مقاله کوتاه

مطالعه کروموزوم‌های *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) در مرحله پاکیتن با روش اسکواش

فاطمه فارسی[۱]، جاماسب نوذری[۱*] و عیسی ظریفی آناخاتون[۲]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاه‌پزشکی، بخش حشره‌شناسی

[۲] ایران، کرج، بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۶

چکیده

میوز یکی از پدیده‌های اساسی در روند زندگی حشرات است که موجب ایجاد گامت‌های هاپلوئید می‌گردد و انجام نرمال این تقسیم شرط پایه برای ادامه نسل یک‌گونه است. در پژوهش حاضر، مجموعه کروموزومی شب‌پره بید آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) در هر دو جنس نر (اسپرماتوسیت) و ماده (اووسیت) در مرحله پروفاز به روش اسکواش با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مورد ارزیابی قرارگرفت. جمعیت مورد مطالعه مربوط به همسانه پایه نگهداری شده (بیش از ۳۰ نسل) در آزمایشگاه بیوسیستماتیک دانشگاه تهران، کرج بود. در هر دو جنس، گستره هسته پاکیتن دارای مجموعه کروموزومی از ۳۰ بیوالنت (2n= 60) بود. نتایج نشان داد که رفتار کروموزوم‌ها در سلولهای مشاهده شده، به شکل نرمال بوده است. افراد این جمعیت، میوز کاملاً نرمالی را نشان دادند و به نظر می‌رسید اسپرماتیدها بارور باشند. به بیان دیگر در افراد این جمعیت، تشکیل بیوالنت‌ها طبیعی رخ می‌داد که در آنافاز به قطبین حرکت می‌کردند.

واژه‌های کلیدی: بیوالنت، گستره پاکیتن، *E. kuehniella*، میوز، اسکواش.

* نویسنده مسئول ، تلفن: ۰۹۱۲۳۶۰۳۷۴۳، پست الکترونیکی: nozari@ut.ac.ir

مقدمه

راسته بالپولکداران با حدوداً ۱۶۰۰۰۰گونه توصیف شده، تقریباً به‌عنوان یکی از بزرگترین تاکسون‌های حیوانی است (۱۴و ۱۷). گونه‌های راسته بالپولکداران در جنبه‌های متعددی با سایر راسته‌های حشرات تفاوت دارند که ازجمله دلایل آن وجود دو نوع اسپرم، اووژنز آکیاسماتیک و هتروگامت بودن ماده‌هاست (۶). میوز در نر و ماده‌های بالپولکداران در مقایسه با سایر راسته‌های حشرات با دو پدیده متمایز می‌گردد. نخست آنکه تفاوت اصلی و پایه در رخدادهای میوز در اعضای این راسته ناشی از آن است که در ماده‌ها میوز آکیاسماتیک و در نرها میوز کیاسماتیک است (۹ و ۱۰). مطالعات سیتوژنتیک تقسیم سلولی میوز آکیاسماتیک ماده در یازده خانواده از بالپولکداران گزارش شده است که بسیار نزدیک به راسته Trichoptera بوده است (۱). در بین این یازده خانواده، خانواده Pyralidae با دو گونه *Ectomylios ceratoriae* توسط موراگ و همکاران (۱۹۸۲) و *Ephestia kuehniella* توسط تراث (۱۹۷۷) مورد ارزیابی قرارگرفته است (۳ و ۱۲). دیگر آنکه، تفاوت بیشتر ناشی از این واقعیت است که در ماده‌ها طی اووژنز دو نوع سلول شامل اووسیت و سلولهای پرستار، در حال رشد و نمو هستند و این در حالی است که

در جنس نر همه اسپرماتوسیت‌ها در مراحل یکسانی از رویدادهای میوزی قرار دارند (۹). در بسیاری از گونه‌های بالپولکداران کروموزوم‌های جنسی Z و W در طی متافاز میتوز غیرقابل تشخیص هستند که این امر به علت اندازه مشابه این کروموزوم‌ها با اتوزوم‌ها و نیز ساختار هولوکینتیک آن‌ها می‌باشد، با این حال، در طی مرحله پاکیتن میوز ماده، می‌توان این کروموزوم‌ها را تشخیص داد و به بررسی آن‌ها پرداخت (۱۸). در اعضای راسته بالپولکداران، کروموزوم‌های W و Z اغلب غیرهمولوگ و با اندازه‌های متفاوت هستند (۱۰).

Ephestia kuehniella شب‌پره بید آرد، به‌عنوان مدل شناخته شده‌ای برای مطالعه بسیاری از مشکلات در فنوژنتیک، ژنتیک بیوشیمیایی، بیولوژی مقایسه‌ای و سیتوژنتیک استفاده می‌شود (۷). ماده‌های بید آرد ناهمگون جنس هستند که وضعیت عمومی در گونه‌های راسته بالپولکداران می‌باشد (۹). کروموزوم‌های جنسی بید آرد هم W و Z است که به نظر می‌رسد غیرهمولوگ باشند (۹). در یک هسته پاکیتن در جنس ماده بید آرد، مجموعه کروموزومی شامل ۳۰ بیوالنت است که ۲۹تای آن را همولوگ‌های اتوزوم و یکی را کروموزوم Z و W تشکیل می‌دهند در حالی که در جنس نر ۳۰ بیوالنت مشابه است (۹). در جنس نر بیوالنت جنسی(ZZ) به دلیل همولوژی جفت‌ها و فقدان هر نوع مارکر مرفولوژیکی دیگر، قابل تشخیص نیست (۹). اگرچه اطلاعات سیتولوژیکی *E. kuehniella* در دنیا موجود است ولی پژوهش‌های کاریولوژیکی این گونه مهم در ایران، صورت نگرفته است. طی مطالعات کروموزومی می‌توان وضعیت سیستماتیک و نیز تکاملی یک موجود را شناسایی و پیگیری نمود (۱۳و ۷). اختلاف در پارامترهای کروموزومی جمعیت‌های مختلف یک‌گونه در گستره طبیعی در بسیاری از موجودات، امری مشهود است (۴، ۵ و ۱۵). بر همین اساس، مطالعات کاریولوژیکی حشرات علاوه بر کاربردی که در زمینه سیستماتیک دارد، می‌تواند در زمینه دستکاری‌های کروموزومی و اصلاح ژنتیکی نیز، مفید باشد. با توجه به اهمیت بید آرد، هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی کروموزوم‌های این گونه مهم در شرایط جغرافیایی ایران ضمن اعمال تغییراتی در تکنیک سیتوژنتیک استاندارد بود.

مواد و روشها

به منظور ارزیابی سیتوژنتیک از جمعیت *Ephestia kuehniella*، همسانه پایه نگهداری شده در آزمایشگاه بیوسیستماتیک دانشگاه تهران، کرج استفاده شد. حشرات بر روی بستر پرورش، شامل ۷۵ درصد آرد گندم، ۲۵ درصد سبوس گندم به همراه ۲ درصد مخمر در انکوباتور 25±1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره نوری 16:8 ساعت روشنایی: تاریکی پرورش داده شدند.

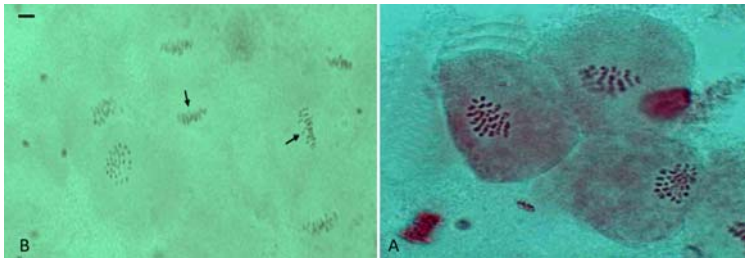
آماده‌سازی کروموزوم‌های پاکیتن (Pachytene Chromosomes): به‌منظور بررسی گستره هسته‌های پاکیتن از روش تراث (۱۹۷۶) با اندکی تغییرات استفاده شد. در آماده‌سازی‌های سیتوژنتیکی از مرحله لارو سن آخر بید آرد استفاده شد. برای تهیه نمونه‌های کروموزومی، گنادهای لاروی در محلول فیزیولوژیک (NaCl 0.9% + KCl 0.042% + CaCl2 0.025% در آب مقطر) با استفاده از سوزن‌های ظریف حشره‌شناسی جداسازی شد. سپس تثبیت نمونه‌ها در محلول کارنوی- ۱ (استیک اسید گلاسیال، الکل اتیلیک مطلق، ۱: ۳ سه حجم اتانول به یک حجم اسید) به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت.

پس از تثبیت، نمونه‌ها در قطره‌ای از اسید استیک ۴۵ درصد (حجمی/ حجمی) به کمک سوزن‌های حشره‌شناسی بر روی لام شیشه‌ای تمیز باز شد و به منظور پخش بهتر سلول‌ها، اسلایدها روی صفحه حرارتی ۴۵ درجه سانتی‌گراد(Ika- C- Mag Hs7, Germany) قرار داده شدند. کلیه گستره‌های آماده‌سازی شده با استفاده از

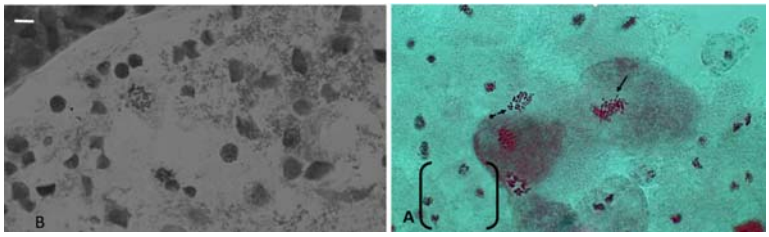
استواورسئین ۲ درصد (شماره کاتالوگ ۷۵۰۵- Merck) رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی 200- 400 X بررسی شدند. تصویربرداری‌ها بااستفاده از میکروسکوپ Zeiss Axiophot مجهز به دوربین The Euromex HD-Ultra camera VC 3036 انجام شدند.

نتایج

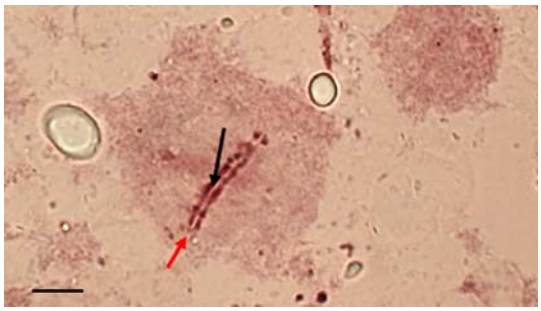
در این پژوهش، تمامی مراحل میوز طبیعی در شب‌پره بید آرد مشاهده و ثبت شد. مجموعه پاکیتن در جنس نر بید آرد شامل ۳۰ بیوالنت بود (شکل ۱). در بررسی حاضر نیز تفکیک کروموزوم جنسی از سایرین مقدور نبود. در آماده-سازی اسکواش اسپرماتوسیت‌های پاکیتن در بید آرد، توده بیوالنتها بدون هیچ‌گونه ویژگی مرفولوژیکی مشخص مشاهده شدند (شکل ۱ و۲a). در هسته پاکیتن جنس ماده بید آرد مجموعه کاملی از ۳۰ بیوالنت قابل رؤیت بود (شکل۲b).



شکل ۱- A) متافاز (بیوالنت) میوز I. اسپرماتوسیت با 30 bivalents، (->) نمای جانبی، B) سیست حاوی اسپرماتوسیت در متافاز I. Scale bar= 2µm



شکل ۲- A) چهار اسپرماتیدهاپلوئید و آنافاز میوزI، B) متافاز میوز I. جنس ماده. Scale bar= 2µm



شکل ۳- مجموعه synaptonemal بیوالنت از یک هسته پاکیتن ماده. فلش سیاه رنگ: عنصر موازی. فلش قرمز رنگ: عنصر مرکزی Scale bar= 2µm

بحث و نتیجه‌گیری

ویژگی‌های کروموزومی بیانگر اطلاعات ژنتیکی است به نحوی که تفاوت‌های پارامترهای کروموزومی می‌تواند عامل مهمی در مطالعه تکامل یک‌گونه باشد. جمعیت‌های یک‌گونه، هریک سازش ویژه‌ای را در محیطی که در آن حضور دارند، نشان می‌دهند. این سازش در سطح ژنوم نیز مطرح است. مطالعات مقایسه‌ای پیرامون پارامترهای کروموزومی طی تقسیمات میتوز و میوز در برخی گروه-های حیوانی، تفاوت‌هایی را نمودار ساخته است که اغلب با روند گونه‌زایی نیز مرتبط بوده‌اند (۱۴).

اهمیت گونه *E. kuehniella* نه تنها به‌عنوان مدلی در مطالعات سیتوژنتیک بلکه با توجه به امکان پرورش انبوه آن، این حشره به عنوان یک میزبان واسط بالقوه برای تولید

عوامل کنترل بیولوژیک نیز مطرح است (۲). به نظر می‌رسد تعداد کروموزومی در بید آرد ثابت بوده و این گونه توانایی خاص را در ثابت نگاه داشتن تعداد کروموزوم‌هایش داراست. نتایج پژوهش حاضر با یافته توتوآ و همکاران (۲۰۰۱) که ۳۰ بیوالنت را در هر دو جنس نر و ماده بید آرد مشاهده کرده بودند، مطابقت داشت. تکنیک تراث (۱۹۷۷) که برای مشاهده هسته‌های پاکیتن استفاده شد، عمدتاً برای تشخیص بیوالنت‌های کروموزوم‌های جنسی در تعداد زیادی از بالپولکداران مورد استفاده قرارگرفته است (۱۱). تمرکز در این تکنیک بر موضوع هتروکروماتیک بودن کروموزومW استوار شده است (۱۶). در ارزیابی هسته‌های پاکیتن جنس ماده در *Ectomyelois ceratoniae*(Lep.: Pyralidae) زمانی که از اسکواش برای مشاهده توده بیوالنت استفاده شد، ویژگی مرفولوژیکی معینی قابل تشخیص نبود به همین دلیل بیان نمودند که به منظور مطالعه ساختار پاکیتن تنها روش‌های سیتوژنتیک مولکولی ازجمله CGH و GISH قادر به تشخیص بیوالنت WZ خواهد بود (۱۱).

باتوجه به رشد کامل تخمدان در لاروهای سن آخر جنس ماده بید آرد، این بافت به منظور بررسی گستره‌های پاکیتن مناسب است. در طی اووژنز، هشت سلول تخم (germ cell) درون یک خوشه به هم متصل بوده که به‌طور موازی تا مرحله پاکیتن رشد می‌کنند. پس از مرحله پاکیتن از این مجموعه، هفت سلول به سلول‌های پرستار تبدیل می‌شوند و تنها یک تخمک (اووسیت) در هر خوشه، میوز را تکمیل می‌نماید (۱۰). مجموعه سیتاپتونمال اووسیت با کوتاه شدن بیووالنت‌ها به‌صورت تغییریافته، مشاهده می‌شوند و تا متافاز اول باقی می‌مانند. اعتقاد براین است که این مجموعه سیناپتونمال تغییریافته به عنوان جایگزین کیاسما عمل می‌نماید (۱۰). همانطور که در مطالعات پیشین تأکید شده بود (۹)، در هسته پاکیتن، سانترومر محل مشخصی ندارد و ما نیز نتوانستیم سانترومری را در تصاویر گرفته شده، بیابیم. از ۳۰ بیوالنت گسترش یافته، ۲۹ عدد را اتوزوم‌های همولوگ به خود اختصاص داده‌اند و تنها یکی، کروموزوم جنسی Z و W است. عمدتاً هسته‌های پاکیتن شامل بیوالنت‌های اتوزومی جفت شده با مجموعه‌های سیناپتونمال (Synaptonemal Complex :SC) هستند که متشکل از دو عدد عنصر جانبی موازی (Lateral element LE_s): با طول‌های برابرند که توسط حلقه‌های کروماتینی عمدتاً یکنواخت (Central Element) محصور شده‌اند. در برخی از گسترش‌ها، در فضای بین دو عنصر جانبی، عنصر مرکزی (Central Element) قابل رؤیت است (۸ و ۹).

نتایج بررسی‌های میکروسکوپی در مطالعه حاضر نشان داد که خصوصیات کروموزوم‌ها در گستره پاکیتن در هر دو جنس نر و ماده *E. kuehniella* ایران با جمعیت مطالعه شده دیگر، مشابه است. عدم وجود ناهنجاری‌های گوناگون طی مراحل مختلف میوز، می‌تواند حاکی از روندی فعال در تکامل جمعیت‌های این گونه باشد.

منابع

1- Bedo, D. G., 1984. Karyotypic and chromosome banding studies of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae), Canadian Journal of Genetics and Cytology, 26(2), PP: 141–145.

2- Farsi, F., Fotouhi, K., Nozari, J., Goldansaz, S. H., and Hoseini Naveh, V., 2019. Effect of different ligth diets on the morphometric changes of the testicles and bursa copulatrix of *Ephesta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Animal Research, 4(32), PP: 362-375.

3- Fisk, J. H., 1989. Karyotype and achiasmatic female meiosis in *Helicoverpa armigera* (Hübner) and H. punctigera (Wallengren)(Lepidoptera: Noctuidae). Genome, 32(6), PP: 967–971.

4- Karahan, A., and Feregene, S., 2010. Cytogenetic analysis of Garra variabilis (Heckel, 1843) (Pisces, Cyprinidae) from Savur Stream (Mardin), Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 10(4), PP: 483-489.

5- Khalilaria, A., and Colak, E., 2014. Morphology

and Karyology of *Microtus socialis* in new distributed location of East Azerbaijan province. Journal of Animal Research, 3(27), PP: 348-359.

6- Kumari, U., and Gautam, D. C., 2014. Chromosome studies on moths from Himachal Pradesh. Cytology and Genetic, 15, PP: 9–14.

7- Marec, F., and Shvedov, A. N., 1990. Yellow eye, a new pigment mutation in *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Hereditas, 113(2), PP: 97-100.

8- Marec, F., and Traut, W., 1993. Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Heredity, 71(4), PP: 394- 404.

9- Marec, F., and Traut, W., 1994. Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of. Genome, 37(Tazima 1964), PP: 426–435.

10- Marec, F., Tothová, A., Sahara, K., and Traut, W., 2001. Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). Heredity, 87(6), PP: 659- 671.

11- Mediouni, J., Fuková, I., Frydrychová, R., Dhouibi, M. H., and Marec, F., 2004. Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). Caryologia, 57(2), PP: 184-194.

12- Morag, D., Friedländer, M., and Raveh, D., 1982. Synaptonemal complexes, telomeric nucleoli and the karyosphere in achiasmatic oocyte meiosis of the carob moth, Chromosoma, 87(3), PP: 293–302.

13- Netto, M. R. D. C.B., Pauls, E., and de Mello Affonso, P. R. A., 2007. a standard protocol for obtaining fish chromosomes under post- mortem conditions. Micron, 38(3), PP: 214- 217.

14- Powell, J. A.,:2003. Lepidoptera (Moths, Butterflies). Encyclopedia of Insects. Edited by: Resh VH, CArdé RG. Academic Press, Burlington MA, USA, 631-663, 1266p.

15- Sichova, J., Voleníková, A., Dincă, V., Nguyen, P., Vila, R., Sahara, K., and Marec, F., 2015. Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies. BMC 15(1), PP: 1- 16.

16- Traut, W., 1977. A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera), Genetica, 47(2), PP: 135-142.

17- Van Nieukerken, E. J., Kaila, L., Kitching, I. J., Kristensen, N. P., Lees, D. C., Minet, J., Mitter, C., Mutanen, M., Regier, J. C., Simonsen, T. J., and Wahlberg, N., 2011. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. Zootaxa, 3148, PP: 212-221.

18- Zrzavá, M., Hladová, I., Dalíková, M., Šichová, J., Õunap, E., Kubíčková, S., and Marec, F., 2018. Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener A. sylvata, Genes, 9(6), 279 p.

Short paper

Study of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) Chromosome in Pachytene Stage with Squash Method

Farsi F.[1], Nozari J.[1] and Zarifi E.[2]

[1]Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture And Natural Resources, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Genetics and Genetic Resources Research, Seed and Plant Improvident Institute, Karaj, I.R. of Iran.

Abstract

Meiosis is one of the main phenomena in the life cycle of insect, which causes creation of haploid gametes, and normal happening of this division is the basic condition to survive the generation of a species. In this study, the chromosomal complex of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in both spermatocytes and oocytes on prophase stage was evaluated by using squash method and contrast phase microscope. The population was a stored population (more than 30 generations) in the biosystematics lab of the University of Tehran, Karaj. In both sex, the pachytene nucleus had a chromosomal complex of 30 bivalent (2n= 60). The results showed that the behavior of chromosomes in the observed cells was normal. The population showed a normal meiosis and it seems that spermatids were fertile. In other words, in the individuals of the population, the formation of bivalent which go toward polar during anaphase, occurred normally.

Key words: bivalent**,** pachytene nucleus, *E. kuehniella*, meiosis, squash.