✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۶و۵۷، پاییز و زمستان ۱۳۸۱

بررسی وضعیت کروموزومی توده مرکزی زنبور عسل ایران

● نعمت ا... اسدی، کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
● علی اکبر قره داغی، عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
● سید محمود غفاری، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی دانشگاه تهران
غلامحسین طهماسبی، عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۱

چکیده

مطالعات کروموزومی یک گام مهم در علم سیتوژنتیک است که برای بررسی خصوصیات ژنومی، ساختار و ناهنجاریهای کروموزومی به‌کار می‌رود. در این تحقیق وضعیت کروموزومهای توده مرکزی زنبور عسل ایران مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های کروموزومی از بافت بیضه لاروهای جوان سه تا چهار روزه و شفیره‌های نر در مرحله‌ای که چشمهای شفیره به رنگ سفید مایل به شیری می‌باشد استفاده گردید. برای این منظور در آزمایشگاه با استفاده از یک استریومیکروسکوپ و پنسهای ظریف، بیضه از داخل بدن نمونه خارج و در محلول (کلشی سین ۰/۱ درصد و KCl ۰/۴ درصد) پیش تیمار می‌شد. سپس بافت بیضه در محلول اسیداستیک / متانول (۳:۱) تثبیت و در فریزر نگهداری می‌شد. برای تهیه لام، از روش له کردن بافت استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ساده از محلول رنگ استواورسئین و برای تعیین الگوی نواربندی، از روش نواربندی G استفاده گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد کروموزومهای زنبور نر در این توده برابر با n=۱۶ کروموزوم می‌باشد. اندازه‌گیری و مطالعه بازوهای کروموزومی نشان داد که تعداد ۴ کروموزوم متاسانتریک، ۱۲ کروموزوم ساب متاسانتریک یا ساب تلوسانتریک بودند. همچنین اندازه طول بازوهای کروموزومی در این توده نیز با دقت مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق تعداد ۱ مورد B کروموزوم برای اولین بار در دنیا مشاهده و گزارش شده است.

کلمات کلیدی: کروموزوم، توده مرکزی زنبور عسل ایران، سیتوژنتیک.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 56 and 57PP: 22-24

Karyological study on centeral honeybee of Iran

By: N.Asadi. A. Gharahedaghi & Gh. Tahmasebi, Animal Science Research Institute of Iran. M. Ghaffari, Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University.

In this study a stock of *Apis mellifera* meda from centeral part of Iran, from karyological point of view was taken into consideration. Testes from drone of the milk-white eye puple and young larvae (3 to 4 instar larvae) were used. They were pretreatment by hypotonic - colchicine (0.4% KCl, 0.1% colchicine) solution for 30 minutes and fixed in acetic acid - metanol (1:3 v/v). The samples were stored a 20° C. The preparation were made by squash technique and usual air dry method. Staining was carried out by acetic - orcein and giemsa solution for G-banding. The chromosome number of the haploid set for this stock were n=16 and they consists of 4 metacentric chromosomes, 12 submetacentric or subtelocentric chromosomes. the longest and the shortest chromosomes were 2.79 and 0.84μ. The secondary constriction was clearly seen in the longest chromosome. G-banding paterns in this stock were not clear. Because, some bands location were changed in different of cells which were observed In many cells a B-chromosome were observed.

Keywords: Karyological, Honeybee, Chromosomes, *Apis mellifera* meda.

مقدمه

ارزش غذایی عسل و استفاده از سایر فرآورده‌های زنبور عسل در صنایع غذایی، داروسازی، لوازم آرایشی و شمع‌سازی اهمیت پرورش این حشره را توجیه می‌کند. این در حالیست که امروزه نقش عظیم زنبور عسل در حفظ فلور گیاهی محیط زیست و افزایش محصولات زراعی و باغی در درجه اول اهمیت قرار گرفته است.

موفقیت در امر پرورش زنبور عسل بستگی به دانش و اطلاعات لازم در مورد رفتار و فعالیت‌های این حشره دارد که خود مستلزم داشتن اطلاعات کافی در مورد خصوصیات بدن، زیست‌شناسی، سیتوژنتیک و ژنتیک آن می‌باشد. لذا در یک مدیریت صحیح لازم است قبلاً از هر اقدامی ابتدا وضعیت ژنتیکی و نژادی کلنی‌های زنبور عسل مورد بررسی قرار گیرد.

علاوه بر تأثیر بسیار مثبت مطالعات ژنتیکی و سیتوژنتیکی بر افزایش تولید، مدارکی وجود دارد که نشان می‌دهد بعضی از بیماریهای زنبور عسل را می‌توان با ایجاد مقاومت‌های ژنتیکی کنترل نمود.

اولین گزارش در مورد میله‌ای شکل بودن کروموزومهای زنبور عسل در سال ۱۹۴۸ توسط Sanderson منتشر شد (۵). Hoshiba در سال ۱۹۸۴ جزئیات بیشتری در مورد کروموزومهای زنبور عسل ارائه کرد. در این مطالعه ضمن شمارش تعداد کروموزومها، محلهای سانترومری نیز تا حدودی مشخص گردید (۳).

با توجه به اهمیت موضوع، در تحقیق حاضر وضعیت کروموزومهای توده زنبور عسل موجود در مرکز کشور مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

مواد و روشها

در این تحقیق، جهت بررسی وضعیت کروموزومی و کاریوتیپ زنبور عسل از بیضه‌های لاروهای جوان زنبوران نر کلنی‌های زنبور عسل موجود در استانهای اصفهان، تهران، مرکزی و قزوین استفاده شد.

جهت نمونه برداری از کلنی‌های فوق ابتدا محدوده دوره پرورش زنبوران نر در هر یک از مناطق مورد نظر برای نمونه گیری مشخص گردید. پس از آن بر حسب

شکل ۱ - مرحله متافاز: تعداد هاپلوئید کروموزومها در زنبور عسل نر توده مرکزی ایران

زمان پرورش زنبوران نر، نمونه گیری از کلنی‌های زنبور عسل انجام گرفت (شکل ۱).

نمونه‌ها پس از جمع آوری به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس با استفاده از یک استریو میکروسکوپ [1] و پنس‌های ظریف بیضه‌ها با دقت از سطح بدن جدا گردید.

بیضه‌های جمع آوری شده هر یک به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کلش سین [2] ۰/۰۱ درصد و کلرید پتاسیم ۰/۴۵ درصد قرار گرفت.

برای تثبیت بافتها از ماده تثبیت کننده اسید استیک / متانول استفاده شد. این ترکیب حاوی یک قسمت اسیداستیک خالص و سه قسمت متانول می‌باشد.

برای رنگ‌آمیزی ساده، پس از تهیه گسترش نمونه، لامها را به مدت حدود ۳۰ ثانیه در اسید استیک سرد خالص قرار می‌دهیم. این کار جهت کاهش رنگ‌پذیری سیتوپلاسم سلول صورت می‌گیرد (۴).

در مرحله بعد پس از خشک کردن اسلایدها، سطح نمونه را با ۳ الی ۴ قطره رنگ استواورسئین پوشانده و پس از چند دقیقه لام را بر روی نمونه قرار می‌دهیم. لام حاوی رنگ به مدت حدود ۲ دقیقه با ملایمت بر روی شعلهٔ چراغ الکلی حرارت داده می‌شود. در مرحله آخر لام را بین چند لایه کاغذ خشک کن قرار داده و با انگشت شصت روی لام به آرامی فشار می‌دهیم. بدین ترتیب علاوه بر خارج شدن رنگ اضافی، کروموزومها نیز بهتر پخش می‌شوند. لازم به یادآوری است که با توجه به شدت رنگ‌پذیری کروموزومها، می‌توان مدت رنگ‌آمیزی را افزایش داد. البته باید توجه داشت که، رنگ موجود در سطح لام در مجاورت هوای اطاق پس از مدتی رسوب ایجاد کرده و امکان اشتباه وجود دارد.

برای اجرای تکنیک نواربندی - G پس از تهیه گسترش نمونه بر روی لام از محلول تریپسین استفاده شد. برای این منظور طبق دستورالعمل زیر اقدام گردید.

لامهای حاوی نمونه به مدت حدود ۷ روز در دمای اطاق قرار گرفتند. سپس سطح نمونه با محلول تریپسین به مدت حدود ۱۰-۱۵ ثانیه پوشانده شد.

لامها بلافاصله بعد از تیمار تریپسین با محلول سالین شستشو شدند.

در این مرحله می‌توان نمونه‌های تهیه شده را با کمک یک میکروسکوپ فازکنتراست، بررسی و اگر لازم بود مجدداً تیمار با تریپسین تکرار شود تا زمانی که کروموزومها به خوبی متورم شوند(۱).

جهت رنگ‌آمیزی و نواربندی - G از رنگ گیمسا استفاده شد.

به‌جای رنگ گیمسا می‌توان از رنگ لیشمن [3] به نسبت ۱ به ۴ با بافر PBS استفاده و لامها را به مدت ۳ تا ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی نمود (۶).

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از بررسی‌های کروموزومی بر روی زنبوران عسل نر در توده مرکزی، نژاد زنبور عسل ایرانی نشان می‌دهد که تعداد هاپلوئید کروموزومی در این توده برابر n=۱۶ می‌باشد (شکل ۱). همچنین آنالیز کاریوتیپ انجام شده بر روی حداقل ۳۰ سلول متافازی بر اساس روش نامگذاری لوان [4] نشان می‌دهد که در بین ۱۶ کروموزوم موجود، چهار عدد از کروموزومها متاسانتریک و دوازده کروموزوم ساب متاسانتریک و یا ساب تلوسانتریک است (شکل ۲).

طول بزرگترین کروموزوم در این توده حدود ۲/۷۹ میکرون و طول کوچکترین کروموزوم حدود ۰/۸۴ میکرون تعیین گردید (جدول ۱).

در بین کروموزومهای مشاهده شده یک کروموزوم بزرگ وجود دارد که اندازه آن حدوداً دو برابر بیشتر از طول کروموزومهای دیگر این توده می‌باشد. این کروموزوم از نظر محل قرار گرفتن سانترومر، یک کروموزوم متاسانتریک محسوب می‌گردد. در همین رابطه Hoshiba در گزارشات خود در سالهای ۱۹۷۸ و ۱۹۸۴ به وجود این کروموزوم در نژادهای زنبور عسل ایتالیایی [5] و همچنین زنبور عسل گونه آسیایی [6] اشاره کرده است (۲، ۳).

در بعضی گزارشات قبلی این کروموزوم به‌عنوان یک کروموزوم متاسانتریک سرکج معرفی شده است (۳).

اما مشاهدات ما بر روی بیش از ۳۰ سلول نشان داد که اگر چه در اغلب موارد انحنای انتهائی در یک بازوی کروموزوم مذکور مشاهده می‌گردد، اما این وضعیت ثابت و پایدار نمی‌باشد و در بعضی سلولها در مرحله متافاز این کروموزوم کاملاً راست و خطی می‌باشد. در شکل شماره ۳ موقعیت این کروموزوم نشان داده شده است.

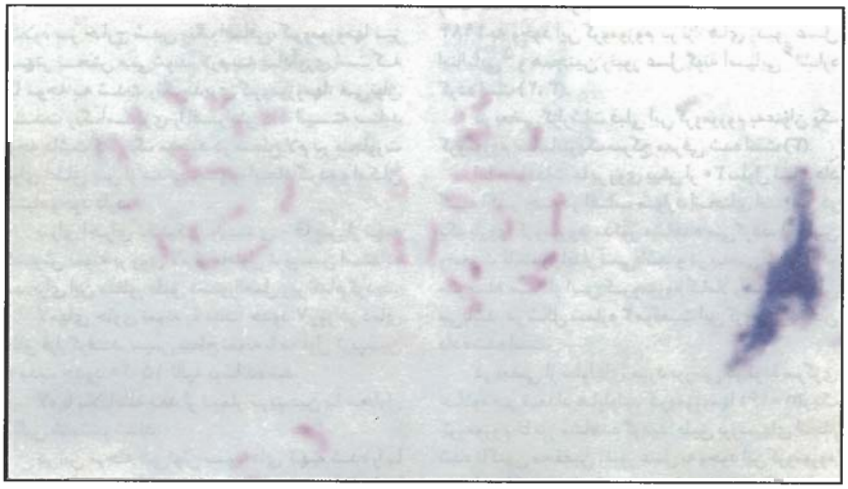
در بعضی از سلولهای مورد بررسی در تودهٔ مرکزی علاوه بر تعداد هاپلوئید کروموزومها (n=۱۶)، یک کروموزوم B نیز مشاهده گردید. طبق بررسیهای انجام شده تاکنون محققین زنبور عسل به وجود این کروموزوم در گزارشات خود اشاره ننموده‌اند (شکل ۴) لذا این موضوع برای اولین بار در دنیا گزارش می‌گردد.

نتایج بررسی‌های نواربندی G در کروموزومهای این توده نشان می‌دهد که باندهای G غالباً انتهایی و یا سانترومری بوده و تعداد باندهای میان بازویی بسیار کم می‌باشد. قابل ذکر است به‌دلیل کوچک بودن اندازه کروموزومها، در این مورد نتیجه‌گیری نتایج نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

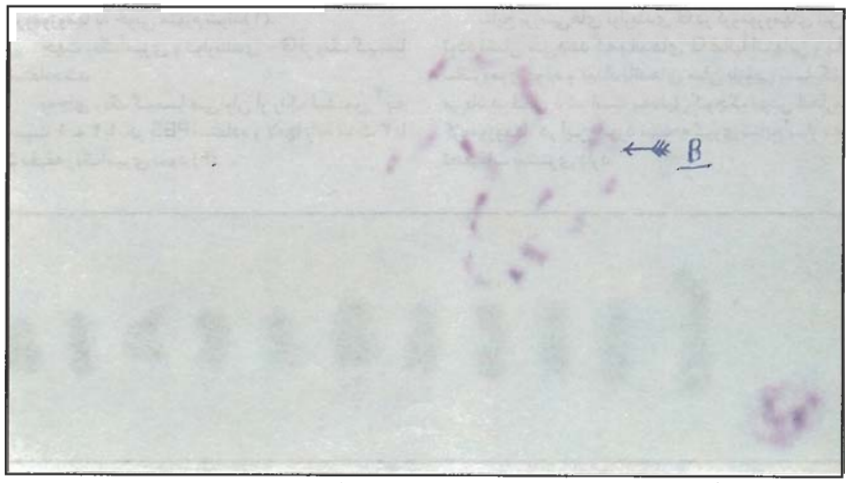
شکل ۲ - کاریوتیپ زنبور عسل نر توده مرکزی ایران ۱ - اندازه کروموزومها و نسبت طول بازوهای کروموزومی در زنبور عسل نر توده مرکزی ایران

۱- اندازه کروموزومها و نسبت طول بازوهای کروموزومی در زنبورعسل نر توده‌مرکزی ایران

شماره کروموزوم	طول کروموزوم	طول‌بازوی بزرگ	طول بازوی کوچک	نسبت‌طول‌بازوی بزرگ به کوچک	موقعیت سانترومر
۱	۲/۷۹	۱/۵۹	۱/۲	۱/۳۳	M
۲	۲/۱	۱/۴	۰/۶۳	۲/۲۲	SM
۳	۱/۸۲	۱/۲۳	۰/۵۹	۲/۰۸	SM
۴	۱/۶۵	۱/۰۲۵	۰/۶۲	۱/۶۵	M
۵	۱/۵۴	۱/۱۶	۰/۳۸	۳/۰۵	SM
۶	۱/۴۸	۱/۱۱	۰/۳۷	۳	SM
۷	۱/۴۲	۰/۸۱	۰/۶۱	۱/۳۲	M
۸	۱/۳۱	۰/۹۳	۰/۳۷	۲/۵	SM
۹	۱/۲۶	۰/۸۴	۰/۴۲	۲	SM
۱۰	۱/۲۳	۰/۸۲	۰/۴۱	۲	SM
۱۱	۱/۲۳	۰/۸۲	۰/۴۱	۲	SM
۱۲	۱/۲۲	۰/۶۱	۰/۶۱	۱	M
۱۳	۱/۱۲	۰/۷۴	۰/۳۷	۲	SM
۱۴	۱/۰۸	۰/۷۲	۰/۳۶	۲	SM
۱۵	۰/۹۵	۰/۷۶	۰/۱۹	۴	SM
۱۶	۰/۸۴	۰/۶۳	۰/۲۱	۴	SM



شکل ۳ - مرحله متافاز: حالت راست و عدم خمیدگی بازو در کروموزوم بزرگ با پیکان نشان داده شده است.



شکل ۴ - مرحله متافاز: حضور Bکروموزوم همراه با نواربندی G در زنبور عسل توده مرکزی ایران

پاورقی‌ها

1- Stereo microscope
2- Colchicin
3- Lishman
4- Levan
5- *Apis mellifera* ligustica
6- *Apis Cerana*

منابع مورد استفاده

۱ - رحیمی، مهران. ۱۳۷۵. بررسی کاریوتیپی نژاد گاو سیستانی در ایران. انتشارات موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. صفحه ۶-۳.

2 - Hoshiba, H; A. Kusanagi. 1978. Karyological study of honey bee. J. Apic Res. 17(3). 105-109.

3 - Hoshiba, H. 1984. Karyotype and banding analyses on haploid males of the honeybee (*Apis mellifera*). proc. Japan. Acad. 60 (B). 238-240.

4 - Imai, H. T; T. Masolobata. 1972. Karyological studies of Japanes ants (Hemenoptera, Formicidae). Chromosoma. 37. 93-200.

5 - Sanderson, A.R., D.W. Hall. 1948. The cytology of the honeybee *Apis mellifera*. Nature. 162. 34-35.

6 - Summer, A. T. 1994. Chromosome banding and identification absorption staining human press. InC. TOWTWA. Ni. 59-86.