

Expression of hSP90 gene and its relationship with ambient temperature and foraging rate in apis mellifera meda

Salim Morammazi 

*Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran. TEL: 09163166802, Email: morammazi.s@pgu.ac.ir

Mohammad Ali Mirhosseini 

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran. TEL: 09137089665, Email: m.mirhosseini@pgu.ac.ir

Abstract

Objective

HSP90 is a member of heat shock proteins (HSPs) family which produces in response to environmental stress factors and has different roles in cells. In this study, the differential expression of HSP90 gene during the day and its relationship with ambient temperature and foraging rate of worker bees were investigated.

Material and methods

The worker bees' commuting in front of hive and ambient temperature in five different times of day (at 7:00, 9:30, 12:00, 14:30 and 17:00) were recorded for three days. The relative transcription level of HSP90 gene was measured in those times using real-time PCR method. The effects of day and different times in a day were subjected to the model as random and fixed effects, respectively, for analyzing worker bees' commuting and ambient temperature. The regression between these traits was also run.

Results

Results showed that time of day has significant effect on ambient temperature, worker bees' commuting and relative expression of HSP90 ($P < 0.01$). The highest and lowest ambient

temperature were recorded at 12:00 pm and 7:00 am, respectively. The highest and least worker bees' commuting were obtained at 17:00 and 12:00 pm, respectively. In addition, the highest and lowest HSP90 gene transcription level were recorded at 12:00 pm and 7:00 am o'clock, respectively. The regression analysis revealed that worker bees' commuting and relative expression of HSP90 gene were increased with increasing of ambient temperature; the commuting of bees was reduced in temperature above 39 ° C. Furthermore, the worker bees' commuting was increased with increasing of HSP90 expression to three-fold, which was decreased with more relative expression level.

Conclusion

In general, the trend of worker bees' commuting, ambient temperature, and relative expression of HSP90 gene were clear during the day. When the ambient temperature was increased, the relative transcription level of HSP90 gene was increased in response to heat stress, while the number of commuter bees was decreased. The management of heat shock can be recommended to improve nectar gathering by commuter bees.

Keywords: HSP90 Gene, Gene Expression, Foraging Behavior, Worker Bee, Ambient Temperature, *Apis mellifera meda*

Paper Type: Research Paper.

Citation: Morammazi S, Mirhosseini MA (2020) Expression of HSP90 Gene and its Relationship with Ambient Temperature and Foraging Rate in *Apis Mellifera Meda*. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (4), 185-205.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (4), 185-205.

DOI: 10.22103/jab.2020.15283.1199


Received: November 10, 2020.

Accepted: December 18, 2020.

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


© the authors.

بیان ژن HSP90 و ارتباط آن با دمای محیط و تردد زنبور عسل ایرانی

سالم مرمزی 

*نویسنده مسئول. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران. تلفن:

morammazi.s@pgu.ac.ir، ۰۹۱۶۳۱۶۶۸۰۲

محمد علی میرحسینی 

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۷۰۸۹۶۶۵.

m.mirhosseini@pgu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۰

چکیده

هدف: پروتئین HSP90 یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های شوک گرمایی است که در پاسخ به استرس‌های محیطی تولید شده و نقش‌های مختلفی در سلول دارد. در این مطالعه تغییر بیان ژن HSP90 در ساعات مختلف روز و رابطه آن با دمای محیط و تردد زنبور عسل کارگر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش: تردد زنبور عسل چراگر در جلوی دریچه کندو و دمای محیط در پنج زمان مختلف روز (ساعت‌های ۷:۰۰، ۹:۳۰، ۱۲:۰۰، ۱۴:۳۰ و ۱۷:۰۰) طی سه روز اندازه‌گیری شد. بیان نسبی ژن HSP90 نیز طی این پنج زمان با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. برای آنالیز آماری داده‌های دما و تردد زنبور عسل، اثر روز به عنوان بلوک (اثر تصادفی و هر روز به عنوان یک بلوک) و اثر زمان‌های مختلف روز به عنوان اثر ثابت در مدل مد نظر قرار داده شد. همچنین تابعیت بین این صفات نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که ساعت‌های مختلف روز اثر معنی‌داری بر تردد زنبور عسل و بیان نسبی ژن HSP90 دارد ($P < 0.01$). حداکثر و حداقل دمای محیط به ترتیب در ساعت‌های ۱۲:۰۰ ظهر و ۷:۰۰ صبح ثبت شد. حداکثر و حداقل تردد زنبورهای چراگر نیز به ترتیب در ساعت‌های ۱۷:۰۰ و ۱۲:۰۰ ظهر حاصل شد. به علاوه اینکه بیشترین و کمترین میزان بیان نسبی ژن HSP90 در ساعت‌های ۱۲:۰۰ و ۷:۰۰ ملاحظه شد. نتایج آنالیز تابعیت مشخص کرد که تردد زنبور کارگر و بیان نسبی ژن HSP90 با

افزایش دمای محیط افزایش می‌یابد؛ البته تردد زنبورها در دمای بالاتر از ۳۹ درجه سلسیوس کاهش یافت. به علاوه، تردد زنبورهای کارگر تا افزایش سه برابری بیان ژن HSP90، افزایشی بود و بعد از آن روند کاهشی داشت.

نتیجه‌گیری: بطور کلی روند تردد زنبور عسل، دمای محیط و بیان نسبی ژن HSP90 طی روز الگوی مشخصی داشت. افزایش دما و وارد شدن یک تنش دمایی در اواسط روز باعث افزایش بیان ژن HSP90 و در نتیجه کاهش تردد زنبور عسل شد. توصیه می‌شود به منظور بهینه‌سازی تردد زنبورهای عسل جهت جمع‌آوری شهد، مدیریت لازم جهت کنترل این تنش دمایی اعمال شود.

کلید واژه: ژن HSP90، بیان ژن، رفتار تردد، زنبور کارگر، دمای محیط، زنبور عسل ایرانی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مرضی سالم، میرحسینی محمد علی (۱۳۹۹) بیان ژن HSP90 و ارتباط آن با دمای محیط و تردد زنبور عسل ایرانی مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۲۰۵-۱۸۵.

مقدمه

امروزه مطالعه گونه‌های بومی به منظور شناخت ظرفیت‌ها و حفاظت از آنها بطور گسترده مورد توجه قرار گرفته است (Mahmoodi et al. 2018). در این راستا استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌تواند اطلاعات مناسبی برای مطالعه این گونه‌ها فراهم کند. مطالعه گونه‌های بومی با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی علاوه بر جمع‌آوری حجم زیاد اطلاعات، پارامترهای لازم برای مطالعه و ارزیابی جمعیت‌های مختلف و همچنین درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها را فراهم می‌کند (Morammazi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2015). یکی از این گونه‌های بومی که در مطالعات مولکولی مورد توجه قرار گرفته، زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) است (Bahador et al. 2016). زنبور عسل از جانوران متعلق به دسته حشرات و راسته پرده بالان است که نقش کلیدی در تولید محصولات کشاورزی از طریق گرده افشانی دارد. علاوه بر این، این جانور توانایی تولید محصولاتی نظیر عسل، ژل رویال، زهر، گرده گیاهان، موم و بره موم را دارد. اما با این وجود تاکنون در کشور ما کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. کلنی زنبور عسل از ملکه، کارگر و نر تشکیل شده است که هر کدام وظایف خاص خود را دارند. علاوه بر این، زنبورهای کارگر وظایف متنوعی دارند که براساس سن زنبور کارگر، نوع وظیفه آن تغییر می‌کند. زنبور کارگر تا سن ۲۱ روزگی (بطور متوسط) فعالیت آن فقط به داخل کندو محدود می‌شود و پس از آن برای جمع‌آوری نکتار، گرده و دیگر نیازهای کلنی به خارج از کندو پرواز می‌کند (Rueppell et al. 2007). بر همین اساس می‌توان گفت زنبور کارگر چراگر که روزانه برای جمع‌آوری مایحتاج کلنی به بیرون پرواز می‌کند در مقایسه با زنبورانی که وظایف آن‌ها در داخل کندو است بیشتر تحت تاثیر عوامل

استرس‌زای محیطی قرار می‌گیرد. تاثیر این عوامل استرس ممکن است رفتار زنبورها را نیز تحت تاثیر گذار قرار دهد (Polatto et al. 2014). هر گونه تغییر در رفتار چرای زنبور عسل کارگر ممکن است بر میزان ذخایر شهد و گرده، جمعیت کلنی و مقاومت به بیماری‌ها تاثیر گذار باشد. یکی از این عوامل استرس‌زای محیطی که تاثیر شدید آن بر رفتار زنبور عسل به اثبات رسیده، دما است (Corbet et al. 1993; Hilario et al. 2000). مطالعات نشان داده، افزایش یا کاهش دما، رفتار چرای زنبور عسل کارگر را تحت تاثیر قرار داده است (Alqarni, 2006; Blazyte-Cereskiene et al. 2010; Alves et al. 2015). با توجه به اهمیت این موضوع، اما تاکنون چگونگی تاثیر منفی تغییرات دمای روزانه بر رفتار چراگری زنبور عسل از لحاظ فیزیولوژیکی و از لحاظ مولکولی مورد مطالعه قرار نگرفته است. مطالعات مختلف نشان داده که موجودات برای محافظت در برابر استرس‌های محیطی نظیر گرما، سرما، خشکی، سم‌ها و عوامل بیماری‌زا، پروتئین‌های شوک گرما^۱ را سنتز می‌کنند (Feder and Lindquist 2002; Hofmann 1999; Kregel 2002). پروتئین‌های شوک گرما گروهی از مولکول‌های بسیار حفاظت شده هستند (Lindquist and Craig 1988; Boorstein et al. 1994; Richter et al. 2010) که براساس اندازه به خانواده‌های HSPهای کوچک، HSP60، HSP70، HSP90 و HSP100 تقسیم می‌شوند (Lindquist and Craig 1988; Boorstein et al. 1994). در سطح سلولی، HSPها از پروتئین‌ها در تمام مراحل از سنتز تا استقرار آنها در برابر آسیب استرس‌ها محافظت می‌کنند (Feder and Hofmann 1999; Hartl and Hayer-Hartl 2002). در بین انواع HSPها، پروتئین شوک گرمایی ۹۰ (HSP90) یکی از فراوان‌ترین و عمومی‌ترین پروتئین بیان شده در برابر استرس است (Rinehart et al. 2007; King 2007; Xu et al. 2015; MacRae 2015). پروتئین HSP90 در مراحل اولیه سنتز پروتئین‌ها از آنها در برابر استرس حفاظت می‌کند (Aamodt 2008). این پروتئین وظایف متنوعی دیگری در سلول دارد. پروتئین HSP90 در بسیاری از فرایندهای سلولی نقش بافر و محافظ-همراه دارد (Rutherford et al. 2007). همچنین مطالعات نشان داده که در فرایندهای سلولی دخیل در تنظیم رشد نیز نقش ایفا می‌کند (Rutherford et al. 2007). با توجه به این مطالب می‌توان از سطح بیان ژن HSP90 به عنوان یک بیومارکر برای ملاحظه پاسخ‌های سلولی و فیزیولوژیکی در برابر انواع تحریکات محیطی استفاده کرد (Aamodt 2008; Tedeschi et al. 2015). همچنین باتوجه به نقش‌های متنوع آن، می‌توان ارتباط سطح بیان این ژن را با فعالیت‌های روزمره جانداران مورد بررسی قرار داد.

مکانیسم‌های مولکولی فرایندهای ژنتیکی مهمی نظیر همانندسازی، بیان (شامل رونویسی و ترجمه) و نحوه تنظیم بیان ژن‌ها را در بر می‌گیرند (Tohidinejad et al. 2015) و ماده ژنتیکی^۲ هر سلول شامل تعداد زیادی ژن بوده که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و بنابر شرایط فیزیولوژیکی فقط تعداد کمی از آنها برای سنتز پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول بیان می‌شوند (Tohidinejad et al. 2015). در ژنوم زنبور عسل حداقل ۳۶ نوع HSP وجود دارد (Weinstock et al. 2006;)

¹ Heat Shock Proteins or HSPs

² DNA

Severson et al. 2014). نقش برخی از این ژن‌ها در تحمل استرس در زنبور عسل مورد مطالعه قرار گرفته است (Severson et al. 2014). نقش برخی از این ژن‌ها در تحمل استرس در زنبور عسل مورد مطالعه قرار گرفته است (Severson et al. 2014). یکی از این ژن‌ها HSP90 است که مطالعات نشان داده عوامل استرس‌زا نظیر گرما، عناصر سنگین و یا هورمون‌ها سطح بیان آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Brunt et al. 2007; and Silver 1991; Pratt and Toft 2003; Sonoda et al. 2007). همچنین مطالعات نشان داده که سطح بیان HSP90 در زنبور عسل با توجه به مرحله سنی زنبور کارگر و نوع بافت سلولی آن، تغییر می‌یابد (Aamodt 2008; Koo et al. 2015). با این وجود ضروری به نظر می‌رسد الگوی بیان ژن HSP90 طی روز برای درک بهتر مکانیسم سلولی و فیزیولوژیکی زنبورهایی که در معرض چالش‌های محیطی قرار می‌گیرند و همچنین ارتباط آن با فعالیتهای زنبور عسل مورد مطالعه قرار گیرد. با توجه به اینکه بیان ژن‌ها در موجودات یوکاریوتی تحت کنترل شرایط موقت و چندبعدی است و هر کدام از بافت‌های موجود زنده تحت تاثیر مرحله نمو و شرایط فیزیولوژیکی تنها یک مجموعه خاص و نسبتاً کوچک از تمام ژنوم را بیان می‌کند (Mohammadabadi 2019)، بنابراین در این مطالعه سعی شده با استفاده از روش Real time PCR سطوح رونوشت‌برداری ژن HSP90 در زنبورهای عسل کارگر طی ساعات مختلف روز اندازه‌گیری شود تا چگونگی پاسخ سلول به استرس دما در شرایط نگهداری مورد نظر شناسایی شود. همچنین، هر چند تاثیر عوامل محیطی و غیر محیطی بر تردد زنبور عسل قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته است (Polatto et al. 2014)، اما تاکنون ارتباط بیان ژن خاص نظیر ژن‌هایی که نقش محافظ-همراه از پروتئین‌ها را دارند با رفتار تردد زنبور عسل مورد مطالعه قرار نگرفته است. برای همین منظور، در مطالعه حاضر ضمن اندازه‌گیری تردد زنبور عسل چراگر و دمای محیط، میزان بیان نسبی ژن HSP90 در زنبور عسل ایرانی که در شرایط گرمسیر برای تولید عسل نگهداری شده مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

منطقه و شرایط اقلیمی: مطالعه حاضر در زنبورداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس واقع در دشتستان استان بوشهر انجام شد. از لحاظ اقلیمی این منطقه گرم، متوسط دمای سالانه آن ۲۳/۷ درجه سلسیوس و متوسط سالانه بارندگی آن در حدود ۱۶۸ میلی‌متر می‌باشد. اطلاعات و نمونه‌های مورد نیاز این آزمایش در هفته اول مهر ماه سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. در این زمان دامنه تغییرات دمای روزانه بین ۳۱ تا ۴۲ درجه سلسیوس و آسمان طی روز کاملاً آفتابی بود. این مطالعه در زمان اوج گل دهی درخت کنار (*Ziziphus spina-christi*) انجام شد.

جمعیت مورد مطالعه: در این مطالعه از ۶ کلنی برای اندازه‌گیری تردد زنبور کارگر و ۳ کلنی برای نمونه برداری جهت مطالعه بیان با شرایط یکسان جمعیتی استفاده شد. برای این منظور کلنی‌ها مورد نظر برای هفت قاب جمعیت همسان سازی شد بطوری که یک قاب آن ذخیره، سه قاب تخم و لاور و سه قاب خالی جهت ذخیره نکتار در نظر گرفته شد. کلنی زنبورهای عسل

ایرانی مورد مطالعه در کندوی چوبی طرح لانگستروت^۳ کف بسته پرورش داده شد و در ارتفاع ۳۰ سانتی متری از کف زمین در زیر سایه درخت نگهداری شدند. تمام ملکه‌ها از نوع ملکه زنبور عسل ایرانی، هم‌سن (هفت ماهه) و مادر یکسانی داشتند که بطور طبیعی در این زنبورستان جفتگیری نموده‌اند. سه هفته قبل از شروع آزمایش به کلنی‌ها داروی ضد کنه (نوار آپیستان) داده شد و در مدت انجام آزمایش هیچ‌گونه علائم بیماری ملاحظه نشد (Medrzycki et al. 2013). از دو هفته قبل از شروع آزمایش و همچنین هنگام انجام آزمایش هیچ‌گونه غذای کمکی در اختیار کلنی‌ها قرار داده نشد.

جمع آوری اطلاعات: جهت انجام تحقیق حاضر اطلاعاتی در خصوص دمای محیط و تردد زنبور عسل کارگر جمع

آوری شد. دمای محیط و تردد زنبور چراگر در ۵ نوبت در روز در ساعت‌های ۷:۰۰، ۹:۳۰، ۱۲:۰۰، ۱۴:۳۰ و ۱۷:۰۰ طی سه روز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری دما از دماسنج دیجیتال ایزولاب (Isolab) در زیر سایه درخت و در ارتفاع ۱ متر از سطح زمین استفاده شد. شمارش تردد زنبور کارگر در جلوی کندو و با شمردن تعداد زنبور عسلی که در مدت ۵ دقیقه به کندو بر می‌گردد اندازه‌گیری شد (Pernal and Currie 2001; Beekman et al. 2004; Ali 2011).

نمونه برداری برای بیان: تمام زنبورهای کارگری که برای مطالعه بیان نمونه برداری شده‌اند از لحاظ سنی تقریباً

یکسان بوده و طبق یک روش استاندارد تولید شدند (Human et al. 2013). همچنین برای اینکه تنوع ژنتیکی بین این نمونه‌ها حداقل باشد همه آن‌ها از تخم‌های یک ملکه طبق روشی که در ادامه توضیح داده شده، تولید شدند. برای این منظور، ۵۰ روز قبل از نمونه برداری (روز ۱)، یک ملکه با وضعیت تخم‌گذاری مناسب (جهت تامین ۱۵۰ زنبور کارگر برای نمونه برداری بیان) شناسایی شد و در سه روز متوالی با استفاده از محصور کننده ملکه، قاب‌های دارای تخم یک روزه از آن تهیه و علامت‌گذاری شدند. این قاب‌ها در روز ۲۰ (یک روز قبل تولد) به انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سلسیوس و رطوبت بین ۶۰ تا ۷۰ منتقل شدند (Human et al. 2013). پس از تولد، پشت سینه زنبورهای جوان با استفاده از ماژیک مخصوص، علامت‌گذاری شد (جهت شناسایی در هنگام نمونه برداری) و در سه کلنی دارای جمعیت یکسان (نظیر کلنی‌های بخش اول مطالعه) هر کلنی یک قاب ادغام شدند (ادغام همراه با اسپری شربت شکر). در نهایت، طی فصل چرا زمانی که عمر زنبور کارگر علامت‌گذاری شده تقریباً ۲۸ روز بوده، از هر کلنی ۱۰ زنبور عسل چراگر علامت‌گذاری شده در هر کدام از ساعت‌های ۷:۰۰، ۹:۳۰، ۱۲:۰۰، ۱۴:۳۰ و ۱۷:۰۰ در جلوی دریچه پرواز جمع آوری شد. نمونه‌ها سریعاً در ازت مایع قرار داده شدند و تا استخراج RNA در فریزر -۸۰ نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA: هر نمونه که برای استخراج RNA در نظر گرفته شد شامل ۱۰ زنبور عسل

کارگر بود که قبل از استخراج RNA سر آن‌ها جداسازی شد. هر ۱۰ سر زنبور عسل کارگر که متعلق به یک نمونه بودند در ابتدا با استفاده از ازت مایع پودر و هموژن شد و سپس با استفاده از محلول RiboEx™ (GeneAil®, Seoul, Korea) طبق پروتکل پیشنهادی، RNA از آن‌ها استخراج شد. در مجموع برای مطالعه بیان از ۱۵۰ زنبور عسل کارگر همسن استفاده شد. در

³ Langstroth

اینجا هر نمونه بیان (واحد آزمایشی) از ۱۰ زنبور کارگر همسن تشکیل شده که از سه کلنی (سه تکرار) در ۵ نوبت زمانی (۵ تیمار) جمع آوری شدند. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده، از اسپکتوفتومتر (Pico 200, Saffron Walden, England) با طول جذب ۲۶۰ نانومتر استفاده شد و جهت تعیین کیفیت RNA از جذب 260nm:280nm و الکتروفورز روی ژل آگاروز دو درصد استفاده شد. برای سنتز cDNA از ۲ میکروگرم RNA و کیت RT-PCR دو مرحله‌ای (BIOFACT, Daejeon,) (Korea) استفاده شد.

شرایط Real-time PCR: برای اندازه گیری سطح رونوشت برداری ژن HSP90 و ژن مرجع (Actin) از سیستم Ampliqon,) RealQ plus 2x Master Mix Green (Illumina®) Eco™ Real-Time PCR (Odense, Denmark) که حاوی تمام مواد مورد نیاز واکنش Real-time PCR به استثنای پرایمر اختصاصی و نمونه cDNA بوده، استفاده شد. ثبات بیان ژن Actin به عنوان ژن مرجع در مطالعات بیان زنبور عسل در مطالعات قبلی گزارش شده بود (Lourenço et al. 2008; Scharlaken et al. 2008). توالی پرایمرهای ژن‌های مورد نظر و دیگر مشخصات آنها در جدول ۱ ذکر شده است. شرایط واکنش PCR نیز طبق سفارش شرکت سازنده انجام شد (جدول ۲). همچنین برای سنجش کارایی این واکنش‌ها از منحنی استاندارد استفاده شد. برای این منظور، سریال رقت (۵ رقت) از مخلوط تمام نمونه‌های cDNA تهیه و واکنش‌های جداگانه‌ای انجام شد.

جدول ۱. توالی پرایمرها، اندازه محصول PCR و شماره دسترسی ژن‌های مطالعه شده

Table 1. Primers sequence, PCR size product and access number of interested genes

منبع	شماره دسترسی	اندازه محصول	آغازگر	نام ژن
Reference	Access number	Product size (bp)	Primer	Gene name
Koo et al., 2015	NM_001160064.1	64	F: 5'-AGGACGTCACCATGGCTAAT-3' R: 5'-TGTGCAATTTTCAGCTTGGAA-3'	HSP90
Lourenço et al., 2008	NM_001185145.1	156	F: 5'-TGCCAACACTGTCCTTTCTG-3' R: 5'-AGAATTGACCCACCAATCCA-3'	Actin

جدول ۲. شرایط واکنش Real-time PCR

Table 2. Real-time PCR condition

مدت	دما (درجه سلسیوس)	مرحله واکنش
Time	Temperature (°C)	Reaction step
15 min	95	واسرشته سازی اولیه Primary denaturation
20 sec	95	واسرشته سازی Denaturation
30 sec	58	اتصال Annealing
30 sec	72	گسترش Extension
20 min	55-95	ذوب Melting

آنالیز داده‌ها-آنالیز واریانس: برای آنالیز اطلاعات دمای محیط و تردد زنبور کارگر از رابطه ۱ و برای آنالیز داده‌های

بیان نسبی از رابطه ۲ استفاده شد. با توجه به اینکه توزیع داده‌ها نرمال نبود قبل از آنالیز داده‌ها، تبدیل داده لگاریتمی بر روی آنها اعمال شد.

$y_{ij} = \mu + T_i + R_j + e_{ij}$	رابطه (۱)
$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$	رابطه (۲)

در رابطه ۱، y_{ij} شامل هر کدام از متغیرهای وابسته دمای محیط و تردد زنبور چراگر می‌باشد. در این رابطه، μ میانگین هر کدام از صفات وابسته، T_i اثر ثابت هر کدام از ساعات روز (۵ سطح)، R_j اثر تصادفی روز به عنوان بلوک (سه روز) و e_{ij} اثر باقیمانده تصادفی است. کلیه مشاهدات این صفات از شش کلنی (۶ تکرار) جمع‌آوری شده بود.

در رابطه ۲، y_{ij} هر کدام از داده‌های مربوط به متغیرهای وابسته تفاوت بیان نسبی ژن بین HSP90 و ژن مرجع می‌باشد. دیگر اجزای مدل مشابه رابطه ۱ می‌باشد. مشاهدات این صفت از سه کلنی (۳ تکرار) جمع‌آوری شده است. در این مطالعه برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون توکی در سطح ۵ درصد استفاده شد. این آنالیز با استفاده از رویه GLM نرم افزار Minitab 18.1 انجام شد.

آنالیز تابعیت: در آنالیز واریانس اثر ساعت‌های مختلف روز بر روی هر کدام از صفات دمای محیط، تردد زنبور عسل و

بیان ژن HSP90 مورد مطالعه قرار گرفته شد. با این وجود آنالیز واریانس به خوبی ارتباط بیان ژن HSP90 و تردد زنبور عسل

با دما و همچنین ارتباط تردد زنبور عسل با بیان ژن HSP90 را نشان نداده و فقط روند روزانه آن‌ها در ساعات مختلف را نشان داده است. در ادامه با استفاده از آنالیز تابعیت رابطه علت و معلولی بین این صفات مورد بررسی قرار گرفته شد. برای توصیف این روابط از تابع پلی نومیال (درجه ۱ تا ۳) استفاده شد و بهترین درجه تابعیت که بهترین توصیف از رابطه بین دو متغیر بوده با استفاده از مقدار R^2 انتخاب شد. این آنالیز و نمودارهای آن با استفاده از نرم افزار Minitab 18.1 انجام شد.

نتایج

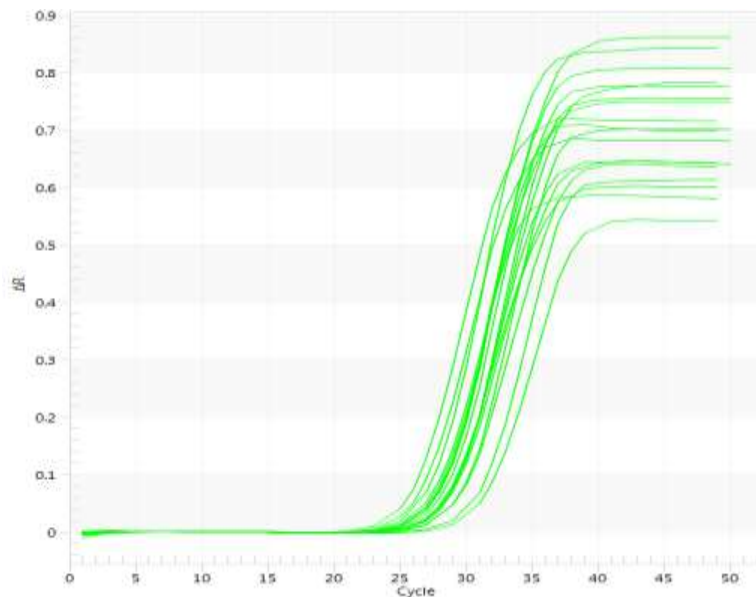
روند دمای محیط و رفتار تردد زنبور عسل طی روز: جدول ۳ دمای محیط اطراف محل استقرار کندوها و همچنین میزان تردد زنبور عسل کارگر طی ساعات‌های مختلف روز را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که ساعات‌های مختلف روز تاثیر معنی‌داری بر روی این دو صفت داشته است ($P < 0/01$). همانطور که در جدول ۳ قابل ملاحظه است، متوسط میانگین دمای محیط در سه روز مورد مطالعه بین ۳۱/۵ تا ۴۱/۵ درجه سلسیوس متغیر بوده است. حداقل این دما در ساعت ۷ صبح و حداکثر آن در ساعت ۱۲:۰۰ بود. تردد زنبور عسل چراگر در تمام ساعات روز ملاحظه شد که حداقل آن در ساعت ۱۲:۰۰ و حداکثر آن در ساعت ۱۷:۰۰ بوده است.

جدول ۳. تردد زنبور عسل کارگر و دمای محیط در ساعات مختلف روز

Table 3. Worker bee foraging and ambient temperature in different times of day

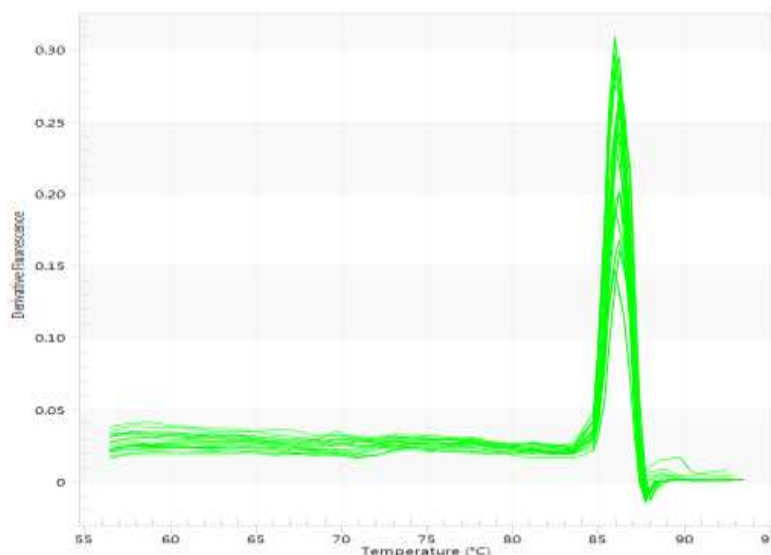
مقدار P P-value	ساعات‌های مختلف روز					صفت Trait
	17:00	14:30	12:00	9:30	7:00	
< 0.01	105.4±13.0 ^a	74.7±14.0 ^{ab}	19.5±4.6 ^c	52.7±4.9 ^{bc}	46.6±7.0 ^{bc}	میزان تردد (تعداد در دقیقه) Foraging rate (number per minute)
< 0.01	38.4±0.02 ^c	39.3±0.06 ^b	41.5±0.12 ^a	35.2±0.06 ^d	31.5±0.11 ^e	دمای محیط (درجه سلسیوس) Ambient temperature (Celsius)

روند رونوشت‌برداری ژن HSP90 طی روز: مطالعه الگوی بیان ژن HSP90 طی روز در زنبور عسل ایرانی توسط Real Time PCR و روش نسبی بیان انجام شد که منحنی تکثیر و منحنی ذوب آن به ترتیب در شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌شود. منحنی تکثیر ژن HSP90 نشان می‌دهد که برای همه نمونه‌ها امکان تعریف حد آستانه تکثیر وجود دارد. همچنین منحنی ذوب ژن HSP90 اختصاصی بودن پرایمرهای این ژن را نشان می‌دهد. علاوه بر این، نمودار منحنی استاندارد خطی و شیب آن برابر با $-3/273$ بوده که نشان می‌دهد این واکنش در Real time PCR با کارایی بالا (۱۰۲/۱٪) قابل انجام می‌باشد.



شکل ۱. منحنی تکثیر ژن HSP90 در زنبور عسل ایرانی

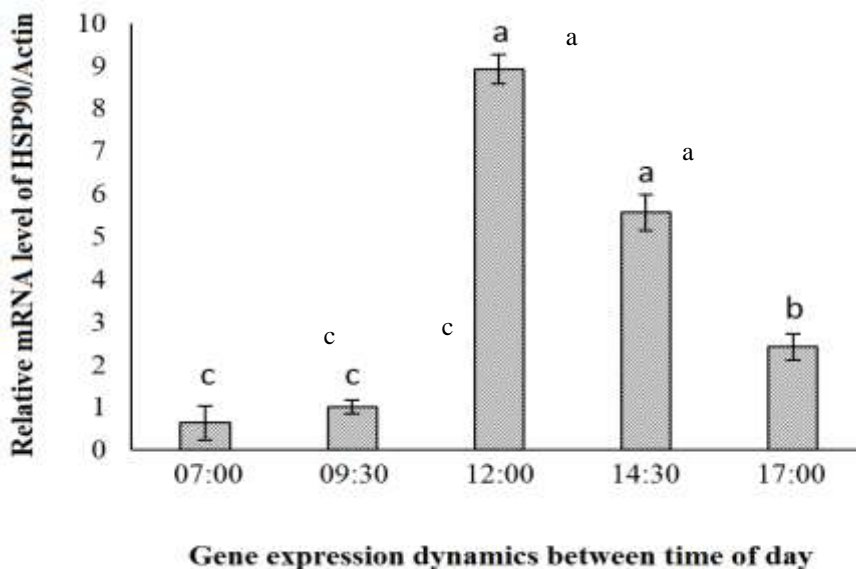
Figure 1. Quantification analysis curve of HSP90 gene in *Apis mellifera meda*



شکل ۲. منحنی ذوب ژن HSP90 در زنبور عسل ایرانی

Figure 2. Melting curve of HSP90 gene in *Apis mellifera meda*

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که میزان بیان نسبی ژن HSP90 به طور معنی‌داری تحت تاثیر ساعت‌های مختلف روز قرار گرفت (شکل ۳، $P < 0.01$). همانطور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، بیشترین میزان رونوشت‌برداری متعلق به زنبورهای نمونه برداری شده در ساعت ۱۲:۰۰ ظهر بود که این مقدار تفاوت معنی‌داری با ساعت ۱۴:۳۰ نداشت. بطور کلی روند بیان نسبی ژن در نیمه اول روز پایین بوده است و پس از رسیدن به اوج رونوشت‌برداری در ساعت ۱۲:۰۰، سطح رونوشت‌برداری کاهش یافته بطوری که در ساعت ۱۷:۰۰ بطور معنی‌دار این کاهش قابل ملاحظه است.



شکل ۳. میزان بیان نسبی ژن HSP90 در ساعت‌های مختلف روز در مغز زنبورهای چراگر

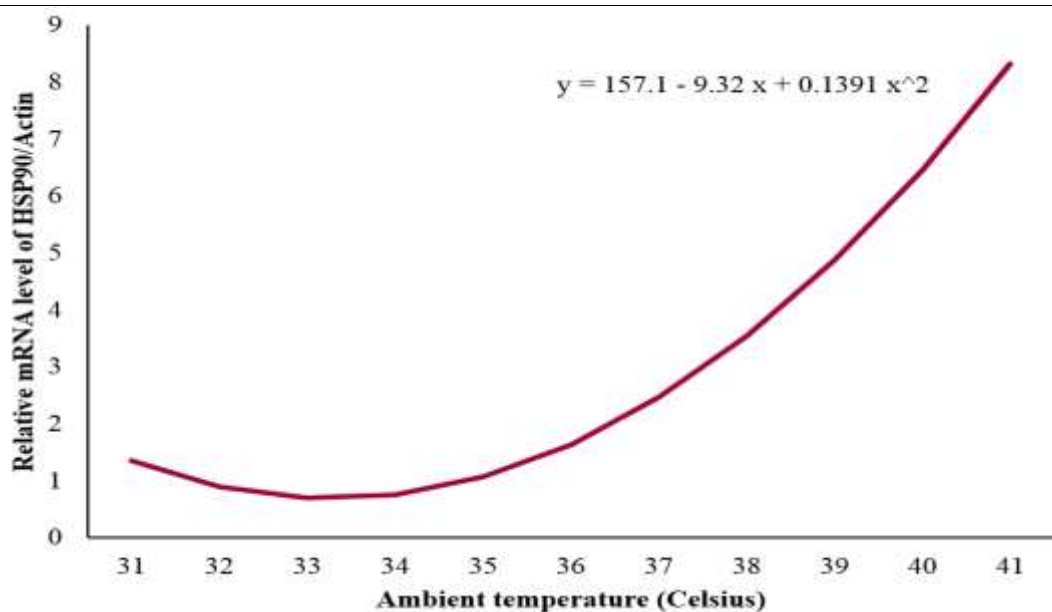
Figure 3. Relative expression of HSP90 gene in brain of foraging bee at different times of day

تابعیت رونوشت‌برداری ژن HSP90 از دمای محیط: مقادیر R^2 هر کدام از آنالیزهای تابعیت در جدول ۴ نشان داده شده است. براساس مقدار R^2 ، برای توصیف تابعیت رونوشت‌برداری ژن HSP90 در بافت سر از دمای محیط بهتر است از تابع درجه ۲ استفاده شود، چرا که این تابع مقدار R^2 آن (۹۱/۳۲) نسبت به تابع درجه ۱ (۷۳/۳۳) بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بوده و تفاوت چندانی با تابع درجه ۳ (۹۱/۴۹) نداشته است. تابع درجه ۲ رونوشت‌برداری ژن HSP90 از دمای محیط که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود نشان می‌دهد که با افزایش دمای محیط، سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90 در سر زنبور عسل چراگر نیز افزایش پیدا کرده است. این افزایش، در دماهای بالاتر از ۳۶ درجه سلسیوس بیشتر قابل ملاحظه است.

جدول ۴. نتایج آنالیز تابعیت میزان تردد زنبور عسل کارگر (تعداد در دقیقه) و بیان نسبی ژن HSP90 از دمای محیط (درجه سلسیوس) و تابعیت تردد زنبور کارگر از بیان نسبی ژن HSP90

Table 4. Regression analysis results among ambient temperature (Celsius), foraging rate (number per minute) and HSP90 relative gene expression in head of foraging worker bee of *Apis mellifera meda*

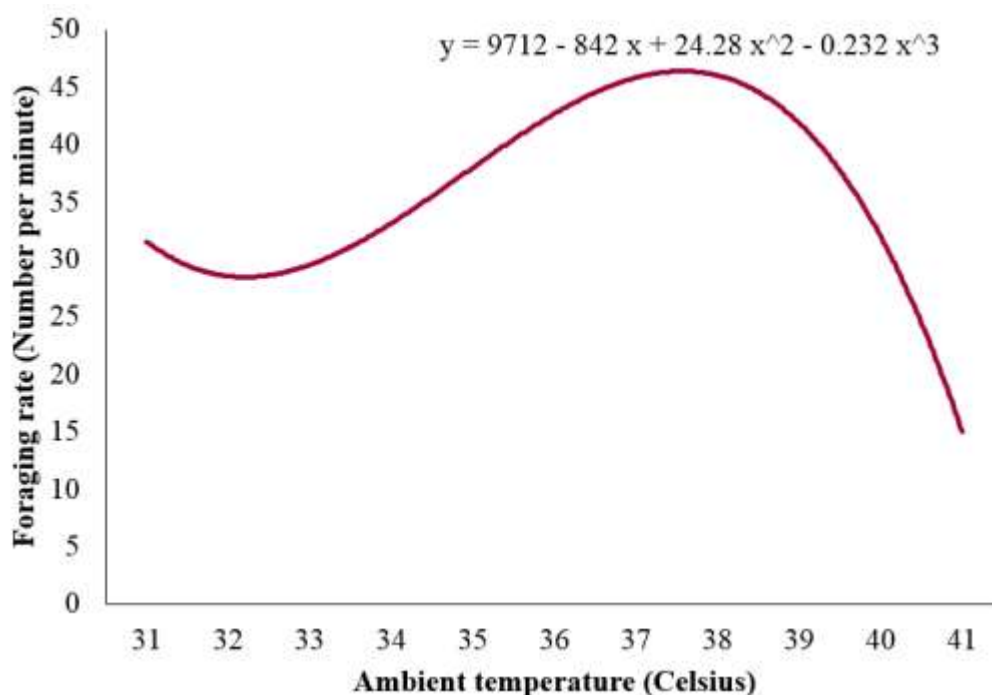
درجه تابع پلی نومیال (مقدار R ²)			رابطه بین دو صفت
Polynomial function degree (R ² value)			Relation between traits
درجه ۳	درجه ۲	درجه ۱	
Cubic	Quadratic	Linear	بیان نسبی ژن HSP90 از دمای محیط
91.49	91.32	73.33	HSP90 gene expression on ambient temperature
69.95	61.05	21.9	تردد زنبور چراگر از دمای محیط
			Foraging rate on ambient temperature
96.6	82.9	18.2	تردد زنبور چراگر از بیان نسبی ژن HSP90
			Foraging rate on relative HSP90 gene expression



شکل ۴. تابعیت درجه دوم میزان رونوشت برداری ژن HSP90 در مغز زنبور چراگر از دمای محیط

Figure 4. Quadratic regression between the amount of HSP90 gene transcription in brain of foraging bee and ambient temperature

تابعیت تردد زنبور عسل چراگر از دمای محیط: همانطور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود برای توصیف تابعیت تردد زنبور عسل کارگر از دمای محیط، مقدار R^2 تابع درجه سه (۶۹/۹۵) بطور قابل ملاحظه‌ای از تابع درجه یک و دو (به ترتیب ۲۱/۹ و ۶۱/۰۵) بیشتر بود. بنابراین برای توصیف تابعیت تردد زنبور چراگر از دمای محیط تابع درجه ۳ بهترین می‌باشد. این تابع که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود نشان می‌دهد که در ابتدا با افزایش دما میزان تردد افزایش پیدا کرده است. این افزایش تا دمای تقریباً ۳۸ درجه سلسیوس ادامه پیدا کرده و پس از آن با افزایش دما میزان تردد زنبورهای کارگر کاهش یافته است.



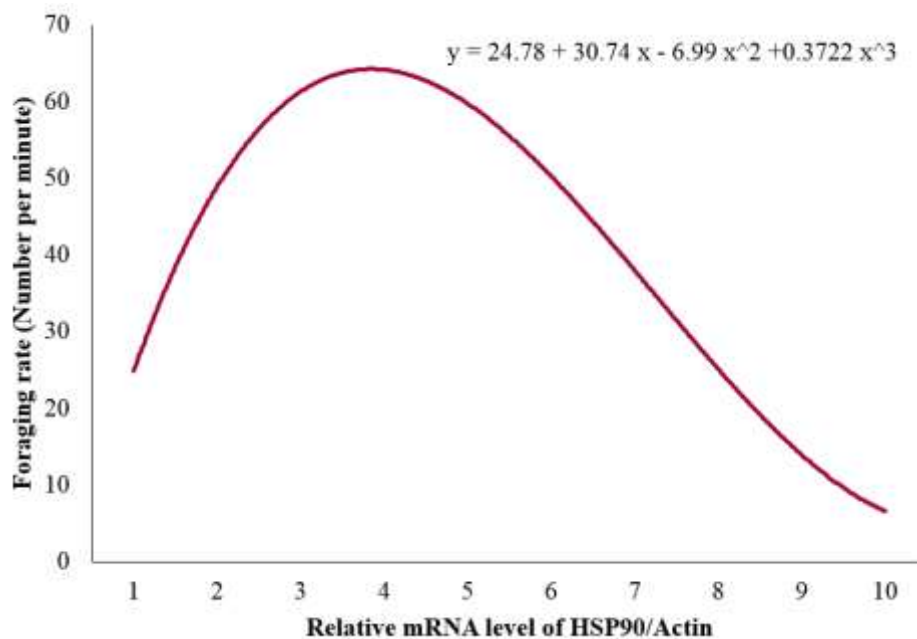
شکل ۵. تابعیت درجه سوم میزان تردد زنبور عسل چراگر از دمای محیط

Figure 5. Cubic regression between the commuting rate of worker bees and ambient temperature

تابعیت تردد زنبور عسل از سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90: براساس مقدار R^2 در جدول ۴، برای توصیف تابعیت تردد زنبور چراگر از رونوشت‌برداری ژن HSP90، تابع درجه ۳ (۹۶/۶) بهتر از توابع درجه ۱ و ۲ (به ترتیب ۱۸/۲ و ۸۲/۹) می‌باشد. طبق این تابع که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود تردد زنبور عسل در ابتدا با افزایش بیان نسبی ژن HSP90 افزایش پیدا کرده است. این افزایش تردد زنبور عسل تا بیان نسبی ۴ ژن HSP90 ادامه یافته و پس از آن افزایش بیان نسبی ژن HSP90 با کاهش تردد زنبور عسل همراه بوده است.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد زنبور عسل ایرانی تحمل دمایی بالایی دارد. طبق نتایج این مطالعه، حداکثر میزان پرواز زنبور عسل ایرانی در دمای با میانگین ۳۸/۴ درجه سلسیوس بوده و در دمای بالاتر از ۴۲ درجه سلسیوس نیز تردد آن ملاحظه شد. به علاوه، براساس آنالیز تابعیت رونوشت‌برداری ژن HSP90 از دمای محیط (شکل ۴)، با افزایش دمای محیط، رونوشت‌برداری ژن HSP90 در سر زنبور عسل افزایش پیدا کرده است.



شکل ۶. تابعیت درجه سوم میزان تردد زنبور چراگر از میزان بیان نسبی ژن HSP90

Figure 6. Cubic regression between the commuting rate of worker bees and HSP90 gene transcription

همچنین نتایج این مطالعه نشان داده، در ساعت ۱۲:۰۰ دمای محیط حداکثر بوده (جدول ۳) و رونوشت‌برداری ژن HSP90 نیز بیشترین سطح (شکل ۳) را داشته است. بر همین اساس می‌توان گفت، تحمل دمایی بالای زنبور عسل ایرانی ممکن است بدلیل افزایش در میزان رونوشت‌برداری ژن HSP90 اتفاق افتاده باشد. نتایج مطالعات قبلی که در شرایط آزمایشگاهی انجام شده (Koo et al. 2015) نتایج مطالعه حاضر که در شرایط مزرعه‌ای انجام شده را تایید می‌کند. در مطالعات قبلی گزارش شده که سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90 در سر زنبور عسل کارگر در دمای ۴۵ درجه سلسیوس از دمای ۲۷ درجه سلسیوس بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بوده است (Koo et al. 2015). با توجه به نقش HSP90 به عنوان محافظ در مراحل اولیه سنتز پروتئین‌ها در شرایط استرس دمایی (Aamodt 2008)، این افزایش در سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90، بدلیل نیاز سلول به

پروتئین HSP90 رخ داده بود. بطور کلی با افزایش سطح پروتئین‌های HSP در سلول، آسیب ناشی از افزایش دما در سطح سلول کاهش می‌یابد (Feder and Hofmann 1999; Kregel 2002). پژوهش حاضر نشان داد که میزان رونوشت‌برداری ژن HSP90 طی روز روند ثابتی نداشته است. این روند در ساعات اولیه روز پایین بوده، سپس در اواسط روز بطور معنی داری به اوج رسیده و آنگاه به تدریج تا پایان روز روند نزولی داشته است (شکل ۳). این روند مشابه روند تغییر دمای محیط طی روز بوده است و نشان می‌دهد که روند بیان ژن HSP90 تابعی از تغییر دمای محیط می‌باشد. براساس این نتایج، زمانی که دمای محیط طی روز حداقل بوده (صبح ساعت ۷:۰۰) حداقل سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90 ملاحظه شد و زمانی که دمای محیط حداکثر بوده بیشترین رونوشت‌برداری ژن HSP90 رخ داده بود (شکل ۳ و جدول ۳). آنالیز تابعیت نیز نتایج مشابهی ارائه داده و نشان داده که با افزایش دما میزان رونوشت‌برداری ژن HSP90 افزایش می‌یابد (شکل ۴). نکته دیگری که در این روند ملاحظه می‌شود این است که سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90 در نیمه دوم روز بیشتر از نیمه اول روز بوده است. شاید این مقادیر بدلیل دمای بالاتر نیمه دوم روز (بعد از ظهر) نسبت به نیمه اول روز (صبح) باشد. همچنین ممکن است به این دلیل باشد که میزان رونوشت‌های ژن HSP90 تا چند ساعت پس از استرس دما در سطح سلول بالا باقی می‌ماند. در این خصوص و در شرایط آزمایشگاهی ملاحظه شده که پس از استرس گرما مقدار رونوشت‌های ژن‌های شوک گرما تا چند ساعت، بالا باقی مانده است (Elekonich 2009). بطور کلی این نتایج نشان می‌دهد که ژن HSP90 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر در تحمل دما در زنبور عسل ایرانی مورد توجه قرار بگیرد.

نتایج آنالیز واریانس که نشان داد بیشترین میزان تردد زنبور عسل در بعد از ظهر بخصوص ساعت ۱۷:۰۰ بوده است این در حالی است که سطح رونوشت‌های اندازه‌گیری شده از ژن HSP90 (شکل ۳) و دما (جدول ۳) در این ساعت متوسط بوده است. علاوه بر این، حداقل تردد زنبور عسل کارگر برای جمع آوری شهد در ساعت ۱۲:۰۰ بوده که همزمان با آن بالاترین درجه حرارت و بیشترین سطح رونوشت‌برداری ژن HSP90 ملاحظه شده است. براساس این نتایج به نظر می‌رسد که بین تردد و بیان نسبی ژن HSP90 رابطه‌ای وجود دارد که برای درک بهتر این رابطه آنالیز تابعیت انجام شد. بهترین مدل برای توصیف این روابط بین تردد زنبور عسل با دما و بیان ژن HSP90 تابع درجه ۳ شد و بطور کلی این تابع نشان داد که در ابتدا، با افزایش بیان ژن HSP90 و دما میزان تردد افزایش یافته و سپس کاهش تردد در اثر افزایش این دو ملاحظه شد (شکل ۵ و ۶). ممکن است افزایش اولیه بیان ژن HSP90 بدلیل افزایش فعالیت زنبور عسل برای جمع آوری نکتار و نقش این پروتئین در فعالیت‌های متنوع سلولی رخ داده باشد (Nadeau et al. 1993; Zou et al. 1998; Isaacs et al. 2002). چرا که ملاحظه شده این پروتئین در مرکز تعدادی از فعالیت‌های سلولی قرار دارد (Zhao and Houry 2007) و فاکتورهای رونویسی را تحریک و در مسیرهای پیام دهی نقش ایفاء می‌کند (Gvozdenov et al. 2019; Wang et al. 2020). با این وجود در ادامه آنالیز تابعیت ملاحظه شد که تمایل زنبور عسل برای تردد با افزایش مقادیر بیشتر دما و بیان ژن HSP90 کاهش یافته است (به ترتیب شکل ۵ و ۶).

همانطور که قبلا هم گفته شد افزایش رونوشت‌برداری از این ژن در پاسخ به افزایش دما و به منظور کنترل استرس دمایی رخ داده بود. با این وجود تاکنون ارتباط بیان این ژن با رفتار چراگری زنبور عسل مطالعه نشده است. با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن HSP90 در اثر استرس دما با کاهش تردد جهت جمع‌آوری شهد در ارتباط باشد. چرا که در مطالعات قبلی گزارش شده که در صورت وجود مقادیر زیاد HSP90، با پروموتور تعدادی ژن متصل شده و سطح رونوشت‌برداری آن‌ها را کاهش داده است (Sangster et al. 2004; Sawarkar et al. 2012). بنابراین ممکن است با افزایش HSP90 در سلول زنبورهای چراگر به پروموتور ژن‌های مرتبط با فعالیت چرا متصل شده و بدین شکل فعالیت چراگری زنبورهای کارگر را کاهش داده است.

نتیجه‌گیری: بطور کلی مطالعه حاضر نشان داد که الگوی تردد زنبور عسل در فصل گلدهی درخت کنار طی روز تابعی از

دما و میزان بیان ژن HSP90 بوده است. افزایش دما در ابتدا با افزایش تردد زنبور عسل جهت جمع‌آوری نکتار همراه بوده است. بهترین دما بین ۳۷ تا ۳۹ درجه سلسیوس بوده که با حداکثر تردد زنبور عسل برای جمع‌آوری نکتار در ارتباط بوده است. اما در دماهای بالاتر به نظر می‌رسد جهت جلوگیری از آسیب‌های سلولی تردد زنبور عسل بسیار کم شده است. بنابراین در اثر استرس دما فعالیت‌های سلول که با تردد در ارتباط هستند کاسته شده و در نتیجه فعالیت جمع‌آوری نکتار توسط زنبور عسل تحت تاثیر قرار گرفته است. بر همین اساس می‌توان پیشنهاد داد که جهت انتخاب مکان مناسب جهت استقرار کلنی‌های زنبور عسل بیشینه دمایی منطقه (حداکثر ۳۹ درجه) مورد توجه قرار گیرد تا ضمن جمع‌آوری حداکثر نکتار کنار، آسیب کمتری به کلنی‌های زنبور عسل وارد شود. علاوه بر این ملاحظه شد که بیان HSP90 تابعی از دما بوده و با رفتار تردد زنبور عسل ارتباطی داشته است. ملاحظه شد که سطوح بالای رونوشت‌برداری از این ژن که در پاسخ به افزایش دما رخ داده با کاهش تردد زنبور عسل همراه است. پیشنهاد می‌شود به منظور شناخت بیشتر این ارتباط، مطالعات تکمیلی در خصوص ارتباط بیان این ژن با ژن‌های مرتبط با فعالیت چراگری زنبور عسل مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری: بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دارند از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه خلیج فارس تشکر را بجا

آورند.

منابع

- 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 رایینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶، ۵۰-۳۵.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸) بیان ژن کالپاستاتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱، ۲۳۵-۲۱۹.

محمودی مریم، آیت اللهی احمد، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۶). بررسی اگزون چهارم ژن کاپاکازین گوسفند کرمانی با تکنیک PCR-RFLP. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۹، ۱۱۹-۱۲۸.

مرمزی سالم، مسعودی علی اکبر، واعظ ترشیزی رسول، پاکدل عباس (۱۳۹۳). تمایز بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلکز (GLUT1) در زمان‌های متفاوت فیزیولوژیکی در غدد پستانی بزهای عدنی ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶، ۱۵۹-۱۷۳.

References

- Aamodt RM (2008) The caste-and age-specific expression signature of honeybee heat shock genes shows an alternative splicing-dependent regulation of Hsp90. *Mech Ageing Dev* 129, 632-637.
- Ali MAM (2011) Comparative study for evaluating two honey bee races, *Apis mellifera jementica* (indigenous race) and *Apis mellifera carnica* (carniolan race) in brood production, population development and foraging activity under the environmental conditions of the central region of the Kingdom of Saudi Arabia. *Ann Agric Sci* 56, 127-134.
- Alqarni AS (2006) Tolerance of summer temperature in imported and indigenous honeybee *Apis mellifera* L. races in central Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* 13, 123-127.
- Alves LHS, Cassino PCR, Prezoto F (2015) Effects of abiotic factors on the foraging activity of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 in inflorescences of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). *Acta Sci Anim Sci* 37, 405-409.
- Bahador Y, Mohammadabadi M, Khezri A et al. (2016) Study of genetic diversity in honey bee populations in kerman province using ISSR markers. *Res Anim Prod* 7, 186-192 (In Persian).
- Beekman M, Sumpter DJT, Seraphides N et al. (2004) Comparing foraging behaviour of small and large honey- bee colonies by decoding waggle dances made by foragers. *Funct Ecol* 18, 829-835.
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA (1994) Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 38, 1-17.
- Blazyte-Cereskiene L, Vaitkeviciene G, Venskutonyte S et al. (2010) Honey bee foraging in spring oilseed rape crops under high ambient temperature conditions. *Zemdirb (Agric)* 97, 61-70.

- Brunt SA, Silver JC (1991) Molecular cloning and characterization of two distinct hsp 85 sequences from the steroid responsive fungus *Achlya ambisexualis*. *Curr Genet* 19, 383–388.
- Corbet SA, Fussell M, Ake R et al. (1993) Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecol Entomol* 18, 17–30.
- Elekovich MM (2009) Extreme thermotolerance and behavioral induction of 70-kDa heat shock proteins and their encoding genes in honey bees. *Cell Stress Chaperones* 14, 219–226.
- Elsik CG, Worley KC, Bennett AK et al. (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics* 15, 86.
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243–282.
- Gregorc A, Bowen ID (1999) In situ localization of heat-shock and histone proteins in honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus* larvae. *Cell Biol Int* 23, 211–218.
- Gvozdenov Z, Bendix LD, Kolhe J et al. (2019) The Hsp90 Molecular Chaperone Regulates the Transcription Factor Network Controlling Chromatin Accessibility. *J Mol Biol* 431, 4993–5003.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *J Sci* 295, 1852–1858.
- Hilario SD, Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert A (2000) Flight activity and colony strength in the stingless bee *Melipona bicolor bicolor* (Apidae, Meliponinae). *Rev Bras Biol* 60, 299–306.
- Human H, Brodschneider R, Dietemann V et al. (2013) Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *J Apic Res* 52, 1–53.
- Isaacs JS, Jung Y-J, Mimnaugh EG et al. (2002) Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem* 277, 29936–29944.
- King AM, MacRae TH (2015) Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annu Rev Entomol* 60, 59–75.
- Koo J, Son T-G, Kim S-Y et al. (2015) Differential responses of *Apis mellifera* heat shock protein genes to heat shock, flower-thinning formulations, and imidacloprid. *J Asia Pac Entomol* 18, 583–589.
- Kregel KC (2002) Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92, 2177–2186.
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631–677.
- Lourenço AP, Mackert A, dos Santos Cristino A et al (2008) Validation of reference genes for

- gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39, 372–385.
- Mahmoodi M, Ayatollahi A, Mohammadabadi MR (2018) Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. *Agric Biotec J* 9, 119–128 (In Persian).
- Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P et al. (2013) Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 52, 1–60.
- Mohammadabadi MR (2019) Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotec J* 11, 219–235 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2017) Role of *Clostridium perfringens* in pathogenicity of some domestic animals. *J Adv Agric* 7, 1117–1121.
- Morammasi S, Masoudi AA, Vaez Torshizi R et al. (2015) Differential Gene Expression of Glucose Transporter 1 (GLUT1) in Different Physiological Times in Mammary Glands of Iranian Adani Goats 6, 159-173 (In Persian).
- Nadeau K, Das A, Walsh CT (1993) Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem* 268, 1479–1487.
- Pernal SF, Currie RW (2001) The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 51, 53–68.
- Polatto LP, Chaud-Netto J, Alves-Junior V V (2014) Influence of abiotic factors and floral resource availability on daily foraging activity of bees. *J Insect Behav* 27, 593–612.
- Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 228, 111–133.
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40, 253–266.
- Rinehart JP, Li A, Yocum GD et al. (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc Natl Acad Sci* 104, 11130–11137.
- Rueppell O, Bachelier C, Fondrk MK et al. (2007) Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Exp Gerontol* 42, 1020–1032.
- Rutherford S, Knapp JR, Csermely P (2007) Hsp90 and developmental networks. In: *Molecular aspects of the stress Response: Chaperones, membranes and networks*. Springer, pp 190–197.
- Sangster TA, Lindquist S, Queitsch C (2004) Under cover: causes, effects and implications of Hsp90 mediated genetic capacitance. *Bioessays* 26, 348–362.
- Sawarkar R, Sievers C, Paro R (2012) Hsp90 globally targets paused RNA polymerase to regulate gene expression in response to environmental stimuli. *Cell* 149, 807–818.

- Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K et al. (2008). Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *J Insect Sci.* 8, 33.
- Severson DW, Erickson EH, Williamson JL et al. (1990) Heat stress induced enhancement of heat shock protein gene activity in the honey bee (*Apis mellifera*). *Experientia* 46, 737–739.
- Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuki H (2007) A comparison of heat shock protein genes from cultured cells of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, in response to heavy metals. *Arch Insect Biochem Physiol Publ Collab with Entomol Soc Am* 65, 210–222.
- Tedeschi JN, Kennington WJ, Berry O et al. (2015). Increased expression of Hsp70 and Hsp90 mRNA as biomarkers of thermal stress in loggerhead turtle embryos (*Caretta caretta*). *J Therm Biol*, 47, 42-50.
- Tohidinejad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK et al. (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35–50 (In Persian).
- Wang MN, Liu LX, Deng YT et al. (2020) Regulatory mechanism of heat shock protein 90 on autophagy-related transcription factor EB in human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Physiol Sin* 72, 157–166.
- Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA et al. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.
- Xu H-J, Xue J, Lu B et al. (2015) Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature* 519, 464.
- Xu PJ, Xiao JH, Xia QY et al. (2010) *Apis mellifera* has two isoforms of cytoplasmic HSP90. *Insect Mol Biol* 19, 593–597.
- Zhao R, Houry WA (2007) Molecular interaction network of the Hsp90 chaperone system. *Adv Exp Med Biol* 594, 27–36.
- Zou J, Guo Y, Guettouche T et al. (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471–480.