

Study of coding genes and SNPs in the brain tissue genome of honeybee related to behavioral traits in Italian and African subspecies using RNA-Seq data analysis

Aliakbar Hasankhani 

M.Sc. Student In Genetics And Breeding Of Animal And Poultry, Department of Animal Sciences, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: A.hasankhani74@ut.ac.ir

Hossein Moradi Shahrabak 

*Corresponding Author. Assistant Professor, Department Of Animal Sciences, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: hmoradis@ut.ac.ir

Mohammad Moradi Shahrabak

Professor, Department of Animal Sciences, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: moradim@ut.ac.ir

Abolfazl Bahrami 

PhD. Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: A.bahrami@ut.ac.ir

Gholam Ali Nehzati Paghaleh

Assistant Professor, Department of Animal Sciences, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: nehzati@ut.ac.ir

Mohammad Hossein Banabazi 

Assistant Professor, Animal Science Research Institute Karaj, Iran. E-mail: hossein.banabazi@gmail.com

Abstract

Objective

Honeybees, as pollinating insects, are an important part of nature. Because behavioral traits are so important in honeybees, comparing brain tissue transcriptomes of the two subspecies with aggressive and calm behavioral characteristics makes it possible to understand this behavioral difference genetically. This study aimed to investigate to gene expression profile and identify the key genes in brain tissue in Italian (*Apis Mellifera Ligustica*) and African (*Apis mellifera Scutellata*) honeybees concerning behavioral traits. The Italian honeybee has calm behavioral characteristics, while the African is known as an aggressive honeybee.

Materials and methods

RNA-Seq data were obtained from the NCBI (GEO) database, and after pre-processing of reads, the brain tissue transcriptomes of both subspecies were aligned and mapped on the honey bee reference genome (v A.mel 4.5), and then data qualification, transcriptome assembly, differential expression analysis, and gene ontology were performed.

Results

Differential gene expression analysis identified 16,701 genes on the honeybee reference genome, of which 22 genes in brain tissue between the two subspecies had significant differential expression (adj p-value <0.05 and Log₂FC>2). As well, some of these genes were first identified. Gene ontology analysis showed that among these 22 genes, such as *ITPR*, *MRJP*, *HSP70Ab*, *MBS*, *GB45410*, and *Defl* are directly or indirectly involved in the occurrence of various traits such as defensive, health behavior, reproductive, heat, light, and smell sensitivity. In addition, the SNPs encoding the honeybee brain tissue genome were identified in both subspecies, and 99636 SNPs were identified in the Italian, and 92514 SNPs were identified in the African subspecies.

Conclusions

RNA-seq data, due to its high throughput, can provide us with accurate information about the expression of genes in different tissues in various subspecies. In this study, genes involved in honeybee behavioral traits and the SNPs in these genes were identified.

Keywords: Behavioral traits, Gene, Honeybee, SNP, Transcriptome.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Hasankhani A, Moradi shahrbabak H, Moradi shahrbabak M, Bahrami A, Nehzati paghaleh GA, Banabazi MH (2022) Study of coding genes and SNPs in the brain tissue genome of honeybee related to behavioral traits in Italian and African subspecies using RNA-Seq data analysis. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 171-192.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (2), 171-192. DOI: 10.22103/jab.2022.15887.1235

Received: March 10, 2022.

Received in revised form: April 29, 2022.

Accepted: April 30, 2022.

Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors


مطالعه ژن‌ها و SNP‌های کدکننده ژنوم بافت مغز زنبورعسل در ارتباط با صفات رفتاری در دو زیرگونه

ایتالیایی و آفریقایی با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی (RNA-Seq)

علی اکبر حسن خانی 

دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه

تهران، کرج، ایران رایانامه: A.hasankhani74@ut.ac.ir


حسین مرادی شهربابک 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه:

hmoradis@ut.ac.ir

محمد مرادی شهربابک

استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: moradim@ut.ac.ir


ابوالفضل بهرامی 

دانش آموخته دکتری تخصصی، ژنتیک و اصلاح نژاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه:

a.bahrami@ut.ac.ir

غلامعلی نهضتی پاقلعه

استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: nehzati@ut.ac.ir

محمدحسین بنابازی 

استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران. رایانامه: hossein.banabazi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

چکیده

هدف: زنبورعسل به عنوان حشره‌ای گرده‌افشان عضو مهمی از طبیعت به حساب می‌آید. از آنجا که صفات رفتاری در زنبورعسل بسیار مهم است، بنابراین مقایسه ترانسکریپتوم بافت مغز از زیرگونه ایتالیایی و آفریقایی با ویژگی‌های رفتاری پرخاشگر و آرام، درک این تفاوت رفتاری را از نظر ژنتیکی امکان پذیر می‌سازد. این مطالعه با هدف بررسی پروفایل بیان ژن و شناسایی ژن‌های شاخص در بافت مغز در زنبورعسل ایتالیایی (*Apis Mellifera Ligustica*) و آفریقایی (*Apis mellifera Scutellata*) در

ارتباط با صفات رفتاری انجام شد. زنبورعسل ایتالیایی از ویژگی‌های رفتاری آرامی برخوردار است، در حالی که زنبورعسل آفریقایی به عنوان یک زنبور مهاجم شناخته می‌شود.

مواد و روش‌ها: داده‌های RNA-seq این پژوهش از پایگاه داده‌های NCBI دریافت و پس از پیش‌پردازش، ترانسکریپتوم بافت مغزی هر دو زیرگونه بر روی ژنوم مرجع زنبورعسل همدریف و نقشه‌یابی شد و پس از کمی‌سازی داده‌ها، سرهم‌سازی ترانسکریپتوم، آنالیز بیان افتراقی ($\text{adj p-value} < 0.05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 2$) و هستی‌شناسی ژن انجام شد.

نتایج: آنالیز بیان افتراقی ژن تعداد ۱۶۷۰۱ ژن را بر روی ژنوم مرجع زنبورعسل شنا سایی کرد که از این تعداد، ۲۲ ژن در بافت مغز بین هر دو زیرگونه دارای بیان افتراقی معنی‌داری ($\text{adj p-value} < 0.05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 2$) بودند. همچنین برخی از این ژن‌ها برای اولین بار شناسایی شدند. آنالیز هستی‌شناسی ژن نشان داد که از میان این ۲۲ ژن، ژن‌هایی همچون MRJP، ITPR، MBS، HSP70 Ab و GB45410 و Def1 به صورت مستقیم یا غیرمستقیم در بروز صفات مختلفی همچون رفتارهای دفاعی، بهداشتی، تولید مثلی، حساسیت به گرما، نور و بو دخیل هستند. علاوه بر این، SNP‌های بخش کدکننده ژنوم بافت مغز زنبورعسل در هر دو زیرگونه نیز شناسایی شد و تعداد ۹۹۶۳۶ SNP در زیرگونه ایتالیایی و ۹۲۵۱۴ SNP در زیرگونه آفریقایی شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: داده‌های RNA-seq به سبب پربرونداد^۱ بودن می‌تواند اطلاعات دقیقی را از بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف در زیرگونه‌های مختلف در اختیار ما قرار دهد. در این مطالعه ژن‌های دخیل در بروی صفات رفتاری زنبورعسل مشخص شد و SNP‌های موجود در این ژن‌ها نیز شناسایی شد.

کلیدواژه‌ها: ترانسکریپتوم، رفتارشناسی، زنبورعسل، ژن، SNP.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حسن‌خانی علی اکبر، مرادی شهربابک حسین، مرادی شهربابک محمد، بهرامی ابوالفضل، نهضتی پاقعه غلامعلی، بنابازی محمدحسین (۱۴۰۱) مطالعه ژن‌ها و SNP‌های کدکننده ژنوم بافت مغز زنبورعسل در ارتباط با صفات رفتاری در دو زیرگونه ایتالیایی و آفریقایی با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی (RNA-Seq). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۲)، ۱۹۲-۱۷۱.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

[۱]. High-throughput

زنبورعسل از شناخته شده ترین اعضای اکوسیستم‌های طبیعی در میان حشرات گرده‌افشان به حساب می‌آید (Bahador et al. 2016). حشرات گرده افشان به طور چشم‌گیری روابط اکولوژیک، حفاظت و پایداری اکوسیستم‌ها، تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی، تنوع گل‌ها و تکامل را متاثر می‌سازند (Bahador et al. 2016). زنبورهای عسل همچنین نقش مهمی در اکوسیستم‌های خاکی یعنی جایی که پوشش گیاهی سبز برای حداقل سه تا چهار ماه در سال وجود دارد را دارا می‌باشند. در صورتی که زنبورهای عسل از بین بروند بسیاری از گونه‌های گیاهی و حیوانی با خطر انقراض مواجه خواهند شد. این امر بدان دلیل است که تولید دانه، هسته و میوه‌ها به میزان زیادی وابسته به گرده افشانی حشرات است و در بین حشرات گرده‌افشان، زنبورهای عسل از گرده افشان‌های اصلی هستند (Bradbear 2009). بنابراین بررسی این حشره مفید از جهات مختلف فیزیولوژی، رفتارشناسی، ژنتیک حائز اهمیت است (Barchuk et al. 2007). برخلاف دیگر حیوانات مزرعه، قابلیت تولید کلنی‌های زنبورعسل به طور عمده مبتنی بر صفات فیزیولوژیکی افراد مانند سرعت رشد، تولید شیر و گوشت نیست بلکه وابسته به صفات اجتماعی مانند ذخیره‌ی عسل و دفاعی بودن است (Breed et al. 2004). حتی صفتی مانند مقاومت به بیماری نیز به میزان زیادی متأثر از فاکتورهای اجتماعی مانند رفتار بهداشتی و همچنین سیستم ایمنی ذاتی افراد است. بنابراین زمانی که زنبورداران به دنبال بهبود ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل خود هستند در ابتدا و عمدتاً به جای صفات فیزیولوژیکی افراد، به دنبال بهبود صفات رفتاری در سطح کلنی هستند. معیار انتخاب رایج برای برنامه‌های اصلاحی و تجاری تولید عسل، حالت تهاجمی و مقاومت به بیماری است (Rittschof et al. 2015). پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک رفتاری زنبورعسل، در توسعه مارکرهای ژنتیکی برای صفات مختلف بویژه رفتار بهداشتی و رفتار نیش زنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Oldroyd & Thompson 2006). انعطاف رفتاری، در بخشی از فرآیندهای ژنومیک پویا همانند تراز سکریتوم جای دارد و شواهد نشان می‌دهند که تغییرات در بیان ژن‌های خاص در مغز، بر روی رفتار تاثیر می‌گذارد (Bell & Robinson 2011) و تفاوت‌ها در رفتار با تغییرات در بیان بسیاری از ژن‌ها در مغز ارتباط دارد (Zayed & Robinson 2012). قابل توجه‌ترین و شناخته شده ترین تفاوت در رفتار تهاجمی زنبورعسل متعلق به زیرگونه آفریقایی (*Apis mellifera Scutellata*) است که نسبت به گونه‌های اروپایی مانند زیرگونه‌ی ایتالیایی (*Apis mellifera Ligustica*) تهاجمی‌تر هستند (Hunt et al. 2007). و گزارشات مرتبط با رفتار تهاجمی در زنبور عسل ارائه شده است که در ارتباط با تغییرات بیان ژن در بافت مغز می‌باشد (Alaux et al. 2009). به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانند سازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی ۲ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد

کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). بیان ژن مکانیسمی حساب شده، پیچیده و تنظیم‌گر است که باعث می‌شود ژنوتیپ به صورت فنوتیپ ظاهر شود و در واقع کدهای ژنتیکی ذخیره شده در DNA ژنومی به mRNA و RNAهای تنظیم‌کننده رونویسی می‌شوند و تفاوت در رونویسی ژن‌ها باعث ایجاد الگوهای مختلف فنوتیپی در ارگانیسم‌ها می‌شود (Nguyen et al. 2002). مطالعات بیان ژن به تولید حجم زیادی از داده‌ها در این زمینه منجر شده است که در میان انواع متعدد داده‌های بیان ژن، داده‌های RNA-seq به سبب پربرونداد بودن و شامل شدن توالی نواحی رونویسی شده و پوشش دادن تمام این نواحی‌ها دارای مزیت عمده بر سایر انواع داده‌ها می‌باشند. از مزایای استفاده از داده‌های RNA-seq شناسایی ژن‌های جدید می‌باشد (Sultan et al. 2008; Gan et al. 2010). RNA-seq یک تکنیک ابتکاری است که در مطالعات ترانسکریپتوم به عنوان یک روش کاربردی برای تهیه ترانسکریپتوم بر اساس تکنولوژی های نسل جدید توالی یابی می‌باشد (Pauerstein 2011). اساس این روش بر برش کل mRNA رونویسی شده (یا به عبارتی دیگر کل ترانسکریپتوم یا کل اگزوم) به قطعات کوچکتر و توالی‌یابی این قطعات با استفاده از پلتفرم‌های فنی پربرونداد متنوعی از جمله Haas & Zody 2010; Marguerat & Bähler) است و Roche ۴۵۴، Illumina/ Solexa و ABI SOLiD استوار است (2010). از این رو از روی تعداد خوانش‌های مکان‌یابی شده برای یک جایگاه خاص می‌توان به یک معیار دقیقی از میزان رونویسی آن جایگاه رسید (Ekblom & Galindo 2011; Wilhelm & Landry 2009). شاخص بیان ژن در این روش، محاسبه‌ی تعداد خوانش یا قطعات (کیلوباز) به ازای هریک میلیون خوانش مکان‌یابی شده (FPKM)^۳ می‌باشد (Mortazavi et al. 2008). توالی‌یابی ژنوم مرجع زنبور عسل توسط مرکز Baylor College of Medicine با استفاده از روش شات گان کل ژنوم^۴ انجام شد (Consortium 2006). جدیدترین نسخه ژنوم مرجع زنبور عسل Amel_4.5 می‌باشد که در فوریه ۲۰۱۱ منتشر شده

[3]. Fragment Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

[4]. whole genome shotgun

است. ژنوم زنبور حاوی ۳۲ کروموزوم ($n=16$) است. بنابراین، هدف اصلی این مطالعه ارزیابی سطح رونویسی کلیه ژن‌های بیان شده و شناسایی SNP‌های کدکننده در ژنوم بافت مغز در دو زیرگونه زنبورعسل ایتالیایی و آفریقایی بود. میزان سطح بیان ژن در دو بافت مغزی مقایسه و یک کتابخانه ژن با بیان متفاوت ساخته شد و علاوه بر این، ژن‌های عملکردی مهم شناسایی شدند و فعالیت آن‌ها مورد بحث قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها: داده‌های ترانسکریپتومی این پژوهش از پایگاه داده‌های GEO^۵ با شماره دسترسی GSE50990 دریافت شد که این مجموعه داده شامل ۱۶ نمونه از ترانسکریپتوم بافت مغز زنبورعسل بود. در این آزمایش گونه اروپایی زنبورعسل (بیشتر شامل زیرگونه‌های ایتالیایی^۶) و زیرگونه آفریقایی^۷ هر کدام دارای ۸ تکرار بیولوژیک ادغام شده بودند. بنابراین در این آزمایش ترانسکریپتوم بافت سر (شایان ذکر است که بخش اعظم بافت سر زنبورعسل را مغز تشکیل می‌دهد) زنبور بالغ نهمیان^۸ زنبورهای نهمیان یک گروه تخصصی از افراد کندو می‌باشند که در جلوی کندو گشت زنی می‌کنند و اولین خط دفاعی کندو می‌باشند که نسبت به محرک‌های خارجی پاسخ می‌دهند) از دو زیرگونه ایتالیایی و آفریقایی نمونه برداری و توسط پلتفرم Illumina Genome Analyzer II در دانشگاه مک‌گیل کانادا توالی‌یابی شد خوانش‌هایی با طول ۱۰۰ جفت‌باز^۹ تولید کرد. توضیحات بیشتر این مجموعه داده را می‌توان در مطالعه Cingolani et al. (2013) یافت.

پیش‌پردازش خوانش‌ها: داده‌ها با فرمت Sra^{۱۰} دریافت و سپس تمامی مراحل آماده‌سازی، پیرایش و آنالیز داده‌ها در محیط دستوری سیستم عامل لینوکس Ubuntu نسخه 18.04.2 LTS انجام شد. برای انجام مراحل بعدی آنالیز، داده‌های دریافت شده با فرمت Sra با استفاده از پکیج نرم افزاری Sra toolkit نسخه 2.9.6 به فرمت Fastq تبدیل شدند. کنترل کیفیت داده‌ها با فرمت Fastq با استفاده از نرم افزار Fastqc (Andrews 2010) نسخه 0.11.8 انجام شد. از گزارش‌های کیفی این نرم افزار برای مرحله بعدی آنالیز، یعنی پیرایش خوانش‌ها استفاده شد. خوانش‌ها و بازها با کیفیت کم و توالی‌های آداپتوری با استفاده از نرم افزار Trimmomatic (Bolger et al. 2014) نسخه 0.36 پیرایش شدند. لازم به ذکر است که خوانش‌ها با طول کمتر از ۶۰ جفت باز حذف شدند و خوانش‌های تازه تولید شده با کیفیت بالا^{۱۱} آماده بقیه مراحل آنالیز شدند.

-
- [5]. Gene expression omnibus
 - [6]. Apis mellifera Ligustica
 - [7]. Apis mellifera Scutellata
 - [8]. Guard bees
 - [9]. Base pair
 - [10]. Sequence Read Archive
 - [11]. Clean Reads

همردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها: ژنوم مرجع زنبورعسل نسخه A.mel 4.5 و فایل حاشیه نویسی آن با فرمت GTF از پایگاه داده‌های Ensemble دریافت و سپس خوانش‌های پیرایش شده برای هر نمونه به صورت جداگانه بر روی ژنوم مرجع زنبورعسل با استفاده از نرم افزار Hisat2 (Kim et al. 2015) نسخه 2.1.0 همردیف و مکان‌یابی شدند. لازم به ذکر است که تا این مرحله از آنالیز برای شناسایی ژن‌ها و واریانت‌ها مشترک بوده و از این مرحله به بعد مسیر آنالیز برای هر کدام متفاوت می‌باشد.

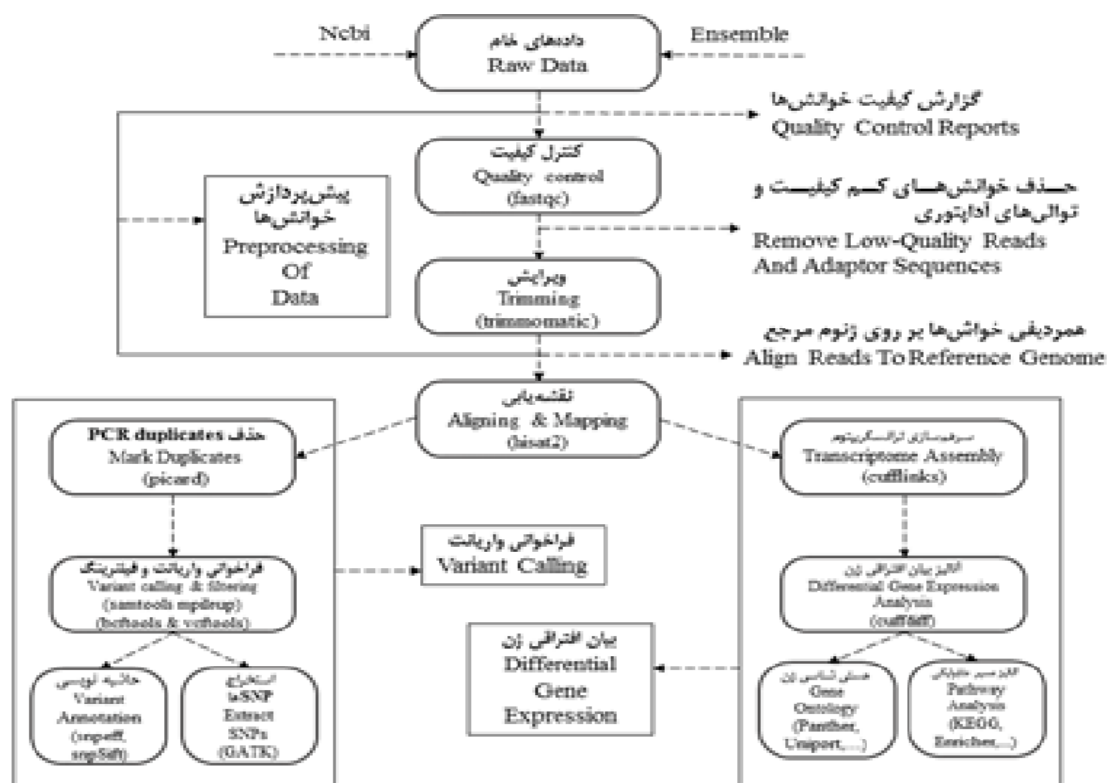
سرهم سازی ترانسکریپتوم، آنالیز بیان افتراقی و تبارشناسی ژن‌ها: سرهم سازی ترانسکریپتوم^{۱۲} برای هر نمونه با استفاده از نرم افزار cufflinks (Trapnell et al. 2012) نسخه 2.2.1 بر اساس فایل حاشیه نویسی ژنوم مرجع انجام شد و سپس تمامی ترانسکریپتوم‌های سرهم سازی شده به منظور تولید ترانسکریپتوم مرجع با استفاده از نرم افزار cuffmerge یکدیگر تلفیق شدند. از نرم افزار Cuffdiff نسخه 2.2.1 برای شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو زیرگونه زنبورعسل استفاده شد. لازم به ذکر است که میزان $FDR \leq 0.05$ در نظر گرفته شد و سپس ژن‌های متفاوت بیان شده با استفاده از پکیج cummerbund (Goff et al. 2012) از بسته Bioconductor تحت محیط برنامه نویسی R مصور سازی شد. تبارشناسی ژن‌ها نیز با استفاده از پایگاه داده‌های آنالین DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) Panther (<http://www.pantherdb.org>) و Uniport (<http://www.uniprot.org>) انجام شد. تجزیه و تحلیل مسیرهای بیولوژیکی نیز از طریق وب سایت آنالین Genecards (<https://www.genecards.org>) انجام شد.

حذف PCR duplicates و فراخوانی واریانت‌ها: در این مرحله از آنالیز PCR duplicates با استفاده از پکیج نرم افزاری picard از روی فایل‌های همردیف شده حذف شد و سپس نمونه‌ها برای هر زیرگونه به طور جداگانه با یکدیگر تلفیق شدند. نهایتاً فراخوانی واریانت‌ها با استفاده از پکیج نرم افزاری samtools mpileup انجام شد و تمامی واریانت‌های خام در فرمت vcf^{۱۳} تولید گشت.

فیلتر کردن واریانت‌ها و مصورسازی داده‌ها: در این مرحله از آنالیز واریانت‌ها با استفاده از پکیج‌های نرم افزاری bcftools و vcftools فیلتر شدند. استخراج SNP‌ها نیز با استفاده از پکیج نرم افزاری GATK نسخه 4.1 انجام گرفت. تعداد SNP‌های مشترک بین زیرگونه‌ها نیز با استفاده از پکیج نرم افزاری bedtools استخراج گشت. مصورسازی داده‌ها نیز با استفاده از پکیج نرم افزاری snpEff (Cingolani et al. 2012) انجام گرفت. خروجی این نرم افزار شامل تعداد کل واریانت‌ها، در صد هریک از انواع واریانت‌ها، درصد نوع SNP‌ها، تعداد واریانت‌ها به تفکیک هر کروموزوم، تعداد هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی می‌باشد. در شکل ۱ خلاصه از گردش کار برای آنالیز داده‌های RNA-seq ارائه شده است.

[12]. Transcriptome assembly

[13]. Variant call format



شکل ۱. مراحل مختلف آنالیز داده‌های RNA-seq

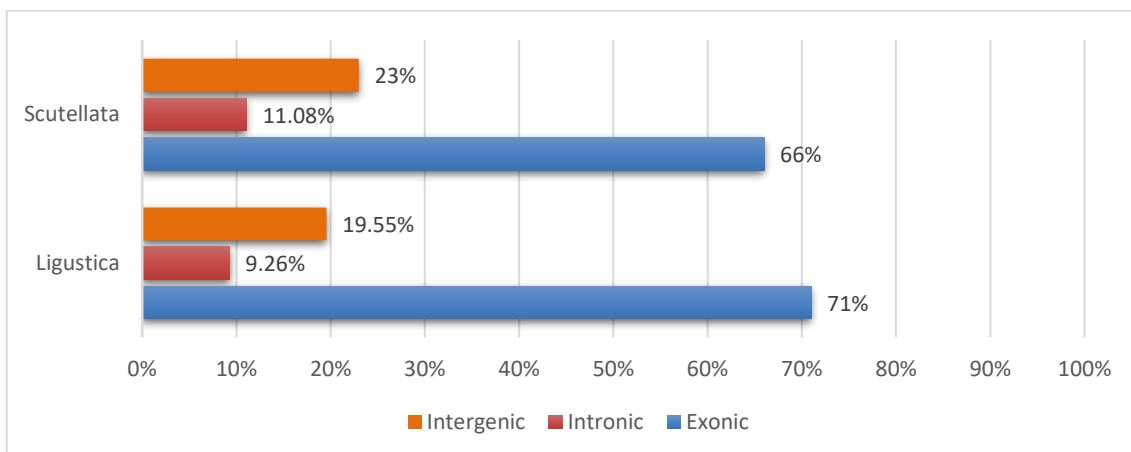
Figure 1. Steps of RNA-seq data analysis

نتایج و بحث

همردیفی و نقه‌شبه‌یابی: شاخص دوازده‌گانه کنترل کیفیت در نرم افزار Fastqc برای نمونه‌های مورد مطالعه حاکی از کیفیت مناسب داده‌ها به ازای هر باز و خوانش صحیح همه‌ی آن‌ها بر اساس میزان باز N (خوانده نشده) به ازای هر توالی بود. با در نظر گرفتن حداقل طول خوانش ۶۰ جفت باز در هنگام ویرایش، کمتر از ۱۰ درصد از کل خوانش‌ها کنار گذاشته شد. داده‌های RNA-seq از ترانسکریپتوم بافت مغز از دو زیرگونه زنبورعسل با موفقیت بر روی ژنوم مرجع همردیف و مکان‌یابی شدند و میزان نرخ همردیفی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع برای زیرگونه ایتالیایی ۷۵ درصد و برای زیرگونه آفریقایی ۷۷ درصد بود. از میان تمامی خوانش‌های همردیف شده بر روی ژنوم مرجع، میزان همردیفی خوانش‌ها بر روی نواحی آگزونی ژنوم در زیرگونه ایتالیایی ۷۱ درصد و در زیرگونه آفریقایی ۶۶ درصد بود (شکل ۲).

آنالیز بیان افتراقی: آنالیز بیان افتراقی با موفقیت انجام شد و نهایتاً ۱۶۷۰۱ ژن بر روی ژنوم زنبورعسل شناسایی شد. ژن‌ها در $P\ value < 0.00005$ ($adj\ p\ value < 0.05$) و $<Log_2\ fold\ change < -2$ فیلتر و ژن‌ها با بیان متفاوت معنی‌دار استخراج شدند. بر اساس نتایج از میان ۱۶۷۰۱ ژن که در ژنوم زنبورعسل شناسایی شدند در بافت مغز دو زیرگونه زنبورعسل ایتالیایی و آفریقایی تنها ۲۲ ژن با بیان متفاوت معنی‌دار در مغز زیرگونه ایتالیایی و آفریقایی مذکور زنبورعسل شناسایی

شدند. شکل 3A انحراف هر ژن از میانگین بیان ژن در هر دو تیمار را نشان می‌دهد. بر اساس شکل، هرچه فاصله بیشتر از خط میانگین باشد، بیان بالاتر از ژن داده شده متفاوت است. ژن‌های کاملاً متفاوت بیان شده در محور X و Y در نمودار نشان داده شده‌اند.



شکل ۲. نرخ هم‌ردیفی خوانش‌ها در نواحی مختلف ژنومی

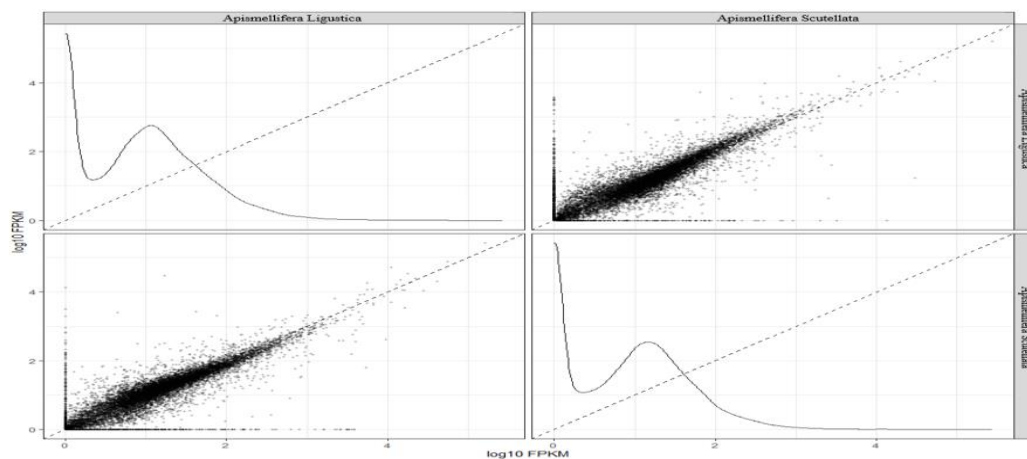
Figure 2. Mapping rate of reads in different genomic regions

همچنان که از شکل 3B برمی‌آید بخشی از تفاوت بیان ژن ناشی از آن است که برخی از ژن‌ها فقط در یکی از تیمارها بیان شده است و بیان آن‌ها در تیمار دیگر صفر بوده است. در نمودارهای میله‌ای شکل ۴ مقایسه بین تیمارها با یکدیگر رسم شده است و از مقدار بیان ژن‌ها در هر تیمار لگاریتم ۲ گرفته شده است تا در نمودار بهتر نمایش داده شوند. همانطور که در این نمودارها مشاهده می‌شود بیان برخی ژن‌ها در بعضی تیمارها چند برابر تیمار دیگر است که نشان دهنده شاخص بودن آن ژن در تیمارهای مورد مقایسه می‌باشد.

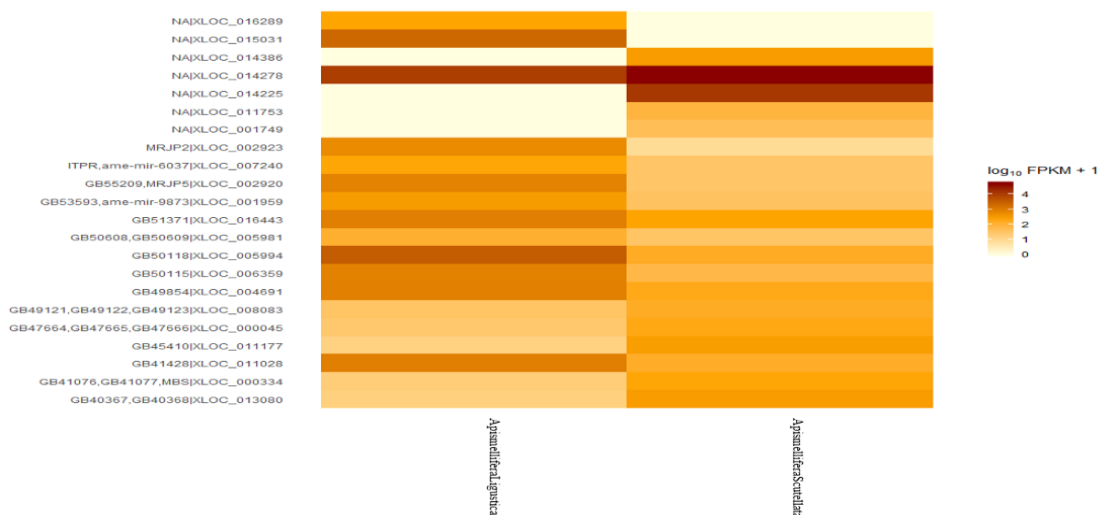
آنالیز تبارشناسی ژن و شناسایی مسیرهای متابولیکی: همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود ژن‌های

MRJP2 و MRJP5 بیشترین بیان را در زیرگونه ایتالیایی نسبت به آفریقایی دارند. این ژن‌ها دخیل در تولید پروتئین‌های اصلی ژل رویال بوده و در تغذیه زنبور عسل‌ها نقش دارد و از طرفی مرتبط با میزان قدرت تولیدمثل بالای ملکه می‌باشد و از آنجایی که تولیدمثل زنبورهای ایتالیایی بیشتر از آفریقایی است، میزان بیان این ژن در زیرگونه ایتالیایی نیز بسیار بیشتر از زیرگونه آفریقایی است (Schmitzova et al. 1998). ژن Def1 نیز بیان بسیار بیشتری در زیرگونه ایتالیایی داشت که این ژن مرتبط با ایمنی میزبان، خاصیت آنتی بیوتیک و آنتی‌باکتریال است که رفتارهای بهداشتی را نیز شامل می‌شود و همین امر باعث افزایش میزان مقاومت زیرگونه ایتالیایی نسبت به زیرگونه آفریقایی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شد (DIMARCQ et al. 1994; Imler & Bulet 2005).

A

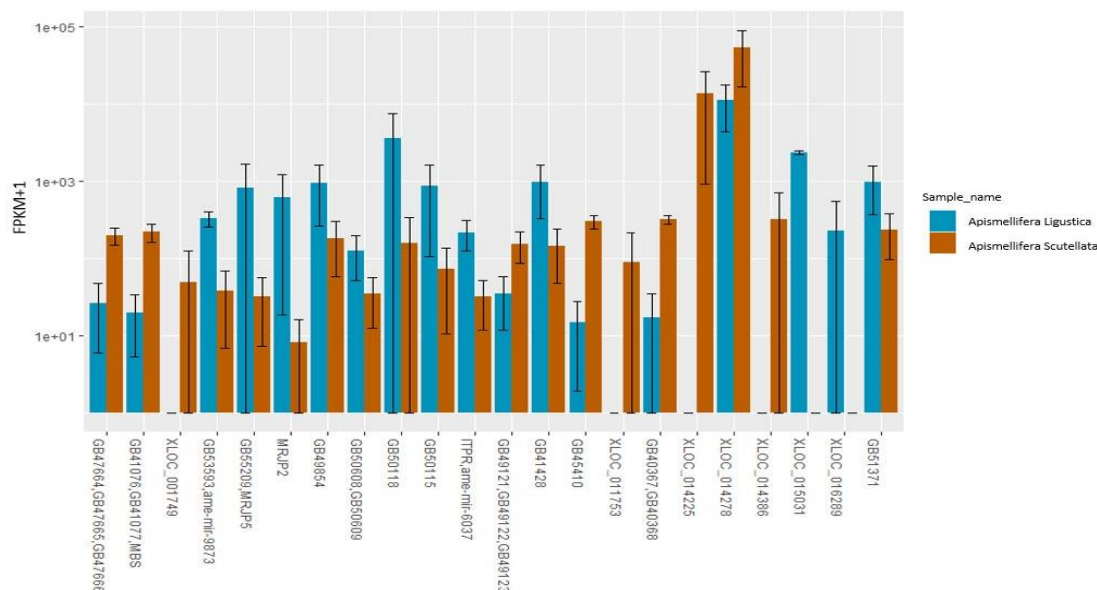


B



شکل ۳: A: نمودار پراکنده نرخ ژن‌های متفاوت بیان شده را در Log_2 در هر دو زیرگونه نشان می‌دهد. مطابق نمودار، مقدار FPKM پایین‌تر به معنی بیان کمتر ژن‌ها است. در هر دو گروه، ژن‌هایی که در مجاورت خط میانگین قرار دارند اختلاف بیان کمتری را نشان می‌دهند. B: نقشه گرمایشی از میزان بیان ژن‌های متفاوت بیان شده از دو زیرگونه زنبور عسل. محور عمودی نشان‌گر نام‌های ژن‌ها با بیان افتراقی است و محور افقی تیمارها را نشان می‌دهد. رنگ‌های قهوه‌ای نشان‌دهنده ژن‌ها با بیان بالاست و هرچه از رنگ قهوه‌ای به رنگ‌های روشن‌تر برویم از میزان بیان ژن‌ها کاسته می‌شود. رنگ سفید هم نشان‌دهنده عدم بیان ژن است.

Figure 3. A: Scatter plots show the different gene rates expressed in Log_2 in both subspecies. According to the chart, lower FPKM values mean less gene expression. In both groups, genes adjacent to the midline indicate less difference in expression. B: Heat map plot of differential genes expression from two subspecies of honeybees. The vertical axis represents the name of the genes with differential expression and the horizontal axis indicates the treatments. Brown colors indicate genes with high expression, and the brighter the color indicates the lower the expression of genes. The white color also indicates a lack of gene expression.



شکل ۴. مقایسه تفاوت بیان ژن‌ها در بین دو زیرگونه. محور افقی نشان دهنده ژن‌های با تفاوت بیان در دو زیرگونه و محور عمودی مقدار بیان ژن‌ها بر اساس لگاریتم ۲ FPKM می‌باشد و در این نمودار ژن‌هایی که تنها در یکی از دو زیرگونه بیان شده‌اند نیز مشخص شده‌اند.

Figure 4. Comparison of differential gene expression related to two subspecies. The horizontal axis represents the genes with different expressions in the two subspecies, and the vertical axis represents the expression value of the genes based on the \log_2 FPKM. In this diagram, the genes that are expressed in only one of the two subspecies are also identified.

ژن HSP 70AB که به میزان زیادی در زنبور ایتالیایی نسبت به آفریقایی بیان شده بود مرتبط با پاسخ به تنش حرارتی و حساسیت به گرما است و از آنجایی که به میزان زیاد در زنبور ایتالیایی بیان شده است نشان دهنده‌ی میزان حساسیت بیشتر این زیرگونه نسبت به زیرگونه آفریقایی به گرما و تنش حرارتی است (Gong & Golic 2006). ژن ITPR نیز بیان بیشتری در زنبور ایتالیایی داشت که این ژن مرتبط با پاسخ به استرس اکسیداتیو، رفتارهای پروازی و تنظیم منفی ذخیره‌ی چربی است (Raffiudin 2002; Gong & Golic 2006; Rajan et al. 2017). بیان ژن GB50118 نیز در زیرگونه ایتالیایی بسیار بیشتر از زیرگونه آفریقایی بود که این ژن دخیل در فرآیند انتقال کربوهیدرات‌ها به ویژه قند ترهالوز ساخته شده در بافت‌های چربی به دیگر بافت‌هایی که نیاز به منبع کربن دارند، است. ژن MBS بیان بسیار زیادی در زنبور آفریقایی نسبت به ایتالیایی داشت که مرتبط با توسعه‌ی گیرنده‌های نوری چشم و تنظیم ریتم حرکتی شبانه‌روزی است (Lee & Treisman 2004; Berger et al. 2008) و همچنین ژن GB45410 بیان بیشتری در زنبور آفریقایی داشت که این ژن آنزیم GTPase را کد می‌کند که

مرتبط با میزان حساسیت به نور، بو و مزه است. با توجه به اینکه نژاد آفریقایی زنبوری مهاجم است و خیلی سریع نسبت به محرک‌ها واکنش نشان می‌دهد (Zayed & Robinson 2012)، می‌توان این نوع رفتار تهاجمی را به بیان زیاد ژن‌های MBS و GB45410 ربط داد چرا که این ژن‌ها باعث افزایش حساسیت به محرک‌های مختلف از جمله بو، رنگ و مزه شده و همچنین باعث افزایش دامنه دید در این زیرگونه می‌شود و باعث می‌شود این نوع زنبور نسبت به محرک‌های خارجی سریع‌تر واکنش نشان دهد. ژن GB47666 نیز بیان زیادی در زنبور آفریقایی داشت که دخیل در متابولیسم چربی و توسعه کوتیکولی است. ژن‌های XLOC_016289 دخیل در تکثیر جمعیت سلولی، فعالیت‌های اندونوکلتازی، فعالیت هیستون متیل ترانسفراز و تعمیر قطعات آسیب دیده DNA و XLOC_015031 که اطلاعاتی از آن در دسترس نیست فقط در زیرگونه ایتالیایی بیان شدند. ژن‌های XLOC_011753 دخیل در تمایز بافت‌های جنینی و تمایز لوله‌های مالپیگی و XLOC_014386 دخیل در تحریک گیرنده C فسفولیپازی متصل به پروتئین G، میزان حساسیت به مزه و تقویت گیرنده‌های بینایی چشم فقط در زیرگونه آفریقایی بیان شده‌اند. ژن‌های XLOC_001749 و XLOC_014225 نیز فقط در زیرگونه آفریقایی بیان شده بودند که هیچ اطلاعاتی از آن‌ها در دسترس نبود. هستی شناسی ژن‌ها (GO terms) برای ژن‌هایی که بیان افتراقی معنی‌دار داشتند و دارای عملکرد شناخته شده بودند و در پایگاه‌های اطلاعاتی وظایف و عملکرد آن‌ها بررسی شده بود در دو دسته‌ی عملکرد مولکولی و فرآیندهای بیولوژیکی به همراه نام پروتئین آن‌ها در جدول ۱ گزارش شده است.

فراخوانی واریانت‌ها: واریانت‌های کدکننده ژنوم بافت مغز برای هر یک از زیرگونه‌ها نیز با استفاده از فایل‌های نقشه‌یابی شده شناسایی و سپس فیلتر شدند. تعداد واریانت‌ها به این صورت بود که تعداد ۱۰۸۱۳۱ واریانت شامل ۹۹۶۳۶ واریانت از نوع SNP، ۳۸۹۲ واریانت از نوع درج و ۴۶۰۳ واریانت از نوع حذفی در زیرگونه ایتالیایی و تعداد ۱۰۰۲۷۰ واریانت شامل ۹۲۵۱۴ واریانت از نوع SNP، ۳۷۰۶ واریانت از نوع درج و ۴۰۵۰ واریانت از نوع حذفی در زیرگونه آفریقایی شناسایی شد. لازم به ذکر است که تعداد ۳۷۷۵۲ SNP در بخش کدکننده ژنوم بافت مغز در هر دو زیرگونه مشترک بود. در شکل ۵ نیز به صورت شماتیک اطلاعات کلی از واریانت‌های شناسایی شده ارائه شده است.

تعداد SNP‌هایی که در هر یک از ژن‌های مرتبط با صفات رفتاری در زنبورعسل رخ داده است در جدول ۴ ارائه شده است. عوامل ایجاد کننده تنوع فنوتیپی بین زیرگونه‌های یک گونه به عوامل مختلفی همچون جهش، فنوکپی، محیط، عوامل ژنتیکی، نفوذ ناقص ژنوتیپ می‌باشد (Falconer 1960). یکی از این عوامل ایجاد کننده جهش‌ها هستند و در میان جهش‌ها بیشترین نوع فراوانی مربوط به SNP‌ها (شکل ۵) می‌باشد. در بین دو زیرگونه مطالعه شده در ارتباط با صفات رفتاری علاوه بر تفاوت در بیان ژن‌ها که ریشه در عوامل ژنتیکی و محیطی دارد، SNP‌هایی که در ژن‌های کنترل کننده صفات رفتاری اتفاق می‌افتد نیز می‌تواند عامل دیگری از وجود تفاوت در رفتار دو زیرگونه مربوطه باشد. لذا با شناسایی این SNP‌ها می‌توان منشا دیگری در تفاوت‌های رفتاری در دو زیرگروه را شناسایی کرد (جدول ۴).

جدول ۱. نتایج حاصل از آنالیز تبارشناسی ژن ها و مسیرهای بیولوژیک

Table 1. Results from gene ontology and biological pathways analysis

| ژن Gene | پروتئین Protein | فرآیند بیولوژیک و عملکرد مولکولی Biological process and Molecular function |
|--------------|---|---|
| Hsp70Ab-like | heat shock protein Hsp70Ab-like | پاسخ به هیپوکسی، پاسخ به گرما و تنش های حرارتی، حمل و نقل با واسطه وزیکول، پاسخ سلولی به استرس های مربوط به شبکه آندوپلاسمی، فعال کننده ATPase، پروتئین شوک حرارتی response to hypoxia, response to heat, cellular response to unfolded protein, ATPase activity, heat shock protein binding |
| GB53593 | choline transporter-like protein 1 | انتقال دهنده کولین، دخیل در سنتز غشا و میلین، نقل و انتقالات غشایی کولین Choline transporter, involved in membrane synthesis and myelin production, choline transmembrane transporter activity |
| GB51371 | glutamine synthetase 2 cytoplasmic-like | سرهم سازی سیناپس، گیرنده برای انتقال دهنده های عصبی در فرآیندهای متابولیکی، فرایند ساخت گلوتامین، فرایند کتابولیکی گلوتامات، فعالیت کتالیزوری، باند شونده به ATP، فعالیت لیگازی گلوتامات-آمونیاک neurotransmitter receptor metabolic process, synapse assembly, glutamine biosynthetic process, glutamate catabolic process, catalytic activity, ATP binding, glutamate-ammonia ligase activity |
| GB49854 | alpha-amylase | فرایند متابولیکی کربوهیدرات ها، فعالیت الفامیلازی، باند شونده به کاتیون carbohydrate metabolic process, alpha-amylase activity, cation binding |
| Def1 | defensin 1 | امیدین، انتی بیوتیک، انتی باکتریال، پاسخ ایمنی ذاتی، اتصالات دی سولفیدی، ایمنی، پاسخ دفاعی به بکتری های گرم مثبت، پروتئین مرجع Amidation, Antibiotic, Antimicrobial, innate immune response, Disulfide bond, Immunity, defense response to Gram-positive bacterium, Reference proteome |
| ITPR | Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor | فعالیت کانال کلسیمی، انتقال یون کلسیم، هموستاز یون کلسیم شبکه آندوپلاسمی، انتقال مایع اپیتلیال، مسیر سیگنالینگ آپوپتوز درونی در پاسخ به آندوپلاسمی، ریتم پروازی calcium channel activity, calcium ion transport, endoplasmic reticulum calcium ion homeostasis, epithelial fluid transport, intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress, negative regulation of calcium-mediated signaling, regulation of insulin secretion, flight behavior |
| MRJP | major royal jelly protein | تغذیه زنبور عسل، قدرت تولیدمثل بالای زنبور ملکه honeybee nutrition, high reproductive ability of the honeybee queen |
| GB50118 | facilitated trehalose transporter Tret1 | انتقال کربوهیدرات Carbohydrate transport |
| GB50115 | chymotrypsin inhibitor | مهارکننده کیموتریپسین و کاتپسین G Chymotrypsin and cathepsin G inhibitor |
| MBS | Myosin binding subunit | توسعه اکسون، توسعه اپیدرم، تشکیل کانال حلقه ای، سازمان دهی موهای دیسک های بال، مورفوژن نورون ها، تنظیم و توسعه گیرنده های نوری چشم، تنظیم ریتم حرکتی axon extension, epidermis development, germline ring canal formation, imaginal disc-derived wing hair organization, imaginal disc morphogenesis, neuron projection morphogenesis, regulation of compound eye photoreceptor development, regulation of locomotor rhythm |
| GB47666 | dolichyl pyrophosphate Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyl transferase | فرایند بیوسنتتیک الیگوساکارید مربوط به دولیکول، فرایند بیوسنتز الیگوساکارید، گلیکوزیلاسیون مرتبط با پروتئین N dolichol-linked oligosaccharide biosynthetic process, oligosaccharide-lipid intermediate biosynthetic process, protein N-linked glycosylation |
| GB45410 | GTPase-activating Rap/Ran-GAP domain-like protein 3 | فعال کننده GTPase، تنظیم انتقال سیگنال واسطه GTPase GTPase activator, regulation of small GTPase mediated signal transduction |



شکل ۵. نوع و درصد انواع واریانتهای شناسایی شده در نواحی کدکننده ژنوم بافت مغز در زیر گونه ایتالیایی و آفریقایی

Figure 5. Type and percentage of variants identified in coding regions of the brain tissue genome in Italian and African subspecies

در این مطالعه از مجموعه داده‌های RNA-Seq برای شناسایی ژن‌های درگیر در صفات رفتاری مانند تولیدمثل، تهاجم و بهداشتی و به دنبال آن آنالیز محاسباتی برای تشخیص ژن‌های افتراقی بیان شده در بافت مغز در دو زیرگونه زنبورعسل ایتالیایی و آفریقایی استفاده شد. زنبورهای عسل به دلیل ایفای نقش قابل ملاحظه در اکوسیستم‌های طبیعی، مورد توجه ویژه پژوهشگران قرار گرفته‌اند.

جدول ۴. تعداد و نوع SNPهای موجود در ژنهای شناخته شده دخیل در بروز صفات رفتاری زنبور عسل به تفکیک زیرگونه ایتالیایی و آفریقایی

Table 4. Number and type of SNPs in known genes involved in the development of honeybee behavioral traits in Italian and African subspecies.

| ژن Gene | تعداد SNP Num SNPs | | نوع SNP SNP Type | |
|------------|-----------------------|-----------------------|---|---|
| | <i>A.m Ligustica</i> | <i>A.m Scutellata</i> | <i>A.m Ligustica</i> | <i>A.m Scutellata</i> |
| Hsp70Ab | 16 | 22 | A/G, C/T, T/C, T/G, C/G, G/A, C/A | A/G, C/T, A/G, T/C, T/G, G/A, |
| GB53593 | 9 | 15 | T/C, T/G, A/G | C/T, A/G, T/C, G/A, G/C |
| Def1 | 2 | 4 | G/A, T/C | T/C, G/A |
| MBS | 2 | 2 | A/G, G/A | A/G, G/A |
| GB45410 | 4 | 7 | G/T, T/C, C/T | A/G, G/A, C/T, T/C |
| MRJP5 | 9 | 14 | T/C, C/T, T/A, G/A, C/G, A/G | A/G, C/T, T/C, G/T, A/G, A/C, T/A, G/A, C/G |
| ITPR | 44 | 66 | G/A, A/G, T/C, C/T, G/A, A/T, T/A, T/G, | T/C, A/G, G/A, C/T, T/G, C/G, G/C, |
| GB50118 | 10 | 0 | C/T, T/A, C/G, A/G, T/C, G/A, C/A | - |
| GB50115 | 5 | 9 | C/T, T/C, T/G | T/C, C/T, G/A, C/G, T/G |
| GB49854 | 24 | 23 | C/G, C/T, A/G, T/C, G/A, G/T, G/C, T/G, | G/A, C/G, A/G, T/C, C/T, G/T, G/C, T/G, |
| GB47666 | 2 | 2 | G/A, A/G | C/T, A/G |
| MRJP2 | 9 | 1 | T/A, C/T, G/T, A/G, T/C, | G/T |

این حشرات گردهافشان با مشارکت در روابط زیست محیطی، حفاظت و پایداری اکوسیستمها و حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های سبز از طبیعت به شیوه مثبتی سود می‌برند. علاوه بر این، به دلیل تولید عسل، زنبورهای عسل به طور قابل توجهی در صنایع غذایی دخیل هستند. بنابراین، مطالعه جنبه‌های فیزیولوژیکی، رفتاری و ژنتیکی زنبورهای عسل می‌تواند راه را در

جهت بهبود اکوسیستم و صنایع زنبورداری هموار کند. به خوبی مشخص شده است که توانایی تولید کلنی‌های زنبورعسل به طور کلی به خصوصیات فیزیولوژیکی مانند سرعت رشد بستگی ندارد بلکه بیشتر به ویژگی‌های رفتاری مانند رفتارهای بهداشتی، مقاومت در برابر بیماری و مکانیسم‌های دفاعی وابسته است. زنبور عسل (*Apis mellifera*) با موفقیت بسیار خوبی در انواع رفتارها مورد مطالعه قرار گرفته است و از آن به عنوان یک الگوی رفتاری تلقی می‌شود (Kucharski & Maleszka 2002). پیش از این، گزارش شده است که تغییرات در رونویسی برخی از ژن‌های شاخص در بافت مغز به طور قابل توجهی بر ویژگی‌های رفتاری زنبورهای زنبور عسل تأثیر می‌گذارد (Bell & Robinson 2011). علاوه بر این Zayed and Robinson (۲۰۱۲) گزارش دادند که فراوانی رونوشت ژن‌ها در مغز می‌تواند در پاسخ به عوامل ژنتیکی و محیطی تغییر یابد. در مطالعه Whitfield et al. (۲۰۰۳) استفاده از داده‌های ریزآرایه بر روی بافت مغز زنبورهای جوان پرستار (۵ تا ۹ روز) و زنبورهای چراگر پیر (۲۸ تا ۳۳ روز) نشان داد که تفاوت در بیان ژن‌های مغز در دوره‌های مختلف سنی باعث رفتارهای متفاوتی در زنبورعسل می‌شود. Alaux et al. (۲۰۰۹) با استفاده از داده‌های ریزآرایه بافتی مغز (تحت تأثیر شرایط محیطی و فرمون‌های هشداردهنده) در مورد رفتار پرخاشگرانه زنبورهای زنبورعسل نگهبان، سرباز و چراگر اروپایی و آفریقایی به تحقیق پرداختند. با توجه به نتایج این مطالعه، تعداد ژن‌های متفاوت بیان شده معنی‌دار در مقدار $P\text{ value} > 0.0005$ در زنبورهای نگهبان بین دو زیرگونه ۶۴ است. با توجه به اینکه مطالعه حاضر روی رونوشت متن مغز زنبورهای عسل نگهبان آفریقایی و ایتالیایی نیز انجام شده است، تعداد ژن‌های دارای بیان متفاوت معنی‌دار به دست آمده با استفاده از داده‌های RNA-seq در مقدار $P\text{ value} < 0.00005$ معادل ۲۲ بود. یکی از دلایل کاهش تعداد ژن‌های مشخص شده در مطالعه حاضر این است که نمونه‌های این آزمایش در شرایط طبیعی و بدون هیچ فرمون هشدار نمونه‌برداری شده‌اند و همچنین تکنیک RNAseq، بسیار دقیق‌تر (مقدار $p < 0.00005$) از تکنیک ریزآرایه برای شناسایی ژن‌ها می‌باشد به گونه‌ای که این روش را، تکنیک دیجیتال بیان ژن می‌نامند (Mortazavi et al. 2008). با توجه به نتایج ذکر شده، در مطالعه حاضر به بررسی رابطه بین صفات رفتاری و تفاوت در بیان ژن در زیرگونه‌های زنبورعسل آفریقایی و ایتالیایی پرداخته شد که به ترتیب به عنوان پرخاشگرترین و آرام‌ترین زیرگونه‌ها شناخته می‌شوند. در اینجا، ما از داده‌های ترانسکریپتومی از زیرگونه‌های فوق در بافت مغز استفاده کردیم که در نهایت منجر به شناسایی تعیین‌کننده‌ترین ژن‌های مرتبط با صفات رفتاری در زنبورهای عسل مذکور شد. با توجه به نتایج به دست آمده، تعدادی از ژن‌های مرتبط با صفات تولیدمثلی، بهداشتی و پرخاشگری شناسایی شد. پس به طور کامل نتیجه گرفته می‌شود که رفتارهای اجتماعی زنبورهای عسل با بیان برخی ژن‌ها در بافت مغز ارتباط نزدیکی و تنگاتنگی دارند. علاوه بر این، هرگونه اختلاف در الگوی بیان ژن منجر به تغییرات رفتاری در این حشرات می‌شود.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج، تنها ۲۲ ژن از ۱۶۷۰۱ ژن در ژنوم زنبورعسل بین دو زیرگونه ایتالیایی و آفریقایی بیان متفاوت معنی‌داری داشتند. اکثر ژن‌های شناسایی شده مربوط به صفات رفتاری، دخیل تولید پروتئین ژل رویال و سیستم تولیدمثلی ملکه، رفتارهای بهداشتی از طریق فعالیت‌های ضد میکروبی و ضدباکتریایی، پاسخ به محرک‌های خارجی و توسعه گیرنده‌های نوری، حساسیت به بو، رنگ و مزه بودند. آن‌ها همچنین با انتقال کربوهیدرات، پروتئین‌ها به ویژه کیموتریپسین، فعال‌کننده

GTPase، ترهالوز و مهارکننده کاتپسین G و همچنین پروتئین‌های شوک حرارتی، ادراک بینایی، نور و طعم ارتباط تنگاتنگی داشتند. همچنین لازم به ذکر است که این مطالعه منجر به شناسایی برخی ژن‌ها شده است که قبلاً گزارش نشده بود. از طرفی تعداد و نوع SNPها بر روی ژن‌های دخیل در بروز صفات رفتاری نیز شناسایی شدند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به خاطر حمایت مالی و حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، اسدی مهدیه، مدحتی لیلا (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

- Alaux C, Sinha S, Hasadsri L et al. (2009) Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. *Proc Natl Acad Sci* 106, 15400-15405.
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online.
- Bahador Y, MR Mohammadabadi, A Khezri, M Asadi, L Medhati. 2016 Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. *Res Anim Prod* 7 (13), 186-192 (In Persian).
- Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R et al. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev Biol* 7, e70.
- Bell AM, Robinson GE (2011) Behavior and the dynamic genome. *Science* 332, 1161-1162.
- Berger J, Senti K-A, Senti G et al. (2008) Systematic identification of genes that regulate neuronal wiring in the *Drosophila* visual system. *PLoS Genet* 4, e265.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- Bradbeer N (2009) Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. *Non-wood Forest Products*.
- Breed MD, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ (2004) Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annu Rev Entomol* 49, 271-298.
- Cingolani P, Cao X, Khetani RS et al. (2013) Intronic non-CG DNA hydroxymethylation and alternative mRNA splicing in honey bees. *BMC Genom* 14, e666.
- Cingolani P, Platts A, Wang LL et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* 6, 80-92.
- Consortium HGS (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931.
- Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M et al. (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin: a study in insect immunity. *Eur J Biochem* 221, 201-209.
- Eklom R, Galindo J (2011) Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107, 1-15.
- Falconer DS (1960) Introduction to quantitative genetics. *Introduction to quantitative genetics*.
- Gan Q, Chepelev I, Wei G et al. (2010) Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in *Drosophila* gonads revealed by RNA-seq. *Cell Res* 20, 763-783.

- Goff LA, Trapnell C, Kelley D (2012) CummeRbund: visualization and exploration of Cufflinks high-throughput sequencing data. R package version 2.
- Gong WJ, Golic KG (2006) Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172, 275-286.
- Haas BJ, Zody MC (2010) Advancing RNA-seq analysis. *Nat Biotechnol* 28, 421-423.
- Hunt GJ, Amdam GV, Schlipalius D et al. (2007) Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. *Naturwissenschaften* 94, 247-267.
- Imler J-L, Bulet P (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. In: *Mechanisms of epithelial defense*. Karger Publishers. pp. 1-21.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12, 357-360.
- Kucharski R, Maleszka R (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol* 3, 1-7.
- Lee A, Treisman JE (2004) Excessive Myosin activity in *mbs* mutants causes photoreceptor movement out of the *Drosophila* eye disc epithelium. *Mol Biol Cell* 15, 3285-3295.
- Marguerat S, Bähler J (2010) RNA-seq: from technology to biology. *Cell Mol Life Sci* 67, 569-579.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim* 7, 289-295.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K et al. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5, 621.

- Nguyen DV, Bulak Arpat A, Wang N et al. (2002) DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics* 58, 701-717.
- Oldroyd BP, Thompson GJ (2006) Behavioural genetics of the honey bee *Apis mellifera*. *Adv Insect Phys* 33, 1-49.
- Pauerstein P (2011) RNA-Seq: Current methods and potential applications. *Comput Mol Biol*, 1-13.
- Raffiudin R (2002) Honey bee behavioural evolution and itpr gene structure studies. James Cook University.
- Rajan A, Housden BE, Wirtz-Peitz F et al. (2017) A mechanism coupling systemic energy sensing to adipokine secretion. *Dev Cell* 43, 83-98. e86.
- Rittschof CC, Coombs CB, Frazier M et al. (2015) Early-life experience affects honey bee aggression and resilience to immune challenge. *Sci Rep* 5, 15572.
- Schmitzova J, Klaudiny J, Albert Š et al. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* 54, 1020-1030.
- Sultan M, Schulz MH, Richard H et al. (2008) A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 321, 956-960.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50 (In Persian).
- Trapnell C, Roberts A, Goff L et al. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7, 562-578.
- Whitfield CW, Cziko A-M, Robinson GE (2003) Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 302, 296-299.
- Wilhelm BT, Landry J-R (2009) RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 48, 249-257.
- Zayed A, Robinson GE (2012) Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. *Annu Rev Genet* 46, 591-615.

