استفاده از خصوصیات الکتروفورتیک پروتئین‌های قفس سینه در تفکیک جمعیتهای زنبور عسل نژاد ایرانی

غلامحسین طهماسبی*، دردی قوجق**، رحیم عبادی*** و منصور آخوندی*

چکیده

تفکیک و متمایز ساختن جمعیتهای زنبور عسل ایرانی از اقدامات اساسی برای برنامه ریزی اصولی اصلاح نژاد این حشره در ایران می‌باشد. طی سالهای ۱۳۷۵ - ۱۳۷۱ تلاش شد تا با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی، وضعیت این جمعیتها در ایران مشخص شود. برای این منظور از ۲۵۱ کلنی مربوط به ۲۱ استان، ۸۴ شهرستان و ۱۵ زنبورستان نمونه برداری صورت گرفت. سپس با استفاده از روش الکتروفورز افقی پروتئین‌های قفس سینه زنبوران عسل کارگر، تفاوتها و شباهتهای زنبوران عسل مناطق مختلف کشور مشخص گردید.

نتایج نشان داد که کلنی‌های مربوط به شهرستانهای شمال و شرق کشور، به دلیل نداشتن باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود صد هزار دالتون، از کلنی‌های مناطق غربی و مرکزی کشور متمایز می‌شوند. با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی و مقایسات مورفولوژیک انجام شده بر روی توده‌های زنبور عسل ایرانی می توان نتیجه گرفت که حداقل در دو منطقه مذکور می‌توان مراکز اصلاح نژادی زنبور عسل ایران را سازماندهی نمود و در جهت بهبود خصوصیات بیولوژیک زنبور عسل ایرانی تلاش کرد.

واژه‌های کلیدی - *زنبور عسل نژاد ایرانی، خصوصیات پروتئین‌ها، الکتروفورز، تفکیک جمعیتها*

مقدمه

منطقه انتشار طبیعی زنبور عسل معمولی[1] در جهان محدودهٔ وسیعی است که از شمال به جنوب کشورهای اسکاندیناوی، از غرب به داکار، از جنوب به دماغه امید نیک و از شرق به کوه‌های اورال، مشهد و عمان محدود می‌شود. البته این حشره توسط انسان به مناطق دیگر جهان نیز انتقال داده شده است. بنابراین زنبور عسل نژاد ایرانی[2] در شرقی‌ترین قسمت پراکنش طبیعی زنبور عسل معمولی قرار دارد. طبق آمارهای منتشر شده از سوی معاونت امور دام وزارت جهاد سازندگی در ایران بیش

*- به ترتیب استادیار پژوهشی و کارشناس مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

**- استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی بابل

***- دانشیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

1. *Apis mellifera* L. 2. *A.m. meda*

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]

از ۲ میلیون کلنی وجود دارد که سالانه بیش از ۲۴ هزار تن عسل تولید می‌کنند. ولی نداشتن ملکه‌های مناسب و پر محصول از مشکلات عمده زنبورداران ایران است و ضعف در بخش اصلاح نژاد به عنوان اساسی‌ترین مشکل این صنعت مطرح می‌باشد. برای برنامه ریزی اصولی اصلاح نژادی، اولین قدم مشخص کردن وضعیت ژنتیکی زنبور عسل در کشور است. این کار به روشهای مختلفی در دنیا صورت می‌گیرد، که در بین آنها می‌توان به استفاده از خصوصیات ظاهری، تنوع پروتئین‌ها و خصوصیات DNA اشاره نمود.

دیویدسون و همکارانش (۳) در مطالعات خود روی زنبورهای افریقایی شده سه پروتئین اختصاصی برای آنها مشخص کردند که در زنبورهای افریقایی و اروپایی وجود ندارد. در بررسی دیگری شپارد (۸) به این نتیجه رسید که آنزیم مالات دهیدروژناز - ۸۰ در زنبوران عسل آمریکای شمالی وجود دارد و در زنبور عسل ایتالیایی وجود ندارد. در مطالعات تایلر و همکارانش (۱۲) مشخص شد که دو آنزیم مالات دهیدروژناز ـ ۱ وهگزوکیناز - ۲ در زنبورهای افریقایی شده وجود دارد.

سیلوستر (۱۱) در بررسیهای خود با استفاده از پلی‌مورفیسم آنزیم مالات دهیدروژناز، توانست زنبورهای کارگر اروپایی و افریقایی شده را با احتمال ۹۰% از هم تفکیک کند. بررسیهای شپارد و برلوچر (۹) در زنبوران عسل ایتالیا نشان داد که در مورد آنزیم‌های استراز، مالیک و مالات دهیدروژناز پلی‌مورفیسم وجود دارد. اندریتو و همکاران (۶) با استفاده از پلی‌مورفیسم‌های آنزیم مالات دهیدروژناز مشخص کردند که در کنیا ۹ توده از چهار نژاد مختلف وجود دارد. بررسیهای لوبو و همکارانش (۴) برای تعیین وضعیت ژنتیکی کلنی‌های زنبور عسل برزیل و افریقا، که با استفاده از پلی مورفیسم آنزیم مالات دهیدروژناز انجام شد، نشان داد که تفاوتهای درون گروهی کمی بین کلنی‌های زنبور عسل منطقه وجود دارد. بررسیهای میکسنر و همکارانش (۵) روی پلی مورفیسم ۵ آنزیم مختلف نشان داد که دو توده قابل تفکیک زنبور عسل در مناطق مرتفع و مناطق دیگر کنیا وجود دارد.

در این بررسی تلاش شد تا با استفاده از خصوصیات پروتئین‌های قفس سینه زنبور عسل در مناطق مختلف کشور وضعیت ژنتیکی توده‌های زنبور عسل نژاد ایرانی مشخص شود تابتوان بر اساس اطلاعات مذکور برای اصلاح نژاد زنبور عسل در کشور به طور اصولی برنامه ریزی نمود.

مواد و روشها

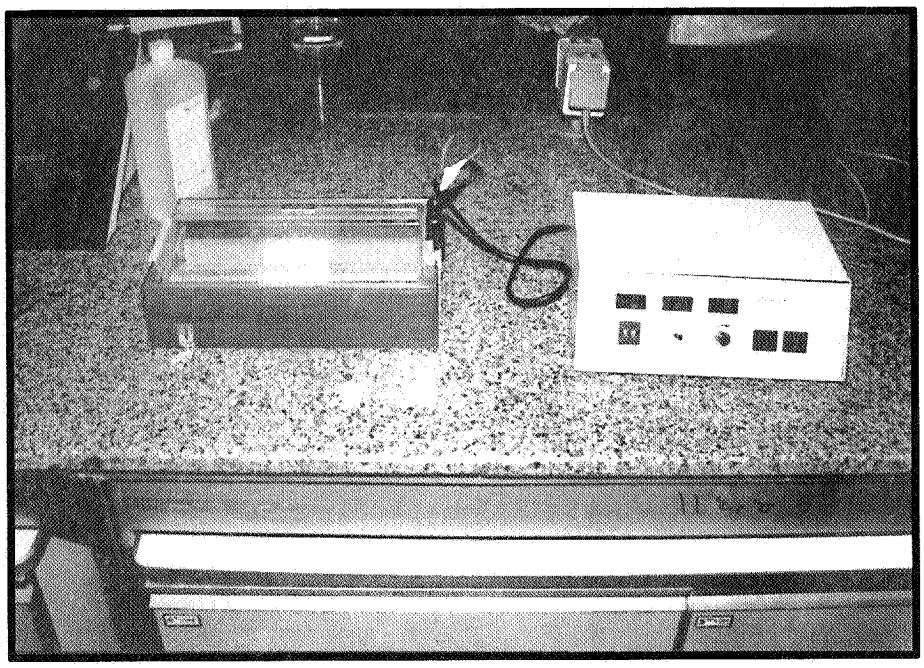
برای انجام بررسیهای بیوشیمیایی توده‌های زنبور عسل ایران، به تناسب پتانسیل زنبورداری از استانهای مختلف کشور نمونه برداری صورت گرفت. به این ترتیب که از بین زنبورداران شهرستانهای مختلف، که دارای بیش از ۱۰۰ کلنی بودند و حدود سه سال سابقه زنبورداری داشتند، ده درصد انتخاب و از ۳ - ۲ کلنی آنها به طور تصادفی نمونه برداری شد. در مجموع از ۲۵۱ کلنی برای انجام بررسیهای بیوشیمیایی نمونه برداری لازم انجام شد که این کلنی‌ها مربوط به ۲۱ استان، ۸۴ شهرستان و ۱۱۵ زنبورستان کشور بود.

نمونه برداری در سالهای ۱۳۷۱ و ۱۳۷۲ و در ماه‌های خرداد و تیر انجام شد و از هر کلنی حدود ۵۰ زنبور کارگر از روی قابهای مختلف به طور تصادفی برداشته شد. برای نمونه برداری از شیشه‌های دهانگشاد نیم کیلویی، که پنبه آغشته به کلروفرم در آنهاقرار داده شده بود، استفاده گردید. نمونه‌ها پس از بیهوش شدن به داخل شیشه‌های مخصوصی که در مقابل سرما مقاومت داشت، منتقل می‌شد. این شیشه‌ها در داخل کانتینرهای ازت مایع با برودت $-160^{\circ}C$ به تهران منتقل و در فریزرهای $-80^{\circ}C$ تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد.

برای انجام این بررسی از روش الکتروفورز افقی و استات سلولز استفاده شد، که مطابق با روش سام‌بروک و مانیاتیس (۷) می‌باشد. در این روش ابتدا سر و قفس سینه زنبورها جدا شده، در داخل هاون چینی کاملاً هموژنیزه گردید. سپس نمونه در بافری به حجم مساوی از اسید کلریدریک و تریس به مدت

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]



شکل ۱ - دستگاه الکتروفورز افقی و استات سلولز برای انجام آزمایشهای بیوشیمیایی

پنج‌دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس از پایان سانتریفوژ از قسمت بالایی شیشه‌ها محلول محتوی پروتئین غلیظ شده برای انجام الکتروفورز جداگردید.

در هر آزمایش محلول آماده شده مربوط به ده شهرستان مختلف در محلهای مخصوصی که روی ژل استات سلولز وجود داشت تزریق و استات سلولز در دستگاه الکتروفورز حاوی باربیتال با pH = ۸/۶ منتقل گردیده، به مدت ۳۰ دقیقه در معرض جریانی با اختلاف پتانسیل ۲۳۴ میلی ولت و شدت جریان ۸ میلی‌آمپر قرار داده شد(شکل ۱). پس از پایان این مرحله استات سلولز به مدت سه دقیقه به محلول رنگ‌آمیزی[1] حاوی ردبلو[2] منتقل گردید. سپس سه دقیقه در محلول رنگ بر[3] و سه دقیقه در محلول شفاف کننده[4] قرار گرفت. پس از آن استات سلولز به داخل آب مقطر انتقال یافت و در نهایت روی شیشه مخصوص ژل الکتروفورز به مدت ۲۰ دقیقه در اتو $80^{\circ}C$ قرارگرفت تا خشک شود. در این مرحله باندهای پروتئینی مختلف بدن زنبورها در ستونهای مختلف در کنار هم قابل رؤیت بود.

نتایج

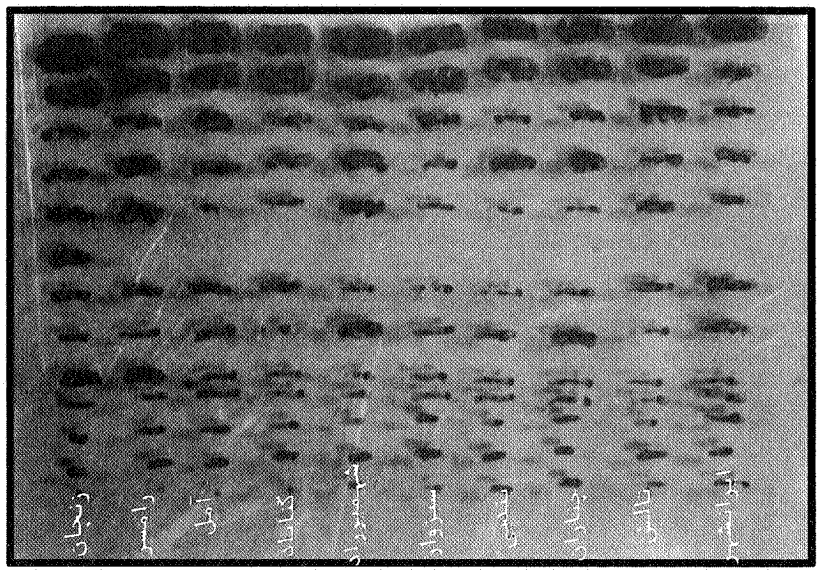
در بررسیهای انجام شده با روش الکتروفورز افقی روی زنبوران عسل ایران، برای هر شهرستان مورد مطالعه ۱۳ باند مختلف به‌دست آمد که مربوط به پروتئین‌های مختلف بدن زنبوران مذکور بود. لازم به ذکر است که در این مطالعه تلاش شد تا تشابهات و تفاوتهای کلنی‌های مربوط به شهرستانهای مختلف در کنار یکدیگر مورد ارزیابی قرار گیرند که پس از آزمایشهای بسیار با ترکیبهای مختلف شهرستانها، نهایتا" نتایج بعضی از آنها، که در برگیرنده نتایج کلی این مطالعه است، ارائه می‌گردد.

در شکل ۲، که محلول تهیه شده از بدن زنبوران شهرستانهای زنجان، گناباد، شهمیرزاد، سبزوار، بندپی، چناران، تالش و ایرانشهر در کنار یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت، تنها نمونه مربوط به شهرستان زنجان دارای کلیه باندهای پروتئینی

1. Staining solution 2. Red blue 3. Destaining solution 4. Clearing solution

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]



شکل ۲ - مقایسه پروتئین‌های قفس سینه زنبوران عسل کارگر برخی شهرستانهای ایران با روش الکتروفورز افقی

بود و بقیه شهرستانها فاقد باند ششم پروتئینی بودند. وزن مولکولی این باند با استفاده از استانداردهای وزن مولکولی حدود صدهزار دالتون تشخیص داده شد. البته در این آزمایش تفاوتهای دیگری از لحاظ غلظت باندهای پروتئینی در باندهای مختلف بین شهرستانها به چشم می‌خورد که مربوط به تفاوت غلظت پروتئین‌های تزریق شده می‌باشد و با توجه به این که در این بررسی تفاوتهای کمّی پروتئین‌ها مد نظر نبوده و تفاوتهای مربوط به وجود یا عدم وجود پروتئین‌ها در تفکیک جمعیتها دخالت داشته است، لذا تفاوتهای مذکور از اهمیت کمتری برخوردار است.

در آزمایش دیگری با همین روش، نمونه‌های مربوط به شهرستانهای مشهد، سمنان، تربت حیدریه، شاهرود و لنگرود فاقد باند پروتئینی ششم با وزن مولکولی حدود صد هزار دالتون بودند و تفاوت بارز و چشمگیری با شهرستانهای دارای این باند داشتند (شکل ۳). تفاوت مربوط به غلظت باندهای پروتئینی مختلف در این بررسی نیز با توجه به توضیحات ذکر شده قبلی از اهمیت کمتری برخوردار بوده و مربوط به تفاوت غلظت پروتئین‌های تزریق شده است.

در آزمایش سوم با روش الکتروفورز افقی، شهرستانهای تبریز، خوی، اردبیل، اسدآباد، مهاباد، بیجار، نجف آباد، ملایر، محلات و مرند در کنار یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. با وجود تفاوتهای مربوط به غلظت باندهای پروتئینی مختلف، چون کلیه شهرستانهای مذکور دارای همه باندهای پروتئینی تشکیل شده بودند لذا اختلاف پروتئینی با هم نداشته، از یکدیگر قابل تفکیک نبودند(شکل ۴).

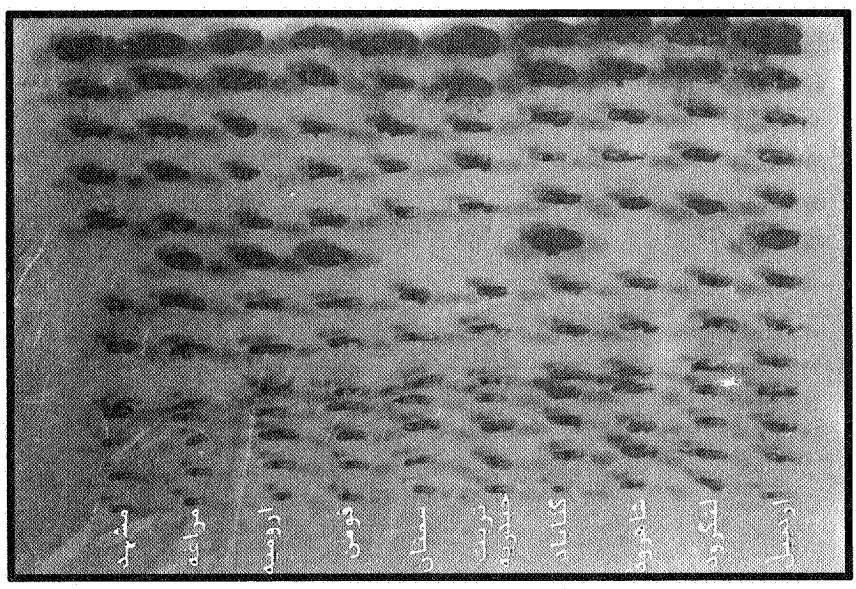
بحث

نتایج به دست آمده از بررسی خصوصیات الکترفورتیک زنبور عسل در مناطق مختلف کشور نشان می‌دهد که شهرستانهای مربوط به استانهای شرقی و شمالی کشور فاقد باند پروتئینی با وزن مولکولی صد هزار دالتون و شهرستانهای مربوط به استانهای مرکزی و غربی کشور دارای این باند هستند. لذا پروتئین مذکور می‌تواند در تفکیک جمعیتهای زنبور عسل ایران به عنوان یک عامل متمایز کننده به کار گرفته شود.

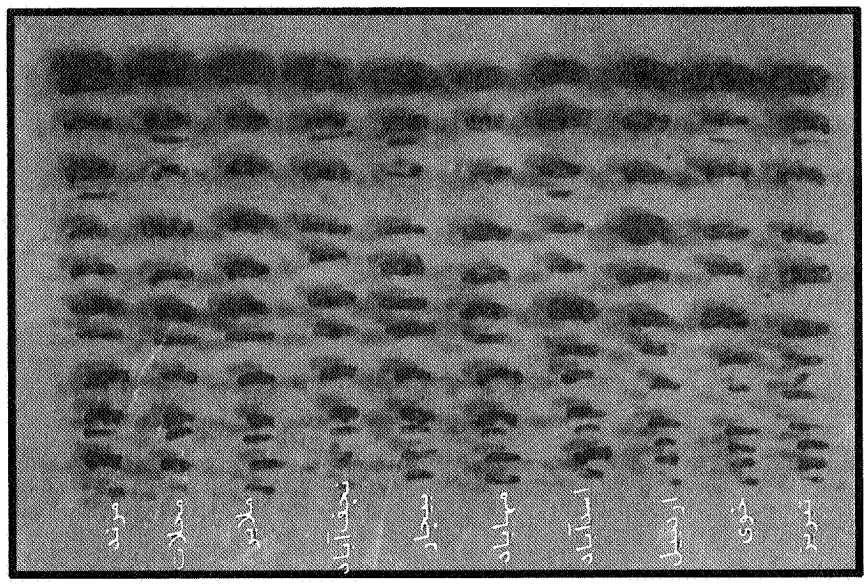
شهرستانهای استانهای شرقی و شمالی کشور یعنی استانهای مازندران، گیلان، خراسان، سمنان و سیستان و

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]



شکل ۳- مقایسه پروتئین‌های قفس سینه زنبوران عسل کارگر برخی شهرستانهای ایران با روش الکترفورز افقی



شکل ۴- مقایسه پروتئین‌های قفس سینه زنبوران عسل کارگر برخی شهرستانهای ایران با روش الکتروفورز افقی

بلوچستان در آزمایشهای به عمل آمده فاقد باند پروتئینی مذکور بودند. در بین آزمایشهای متعدد که بخشی از آنها در قسمت نتایج ارائه شده، تنها در یک آزمایش شهرستانهای فومن و گناباد برخلاف معمول دارای باند پروتئینی ششم بودند. ولی با توجه به این که در اکثریت قریب به اتفاق آزمایشهای به عمل آمده، استانهای شرقی و شمالی مورد مطالعه فاقد پروتئین مذکور بوده‌اند شاید منبع تامین کلنی‌هایی که به عنوان شاخص در این شهرستانها بوده و در آزمایشها شرکت داده شده‌اند، استانهای دیگر کشور باشد. بنابراین می‌توان پروتئین مذکور را به عنوان عامل متمایز کننده جمعیتها در زنبور عسل ایرانی

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]

ذکرنمود.

در مطالعات انجام شده در دنیا نیز از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها برای تفکیک نژادها و جمعیتهای زنبور عسل استفاده شده است. دیویدسون و همکاران (۳) در بررسیهای خود روی زنبور عسل افریقایی شده سه پروتئین اختصاصی از قفس سینه زنبور جدا کردند که در زنبورهای افریقایی و اروپایی وجود نداشت و در واقع این پروتئین‌ها متمایز کننده زنبورهای افریقایی شده از زنبوران دیگر در منطقه می‌باشند که شباهت زیادی به شاخص تمایز جمعیتهای زنبور عسل ایران دارد. در دنیا علاوه بر روش استفاده از کل پروتئین‌های بدن زنبور عسل از روشهای دیگری مثل استفاده از پلی مورفیسم آنزیم‌ها نیز استفاده می‌شود، که با توجه به ماهیت پروتئینی آنزیم‌ها می‌توان گفت در آن موارد نیز از اختلافات و تشابهات مربوط به پروتئین‌های بدن در تمایز و گروه‌بندی آنها استفاده می‌شود.

بررسیهای مورفولوژیک انجام شده توسط طهماسبی (۱) روی زنبور عسل معمولی در ۲۵ استان و ۱۰۴ شهرستان ایران، نشان می‌دهد که مناطق شمالی کشور شامل استانهای گیلان، اردبیل، مازندران و گلستان در یک گروه مجزا قرار دارند و استانهای مرکزی و غربی کشور به رغم این که در دو گروه قرار گرفته‌اند ولی تداخل زیادی با یکدیگر دارند.

بررسیهای بیوشیمیایی، نتایج به دست آمده از مطالعات مورفولوژیک توده‌های زنبور عسل ایران را تأیید کرد، به‌طوری که می‌توان نتیجه گرفت در ایران دو جمعیت کاملاً متفاوت در مناطق مرکزی و غربی و نیز مناطق شمال و شمال شرق وجود دارد. تفاوت جمعیت شمال و شمال شرق با بقیه مناطق، به‌دلیل شرایط متفاوت اکولوژیک شمال با بقیه مناطق کشور است. در ضمن، زنبورداران شمال به خاطر این که ییلاق و قشلاق مورد نیازشان در شرایط شمالی کشور تأمین می‌شود اکثراً در همان مناطق شمالی جا به جا می‌شوند. در این مناطق شرایط معتدل ساحلی شمال وضعیت مطلوبی برایشان به وجود آورده است به طوری که نیازی به کوچهای زمستانی به جنوب کشور ندارند. بنابراین تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین زنبوران عسل این منطقه و زنبوران مناطق دیگر وجود دارد که به عنوان دو جمعیت کاملاً متفاوت از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند. لذا می‌توان برای این دو منطقه کشور مراکز اصلاح نژادی جداگانه سازماندهی نمود و در جهت تثبیت خصوصیات مطلوب در این توده‌ها تلاش کرد.

با توجه به این که نژاد ایرانی در شرقی‌ترین قسمت پراکنش طبیعی زنبور عسل معمولی قرار دارد و کویر شرقی ایران دو گونه زنبور عسل معمولی و زنبور عسل آسیایی[1] را در جهان از یکدیگر جدا می‌کند، لذا تفاوتهای الکتروفورتیک به دست آمده بین جمعیتهای شرق و شمال شرق زنبور عسل ایرانی با بقیه جمعیتهای این نژاد، می‌تواند راهگشای مطالعات دقیق‌تر در مورد ارتباط گونه‌های زنبور عسل آسیایی و معمولی باشد. ضمناً می‌توان با مطالعات دقیق‌تر مورفولوژیک و بیوشیمیایی روی جمعیتهای شرقی زنبور عسل ایرانی و جمعیتهای غربی گونه زنبور عسل آسیایی در افغانستان و پاکستان، رابطه فیلوژنتیک این دو گونه را در جهان مورد بررسی قرار داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم آموزش و تحقیقات وزارت جهاد سازندگی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره)، دانشکده پزشکی بابل و دانشگاه تربیت مدرس که امکانات انجام این تحقیق را فراهم نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. *Apis cerana*

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]

منابع مورد استفاده

۱ـ طهماسبی، غ .ح. ۱۳۷۵. بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی توده‌های زنبور عسل ایران. پایان نامه دکترای تخصصی حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس ۲۴۹ صفحه.

2. Badino, G., G. Celebrano, A. Manino and S. Lobo. 1985. Enzyme polymorphism in the Sicilian honeybee. Experientia 41: 752-754.

3. Davidson, F., T. Udagawa and N. Lakey. 1989. Honeybee identification: characterization of three proteins specific to Africanized bees. Am. Bee J. 129(12): 813-814.

4. Lobo, J. A., M. A. Dellama and M. A. Mestriner. 1989. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera L.*). Evolution 43(4): 794-802.

5. Meixner, M. D., W. S. Sheppard, A. Dietz and R. Krell. 1994. Morphological and allozyme variability in honeybees from Kenya. Apidologie 25(2): 188-202.

6. Ndiritu, D. W., N. Mutugi and S. Ndungu. 1986. Variation in malate dehydrogenase allozymes among honeybee populations in Kenya. J. Apic. Res. 25(4): 234-237.

7. Sambrook, F. and A. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harber, Laborarory Press.

8. Sheppard, W. S. 1988. Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honeybee populations. Entomol. Soc. Am. 81(6): 886-889.

9. Sheppard, W. S. and S. H. Berlocher. 1985. New allozyme variability in Italian honeybee. J. Apic. Res. 76: 45-46.

10. Smith, D. R. and C. Glenn. 1995. Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). J. Heridity 86(1): 12-16.

11. Sylvester, H. A. 1982. Electrophoretic identification of Africanized honeybees. J. Apic. Res. 21: 93-97.

12. Taylor, O. R., A. Delgado and F. Brizuela. 1991. Identification of neotropical African hybrid and European honeybees with the use of allozymes. Am. Bee J. 131(12): 783.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.4.1.3]