

Comparison of Italian honeybees (*Apis Mellifera Ligustica*) and Caucasian honeybees (*Apis Mellifera Caucasica*) for identifying signatures of selection

Hadi Tavakoli

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: hadi.tavakoli.m.1997@gmail.com

Nemat Hedayat 

*Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: nhedayat@uma.ac.ir,

Reza Khalkhali-evrigh 

Animal Science Research Department, Ardabil Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ardabil, Iran. E-mail: rezakhalkhali110@gmail.com

Reza Seyed Sharifi 

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: reza_seyedsharifi@yahoo.com

Mirdarioush Shakouri 

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: mdshakouri@uma.ac.ir

Kobra Pourasad

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail: pahnakpourasad@gmail.com

Tanveer Hussein 

Department of Molecular Biology, Virtual University of Pakistan, Lahore, Punjab, Pakistan. E-mail: tanveer.hussain@vu.edu.pk

Abstract

Objective

The honeybee (*Apis mellifera*) is considered one of the most important insect species from an ecological and economic perspective. The honeybee provides an ideal model for utilizing population genomics to understand the evolutionary forces shaping the genomes of social insects. This study aimed to investigate and identify signatures of selection at the whole-genome level between the Italian and Caucasian honeybee breeds, considering the significance of these two breeds in honeybee-related production in Iran and globally.

Materials and Methods

The current study used whole-genome sequencing data of two subspecies of European honeybees available in the NCBI database. After applying quality control and filtration to the downloaded sequences, high-quality reads were aligned to the honeybee reference genome using BWA software. Subsequently, after applying various filters, high-quality SNPs were extracted using GATK software. In the next step, XP-EHH and Fst methods were employed to identify signatures of selection in the Italian honeybees compared to Caucasian bees. Additionally, to examine the genetic structure of the two studied breeds and to give a brief overview of their admixture and purity, the ADMIXTURE program was used.

Results

The analyses led to the identification of 847 genomic windows (containing 244 protein-coding genes) by the XP-EHH method, and 815 genomic windows (containing 439 protein-coding genes) by the Fst method. The results indicated that 19 genes were identified by both methods, and these genes were further investigated as final selection signatures. Among these genes, LOC72499, LOC551114, and LOC411919 were involved in immunity; LOC41390 in the foraging behaviors of workers; LOC413200 in cellular growth and development; LOC725885 in cellular differentiation, nursing, and foraging behaviors of bees as well as wing growth; LOC550886 in hygienic behaviors; LOC410393 in gut health and detoxification; and LOC408718 in growth of neural cells and the transformation of larvae into workers or queens. Identifying selection signatures can facilitate breeding strategies, disease management, and colony management. Furthermore, genomic information pertaining to various breeds enables the prediction of their behaviors in response to environmental challenges including climate changes.

Conclusion

Since traits such as behavior, foraging for food (nectar and pollen), cleanliness, colony defense, and immunity are among the most important and economically significant characteristics in honey bees, identifying the genes associated with these traits in the current study highlights the high potential of genomic data for better understanding the different breeds of honeybees.

Keywords: Caucasian honeybee, Italian honeybee, signature of selection, whole-genome sequencing

Paper Type: Research Paper.

Citation: Tavakoli, H., Hedayat, N., Khalkhali-evrigh, R., Seyed Sharifi, R., Shakouri, M., Pourasad, K., & Hussein, T. (2025). Comparison of Italian honeybees (*Apis Mellifera Ligustica*) and Caucasian honeybees (*Apis Mellifera Caucasica*) for identifying signatures of selection. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(3), 27-48.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(3), 27-48.

DOI: 10.22103/jab.2025.24103.1620

Received: March 17, 2025.

Received in revised form: June 02, 2025.

Accepted: June 03, 2025.

Published online: August 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors



Introduction

The western honeybee (*Apis mellifera*) is one of the most significant insect species in the world, both ecologically and economically. As a key pollinator of agricultural and wild plants, the honeybee contributes substantially to global food security, biodiversity, and ecosystem stability. In addition to its ecological importance, the honeybee is central to apiculture, which involves the commercial production of honey, royal jelly, beeswax, propolis, and other hive products. Among the many subspecies and ecotypes of honeybees, the Italian (*Apis mellifera ligustica*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honeybees are two of the most well-known and widely used in apiculture worldwide, including in Iran. These two subspecies possess distinct genetic, behavioral, and physiological traits that make them suitable for different environments and management systems. Given their importance, a comparative genomic analysis of these breeds offers valuable insights into the evolutionary forces that have shaped their genomes and can inform breeding strategies aimed at enhancing desirable traits such as disease resistance, productivity, and environmental adaptation. Population genomics, made possible by advancements in next-generation sequencing (NGS) technologies, has emerged as a powerful tool to examine genome-wide patterns of variation and identify regions under selection. Identifying such selection signatures helps to detect genomic regions associated with adaptive and economically valuable traits, providing a foundation for marker-assisted selection and improved colony management. The main objective of the present study was to identify and characterize selection signatures across the whole genomes of Italian and Caucasian honeybee breeds using public whole-genome sequencing (WGS) data. By applying robust statistical methods and bioinformatics tools, we aimed to uncover genomic regions and specific genes that have been targets of selection and are potentially responsible for key phenotypic differences between the two breeds.

Materials and Methods

This study utilized publicly available WGS data for two European honeybee subspecies obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The raw sequencing reads were first subjected to rigorous quality control using standard filtering pipelines to remove low-quality reads and sequencing artifacts. High-quality reads were then aligned to the *Apis mellifera* reference genome using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) software. Post-alignment processing included the removal of duplicate reads, local realignment around indels, and base quality score recalibration. Subsequently, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were called using the Genome Analysis Toolkit (GATK), followed by variant filtering to retain only high-confidence SNPs for downstream analysis. Two complementary methods were used to detect selection signatures:

- 1- Cross-Population Extended Haplotype Homozygosity (XP-EHH): This method detects recent positive selection in one population relative to another by comparing the decay of haplotype homozygosity between populations. It is particularly effective in identifying regions that have undergone recent selective sweeps.
- 2- Fixation Index (F_{st}): This classic population genetics statistic measures genetic differentiation between populations. Genomic regions with high F_{st} values indicate loci that may have been subject to divergent selection pressures.

The genome was partitioned into sliding windows, and XP-EHH and Fst scores were calculated for each window to detect outlier regions likely to have experienced positive selection. To provide further insights into the genetic structure and ancestry of the populations studied, we used the ADMIXTURE software to perform population structure analysis, estimating individual ancestries and potential genetic admixture between populations.

Results

The XP-EHH analysis identified 847 genomic windows harboring a total of 244 protein-coding genes as candidate regions under positive selection in the Italian honeybee relative to the Caucasian breed. In parallel, the Fst analysis detected 815 genomic windows containing 439 protein-coding genes that exhibited significant genetic differentiation between the two populations. Notably, 19 genes were identified by both XP-EHH and Fst methods as overlapping selection signals, increasing the confidence in their functional relevance. These 19 genes were further analyzed to elucidate their biological roles and relevance to honeybee phenotypes. Functional annotation and literature review revealed that many of these genes are associated with key behavioral and physiological traits critical to colony performance and adaptation:

LOC72499, LOC551114, and LOC411919 were found to be involved in immune responses and pathogen resistance, indicating selection for enhanced colony health and disease resilience.

LOC41390 plays a role in foraging behavior, which is crucial for resource acquisition and colony productivity. LOC413200 is linked to cellular growth and developmental processes, suggesting selection on growth regulation. LOC725885 is associated with cellular differentiation, nursing behavior, wing development, and foraging—traits essential for worker bee functionality.

LOC550886 is implicated in hygienic behaviors, including the removal of diseased or dead brood, a known factor in colony resistance to disease. LOC410393 is related to gut health and detoxification mechanisms, highlighting adaptations to diverse dietary and environmental conditions. LOC408718 plays a critical role in the development of neural cells and the differentiation of larvae into queens or workers, reflecting selection on caste determination and colony structure.

The identification of these genes highlights the potential for using genomic data to enhance breeding programs and develop honeybee strains with improved traits. The ADMIXTURE analysis provided additional evidence of genetic differentiation between the two breeds and showed limited levels of admixture, suggesting that the Italian and Caucasian breeds maintain largely distinct genetic profiles despite some shared ancestry. This genetic separation supports the validity of our comparative approach and indicates that selection has acted differently on each population.

Conclusions

In summary, this study presents a comprehensive analysis of genome-wide selection signatures in two prominent honeybee breeds using whole-genome sequencing data and population genomics approaches. The identification of genes under selection provides valuable insights into the genetic basis of economically and ecologically important traits in honeybees. Traits such as behavior, foraging, hygiene, immunity, and developmental plasticity are crucial for colony success and are shown to be influenced by identifiable genomic regions. The application of these findings in breeding programs can lead to the development of more resilient, productive,

and adaptable honeybee populations, thereby contributing to the sustainability of apiculture in the face of global challenges such as climate change, emerging diseases, and habitat loss. Furthermore, the methodology applied in this study can serve as a model for similar genomic investigations in other subspecies or populations of honeybees and social insects. Ultimately, our research underscores the power of population genomics in unraveling the evolutionary history of domesticated species and offers practical tools for enhancing biodiversity, productivity, and resilience in managed pollinator populations.

Author Contributions

Conceptualization: Hadi Tavakoli, Nemat Hedayat; methodology: Reza Khalkhali and Hadi Tavakoli; software, Hadi Tavakoli; validation, Nemat Hedayat, Reza Seyedsharifi and Reza Khalkhali; formal analysis: Hadi Tavakoli; investigation, Hadi Tavakoli; resources, Hadi Tavakoli; data curation, Hadi Tavakoli and Nemat Hedayat.; writing—original draft preparation, Hadi Tavakoli; writing—review and editing, Nemat Hedayat, Reza Seyedsharifi, Reza Khalkhali, Mirdariuosh Shakouri and Kobra Pourasad; visualization, Kobra Pourasad; supervision: Nemat Hedayat and Reza Seyedsharifi; project administration, Nemat Hedayat; funding acquisition, University of Mohaghegh Ardabili. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability statement

Not applicable

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Vice Chancellor for Research of the University of Mohaghegh Ardabili for the financial support / moral support / collaboration in conducting this research.

Ethical considerations

The data used in this study are publicly available, ethically approved, and the subjects have given their informed consent. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the University of Mohaghegh Ardabili, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

مقایسه ژنومی زنبورهای عسل نژاد ایتالیایی (*Apis Mellifera Ligustica*) و قفقازی (*Apis Mellifera Caucasica*) برای شناسایی نشانه‌های انتخاب

هادی توکلی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: hadi.tavakoli.m.1997@gmail.com

 **نعمت هدایت**

*نویسنده مسئول: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: nhedayat@uma.ac.ir

 **رضا خلخال‌ای یوریق**

گروه تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل، اردبیل، ایران. رایانامه: rezakhalkhali110@gmail.com

 **رضا سیدشریفی**

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: reza_seyedsharifi@yahoo.com

 **میرداریوش شکوری**

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: mdshakouri@uma.ac.ir

کبری پوراسد

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: pahnakpourasad@gmail.com

 **تنویر حسین**

گروه بیولوژی مولکولی، دانشگاه مجازی پاکستان، لاهور. رایانامه: tanveer.hussain@vu.edu.pk

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۳

چکیده

هدف: زنبور عسل (*Apis mellifera*) یکی از مهمترین گونه‌های حشره از نظر اکولوژیکی و اقتصادی به شمار می‌رود. زنبور عسل یک الگوی ایده‌آل برای به کارگیری ژنومیک جمعیت برای درک نیروهای تکاملی شکل‌دهنده ژنوم حشرات اجتماعی ارائه می‌دهد.

مطالعه حاضر با هدف بررسی و شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح کل ژنوم، بین دو نژاد زنبور عسل ایتالیایی و قفقازی با توجه به اهمیت دو نژاد در زمینه تولیدات مرتبط با زنبور عسل در ایران و جهان انجام شد.

مواد و روش‌ها: به منظور انجام مطالعه کنونی، از داده‌های توالی‌یابی شده کل ژنوم دو زیر گونه زنبور اروپایی موجود در پایگاه داده‌ای NCBI استفاده شد. پس از اعمال کنترل و پالایش کیفی توالی‌های دانلود شده، خوانش‌های با کیفیت بالا، توسط نرم‌افزار BWA به ژنوم مرجع زنبور عسل هم‌ردیف شدند. متعاقباً، پس از اعمال فیلترهای مختلف، SNP‌های باکیفیت بالا توسط نرم‌افزار GATK استخراج شدند. در گام بعدی، با استفاده از روش‌های XP-EHH و Fst نسبت به شناسایی نشانه‌های انتخاب در زنبورهای عسل ایتالیایی نسبت به زنبورهای قفقازی اقدام گردید. همچنین به منظور بررسی ساختار ژنتیکی دو نژاد مورد مطالعه و بررسی اجمالی میزان آمیختگی و خلوص آنها، از برنامه ADMIXTURE استفاده شد.

نتایج: آنالیزهای صورت گرفته منجر به شناسایی ۸۴۷ پنجره ژنومی (حاوی ۲۴۴ ژن کد کننده پروتئین) توسط روش XP-EHH و ۸۱۵ پنجره ژنومی (حاوی ۴۳۹ ژن کد کننده پروتئین) توسط روش Fst شد. نتایج نشان دادند که تعداد ۱۹ ژن توسط هر دو روش شناسایی شده‌اند که این ژن‌ها به عنوان نشانه‌های انتخاب نهایی مورد بررسی‌های بیشتری قرار گرفتند. از بین ژن‌های مذکور، LOC72499، LOC551114 و LOC411919 در ایمنی، LOC41390 در رفتارهای جستجوگری کارگران، LOC413200 در رشد و توسعه سلولی، LOC725885 در تمایز سلولی، رفتارهای پرستاری و جستجوگری زنبورها و رشد بال، LOC550886 در رفتارهای نظافتی، LOC410393 در سلامت روده‌ها و سم‌زدایی و LOC408718 نیز در رشد سلول‌های عصبی و تبدیل لارو به کارگر یا ملکه دخیل بودند. شناسایی نشانه‌های انتخاب می‌تواند به استراتژی‌های آمیخته‌گری، کنترل بیماری و مدیریت کلونی کمک کند. علاوه بر این، اطلاعات ژنومی نژادها امکان پیش‌بینی رفتار آنها در برابر چالش‌های محیطی از جمله تغییرات اقلیمی را فراهم می‌آورد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که صفاتی مانند رفتار، جستجوگری غذا (شهد و گرده)، نظافت، دفاع از کلنی و ایمنی در زنبورهای عسل جزء مهمترین و اقتصادی‌ترین صفات به شمار می‌روند؛ لذا شناسایی ژن‌هایی مرتبط با این ویژگی‌ها در مطالعه کنونی، نشان از ظرفیت بالای داده‌های ژنومی برای شناخت هر چه بیشتر نژادهای مختلف زنبور عسل دارد.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی کل ژنوم، زنبور عسل ایتالیایی، زنبور عسل قفقازی، نشانه‌های انتخاب

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: توکلی هادی، هدایت نعمت، خلخالی ایوریک رضا، سیدشریفی رضا، شکوری میرداریوش، پوراسد کبری، حسین تنویر (۱۴۰۴).

مقایسه ژنومی زنبورهای عسل نژاد ایتالیایی (*Apis Mellifera Ligustica*) و قفقازی (*Apis Mellifera Caucasica*) برای

شناسایی نشانه‌های انتخاب. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۳)، ۲۷-۴۸.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

زنبور عسل (*Apis mellifera*) یکی از مهمترین گونه‌های حشره‌ای به شمار می‌رود که از نظر اکولوژیکی و اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. شهرت اصلی زنبور عسل بیشتر به دلیل نقش مهم این حشره در گرده‌افشانی و کمک به کشاورزی پایدار و بهینه می‌باشد. به عنوان مثال، زنبور عسل با ایفای نقش در گرده‌افشانی محصولات کشاورزی در ایالات متحده آمریکا، سالانه حدود ۳۴ میلیارد دلار به اقتصاد این کشور کمک می‌کند (Boncristiani et al., 2021). این حشره ارزشمند بعد از پایان آخرین دوره یخبندان به طور گسترده‌ای به نواحی مختلف اروپا منتشر و به زیر گونه‌های مختلفی منشعب شد (Franck et al., 2000). همچنین وجود شرایط بهینه آب و هوا در طول چند هزار سال گذشته، سازگاری آنها را با مناطق مختلف اکو-جغرافیایی تثبیت کرده است. بیش از ۳۰ زیر گونه مختلف زنبور عسل در جهان شناسایی شده است که پراکنش بومی آن علاوه بر اروپا، آسیای غربی، آفریقا و خاورمیانه را نیز در بر می‌گیرد. زیرگونه‌های زنبور عسل به طور کلی به چهار دودمان اصلی، زیرگونه آفریقایی (A)، زیرگونه اروپایی شرقی (C)، زیرگونه اروپایی غربی و شمالی (M) و زیرگونه خاورمیانه (O) تقسیم می‌شوند (Minozzi et al., 2021). وجود تنوع در بین جمعیت‌های گونه‌های مختلف جانوری موجب سازگاری بهتر با شرایط زیستی می‌شود. از جمله عوامل ایجاد کننده تنوع در بین جمعیت‌ها جهش‌های ایجاد شده در سطح DNA می‌باشد. از این جهش‌ها می‌توان به چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs)، جهش‌های حذفی (Deletion) و جهش‌های از نوع اضافه (Insertion) اشاره کرد که در اثر انتخاب طبیعی یا مصنوعی در جمعیت‌های مختلف تثبیت شوند. در اغلب موارد، این تنوعات در پاسخ به انتخاب طبیعی و مصنوعی ایجاد شده و آثاری بر ژنوم گونه‌های مختلف می‌گذارند که تحت عنوان نشانه‌های انتخاب شناخته می‌شوند. امکان توالی‌یابی کل ژنوم از یک سو و پیشرفت در زمینه برنامه‌ها و الگوریتم‌های بیوانفورماتیک از سویی دیگر به محققان امکان داده است تا با دقت بالایی به شناسایی این نواحی بپردازند. توالی‌یابی کل ژنوم فرصت بررسی تنوع ژنتیکی در میلیون‌ها مکان ژنومی را فراهم می‌کند و در عین حال اطلاعات مرتبطی در مورد عملکرد گونه‌های مختلف ارائه می‌دهد. در دسترس بودن اطلاعات ژنوم و فنوتیپ‌های دقیق می‌تواند برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای دخیل در صفات مهمی مانند باروری، سازگاری، ویژگی‌های اجتماعی و عملکردهای مرتبط با ایمنی و همچنین سایر صفات مهم اقتصادی استفاده شود (Grozinger & Zayed 2020; Wragg et al., 2016). معرفی فناوری‌های توالی‌یابی ارزان و با توان بالا، فرصتی بی‌نظیر برای تجزیه و تحلیل سریع ساختار جمعیت‌ها در سیستم‌های مرتبط با محیط زیست و شروع بررسی نیروهای تکاملی مبتنی بر تنوع انطباقی در درون و در میان جمعیت‌ها و گونه‌ها ارائه می‌کند (Nadeau & Jiggins 2010). از آنجایی که زنبور عسل شناخته شده‌ترین حشره اجتماعی از نظر رفتار، فیزیولوژی و ژنتیک می‌باشد، لذا یک گونه ایده آل برای به کارگیری ژنومیک جمعیت برای درک نیروهای تکاملی شکل‌دهنده این نوع از حشرات می‌باشد (Chandrasekaran et al., 2011). ژنوم زنبور عسل نسبتاً کوچک بوده (حدود ۲۲۵ میلیون جفت باز) و از توالی‌های تکراری کمی برخوردار است که عمل هم‌ترازی از طریق خوانش‌های کوتاه را هم امکان‌پذیر می‌کند. در سطح جهان چند نژاد مهم زنبور عسل به دلیل دارا بودن صفات اقتصادی مطلوب از اهمیت ویژه‌ای بین زنبور داران برخوردار هستند. زنبور عسل ایتالیایی (*Apis mellifera ligustica*) به

عنوان یکی از اعضای دودمان C، یکی از این نژادها می‌باشد که خواستگاه اصلی آن ایتالیا و در اصل بومی منطقه آب و هوایی مدیترانه‌ای اروپای جنوبی در شبه جزیره آپنین است که دارای تابستان‌های گرم و خشک است. (Kovac et al., 2014) این نژاد به دلیل ویژگی‌های مطلوب خود در بسیاری از مناطق دیگر جهان به واسطه انسان گسترش یافته است. زنبور عسل قفقازی (Apis mellifera caucasica) نیز جزء دودمان O بوده و ارتفاعات قفقاز مرکزی در کشور گرجستان موطن اصلی این نژاد می‌باشد. زنبور عسل قفقازی به دلیل تولید محصول مطلوب و رفتار آرام آن شهرت دارد. هر دو نژاد زنبور عسل توسط زنبورداران کشور پرورش می‌یابند و شناخت هر چه بهتر آنها می‌تواند در مدیریت و پرورش آنها کمک کننده باشد. شناسایی تنوعات ژنتیکی در فرآیند اصلاح نژاد حیوانات اهلی بسیار مهم است (Mohammadabadi and Tohidinejad, 2017; Saadatabadi et al., 2023). تنوع ژنتیکی یک عنصر ضروری برای بهبود ژنتیکی، حفظ جمعیت، تکامل و سازگاری با شرایط محیطی متغیر است (Askari et al., 2011; Mohammadabadi et al., 2024). از این رو، تعیین چندشکلی‌های ژنی و مطالعه در مورد تنوعات ژنتیکی در اصلاح نژاد حیوانات اهلی، به منظور تعریف ژنوتیپ حیوانات و ارتباط آنها با صفات تولیدی، تولیدمثلی و اقتصادی (Norouzy et al., 2005; Shokri et al., 2023) مهم است. نشانه‌های انتخاب بخشی از نواحی ژنومی در مقایسه بین نژادهای مختلف هستند که دارای تنوعات ژنتیکی موثری بر صفات موجودات می‌باشند. مطالعه کنونی با هدف بررسی و شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح کل ژنوم، بین دو نژاد زنبور عسل ایتالیایی و قفقازی برای بررسی تاثیر این نواحی بر صفات اقتصادی انجام گرفت. از آنجایی که مقایسه ژنومی دو نژاد مذکور با استفاده از داده‌های ژنومی به کار برده شده در مطالعه کنونی، پیش‌تر صورت نپذیرفته است؛ لذا این مطالعه می‌تواند اطلاعات جدیدی در این زمینه در اختیار محققان قرار دهد. استفاده از داده‌های کل ژنوم به دلیل پوشش تمام نواحی ژنومی می‌تواند منجر به کسب اطلاعاتی دقیق‌تر و جامع‌تر از موجودات مورد مطالعه شده و تصویری روشن‌تر و کامل‌تری از ویژگی‌های نژادهای مختلف و تفاوت‌های بین آنها ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و هم‌ترازی خوانش‌ها در ژنوم مرجع: در مطالعه حاضر، از داده‌های ژنومی ۴۰ نمونه زنبور عسل نر متعلق به دو نژاد ایتالیایی (۲۶ نمونه) و قفقازی (۱۴ نمونه) جهت انجام آنالیز ژنومی و شناسایی نشانه‌های انتخاب استفاده شد. لازم به ذکر است که این داده‌ها از پایگاه داده‌ای NCBI دانلود شدند (جدول ۱). جهت سنجش کیفیت داده‌های خام دانلود شده، از برنامه FastQC (نسخه ۱۱/۹) استفاده شد. این برنامه با ارائه یک گزارش کلی از وضعیت داده‌های خام، این امکان را فراهم می‌کند تا محققان با اطلاعات دقیق‌تری از وضعیت داده‌ها، به طراحی مرحله پالایش کیفی بپردازند (Hedayat-Evrigh et al., 2020). در قدم بعدی، با استفاده از نسخه ۰/۳۹ نرم‌افزار Trimmomatic (Bolger et al., 2014)، خوانش‌های با کیفیت پایین تصحیح شدند. گزینه‌های استفاده شده برای این منظور شامل TRAILING:5، SLIDINGWINDOW:5:20، LEADING:5 و

MINLEN:40 بود که در مورد همه داده‌ها اعمال شد. با استفاده از گزینه‌های LEADING و TRAILING به ترتیب جایگاه‌های کم‌کیفیت ابتدایی و انتهایی هر خوانش حذف شد. با استفاده از گزینه SLIDINGWINDOW، طول همه خوانش‌ها توسط نرم‌افزار به پنجره‌هایی ۵ جفت‌بازی تقسیم شد و پنجره‌هایی که نمره کیفی کمتر از ۲۰ را کسب کردند، از ادامه‌ی روند آنالیزها کنار گذاشته شدند. همچنین توالی‌هایی که طول آنها بعد از پالایش‌های صورت گرفته، به کمتر از ۴۰ جفت‌باز رسید، حذف شدند. همچنین برای حذف آداپتورهای الصاقی به توالی‌ها (در طی فرآیند توالی‌یابی) از گزینه ILLUMINACLIP استفاده شد. پالایش کیفی داده‌های ژنومی علاوه بر حذف توالی‌های با نمره کیفی پایین، حذف قسمتهایی با اشتباهات توالی‌یابی و یا نوکلئوتیدهای توالی‌یابی نشده و حذف آلودگی‌هایی مانند آداپتورهای استفاده شده در طی فرآیند توالی‌یابی، با حذف اثر دسته‌ای^۱ (ناشی از نوع نمونه‌برداری، نوع آزمایشات پیش از توالی‌یابی، نوع توالی‌یابی) به بالا رفتن کیفیت واریانت‌های شناسایی شده کمک شایانی می‌کند (Lou & Therikildsen 2022). خوانش‌هایی که مراحل پالایش را گذرانده بودند، با استفاده از نسخه ۷/۱۷ نرم‌افزار BWA (Li & Durbin 2009) به ژنوم مرجع زنبور عسل (GCF_003254395.2_Amel_HAv3.1) هم‌تراز شدند. در ادامه آنالیز، با استفاده از گزینه MarkDuplicates موجود در نرم‌افزار Picard، همه خوانش‌های مضاعف شده (Duplicate Reads) شناسایی و بوسیله گزینه REMOVE_DUPLICATES حذف شدند. به منظور انجام عمل بازهم‌ترازی در نواحی نزدیک به واریانت‌های حذف/درج از دستورهای IndelRealigner و RealignerTargetCreator نسخه ۷/۳ برنامه GATK بر روی فایل‌های BAM ایجاد شده در مرحله قبل استفاده شد.

شناسایی و پالایش واریانت‌ها: از الگوریتم HaplotypeCaller موجود در نرم افزار GATK، برای شناسایی

واریانت‌های همه نمونه‌ها به صورت ERC GVCF استفاده شد. در مرحله‌ی بعد، با استفاده از گزینه GenotypeGVCFs، یک فایل VCF که شامل اطلاعات همه واریانت‌های موجود در ژنوم همه نمونه‌ها بود، ایجاد شد. از برنامه‌های BCFtools و GATK به منظور پالایش کیفی واریانت‌های مذکور استفاده شد. در این مرحله SNP‌هایی که معیارهای $MQ < 40.0$ ، $SOR < 3.0$ ، $MQRankSum < -12.5$ ، $FS > 60.0$ ، $ReadPosRankSum < -8.0$ و $QD < 2.0$ را کسب نکردند، از ادامه آنالیز کنار گذاشته شدند. برای افزایش کیفیت SNP‌های شناسایی شده از معیارهای $maf \geq 0.05$ ، $minDP \geq 2$ ، $max\text{-}alleles \geq 2$ ، $max\text{-}missing \leq 0.8$ و $hwe \geq 0.001$ نیز برای پالایش مابقی واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی با استفاده از برنامه VCFtools (Danecek et al., 2011) استفاده گردید. لازم به ذکر است که به منظور بررسی ساختار ژنتیکی دو نژاد مورد مطالعه و بررسی اجمالی میزان آمیختگی و خلوص آنها، از برنامه ADMIXTURE (Alexander et al., 2009) استفاده شد. قبل از انجام آنالیز مذکور و به منظور کاهش اثر SNP‌های دارای عدم تعادل لینکاژی (LD) قوی، از گزینه "indep-pairwise 50 5" استفاده شد.

¹ Batch Effects

0.1" در برنامه Plink1.9 استفاده شد. این دستور در یک بازه با ۵۰ SNP (با همپوشانی ۵ SNP) یکی از SNP‌هایی که با SNP دیگر، دارای LD بیشتر از ۰/۱ باشد را حذف می‌کند.

جدول ۱. شماره دسترسی نمونه‌های استفاده شده در مطالعه کنونی (NCBI)

Table 1. The accession number of the samples used in the current study (NCBI)

منبع	شماره دسترسی	نژاد
Reference	Accession Number	Breed
Wragg et al., 2016	SRR6236947, SRR15173712, SRR15173713, SRR15173714, SRR15173715, SRR15173716, SRR15173717, SRR15173718, SRR15173719, SRR15173720, SRR15173721, SRR15173732,	ایتالیایی
Wragg et al., 2018	SRR6236907, SRR6236954, SRR6236950, SRR6236908, SRR6236952, SRR15173723, SRR15173727, SRR15173731, SRR15173730, SRR15173728, SRR15173729, SRR6236953, SRR6236951, SRR6236949	Ligustica
Wragg et al., 2016	SRR6236943, SRR6236944, SRR6236945, SRR6236946, SRR15173873, SRR15173874, SRR15173875,	قفقازی
Wragg et al., 2018	SRR15173876, SRR15173877, SRR6236933, SRR6236934, SRR6236938, SRR6236939, SRR6236940	Caucasica

شناسایی نشانه‌های انتخاب: به منظور شناسایی نشانه‌های انتخاب از روش‌های شاخص تمایز جمعیت (F_{st}) و هموزیگوسیتی هاپلوتایی بسط داده شده بین جمعیتی (XP-EHH) استفاده شد. روش F_{st} با شناسایی نواحی ژنومی متمایز در دو گروه مورد مطالعه، یک ابزار قدرتمند برای شناسایی قسمتهایی از ژنوم می‌باشد که تحت تاثیر عوامل محیطی، مسیرهای انتخابی متفاوتی را طی کرده‌اند. از سویی دیگر روش XP-EHH به شناسایی قسمتهایی از ژنوم گروه‌های مورد مقایسه می‌پردازد که به طور کامل و یا نزدیک به کامل، به هموزیگوسیتی رسیده و تثبیت شده‌اند (Sabeti et al., 2007). لذا استفاده توأم از این روش‌ها می‌تواند در افزایش دقت و صحت نواحی شناسایی شده به عنوان نشانه‌های انتخاب، موثر باشد. در هر دو روش ابتدا پنجره‌هایی با اندازه ۵۰۰۰ جفت باز و همپوشانی ۲۵۰۰ باز در کل ژنوم نمونه‌های مورد بررسی، ایجاد شد. در آنالیز به هر دو روش مذکور، زنبورهای ایتالیایی به عنوان جمعیت هدف و زنبورهای قفقازی به عنوان جمعیت مرجع در نظر گرفته شدند. محاسبه XPEHH در هر پنجره بوسیله نرم افزار Selscan انجام شد. همچنین برنامه VCFtools برای محاسبه مقادیر F_{st} در هر یک از پنجره‌های ژنومی، اجرا گردید. سپس برای محاسبه ZFst از فرمول $(F_{st} - \mu F_{st}) / \sigma F_{st}$ استفاده شد. در این معادله σF_{st} انحراف از استاندارد و μF_{st}

میانگین Fst در تمام پنجره‌های ژنومی را نشان می‌دهد. در هر دو روش، برای حذف نشانه‌های انتخاب کاذب، پنجره‌هایی با تعداد SNP کمتر از ۵ از آنالیز کنار گذاشته شدند. نهایتاً پنجره‌هایی که نمره ZFst و XP-EHH آنها در محدوده یک درصد بالایی دامنه اعداد قرار داشتند، به عنوان نشانه‌های احتمالی انتخاب مثبت در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که پیش از انجام روش XP-EHH، ابتدا فایل VCF با کمک نسخه‌ی ۲/۵ نرم‌افزار Beagle (Browning et al., 2021) مورد فازبندی هاپلوتیپ‌ها قرار گرفت. برای این منظور از گزینه‌های $\text{bornin}=5$ و $\text{iteration}=20$ این نرم‌افزار استفاده شد.

حاشیه‌نویسی مناطق تحت انتخاب مثبت و آنالیز هستی‌شناسی ژن: با استفاده از نسخه ۲/۲۷/۱

برنامه BEDtools (Quinlan & Hall 2010) و فایل GTF مربوط به ژنوم مرجع زنبور عسل، ژن‌های استخراج شده در نواحی تحت انتخاب، بوسیله ابزار تحت وب "g:Profiler" و آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO) این ابزار، شرح نویسی شدند. این آنالیز عملکرد ژن‌ها را به سه گروه اجزای سلولی (CC)، عملکرد مولکولی (MF)، فرایندهای زیستی (BP) و همچنین مسیرهای KEGG تقسیم‌بندی می‌کند. برای شناسایی عبارات معنادار GO و مسیرهای KEGG از آستانه $p\text{-value} \leq 0.05$ تصحیح شده (با استفاده از روش Benjamini-Hochberg) استفاده شد.

نتایج و بحث

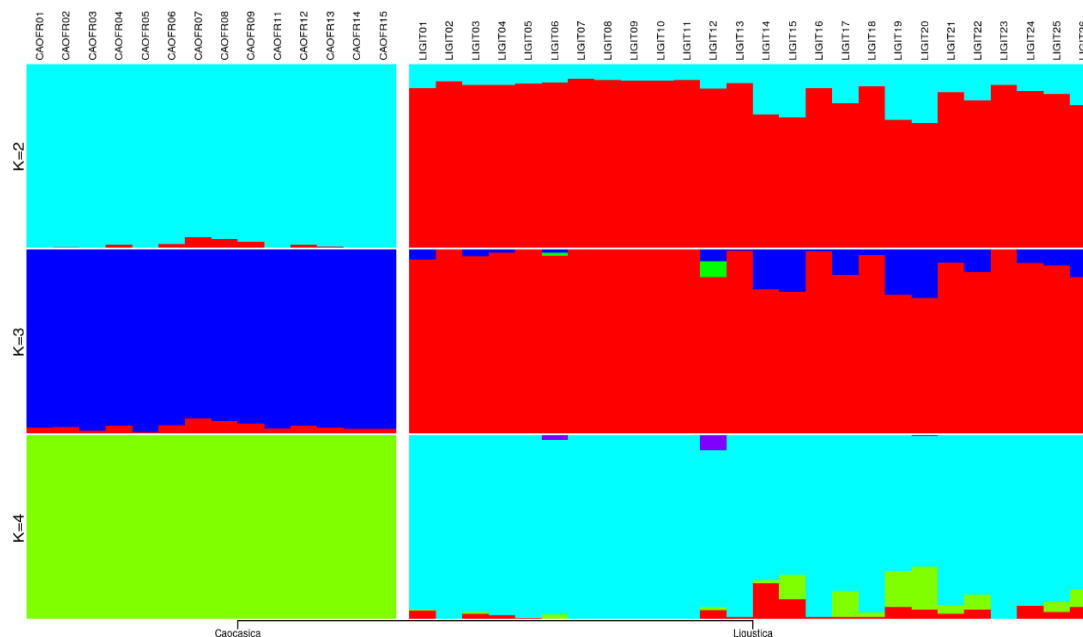
با توجه به انباشتگی تعداد زیادی داده ژنومی در پایگاه‌های اطلاعاتی از جمله NCBI، طراحی مطالعات بر پایه استفاده از این داده‌ها و استخراج اطلاعاتی جدید از آنها، یکی از حوزه‌های مهمی است که طی سالهای اخیر، توجه بسیاری از محققان را جلب کرده است. در مطالعه حاضر، بخشی از داده‌هایی که محققان اصلی تولید کننده داده، پیش‌تر، از آنها برای انجام دو مطالعه استفاده کرده بودند، برای انجام آنالیزهای جدید به کار گرفته شد. در یکی از مطالعات مذکور، محققان به شناسایی نواحی دخیل در تولید ژل رویال پرداختند. ژن‌های شناسایی شده شامل ژن‌های مرتبط با یوبی کوئیناسیون، فعالیت پپتیداز نوع سرین، پروتئین‌های ریبوزومی، ویتلوژنین و متابولیسم گلوکز بودند که می‌توانند در سطح تولید ژل رویال موثر باشند (Wragg et al., 2016). در مطالعه دیگر، با استفاده از بخش دیگری از داده‌های تولید شده، به بررسی آمیختگی زنبورهای عسل جزیر رئونیون پرداخته شد. شواهد به دست آمده از تاثیر طولانی مدت زنبورهای وارداتی اروپایی بر زنبورهای بومی جزیره مذکور، پرده برداشتند (Wragg et al., 2018). در مطالعه کنونی، از داده‌های مربوط به زنبورهای عسل نر استفاده شد. از آنجایی که نرها از نظر ژنتیکی، هاپلوئید بوده و محتوای ژنومی کوچک‌تری نسبت به کارگرها دارند، لذا داده‌های ژنومی تولید شده برای نرها، از نظر اقتصادی کم‌هزینه و از نظر محاسباتی آسان‌تر است. به طوری که شواهد نشان داده‌اند که برای مثال یک داده با عمق ۷X برای دو نر، اطلاعات بیشتری نسبت به یک داده با عمق ۱۴X برای یک کارگر، تولید کرده و منجر به شناسایی تنوع ژنتیکی بیشتری می‌گردد. البته نگرانی‌ها در مورد مطالعه ژنوم نرها به این مسئله بر می‌گردد که تنوع ژنتیکی شناسایی شده فقط مربوط به ملکه بوده (به دلیل شرایط تولید نرها در کلونی) و کل تنوع ژنتیکی

کلونی را پوشش نمی‌دهد. هرچند این ویژگی زمانی که مطالعه صفات مرتبط با ملکه مد نظر باشد، یک نکته مثبت در نظر گرفته می‌شود (Wragg et al., 2016). نتایج حاصل از آنالیز Admixture نشان داد که دو نژاد زنبور مورد مطالعه به طور کاملاً واضحی از نظر ژنتیکی مجزا از هم هستند (شکل ۱). تأثیرات ژنتیکی نژادها بر هم تا حدودی قابل مشاهده می‌باشد هرچند به نظر می‌رسد سهم نژاد قفقازی به عنوان نژاد دهنده ژن بیشتر از نژاد ایتالیایی باشد. به بیانی دیگر، قفقازی دارای خلوص بیشتری نسبت به نژاد ایتالیایی می‌باشد که می‌توان این عامل را به استفاده تجاری بیشتر از نژاد ایتالیایی نسبت داد که احتمالاً منجر به دست‌ورزی ژنتیکی (مباحثی مانند انتخاب مصنوعی و آمیختگی‌های هدفمند توسط انسان) بیشتری در این نژاد شده است. از سویی دیگر منطقه پراکنش نیز می‌تواند در میزان آمیختگی زنبورهای عسل تأثیرگذار باشد. یکی از دلایل احتمالی خلوص بالاتر در نژاد قفقازی احتمالاً پراکنش این زنبور در مناطق کوهستانی و با شرایط خاص منطقه قفقاز می‌باشد. البته لازم به ذکر است که دو نژاد مورد بررسی از دو گروه ژنتیکی جداگانه نیز هستند؛ به طوریکه نژاد قفقازی متعلق به گروه O و نژاد ایتالیایی نیز متعلق به گروه C می‌باشد (Kandemir et al., 2011) که یکی دیگر از دلایل جدایی آشکار ژنتیکی در نتایج مربوط به Admixture می‌باشد. شواهد علمی متعددی نشان داده‌اند که پدیده آمیختگی و متعاقب آن، نفوذ ژنتیکی^۲ می‌تواند منجر به انتقال آلل‌های خاصی از یک جمعیت به جمعیت دیگر شده و توانایی‌های سازگانه جمعیت گیرنده را افزایش دهد (Kang et al., 2024; Khalkhali-Evrigh et al., 2025). این فرآیند می‌تواند در چگونگی تفسیر ما از نتایج بدست آمده در مطالعه‌های ژنتیکی تأثیرگذار باشد. اما نکته مهم این است که روش‌های استفاده شده در مطالعه کنونی، نواحی از ژنوم را شناسایی می‌کنند که دارای تمایز ژنتیکی بالایی بوده و لذا نواحی دارای شباهت ژنتیکی بالا که می‌تواند در اثر ورود ژنی از جمعیتی به جمعیت دیگر باشد، به عنوان نشانه انتخاب شناسایی نمی‌شوند.

به منظور شناسایی نشانه‌های انتخاب در زنبور عسل ایتالیایی در قیاس با نژاد قفقازی، از دو روش Fst و XP-EHH استفاده شد. در روش Fst، ۸۱۵ پنجره ژنومی (حاوی ۴۳۹ ژن کدکننده پروتئین) که در حد آستانه بالاتر از $ZFst > 3.13$ قرار داشتند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شد. در روش XP-EHH نیز ۸۴۷ پنجره ژنومی (حاوی ۲۴۴ ژن کدکننده پروتئین) که دارای مقادیر XP-EHH بالاتر از ۱/۹۹ بودند، مورد شناسایی قرار گرفتند. در مجموع ۱۹ ژن توسط هر دو روش به عنوان نشانه‌های انتخاب معرفی شدند که برای اطمینان و دقت بیشتر، از همین ۱۹ ژن به عنوان نشانه‌های انتخاب نهایی نژاد ایتالیایی در مقایسه با نژاد قفقازی استفاده شد (شکل ۲). نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی بر روی ژنهای مذکور منجر به شناسایی ۱۶ عبارت معنادار شد که ۵ عبارت مربوط به عملکرد مولکولی و ۱۱ عبارت متعلق به فرآیندهای زیستی بودند (جدول ۲). هیچ مسیر KEGG معناداری در این مطالعه گزارش نشد. از بین ۱۹ ژن شناسایی شده، ژنهایی که عملکرد آنها در زنبور عسل یا گونه‌های دیگر ارزیابی شده بودند، مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. ژن LOC724997 (NKD2) یکی از ژنهای حاضر در مسیر سیگنالینگ wnt می‌باشد. این ژن همانند NKD به عنوان یک تنظیم کننده منفی مسیر سیگنالینگ Wnt به ایفای نقش می‌پردازد (Ganapathy & Ezekiel

² Introgression

2019). نتایج یک مطالعه نشان داد که میزان mRNA مربوط به ژن NKD در زنبورهای آلوده به نوزما بالا بوده و کاهش این رشته‌ها با استفاده از dsRNAهای اختصاصی NKD منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی شده و باعث بهبودی زنبورها و افزایش طول عمر آنها شد (Li et al., 2016). ژن LOC411919 یکی دیگر از ژنهای موجود در مسیر سیگنالینگ wnt بود و از این رو در ایمنی زنبور عسل دخیل می‌باشد.

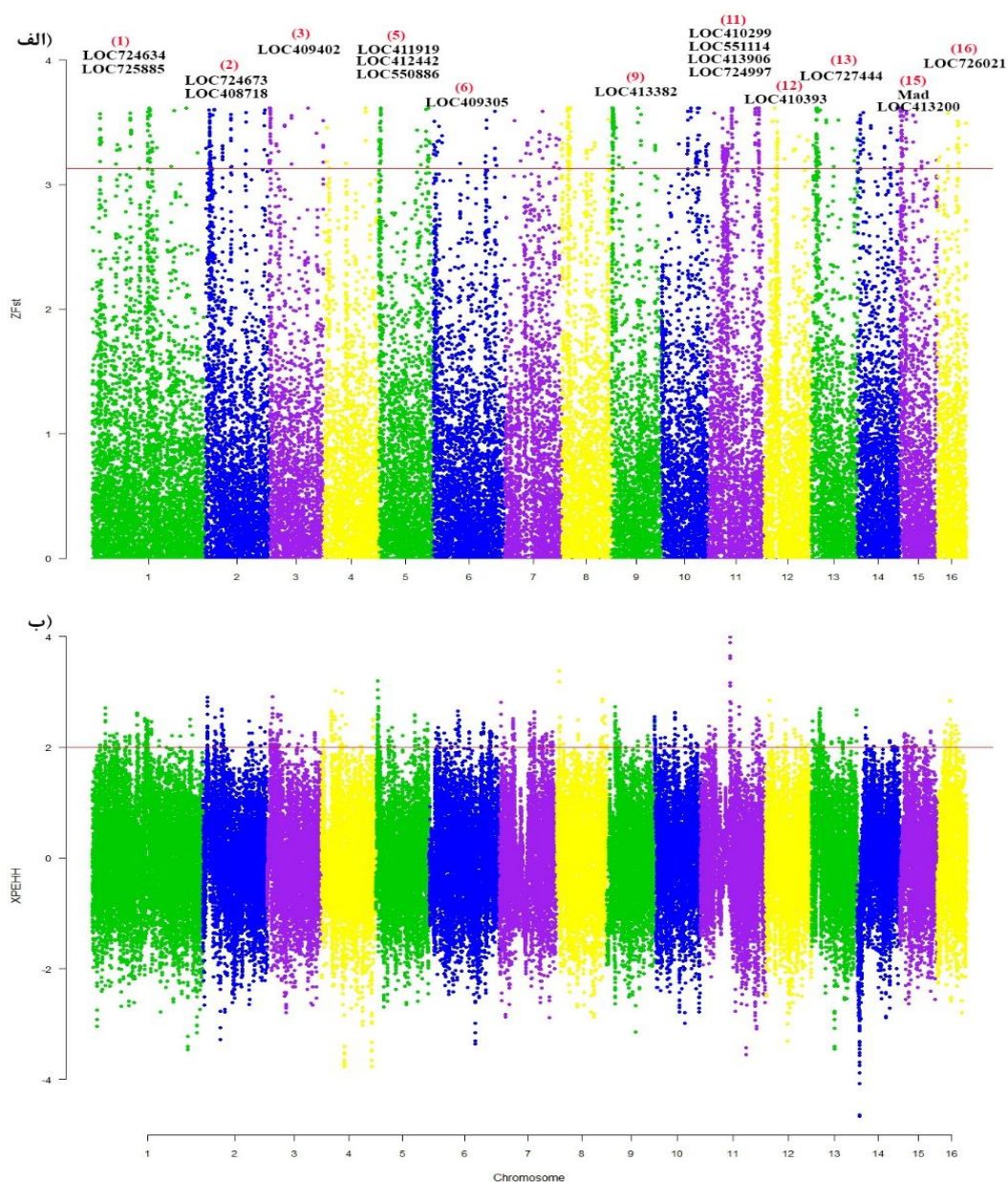


شکل ۱. نتایج Admixture مربوط به دو نژاد قفقازی (Caucasica) و ایتالیایی (Ligustica) در سه مقدار K=2 تا K=4

Figure 1. Admixture results for Caucasian and Italian (Ligustica) honeybees, at three values of K=2 to K=4

یکی دیگر از ژن‌های مهم در لیست ژن‌های با انتخاب مثبت، ژن LOC551114 (METL9) بود. عملکرد ژن METL9 در حشرات بخصوص زنبور عسل به خوبی بررسی نشده است. مطالعات صورت گرفته روی کرم الگانس نشان می‌دهد که این پروتئین به عنوان متیل ترانسفراز شناسایی شده است که تغییرات DNA m6A را در هنگام عفونت پاتوژنی کاتالیز می‌کند. کمبود METL9 القای ژن‌های پاسخ ایمنی ذاتی را مختل کرده و حیوانات را نسبت به عفونت‌ها حساس‌تر می‌کند. جالب توجه است که METL9 از طریق مکانیسم‌های وابسته به m6A و مستقل برای تنظیم رونویسی ایمنی ذاتی عمل می‌کند (Ma et al., 2023). ژن LOC413906 (MCT10) از کاندیدهای دیگری است که در زنبور عسل ایتالیایی به عنوان یکی از نشانه‌های انتخاب شناسایی شد. در یک مطالعه بر روی زنبور عسل، MCT10 به عنوان یکی از ژن‌های دخیل در عملکرد شبکه تنظیم کننده رونویسی مغز

(TRN) شناخته شد. شبکه تنظیمی رونویسی مغز، حالات رفتاری کارگران زنبور عسل از جمله بلوغ رفتاری، جستجوی غذا و دفاع از کلنی را کنترل می‌کند (Molodtsova 2015).



شکل ۲. نمودار منتهن مقادیر ZFst (الف) و XP-EHH (ب) در طول کل ژنوم (۱۶ کروموزوم اتوزومی) جمعیت زنبور عسل ایتالیایی در مقایسه با نژاد قفقازی – اعداد داخل پرانتز نشانگر شماره کروموزوم می‌باشد

Figure 2. Manhattan plots of ZFst (a) and XP-EHH (b) across the entire genome (16 autosomal chromosomes) of the Italian honeybee population compared to the Caucasian breed – the numbers in parentheses indicate the chromosome number

جدول ۲. نتایج آنالیز هستی‌شناسی ژن روی ۱۹ ژن شناسایی شده به عنوان نشانه‌های انتخاب در نژاد ایتالیایی در مقایسه با قفقازی

Table 2. Results of the gene ontology analysis of 19 genes identified as selection signatures in the Italian breed compared to the Caucasian breed

p-value	شناسه عبارت		
تصحیح شده	نام عبارت هستی‌شناسی	هستی‌شناسی	دسته‌بندی
Adjusted p-value	Gene ontology term name	Gene ontology term ID	Category
0.002	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	GO:0007169	BP
0.002	cell surface receptor signaling pathway	GO:0007166	BP
0.005	enzyme-linked receptor protein signaling pathway	GO:0007167	BP
0.011	cellular response to fibroblast growth factor stimulus	GO:0044344	BP
0.011	fibroblast growth factor receptor signaling pathway	GO:0008543	BP
0.011	response to fibroblast growth factor	GO:0071774	BP
0.027	positive regulation of cell population proliferation	GO:0008284	BP
0.046	regulation of cell population proliferation	GO:0042127	BP
0.046	cell population proliferation	GO:0008283	BP
0.046	cellular response to growth factor stimulus	GO:0071363	BP
0.046	response to growth factor	GO:0070848	BP
0.007	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	GO:0004714	MF
0.012	transmembrane receptor protein kinase activity	GO:0019199	MF
0.026	protein-L-histidine N-pros-methyltransferase activity	GO:0106370	MF
0.026	protein tyrosine kinase activity	GO:0004713	MF
0.026	fibroblast growth factor receptor activity	GO:0005007	MF

ژن LOC413200 (FGFR) یا همولوگ گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاست ۱، جزء گیرنده‌هایی است که در فعالیت فاکتورهای رشد فیبروبلاست نقش دارند. فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGFs) خانواده بزرگی از پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند که به عنوان سیگنال‌های کلیدی بین سلولی در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای رشدی و پاتولوژیک عمل می‌کنند (Lin et al., 1999). مطالعات انجام شده بر روی فاکتورهای رشد فیبروبلاست نشان داده است که در انواع فرآیندهای سلولی مانند تکثیر و تمایز سلولی، مهاجرت سلولی و تشکیل مزودرم نقش دارند (Sharma 1983)، اما با این وجود عملکرد این ژن در زنبور عسل مورد بررسی قرار نگرفته است. یکی دیگر از ژنهای موجود در لیست ژنهای مشترک بین هر دو روش، LOC725885 (Kruppel-like factor 7) بود. این ژن جزء خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی می‌باشد که نقش‌های مهمی از جمله دخالت در فرآیند توسعه و تمایز سلولی را دارا می‌باشند. اعضای این خانواده ژنی در فرآیندهایی مانند تغییر نقش زنبورهای عسل از پرستاری به چراکنده‌گی (Grozing et al., 2003) و تولیدمثل در زنبور *Ceratina calcarata* (Huisken & Rehan 2023) و توسعه مناسب بال‌ها در دوران شفیرگی کرم ابریشم (Ou et al., 2014) دخیل هستند. یکی دیگر از ژنهای قابل توجه و مهمی که به عنوان نشانه انتخاب در نژاد ایتالیایی مورد شناسایی قرار گرفت، ژن LOC408718 (ALK) بود. این ژن یک پروتئین را کد می‌کند که به عنوان عاملی برای تنظیم رشد بدون نیاز به محرک‌های تغذیه‌ای شناخته می‌شود. به طور طبیعی، تحریک به رشد از طریق در دسترس بودن گلوکز و انرژی و به واسطه یک مسیر به نام phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) فعال می‌شود که در حضور گلوکز کافی در خون و فعال شدن گیرنده‌های انسولین، چرخه شروع به فعالیت کرده و نهایتاً در تمایز سلولی و رشد سلولهای مغزی و عصبی به ایفای نقش می‌پردازد. ژن ALK با کنار گذاشتن تاثیر ناشی از گیرنده‌های انسولین در فعال شدن مسیر PI3K، این مسیر را مستقل از تغذیه، فعال کرده و منجر به فرآیندهای مربوط به تمایز سلولی و رشد می‌گردد. با توجه به تفاوت در سطح متیلاسیون این ژن در مغز لاروهای زنبور عسل نسبت به بالغین، احتمالاً یکی از ژنهای تعیین کننده در تاثیر تغذیه در توسعه زنبورهای عسل و تبدیل آنها به ملکه یا کارگر می‌باشد (Foret et al., 2012). به نظر می‌رسد انتخاب مثبت این ژن در زنبورهای ایتالیایی، بدلیل تاثیر مهم آن بر رشد و توسعه سلولی بدون وابستگی به تحریک تغذیه‌ای، با توانایی بالای آنها در جمعیت‌سازی مرتبط باشد. هرچند اثبات این ادعا به مطالعات بیشتری نیاز دارد. کنه واروا یکی از عوامل نابودی کلونی‌های زنبور عسل و مسبب زیان‌های اقتصادی کلان در زنبورستان‌های اقصی نقاط جهان به شمار می‌رود. از این‌رو، وجود نژادهایی از زنبورهای عسل که بتواند با این کنه مقابله کند، یکی از اهداف اصلی بسیاری از کارهای اصلاحی می‌باشد. نتایج حاصل از یک مطالعه نشان می‌دهد که بخش خاصی از ژنوم زنبور عسل نقش مهمی در رفتارهای نظافتی زنبورهای عسل ایفا می‌کند (Arechavaleta-Velasco et al., 2012) و از آنجا که این رفتارها یکی از راه‌های مبارزه با کنه واروا می‌باشد لذا اهمیت بالایی برای این نواحی ژنومی قائل هستند. انتخاب مثبت یکی از این ژنها (LOC550886-Atlastin) در زنبور عسل ایتالیایی در مقایسه با زنبور عسل قفقازی، مطابق با نتایج یک مطالعه بر روی رفتارهای نظافتی پنج نژاد مختلف زنبور عسل بود که مشخص شد زنبور عسل ایتالیایی بالاترین و زنبور عسل قفقازی پایین‌ترین رفتار نظافتی را دارند (Yildiz & Karabağ 2022). ژن LOC410393 (ALP) یکی دیگر از کاندیدهای نشانه انتخاب در زنبور عسل

ایتالیایی بود. ژن ALP در تنظیم جذب مواد مغذی (به ویژه لیپیدها)، سم‌زدایی از لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی، جلوگیری از تهاجم باکتری‌ها و کاهش التهاب روده پستانداران نقش دارد. البته مشخص نیست که آیا ALP نقش‌های مشابهی در حشرات نیز داشته باشد، اما همسانی‌های ساختاری بین ALP حشرات و پستانداران وجود دارد. از طرفی دیگر شواهد نشان داده‌اند که همبستگی مثبتی بین فعالیت ALP و طول عمر و سلامتی زنبور عسل وجود دارد (Di Pasquale et al., 2013). نقش ALP در گوارش و سم‌زدایی باعث شده است از این آنزیم به عنوان یک نشانگر زیستی برای آلودگی مناطق پرورش زنبور عسل با حشره‌کشها استفاده گردد (Decio et al., 2021). شناخت پایه‌های ژنتیکی صفات مهم و اقتصادی زنبورهای عسل می‌تواند در تعیین استراتژی‌های مناسب برای مدیریت کلونی‌ها، مهم باشد. به طور مثال شناسایی نشانه‌های انتخاب در زمینه ایمنی و رفتار زنبور عسل می‌تواند در فعالیت‌هایی مانند آمیخته‌گری‌ها و تعیین روش‌های مناسب کنترل بیماری و نحوه کار با کلونی موثر باشد. همچنین داشتن اطلاعات دقیق درباره پتانسیل‌های ژنومی نژادهای مختلف می‌تواند به پیش‌بینی رفتار آنها در چالش‌های پیش‌رو از جمله تغییرات اقلیمی کمک کند. نکته‌ای که در نهایت باید به آن توجه کرد این است که به دلیل نبود اطلاعات کافی در مورد عملکرد ژن‌های زنبور عسل، انجام مطالعات بیشتر در جهت شناخت بهتر عملکرد ژن‌ها در این گونه بسیار حیاتی می‌باشد. همچنین، هرچند زنبور عسل ایرانی به دلیل فقدان داده‌های ژنومی، بخشی از تحقیق حاضر نبود، اما به عنوان یک پیشنهاد می‌توان به این مسئله اشاره کرد که پرداختن دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی به این مخزن ژنی ارزشمند می‌تواند به طراحی استراتژی‌های کارآمد حفاظتی، اصلاحی و مدیریتی منجر گردد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر از اطلاعات ژنومی دو نژاد زنبور عسل ایتالیایی و قفقازی که جزء نژادهای پر طرفدار در بین

زنبورداران ایران و جهان هستند، به منظور شناسایی نواحی متمایز ژنتیکی بین آنها استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که علیرغم عدم تکمیل اطلاعات ژنومی مربوط به زنبورهای عسل در پایگاه‌هایی مانند NCBI، مطالعات ژنومی قابلیت بالایی در شناسایی تمایزات ژنتیکی و قابلیت‌های متفاوت بین نژادهای گوناگون را دارا می‌باشند. شناخت پتانسیل‌های ژنتیکی و شناسایی تنوعات موجود بین نژادهای مختلف زنبور عسل به ما این امکان را می‌دهند که به استراتژی‌های اصلاحی و مدیریتی مطلوبی دست یابیم. یافته‌ها نشان دادند که نواحی ژنومی موثر بر سیستم ایمنی، جزء قسمت‌هایی است که تحت تاثیر انتخاب قرار گرفته‌اند. این نواحی می‌تواند اطلاعاتی ارزشمند درباره ظرفیت‌های ایمنی‌زایی نژادهای مختلف را در اختیار اصلاح‌گران و پرورش دهندگان قرار دهند. آنالیز داده‌های ژنومی اطلاعاتی مفید در مورد زنبور عسل در اختیار ما قرار داده و نشان داد که می‌توان با استفاده از این اطلاعات به جنبه‌های پنهان تکامل در گونه‌های مورد مطالعه دست یافت. نتایج بررسی‌ها نشان داد که ژن‌هایی که دچار انتخاب مثبت شده‌اند، در زمینه‌هایی از جمله رفتار، جستجوی غذا، نظافت، دفاع از کلنی، ایمنی و همچنین انواع فرآیندهای سلولی دخیل هستند. این صفات جزء مهمترین و اقتصادی‌ترین صفات در پرورش زنبور عسل به شمار می‌روند و از این‌رو کسب دانش در مورد آنها می‌تواند در آینده زنبورداری حائز اهمیت باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی / حمایت معنوی / همکاری در اجرای

پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655–1664. <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>
- Arechavaleta-Velasco, M. E., Alcalá-Escamilla, K., Robles-Rios, C., Tsuruda, J. M., & Hunt, G. J. (2012). Fine-scale linkage mapping reveals a small set of candidate genes influencing honey bee grooming behavior in response to *Varroa* mites. *PLoS ONE*, 7(11), Article e47269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047269>
- Askari, N., Mohammadabadi, M., & Baghizadeh, A. (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat, and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(3), 222–229. <https://doi.org/10.5812/ijb.7228>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boncristiani, D. L., Tauber, J. P., & Palmer-Young, E. C. (2021). Impacts of diverse natural products on honey bee viral loads and health. *Applied Sciences*, 11(22), Article 10732. <https://doi.org/10.3390/app112210732>
- Browning, B. L., Tian, X., Zhou, Y., & Browning, S. R. (2021). Fast two-stage phasing of large-scale sequence data. *American Journal of Human Genetics*, 108(10), 1880–1890. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.08.005>
- Chandrasekaran, S., Ament, S. A., Eddy, J. A., Rodriguez-Zas, S. L., Schatz, B. R., Price, N. D., & Robinson, G. E. (2011). Behavior-specific changes in transcriptional modules lead to distinct and predictable neurogenomic states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18020–18025. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114093108>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Decio, P., Miotelo, L., Pereira, F. D. C., Roat, T. C., Marin-Morales, M. A., & Malaspina, O. (2021). Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, e112581. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112581>
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee

- health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8(8), Article e72016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Foret, S., Kucharski, R., Pellegrini, M., Feng, S., Jacobsen, S. E., Robinson, G. E., & Maleszka, R. (2012). DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4968–4973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202392109>
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., & Cornuet, J. M. (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*, 9(7), 907–921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00956.x>
- Ganapathy, A., & Ezekiel, U. (2019). Phytochemical modulation of miRNAs in colorectal cancer. *Medicines*, 6(2), Article 48. <https://doi.org/10.3390/medicines6020048>
- Grozinger, C. M., & Zayed, A. (2020). Improving bee health through genomics. *Nature Reviews Genetics*, 21(5), 277–291. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0210-7>
- Grozinger, C. M., Sharabash, N. M., Whitfield, C. W., & Robinson, G. E. (2003). Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(Suppl. 2), 14519–14525. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335884100>
- Hedayat-Evrigh, N., Khalkhali-Evrigh, R., & Bakhtiarizadeh, M. R. (2020). Genome-wide identification and analysis of variants in domestic and wild Bactrian camels using whole-genome sequencing data. *International Journal of Genomics*, 2020, Article 2430846. <https://doi.org/10.1155/2020/2430846>
- Huisken, J. L., & Rehan, S. M. (2023). Brain gene expression of foraging behavior and social environment in *Ceratina calcarata*. *Genome Biology and Evolution*, 15(7), Article evad117. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad117>
- Kandemir, I., Özkan, A., & Fuchs, S. (2011). Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: A geometric morphometric approach. *Apidologie*, 42(5), 618–627. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0063-3>
- Kang, Y., Wang, Z., An, K., Hou, Q., Zhang, Z., & Su, J. (2024). Introgression drives adaptation to the plateau environment in a subterranean rodent. *BMC Biology*, 22(1), Article 187. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01986-y>
- Khalkhali-Evrigh, R., Hedayat, N., Seyedsharifi, R., Shakouri, M., & Ponnampalam, E. N. (2025). Genomic evidence of improved fertility and adaptation in Iranian domestic sheep attributed to introgression from Asiatic mouflon and urial. *Scientific Reports*, 15(1), e1185. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-85756-y>
- Kovac, H., Käfer, H., Stabentheiner, A., & Costa, C. (2014). Metabolism and upper thermal limits of *Apis mellifera carnica* and *A. m. ligustica*. *Apidologie*, 45(6), 664–677. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0284-3>

- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, W., Evans, J. D., Huang, Q., Rodríguez-García, C., Liu, J., Hamilton, M., Grozinger, C. M., Webster, T. C., Su, S., & Chen, Y. P. (2016). Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6779–6787. <https://doi.org/10.1128/AEM.02105-16>
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N., & Michelson, A. M. (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development*, 126(17), 3715–3723. <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3715>
- Lou, R. N., & Therikildsen, N. O. (2022). Batch effects in population genomic studies with low-coverage whole-genome sequencing data: Causes, detection, and mitigation. *Molecular Ecology Resources*, 22(5), 1678–1692. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13559>
- Ma, C., Xue, T., Peng, Q., Zhang, J., Guan, J., Ding, W., Li, Y., Xia, P., Zhou, L., Zhao, T., Wang, S., Quan, L., Li, C.-Y., & Liu, Y. (2023). A novel N6-deoxyadenine methyltransferase METL-9 modulates *C. elegans* immunity via dichotomous mechanisms. *Cell Research*, 33(8), 628–639. <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00826-y>
- Minozzi, G., Lazzari, B., De Iorio, M. G., Costa, C., Carpana, E., Crepaldi, P., Rizzi, R., Facchini, E., Gandini, G., Stella, A., & Pagnacco, G. (2021). Whole-genome sequence analysis of Italian honeybees (*Apis mellifera*). *Animals*, 11(5), Article 1311. <https://doi.org/10.3390/ani11051311>
- Mohammadabadi, M. R., & Tohidinejad, F. (2017). Characteristics determination of *Rheb* gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(2), 289–295. <https://doi.org/10.22099/IJAAS.2017.4076>
- Mohammadabadi, M. R., Kheyroodin, H., Afanasenko, V., Babenko, O., Klopenko, N., Kalashnik, O., & Buchkovska, V. (2024). The role of artificial intelligence in genomics. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15(2), 1–10. <https://doi.org/10.22092/JAB.2024.355960.1411>
- Molodtsova, D. (2015). *Molecular evolution of the brain transcription regulatory network affecting worker behaviour of honey bees (Apis mellifera)* [Unpublished doctoral dissertation]. [Institution Name].
- Nadeau, N. J., & Jiggins, C. D. (2010). A golden age for evolutionary genetics? Genomic studies of adaptation in natural populations. *Trends in Genetics*, 26(11), 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.004>
- Norouzy, A., Nassiry, M. R., Eftekhari Shahrody, F., Javadmanesh, A., Mohammad Abadi, M. R., & Sulimova, G. E. (2005). Identification of bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Brown Swiss AI bulls in Iran. *Russian Journal of Genetics*, 41(12), 1409–1413. <https://doi.org/10.1007/s11177-005-0243-9>

- Ou, J., Deng, H. M., Zheng, S. C., Huang, L. H., Feng, Q. L., & Liu, L. (2014). Transcriptomic analysis of developmental features of *Bombyx mori* wing disc during metamorphosis. *BMC Genomics*, 15, Article 820. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-820>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Saadatabadi, L. M., Mohammadabadi, M., Nanaei, H. A., Ghanatsaman, Z. A., Stavetska, R. V., Kalashnyk, O., Kochuk-Yashchenko, O. A., & Kucher, D. M. (2023). Unraveling candidate genes related to heat tolerance and immune response traits in some native sheep using whole-genome sequencing data. *Small Ruminant Research*, 225, Article 107018. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.107018>
- Sabeti, P. C., Varilly, P., Fry, B., Lohmueller, J., Hostetter, E., Cotsapas, C., Xie, X., Byrne, Vinh, E. H., McCarroll, S. A., Gaudet, R., Schaffner, S. F., Lander, E. S., & The International HapMap Consortium. (2007). Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature*, 449(7164), 913–918. <https://doi.org/10.1038/nature06250>
- Sharma, R. (2014). *Analysis of the FGF signalling pathway during embryogenesis of the red flour beetle Tribolium castaneum* [Doctoral dissertation, Universität Rostock]. https://rosdok.uni-rostock.de/resolve/id/rosdok_document_0000002959
- Shokri, S., Khezri, A., Mohammadabadi, M., & Kheyroodin, H. (2023). The expression of *MYH7* gene in femur, humeral muscle, and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(2), 217–236. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.21524.1486>
- Wragg, D., Marti-Marimon, M., Basso, B., Bidanel, J. P., Labarthe, E., Bouchez, O., Le Conte, Y., & Vignal, A. (2016). Whole-genome resequencing of honeybee drones to detect genomic selection in a population managed for royal jelly. *Scientific Reports*, 6, Article 27168. <https://doi.org/10.1038/srep27168>
- Wragg, D., Techer, M. A., Canale-Tabet, K., Basso, B., Bidanel, J. P., Labarthe, E., Bouchez, O., Le Conte, Y., Clémencet, J., Delatte, H., & Vignal, A. (2018). Autosomal and mitochondrial adaptation following admixture: A case study on the honeybees of Reunion Island. *Genome Biology and Evolution*, 10(1), 220–238. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx247>
- Yıldız, B. İ., & Karabağ, K. (2022). Quantitation of neuroxin-1, ataxin-3, and atlastin genes related to grooming behavior in five races of honey bee, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae), in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 46(1), 3–11. <https://doi.org/10.16970/entoted.992984>