولی به‌عنوان مکمل شناسایی نیاز می‌باشد. کاربرد نشانگرها موجب تسریع پروژه‌های اصلاحی شده و در افزایش تولید محصولات زراعی و دامی سهم اساسی دارند (Vuylsteke *et al*., 2000). نشانگرهای ریزماهواره از جمله نشانگرهایی هستند که اختلاف ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را در سطح نژاد نشان می‌دهند و ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشند. (Barriere, *et al*., 2001; Agrawal *et al*., 1999; Bernardo, 2001). توالی‌های احاطه کننده جایگاه‌های ریزماهواره‌ای در داخل یک گونه یا در گونه‌های داخل یک جنس و ندرتا در جنس‌های خویشاوند مشخص می‌باشند و از آن‌ها می‌توان برای طراحی آغازگر به‌منظور تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره‌ای استفاده نمود. ISSR نشانگر مولکولی با کاربرد آسان است که به مقدار بسیار اندک DNA الگو برای بررسی ریزماهواره‌ها کفایت می‌کند. بنابراین نمونه‌گیری از موجودات بدون از بین رفتن آن‌ها امکان‌پذیر می‌شود. فراوانی ریز ماهواره‌ها در ژنوم، سطح بالای تنوع آللی در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای و سهولت به‌کارگیری این نشانگرها، آن‌ها را در نشانگرهای ژنتیکی مشهور ساخته است. استفاده گسترده از نشانگرهای ISSR در ژنتیک کرم ابریشم تایید این امر است. از این رو روشی عالی برای نقشه‌یابی ژنتیکی کرم ابریشم و زنبور عسل می‌باشد (Reddy *et al*., 1999) زیرا تعیین وضعیت ژنتیکی موجودات زنده زیر بنای اصلاح نژاد آن‌ها در هر منطقه است. به همین منظور این تحقیق جهت تعیین روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل سه استان کشور ایران با استفاده از نشانگر ISSR انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی ژنتیکی توده‌های زنبور عسل از سه استان (خوزستان، کردستان، اصفهان) نمونه‌برداری شد. از هر استان از ۳–۵ کلنی و از هر کلنی ۱۰ زنبور کارگر به‌صورت تصادفی توسط آسپیراتور جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور استخراج DNA زنبور عسل از روش بهینه نمکی استفاده شد. بدین صورت که حشره کامل توسط ازت مایع به‌صورت پودر درآمده و درون میکروتیوب ۱/۷ قرار داده شد. برای جداسازی DNA، ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Tris-HCl 10mM، EDTA 2mM، NaCl 0.4mM) و ۴۰ میکرولیتر SDS ۲۰ درصد به مجموعه اضافه (Reddy *et al*. 1999) و به‌مدت کوتاه (۵ ثانیه) ورتکس و درون حمام بن ماری در دمای ۶۵ درجه به‌مدت ۲ ساعت قرار داده شد. پس از خارج کردن نمونه‌ها ۳۰۰ میکرولیتر Nacl ۴/۵ مولار به آن‌ها افزوده و مجددا به‌مدت کوتاه (۱۵ تا ۳۰ ثانیه) سر و ته شد. نمونه‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و پس از آن مایع‌رویی به تیوب‌های ۱/۷ جدید انتقال داده شد.

هم حجم مایع به آن کلروفرم افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه مجددا سانتریفوژ شد. مایع‌رویی به تیوب‌های جدید انتقال داده و دو برابر حجم اتانول مطلق سرد و یک دهم حجم استات سدیم به تیوب‌ها افزوده شد. پس از کمی سر و ته کردن (برای دیدن کلاف) درون فریزر در منفی ۲۰ برای یک شب قرار داده‌شد (Chatterjee & Mohandas, 2003). روز بعد برای دیدن پلیت، مجموعه را به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده، و پلیت‌ها با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و مجددا به مدت۲ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس الکل موجود در تیوب‌ها را دور ریخته و پلیت‌ها در دمای اتاق حدودا برای ۲ ساعت نگه داشته شدند تا به‌طور کامل خشک شوند.۵۰ میکرولیتر آب استریل (دو بار تقطیر) به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)[1]

۱۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۴ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر آغازگر و ۱/۸ میکرولیتر DNA ژنومی و ۸/۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده پس از آماده‌سازی در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار داده شد. مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس در ۲ دقیقه، مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس در ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۴۵ تا ۵۲ درجه سلیسیوس (بسته به آغازگر مورد استفاده) در ۴۵ ثانیه، و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس در۲ دقیقه، و به تعداد ۴۵ چرخه تکرار شد و جهت تکمیل سنتز DNA مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

الکتروفورز محصول PCR

الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت. ۱۰ میکرولیتر از هر یک از محصولات نهایی واکنش (۱۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۴ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر آغازگر و ۱/۸ میکرولیتر DNA ژنومی و ۸/۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر) بر روی ژل ۲ درصد در توان ۷۰ وات به مدت ۳ الی ۴ ساعت بارگذاری شد. در انتهای ردیف چاهک از یک مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی استفاده شد. پس از الکتروفورز محصول PCR، از طرح ایجاد شده توسط نشانگر ISSR روی ژل با استفاده از دستگاه BioDoc Analyzer و سیستم تصویربرداری اشعه UV تصویربرداری شد.

آنالیز داده‌ها

پس از وارد کردن داده‌ها به‌صورت صفر و یک در نرم افزار اکسل، از نرم افزار NTSYS 2.02 برای اندازه‌گیری فاصله یا تشابه ژنتیکی بر اساس ضریب جاکارد (Jaccard, 1908) و رسم دندروگرام حاصل از آنالیز خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA[2] انجام شد.

[1] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[2]Unweighted Paris Group Method Alitmetic Average

نتایج و بحث

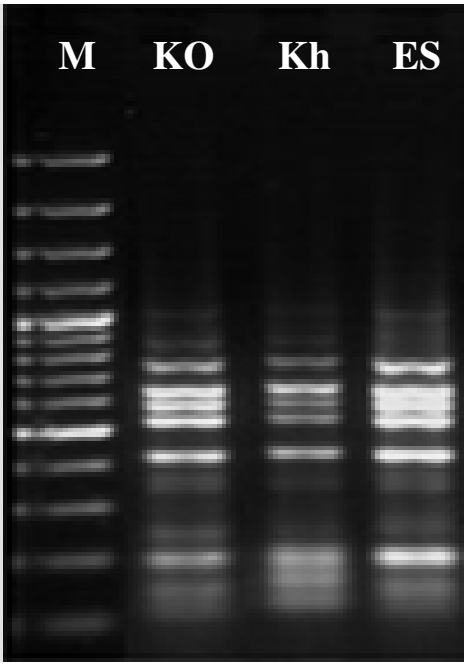
ISSR ابزاری مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی حشرات می‌باشد (Black *et al*., 1992). نتایج آزمایش‌ها نیز این نشانگر غالب را به‌عنوان ابزاری مفید در نقشه‌یابی ژنتیکی زنبور عسل و انگشت نگاری ژنتیکی پیشنهاد می‌کنند (Reddy *et al*., 1999; Zietkiewicz *et al*., 1994). پس از آزمایش ۴ جفت آغازگر متفاوت و تعیین توالی آن‌ها و چند شکلی، تمام آغازگرها از لحاظ شفافیت و باند، دارای باندهای قابل قبول بودند. در تمامی آغازگرها باندهای تشکیل شده بین ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ جفت باز بودند. آغازگر ۱(P1) کمترین و آغازگر۴ (P4) حداکثر درصد چند شکلی با میزان (۴۲/۸۵) درصد را نشان دادند. حداکثر محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگر ۴ دلیل مشهود بر چند شکلی زیاد و از طرفی بیانگر کارایی بالای این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت‌ها و مناسب بودن نوع آغازگر انتخابی در بین آغازگرهای مورد مطالعه می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده تکنیک ISSR روش مناسبی برای تشخیص میزان چند شکلی در زنبور عسل است اما با توجه به چند شکلی آغازگرهای مورد مطالعه لزوم استفاده از آغازگرهای دیگر با توالی‌های متفاوت ممکن است نتایج متفاوتی به دنبال داشته باشد. بررسی محدوده قطعات تکثیر شده در مطالعه انجام شده از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز در آغازگرهای متناوب متغییر است که در تحقیقات دیگر این میزان ۳۰۰۰-۳۵۰ و ۸۵۰-۱۰۰ جفت باز بود (Paplauskiene *et al*., 2006; Al-Otaibi, 2008) .

جدول۱- لیست آغازگرها، توالی آن‌ها و چند شکلی مشاهده شده در نژادهای زنبور عسل

Tabel 1- Primers list, sequence & polymorphism observed in honey bees races

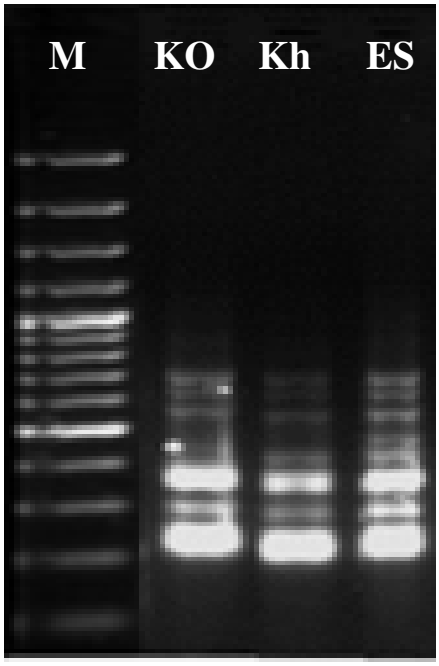
No	Primer	Rang of fragment Sizes (bp)	Temperature of the primer	Total number of fragments	Number of polymorphic fragments	Percent of polymorphic fragments	Polymorphism Information Content
P1	$(AGA)_5$ GT	100- 100	52	12	1	8.33	0.111
P2	$(GAG)_5$ AC	200- 750	52	9	2	22.22	0.148
P3	$(GAG)_5$ AA	150- 700	52	9	1	11.11	0.049
P4	$(ACA)_5$ CG	200- 100	52	7	3	42.85	0.253
Total		-	-	45	8	84.52	0.562
Average		-	-	-	-	16.90	0.112

الگوی باندهای تشکیل شده به‌وسیله هر آغازگر در بررسی تنوع ژنتیکی زنبور عسل ایران در تصاویر زیر نمایش داده شده است (اشکال ۱ تا ۴) این موضوع بیانگر این است که آغازگر ۵ بیشترین باندهای چند شکل و آغازگر ۱ کمترین باندهای چند شکل را دارا می‌باشد. محاسبه باند های چند شکل وتک شکل در میان تمام ژنوتیپ‌ها، نشان می‌دهد که نشانگر ISSR توانایی تمایز و تعیین رابطه ژنتیکی بین سه جمعیت زنبور عسل را دارد که نتایج به‌دست آمده با Al-Otaibi(2008) و Paplauskiene (2006) و همکاران مطابقت داشت.



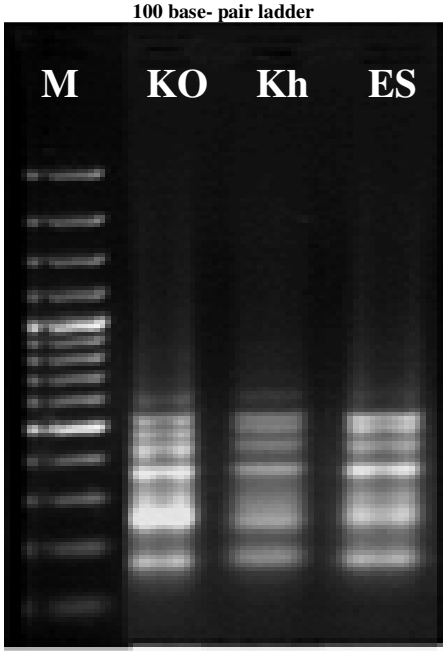
شکل۱- ژل آگارز ۲ درصد آغازگر ۱ با استفاده از مارکر **100 bp**

Fig. 1- Agarose gel 2% primer 1(P1) with molecular marker 100 base- pair ladder



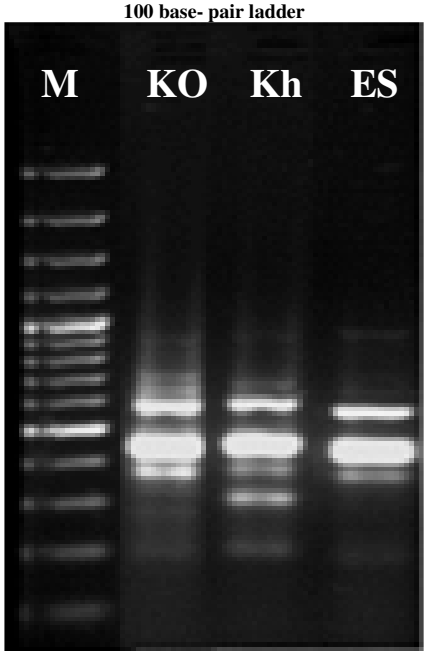
شکل۲- ژل آگارز ۲ درصد آغازگر۳ با استفاده از مارکر **100 bp**

Fig. 2- Agarose gel 2% primer 2(P2) with molecular marker 100 base- pair ladder



شکل۳- ژل آگارز ۲ درصد آغازگر ۴ با استفاده از مارکر **100 bp**

Fig. 3- Agarose gel 2% primer 3(P3) with molecular marker 100 base- pair ladder

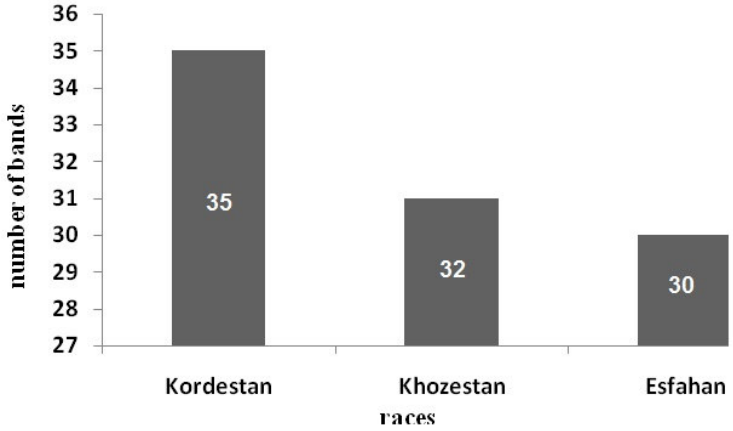


شکل۴- ژل آگارز ۲ درصد آغازگر ۵ با استفاده از مارکر **100 bp**

Fig. 4- Agarose gel 2% primer 4(P4) with molecular marker 100 base- pair ladder

(M= Marker, Ko= Kordestan, Kh= Khozestan, Es= Esfahan)

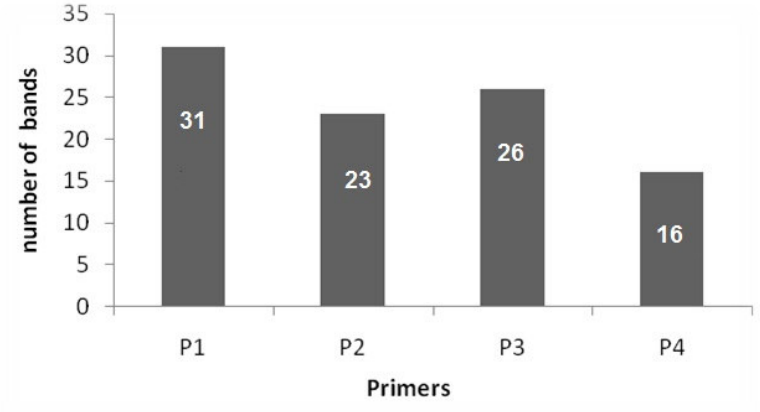
در این تحقیق بیشترین تعداد باند تولید شده در جمعیت کردستان با ۳۵ باند، اصفهان با ۳۰ باند کمترین باند تولید شده و بعد از آن نیز خوزستان با ۳۱ باند قرارگرفت (شکل ۵). نتایج به‌دست آمده نشان داد باندهای ISSR در تکرارهای فراوان بروی نژادهای مختلف بسیار تکرار پذیر هستند که در مقایسه با سایر تکنیک‌های مولکولی حتی در میان نژادهای نزدیک نیز الگوهای متفاوتی از باندها را آشکار می‌سازند که با سایر پژوهش‌ها تا حدودی مطابقت دارد (Al-Otaibi, 2008).



شکل۵- تعداد باندهای تولید شده در هر جمعیت زنبور عسل سه استان مورد مطالعه

Fig. 5- The number of bands produced in the bee population of three provinces

در میان آغازگرهای مورد مطالعه در نژادهای زنبور عسل آغازگرهای ۱ و ۳ بیشترین تعداد باندهای تکثیر شده (به‌ترتیب ۳۱ و ۲۶ باند) را دارا هستند (شکل ۶). بیشترین تعداد باندها را در آغازگرهایی که دارای توالی AGA و GAG بودند به‌دلیل وجود توالی‌های A+G و A+C در ژنوم زنبور ابوت عسل مشاهده کرد (Abott, 2001).



شکل۶- تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای جمعیت زنبور عسل سه استان مورد مطالعه

Fig. 6.-The number of bands produced by each primer for honey bees populations of three provinces

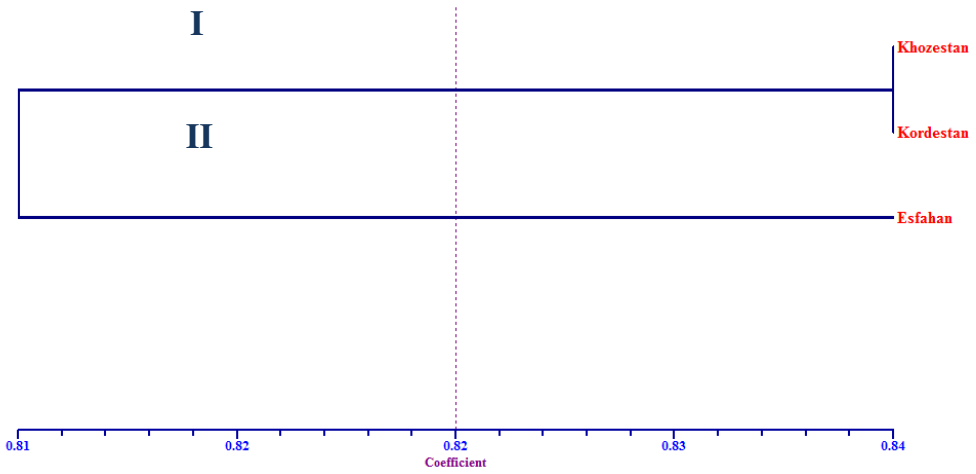
در روش ISSR به انجام کلونینگ و توالی‌یابی ناحیه متصل به ریزماهواره که روشی پر هزینه است نیاز نیست. به دلیل این امر ISSR را می‌توان به‌عنوان بهترین نشانگر برای نژادهای بررسی شده معرفی کرد. این نشانگر به خوبی درصد بالایی از میزان چند شکلی را با میانگین ۱۶/۹۰ درصد نشان داد. این میزان بالای چند شکلی آن‌ها را جهت بررسی‌های تنوع ژنتیکی افراد و جمعیت‌ها مناسب ساخته است. بین زنبورهای نمونه‌برداری شده از سه استان بیشترین شباهت بین زنبورهای استان خوزستان و کردستان با (۰/۸۴) و بیشترین فاصله ژنتیکی در نمونه‌های اصفهان (۰/۲۰) با دو استان دیگر مشاهده شد. بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده، تعداد کم افراد انتخاب شده در هر نسل و آمیزش خویشاوندی شدید بین دو جمعیت کردستان و خوزستان به‌دلیل تبادل زیاد کلنی بین این دو استان موجب شده که تنوع درون گونه‌ای این جمعیت‌ها شدیدا کاهش یابد.

جدول۲- ضریب تشابه ژنتیکی (قسمت پایین) و فاصله ژنتیکی (قسمت بالا) بین سه جمعیت زنبور عسل بر اساس نشانگر ISSR

Tabel 2- The genetic similarity coefficient (the low part) and genetic distance (The top part) between three population of bees based on ISSR marker

population	Kordestan	Khozestan	Esfahan
Kordestan	****	0.15	0.20
Khozestan	0.84	****	0.18
Esfahan	0.79	0.81	****

آنالیز خوشه‌ای و دندروگرام حاصل براساس روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد سه جمعیت مورد مطالعه را در گروه‌های متفاوتی قرار داده است. دو جمعیت کردستان و خوزستان مجزا از جمعیت دیگر در گروه I قرار گرفتند که نشان دهنده شباهت زنبورهای این دو استان نسبت به‌هم است. یکی از دلایل شباهت بین زنبورهای عسل این دو استان را میزان داد و ستد زیاد کلنی توسط زنبورداران این دو استان و کوچ به استان دانست. پس از مطالعه در مورد جمعیت استان اصفهان و نتایج به‌دست آمده مشخص شد که جمعیت زنبورهای استان اصفهان مجزا از گروه اول در گروه II قرار می‌گیرد (شکل۷).



شکل۷- دندروگرام حاصل از آنالیز خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA با ماتریس تشابه جاکارد برای جمعیت‌های سه زنبور از سه استان

Fig. 7- Dendogram generated by UPGMA Cluster analysis based on Jaccard's coefficient for populations of bees from three provinces

نتایج به‌دست آمده به وضوح نشان می‌دهد که نشانگر ISSR برای تعیین ژنوتیپ و انگشت‌نگاری سه جمعیت مورد مطالعه مناسب می‌باشد که نتایج به‌دست آمده با نتایج Al-Otaibi و Paplauskiene مطابقت دارد. (Paplauskiene *et al*., 2006; Al-Otaibi, 2008) همچنین Roux *et al*., 2007 اثبات کرد که ISSR- PCR یک ابزار مناسب برای آنالیز و تمایز ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *Plutella xylostella* L. در مناطق جغرافیایی مختلف می‌باشد. Dusinsk *et al*., 2006 با استفاده از نشانگر ISSR با موفقیت توانست ساختار تنوع درون و برون گونه‌ای سفید بالک‌ها را متمایز سازد.

تاکنون مطالعات زیادی روی تنوع ژنتیکی زنبور عسل با استفاده از نشانگرهای مختلف انجام شده است. برای مثال Tunca & Kence استفاده از نشانگر RAPD بروی نژادهای زنبور عسل ترکیه (Tunca & Kence, 2011) و ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR (Paplauskiene *et al*., 2006) صورت گرفته است. بنابراین به نظر می‌رسد که از تکنیک ISSR می‌توان به‌عنوان روش مناسبی برای تشخیص میزان چند شکلی و تنوع ژنتیکی در زنبور عسل استفاده نمود.

References

Abbot, P. 2001. Individual & population variation in invertebrates revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). Journal of Insect Science, 1: 8-11.

Agrawal, D. C., Sukumar, S. and May, L. 1999. Use of cross-species simple sequence repeat (SSR) primers for developing polymorphic DNA markers. Journal of New seeds, 1: 25-37.

Al-Otaibi, S. A. 2008. Genetic variability in mite-resistant honey bee using ISSR molecular markers. Arab Journal Biotechnology, 2: 241-252.

Barriere, Y., Gibelin, C., Argillier, O. and Mechin, V. 2001. Genetic analysis in inbred lines of early dent forage maizi. I-QTL mapping for yield, earliness, starch & crude protein contents from *pre se* value & top cross experiments. Maydica, 49: 253-266.

Bernardo, R. 2001. Breeding potential of intra & inter heterotic group crosses inmaize. Crop Sciences, 41: 67-71.

Black, W. C., DuTeau, N. M. and Puterka, G. J. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNApolymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms inaphids (Homoptera: Aphididae). Bulletin of Entomological Research, 82: 51-159.

Chatterjee, S. N. and Mohandas, T. P. 2003. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. Genome, 46: 439-447.

Dusinsky, R., Kudela, M., Stloukalova, V. and Jedlicka, L. 2006. Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between & within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). Biologia (Bratislava), 61: 299-304.

Jaccard, P. 1908. Nouvelle recherche distribution floral. Bulletin Societe Sciences. Nat. 44: 223

Paplauskiene, V., Ceksteryte, V., Pasakinskiene, I., Tamasauskiene, D. and Racye, J. 2006. The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. Biologica, 3: 16-20.

Reddy, K. D., Nagaraju, J. and Abraham, E. G. 1999. Genetic characterization of the silkworm (*Bombyx mori*) by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR. Heredity, 83: 681-687.

Ruttner, F. 1988. Biogeography & taxonomy of honeybees. Springer, Verlag, Berlin, Germany, 285: 55- 88

Roux, O., Gevrey, M., Arvanitakis, L., Gers, C., Bordat, D. and Legal, L. 2007. ISSR-PCR: Tool for discrimination & genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. Molecular Phylogenetics & Evolution, 43: 240–250.

Tunca, R. I. and Kence, M. 2011. Genetic diversity of honey bee (*Apis mellifera* L.; Hymenoptera: Apidae) population in Turky revealed by RAPD markers. African Journal of Agricultural Research, 6(29): 6217-6225.

Vuylsteke, M., Mank, R., Brugmans, B., Stam, P., and Kuiper, M. 2000. Further characterization of AFLP data as tool in genetic diversity assessment among maize (*Zea mays* L.) inbred lined. Molecular Breeding, 6: 256-276.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.

Journal of Entomological Research

Volume 7, Issue 3, pages: 209-218

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

Study on gentic diversity of the honey bee, *Apis mellifera* L. using microstatellite ISSR markers in three provinces of Iran

N. Palvaneh[1*], E. Soleyman-Nejadian[2], R. Radjabi[3], F. Yaghout nejad[1]

1- Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University Arak Branch, Arak, Iran
2- Associate Professor, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
3- Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University Dezful Branch, Dezful, Iran

Abstract

Microsatellite markers ISSR were used for isolation of *Apis mellifera* L. from populations of Kurdistan, Khuzestan and Esfahan. DNA was extracted from worker bees by optimized salting method. Reproducing was done by 4 pairs of ISSR Primers. The obtained bands were visible using 2% agaroz gel & satining with ethidium bromaid. The Bands pattern was recorded by presence (1) or absence (0) method. Total of 45 bands were observed which of 84.52 were diffrent.The cluster analysis based on jaccard similarity cofficient indicated the genetic distance. Populations of Kurdistan & Khuzestan were located in group (I) and Esfahan in group (II). Therefore, populations of Kurdistan and Khuzestan provinces showed the highest similarity.

Key Word: Microsatellite, Honey bee, Genetic Diversity, ISSR

* Corresponding Author, E-mail*: nedapalvaneh@gmail.com*
Received: 12 Nov. 2013 – Accepted: 17 Dec. 2014