

Evaluating the possibility of horizontal transfer of small RNAs from Sidr pollen to honey bee and their interaction in the host cell

Leila Gharehdaghi 

*Corresponding author. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail address: l.gharedaghi@znu.ac.ir

Taher Harkinezhad 

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail address: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir

Gholamhosein Tahmasbi 

Professor, Department of Honey bee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email address: tahmasbigholamhosein@gmail.com

Abstract

Objective

The existence of molecular relationship between different organisms through diet-derived plant miRNAs is one of the most challenging debates of the last decade. Considering the mutual relationship between plants and pollinating insects, including honey bee as the most important pollinating insect, the aim of the present study is to investigate the existence of molecular relationship in the interaction between plants and honey bee through plant-derived xenomiRs can be very important and create a new perspective of the beneficial effects of this relationship.

Materials and methods

Pollen was collected by pollen trap device from honey bee colonies that were located near Sidr trees. Honey bees were fed under controlled conditions in two groups (fed by Sidr pollen as treatment and fed by sugar syrup as control). Following the feeding experiments, the bees were anesthetized using cold and their midgut tissue was collected and used for RNA extraction. After the Small RNA sequencing of the samples, the identification of pollen miRNAs and their tracking in the bee body was done using different bioinformatics analysis. Finally, the target genes of the

detected plant miRNAs in the bee body and the molecular pathway involved by them were determined.

Results

The results of bioinformatics analysis indicate the detection of eleven plant miRNAs including miR-148a, miR-26a, miR-21-5p, miR-143, miR-27a, miR-203, let-7g, miR-126, miR-206, miR-30d and miR-199b into the tissue of honey bees fed by Sidr pollen. miRNAs participate in various biological processes through their target genes. In the present study, 99 target genes for the detected plant miRNAs were predicted in honey bee genome. The result of KEGG pathway analysis showed that target genes are significantly involved in 23 different biological pathways.

Conclusions

The result of the current study clearly present the role of plant-derived xenomiRs in the regulation of honey bee gene expression. Therefore on one hand, these findings extend our understanding of the molecular interaction between honey bees and flowering plants, and on the other hand, it can be used as a practical road map for breeding studies in order to improve honey production and deal with diseases related to bees, as the most important pollinating insects in the 21st century's agriculture.

Keywords: Honey Bee, Plant-derived xenomiRs, Sidr pollen

Paper Type: Research Paper.

Citation: Gharehdaghi L, Harkinezhad T, Tahmasbi G (2023) Evaluating the possibility of horizontal transfer of small RNAs from Sidr pollen to honey bee and their interaction in the host cell. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 157-180.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 157-180 DOI: 10.22103/jab.2023.20767.1450

Received: March 11, 2023.

Received in revised form: May 12, 2023.

Accepted: May 13, 2023.


Published online: June 10, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




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

ارزیابی امکان انتقال افقی RNA کوچک از گرده کنار (سدر) به زنبور عسل و برهمکنش آن‌ها در سلول میزبان


لیلا قره‌داغی 

*نویسنده مسئول: دانش‌آموخته‌ی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان،

ایران، رایانامه: l.gharedaghi@znu.ac.ir

طاهر هرکی‌نژاد 

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، رایانامه: taher.harkinezhad@znu.ac.ir

غلامحسین طهماسبی 

استاد، گروه زنبور عسل، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، رایانامه:

tahmasbigholamhosein@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳

چکیده

هدف: وجود رابطه مولکولی بین موجودات زنده مختلف از طریق انتقال غذایی miRNAها یکی از چالش برانگیزترین بحث‌های دهه اخیر می‌باشد. با توجه به رابطه مستحکم و اجتناب ناپذیر گیاهان و حشرات گرده‌افشان از جمله زنبور عسل بعنوان مهمترین حشره گرده‌افشان، هدف مطالعه حاضر که بررسی امکان انتقال غذایی miRNAهای گرده کنار به بدن زنبور عسل و نقش تنظیمی احتمالی آن‌ها در سلول میزبان می‌باشد، از اهمیت بسزایی برخوردار بوده و می‌تواند چشم انداز جدیدی از اثرات سودمند این رابطه را ایجاد کند.

مواد و روش‌ها: گرده توسط تله گرده از کندوهای زنبور عسل واقع در نزدیکی درختان کنار جمع‌آوری و از آن برای تغذیه زنبوران عسل تحت شرایط کنترل شده در دو گروه (گروه تغذیه شده با گرده کنار به عنوان تیمار و گروه تغذیه شده با شربت شکر به عنوان کنترل) استفاده گردید. در ادامه زنبوران با استفاده از سرما بیهوش شدند و بافت روده میانی آن‌ها جمع‌آوری و برای استخراج RNA استفاده شد. بعد از توالی‌یابی Small RNA-Seq، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، miRNAهای گرده کنار شناسایی و سپس ردیابی آن‌ها در زنبورهای گروه‌های مختلف تغذیه شده انجام گرفت. در گام بعد، ژن‌های هدف miRNAهای گیاهی ردیابی شده در بدن زنبور عسل و مسیرهای درگیر شده توسط آن‌ها نیز مشخص شد.

نتایج: نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی حاکی از ردیابی یازده miRNA گیاهی شامل: miR-21-5p, miR-26a, miR-148a, miR-143, miR-27a, miR-203, let-7g, miR-126, miR-30d, miR-206, miR-199b و miR-199b در زنبوران عسل تغذیه شده با گرده کنار بود. با توجه به اینکه miRNAها از طریق ژنهای هدفشان در فرآیندهای بیولوژیکی مختلفی نقش ایفا می کنند، در مطالعه حاضر ۹۹ ژن هدف برای miRNAهای گیاهی ردیابی شده در بدن زنبور عسل یافت شد. نتایج آنالیز مسیر نشان داد که ژنهای هدف به طور معنی داری در ۲۳ مسیر مختلف بیولوژیکی در زنبور عسل نقش دارند.

نتیجه گیری: نتایج پژوهش حاضر به طور واضح نقش miRNAهای غذایی با منشأ گیاهی در تنظیم بیان ژن زنبور عسل را ارائه می دهد. لذا این یافته ها از یک سو درک نظری ما را از فعل و انفعالات مولکولی صورت گرفته بین زنبور عسل و گیاهان گلدار افزایش می دهد و از سوی دیگر می تواند به صورت عملی به عنوان یک نقشه ی راه جهت مطالعات اصلاح نژادی به منظور بهبود تولید عسل و مقابله با بیماری های مرتبط با زنبور عسل، به عنوان مهمترین - شره گرده افشان در کشاورزی قرن بیست و یکم، عمل نماید.

کلیدواژه ها: انتقال غذایی miRNAهای گیاهی، زنبور عسل، گرده کنار

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قره داغی لیلا، هرکی نژاد طاهر، طهماسبی غلامحسین (۱۴۰۲) ارزیابی امکان انتقال افقی RNA کوچک از گرده کنار (سدر) به زنبور عسل و برهمکنش آن ها در سلول میزبان. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۱۵۷-۱۸۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

زنبور عسل افزون بر تولید محصولات گوناگون مهمترین نقش خود را در طبیعت با دخالت در عمل گرده افشانی و افزایش تولید محصولات کشاورزی و احیای محیط زیست ایفا می کند (Bahador et al. 2016)، به طوری که تقریباً یک سوم تولید منابع غذایی بشر مستقیم یا غیر مستقیم به گرده افشانی حشرات (زنبور عسل در رأس آنها) بستگی دارد (Morse and Calderone 2000). همچنین بررسی ها نشان می دهد که در کشورهای مختلف، نقش زنبور عسل در افزایش تولیدات کشاورزی ۶۹ تا ۱۴۳ برابر تولیدات مستقیم آن می باشد (Tahmasbi and Porgharaei 2000). به علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم های مولکولی در زمره مهمترین فرآیندهای ژنتیکی (مشمول بر همانند

سازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم بیان ژن‌ها) هستند (Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی^۱ 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 (Arabpour et al. 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Solflaei 2020). فرضیه تنظیم بیان ژن بین فرمانروهای مختلف^۲ از طریق RNAهای کوچک^۳ خوراکی که اخیراً توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است، می‌تواند در رابطه متقابل گیاهان و حشرات گرده‌افشان نقش مؤثری ایفا نماید. بدین ترتیب گیاهان می‌توانند بیان ژن حشرات گرده‌افشان را از طریق انتقال RNAهای کوچک کنترل نمایند. زنبور عسل یکی از مهمترین حشرات گرده‌افشان می‌باشد که می‌تواند مدل بهینه‌ای در زمینه انتقال غذایی RNAهای کوچک در تعامل بین گیاه و این حشره باشد (Waster and Ollerton 2006). miRNAها، گروهی از RNAهای کوچک غیر کد کننده با طول تقریبی ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که به عنوان تنظیم کننده‌های بیان ژن بعد از رونویسی، در گستره وسیعی از حیوانات، گیاهان و ویروس‌ها عمل می‌کنند. این مولکول‌های کوچک نقش حیاتی در فرآیندهای مهم بیولوژیکی مرتبط با رشد و تمایز سلولی، تکثیر سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول^۴ و پاسخ ایمنی و ... ایفا می‌کنند (Rusek et al. 2015). مطالعات روز افزون نشان می‌دهد miRNAهای گیاهی به دلیل ساختار منحصر بفرد خود از طریق چندین مسیر برون زاده^۵ درون سلولی و انتقال بین سلولی از طریق اجسام P^۶ (اجسام سیتوپلاسمی^۷)، اجسام چندگانه وزیکولی^۸ و اندوزوم‌ها^۹، می‌توانند به پستانداران منتقل شوند (Cocucci et al. 2009). احتمالاً miRNAهای غذایی منتقل شده با منشأ گیاهی قادر باشند اهداف مکمل خود را در موجود میزبان پیدا کرده و فرآیندهای رونویسی یا پس از رونویسی را در آن‌ها تعدیل کنند. تا به امروز، انتقال RNAهای کوچک حاصل از رژیم غذایی در بین گونه‌های مختلف در مهره‌داران (Zhang et al. 2012) و بی‌مهرگان (Ivashuta et al. 2015; Wang et al. 2018) گزارش شده است. مطالعات در شاخه بندپایان نیز، حاکی از انتقال موفقیت آمیز RNAهای کوچک از طریق غذا به بدن شماری از حشرات بوده که منجر به تنظیم بیان ژن‌ها و نهایتاً تغییر شکل فنوتیپی حشره می‌شود (Li et al. 2011; Ashby et al. 2016). در همین راستا، در مطالعه‌ای گزارش شد که miRNAهای گیاهی موجود در غذای لارو زنبور عسل با تنظیم بیان ژن آن، سرنوشت لارو را

^۱ DNA

^۲ Cross-Kingdom

^۳ Small Rna

^۴ Apoptosis

^۵ Exogenous

^۶ P Bodies

^۷ Cytoplasmic Bodies

^۸ Multi Vesicular Bodies (Mvbs)

^۹ Endosomes

به سمت زنبور ملکه یا زنبور کارگر تعیین می‌کنند (Zhu et al. 2017). این یافته‌ها به طور واضح نقش miRNAهای گیاهی موجود در غذا را در تنظیم بیان ژن م صرف کننده و وجود یک رابطه مولکولی بین گونه‌های مختلف را تأیید می‌کند. فر ضیه انتقال افقی miRNAها، به عنوان یک مبادله یا ادغام پایدار ماده ژنتیکی درون یک نسل بین سوبه‌ها یا گونه‌های متفاوت، و فعالیت‌های تنظیمی آن در موجود مصرف کننده، یکی از چالش برانگیزترین بحث‌های دهه اخیر می‌باشد. اما تا کنون مطالعات محدودی در زمینه انتقال غذایی miRNAهای گیاهی به زنبور عسل به عنوان مهمترین حشره گرده افشان انجام شده است. بنابراین هدف مطالعه حاضر که در درجه اول بررسی انتقال غذایی miRNAهای گیاهی به بدن زنبور عسل، سپس شناسایی ژن‌های هدف آنها در موجود میزبان و در نهایت بررسی عملکرد ژن‌ها و مسیرهای مولکولی مرتبط با آنها بوده حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایشات مزرعه‌ای، جمع‌آوری گرده کنار (سدر): برای تهیه‌ی گرده کنار، بعد از اطمینان از سالم بودن کندوهای زنبور عسل از هر گونه بیماری باکتریایی، قارچی و ویروسی، همزمان با گلدهی این درخت در مهر ماه ۱۳۹۷، تعدادی کندو به منطقه‌ای دارای درختان کنار در نزدیکی شهر ستان جیرفت، استان کرمان منتقل شدند. در روزهای اوج گلدهی کنار، تله گرده در ورودی کندوها نصب و گرده به محض افتادن در تله گرده جمع‌آوری و به تانک ازت منتقل شد.

جمع‌آوری و تغذیه‌ی زنبور عسل تحت شرایط کنترل شده: آزمایشات تغذیه‌ای زنبور عسل در زنبورستان مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع در کرج انجام گرفت، برای این منظور از قفس‌هایی دارای ابعاد خارجی ۱۵×۱۱×۱۵ سانتی‌متر که به جز قسمت جلویی بقیه‌ی قسمت‌های آن از چوب ساخته شده بود استفاده شد. قسمت جلویی قفس‌ها از صفحه هشت مشی (عرض سلول‌های صفحه ۱/۵ میلی‌متر) در ست شده بود و به منظور گذاشتن زنبورهای جمع‌آوری شده در داخل قفس، یکی از طرفین آن حالت کشویی داشت و همچنین قطعه‌ای از شان خالی برای استراحت زنبورها در داخل قفس تعبیه شده بود. به منظور تغذیه زنبورهای داخل قفس، دو سوراخ در قسمت بالایی قفس‌ها برای گذاشتن تیوپ تغذیه و آب تعبیه شده بود. برای جمع‌آوری زنبورهای پرستار، زنبورهایی که روی قاب‌های لارو جوان در حال تغذیه‌ی لاروها بودند جمع‌آوری و به قفس‌های آزمایشی منتقل گردید. جهت انجام آزمایشات تغذیه‌ای قفس‌های حاوی زنبورهای پرستار در طبقه بالای کندو قرار داده شد تا شرایط طبیعی کندو (فرمون ملکه، دما و رطوبت) در حین آزمایش فراهم باشد. از چهار عدد کندو برای جمع‌آوری زنبور پرستار و تغذیه تحت شرایط کنترل شده استفاده شد بدین ترتیب حدود صد عدد زنبور جوان از هر کدام از کندوها به داخل قفس‌ها منتقل شد. دو عدد از قفس‌ها بعنوان شاهد و دو قفس بعنوان تیمار تغذیه شده با گرده کنار در نظر گرفته شد. تیمارها به مدت ۴۸ ساعت با شربت شکر تغذیه شده، بعد از آن برای تشویق تغذیه بعدی حدود ۳ ساعت زنبورها گرسنه نگه داشته شدند. در ۲۴ ساعت بعدی تیمار شاهد با شربت شکر و تیمار بعدی با محلول ۳۰ درصد شکر و ۷۰ درصد گرده کنار تغذیه شدند. بعد از اتمام آزمایشات تغذیه‌ای، با استفاده از سرما

زنبورهای تغذیه شده بیهوش شدند و از بافت شکمی زنبورها، قسمت روده میانی^{۱۰} برداشته شد، و تمامی نمونه‌ها در داخل محلول تریزول هموژنیزه شد و برای آنالیزهای بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه ذخیره شدند.

استخراج RNA وتوالی‌یابی Small RNA: استخراج RNA کل از گرده کنار و بافت روده میانی زنبور عسل با استفاده از کیت miRNeasy mini Kit (شرکت کیازن^{۱۱}) و طبق دستورالعمل انجام شد. بررسی تخریب و آلودگی RNA بر روی ژل آگارز یک درصد انجام گرفت و خلوص RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانومتر (NanoPhotometer®) (spectrophotometer (IMPLEN, CA, USA) صورت گرفت. غلظت RNA با استفاده از کیت Qubit® RNA با استفاده از کیت Assay Kit in Qubit® 2.0 Flurometer (Life Technologies, CA, USA) و یکپارچگی^{۱۲} RNA با استفاده از کیت RNA Nano 600 Assay of the Agilent Bioanalyzer 2100 system انجام شد (Agilent Technologies). توالی‌یابی توسط شرکت Novogene بیجینگ چین (<https://en.novogene.com/>) با استفاده از Illumina Hiseq 2500 انجام گرفت. بدین ترتیب حدود ۳ میکروگرم از RNA کل برای تهیه کتابخانه استفاده شد. کتابخانه‌های cDNA با استفاده از NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (NEB, USA) ایجاد شد و خوشه بندی نمونه‌های کدگذاری شده شاخص بر روی سیستم ایجاد cBot cluster با استفاده از TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina) طبق دستورات شرکت سازنده ایجاد شد. بعد از ایجاد کلاستر، کتابخانه آماده‌سازی شده بر روی پلت فرم ایلومینا Hiseq 2500 و خوانش‌های ۵۰ جفت باز single-end توالی‌یابی شدند.

شناسایی miRNAها: توالی‌های خوانده شده توسط دستگاه توالی‌یابی، توالی‌های خام^{۱۳} نامیده می‌شوند. به طور کلی، دو نوع خوانش اضافی باید از داده‌های خام miRNAseq حذف شوند: آداپتورهای تعیین توالی و خوانش‌های با پیچیدگی پایین^{۱۴} (Martin and Wang 2011). برای کنترل کیفیت داده‌ها در مطالعه‌ی حاضر از نرم افزار FASTQC استفاده شد (Schmiedder and Edwards 2011)، سپس از نرم افزار Trimmomatic برای پیرایش داده‌ها، حذف بازهای با کیفیت پایین و حذف توالی‌های سازگار شده (آداپتوری) استفاده شد (Bolger et al. 2014). به طور خلاصه، داده‌های پاک بعد از حذف توالی‌های آداپتورها، توالی Poly-N، توالی‌های با کیفیت پایین و خوانش‌هایی با طول نوکلئوتیدی کمتر از ۱۶ و بیشتر از ۳۰ نوکلئوتید به دست آمد. در مرحله بعد حا شیه نویسی^{۱۵} داده‌های پاک با استفاده از نرم‌افزار یونیتاس^{۱۶} به منظور شناسایی و حذف

^{۱۰} Midgut

^{۱۱} (Qiagen, Valencia, Ca, Usa)

^{۱۲} Rna Integrity

^{۱۳} Raw Reads

^{۱۴} Law-Complexity Reads

^{۱۵} Annotation

^{۱۶} Unitas

سایر RNAهای کوچک به غیر از miRNA ها از داده‌های مورد آزمایش انجام گرفت. حاشیه‌نویسی داده‌های گرده کنار و تیمارهای زنبور عسل (گروه کنترل و گروه تغذیه شده با گرده کنار) هر کدام با دو تکرار بیولوژیکی به طور جداگانه انجام گرفت (Anders and Huber 2012). با توجه به اینکه ژنوم کنار با نام علمی *Ziziphus spina Christi* هنوز توالی‌یابی نشده است، از اطلاعات نزدیکترین گونه به کنار (گونه هلو با نام علمی *Prunus Persica*) برای حاشیه‌نویسی RNAهای کوچک گرده کنار استفاده گردید. بعد از حاشیه‌نویسی داده‌های RNAهای کوچک گرده کنار از خروجی نرم افزار برای هر مجموعه داده‌ی ورودی، مجموع خوانش‌های مربوط به miRNAهای شناخته شده در گونه مورد نظر که در داده مورد آزمایش موجود هست، miRNAهای حفاظت شده^{۱۷} که در سایر گیاهان به غیر از گونه مورد نظر شناسایی و ثبت شده و miRNAهای شناسایی نشده که در واقع miRNAهای جدید می‌باشد برداشته شده و برای آنالیز بعدی باهم ادغام شدند. در مرحله بعد، توالی‌های فیلتر شده‌ی پاک برای پیش‌بینی miRNAهای محافظت شده در گرده کنار با توالی‌های miRNAهای گیاهی بالغ موجود در پایگاه داده miRBase نسخه ۲۲ (<http://www.mirbase.org>) با استفاده از ابزار هم‌ردیفی Bowtie (v1.1.2) با یک عدم تطابق^{۱۸} هم‌ردیف شدند. توالی‌های هم‌ردیف نشده با miRNAهای گیاهی پایگاه داده miRBase برای پیش‌بینی miRNAهای جدید در کنار با استفاده از نرم‌افزار miRnovo (Vitsios et al. 2017) که بر اساس یادگیری ماشینی بوده و قادر به پیش‌بینی miRNAهای شناخته شده و جدید مستقیماً از داده‌ی توالی‌یابی شده RNA کوچک با یا بدون ژنوم مرجع می‌باشد استفاده شد.

ردیابی miRNAهای گرده کنار در بدن زنبور عسل تغذیه شده با آن: پس از حاشیه‌نویسی داده‌های RNAهای کوچک تیمارهای مختلف زنبور عسل، برای حذف miRNAهای شناخته شده و حفاظت شده در زنبور عسل، داده‌های تیمارهای زنبور عسل با miRNAهای شناخته شده حشرات که از پایگاه miRBase (<http://www.mirbase.org/Release> 22) دریافت شدند با استفاده از ابزار هم‌ردیفی Bowtie (V1.1.2) و حداکثر یک عدم تطابق هم‌ردیف گردیدند. برای حذف miRNAهای جدید زنبور عسل، خوانش‌های منطبق نشده با miRNA حشرات با ژنوم زنبور عسل (accession number: GCA_000002195.1) هم‌ردیف شدند. در مرحله آخر برای ردیابی miRNAهای گرده کنار در روده میانی زنبور عسل تغذیه شده با آن، توالی‌های هم‌ردیف نشده با ژنوم زنبور عسل با miRNAهای شناسایی شده گرده کنار در مطالعه حاضر هم‌ردیف شدند.

پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNAهای گیاهی منتقل شده به بدن زنبور عسل: برای پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNAها، بخش 3'UTR^{۱۹} ژن‌های گزارش شده‌ی زنبور عسل و برای ژن‌هایی که 3'UTR^{۱۹} پیش‌بینی شده ندارند ۵۰۰

^{۱۷} Conserved Mirnas

^{۱۸} Mismatch

^{۱۹} Un-Translated Region

جفت باز پایین دستی کدون توقف، انتخاب شد (Ashby et al. 2016). در مطالعه‌ی حاضر برای حداقل کردن اثر مثبت کاذب، سه نرم افزار پیش‌بینی ژن‌های هدف شامل: PITA (Kertesz et al. 2007)، Miranda (Enright et al. 2003) و RNAHybrid (Rehmsmeier et al. 2004) با حداکثر انرژی آزاد 15 kcal/mol- به کار گرفته شد. ژن‌هایی که توسط حداقل دو مورد از نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده تأیید شدند به عنوان ژن هدف نهایی در نظر گرفته شد.

آنالیز GO^{۲۰} و KEGG^{۲۱}: آنالیز هستی شناسی ژن بر پایه‌ی نتایج حاشیه‌نویسی Nr و BLASTx با استفاده از نرم افزار Blast2GO (<http://www.blast2go.com>) انجام گرفت و آنالیز KEGG توسط KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn>) صورت گرفت. علاوه بر آن P-value تصحیح شده^{۲۲} > ۰/۱ به عنوان آستانه معنی‌داری در نظر گرفته شد (Du et al. 2016).

نتایج و بحث

شناسایی miRNAهای گرده کنار: دو نمونه گرده کنار توسط شرکت Novogene (بیجینگ^{۲۳}، چین) با استفاده از Illumina Hiseq 2500 با موفقیت توالی‌یابی شد. خوانش‌ها به صورت single-end بوده و طول آن‌ها ۵۰ جفت باز بود. در مجموع ۳۱۲۴۱۵۱ (نمونه اول گرده کنار) و ۱۷۸۲۱۳۳ (نمونه دوم گرده کنار) خوانش خام ایجاد شد که بعد از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، خوانش‌های آلوده، آداپتورهای 3' و 5'، توالی‌های Poly-A و خوانش‌های کمتر از ۱۶ و بیشتر از ۳۰ نوکلئوتید نهایتاً ۳۰۷۴۲۶۵ و ۱۷۳۴۷۲۱ خوانش پاک در نمونه‌های اول و دوم بدست آمد. در مرحله‌ی بعد، به منظور شناسایی و حذف سایر RNAهای کوچک به غیر از miRNAها از داده‌های مورد آزمایش، حاشیه‌نویسی داده‌های RNA کوچک با استفاده از نرم افزار یونیتاس انجام گرفت. شکل ۱ نتایج حاشیه‌نویسی RNAهای کوچک در دو نمونه گرده کنار با استفاده از اطلاعات گونه هلو را نشان می‌دهد حدود ۱۹/۹ و ۲۴/۲ درصد داده‌ها مربوط به miRNAهای شناخته شده در داده‌های مورد آزمایش می‌باشد. ۴۸/۳ و ۵۲/۹ درصد داده‌ها در نمونه‌های A و B مربوط به miRNAهای ناشناخته بودند که با عنوان miRNA جدید یاد می‌شود. همانطور در شکل مشاهده می‌شود توزیع فراوانی همه‌ی RNAهای کوچک اعم از miRNAها و سایر RNAهای کوچک در دو نمونه یکسان می‌باشد که بیشترین فراوانی در هر دو نمونه مربوط به miRNAهای جدید می‌باشد. بعد از حاشیه‌نویسی، خوانش‌های مربوط به miRNAها

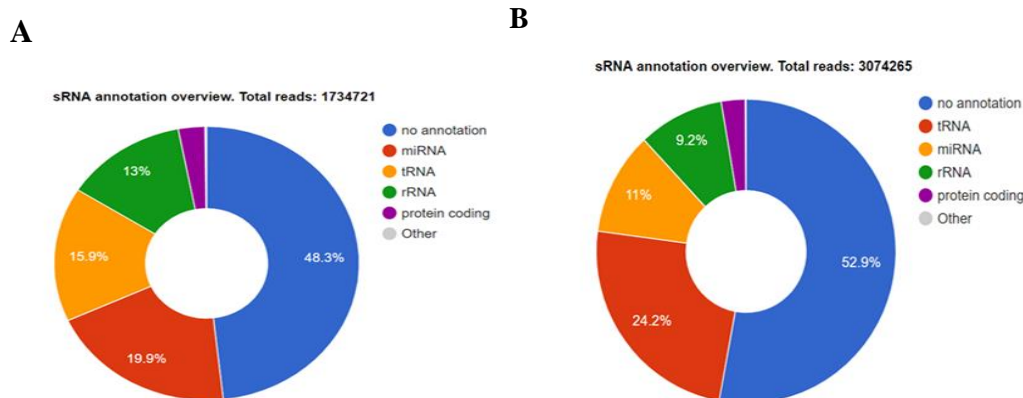
^{۲۰} Gene Ontology

^{۲۱} Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes

^{۲۲} Corrected P-Value

^{۲۳} Beijing

(شامل miRNAهای شناسایی شده در گونه مورد نظر، miRNAهای حفاظت شده که در سایر گیاهان شناسایی شدند و خوانش-های شناسایی نشده^{۲۴} که مرتبط با miRNAهای جدید می باشد) با هم ادغام شده و با miRNAهای گیاهی استخراج شده از پایگاه داده miRBase همردیف می شوند نتایج حاصل منجر به شناسایی ۴۲۳ و ۷۷۳ miRNA حفاظت شده، می باشد (جدول ۱). برای افزایش صحت آنالیز، miRNAهای مشترک در دو نمونه برای آنالیز بعدی در نظر گرفته شد.



شکل ۱. مروری بر حاشیه نویسی داده های RNA کوچک در دو نمونه گرده کنار با استفاده از ژنوم گونه هلو

Figure 1. A review of small RNA annotation in two samples of sidr pollen using of *Prunus Persica* genome

جدول ۱. ویژگی های آماری داده های RNA کوچک در نمونه های گرده کنار

Table 1. Statistics of small RNA sequences in Sidr pollen samples

| Types | انواع | نمونه اول گرده کنار | نمونه دوم گرده کنار |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | The first sample of sidr pollen | The second sample of sidr pollen |
| Raw reads | خوانش خام | 3124151 | 1782133 |
| Clean reads | خوانش پاک | 3074265 | 1734721 |
| The reads related to rRNAs | خوانش های مرتبط با rRNA | 283842 | 225353 |
| The reads related to tRNAs | خوانش های مرتبط با tRNAs | 745454 | 275339 |
| The reads related to snRNA | خوانش های مرتبط با snRNA | 1297 | 735 |
| The reads related to snoRNA | خوانش های مرتبط با snoRNA | 227 | 224 |
| Law Complexity reads | خوانش هایی با پیچیدگی پایین | 1526 | 2301 |
| The reads related to miRNAs | خوانش های مرتبط با miRNAs | 336919 | 344950 |

^{۲۴} No Annotation

| | | | |
|---|--|---------|--------|
| Contaminated reads | خوانش‌های آلوده | 61 | 90 |
| No annotation reads | خوانش‌های حاشیه نویسی نشده | 1625588 | 837068 |
| | خوانش‌های منطبق شده با miRNAهای شناخته شده گیاهی | 47478 | 67393 |
| Aligned reads against known mature plant miRNAs | | | |
| Known miRNAs | miRNAهای شناخته شده | 423 | 773 |

خوانش‌هایی که با miRNAهای گیاهی دریافت شده از پایگاه داده miRBase منطبق نشدند برای پیش‌بینی miRNA جدید در گرده کنار با استفاده از نرم‌افزار miRNovo که قادر به پیش‌بینی miRNAها مستقیماً از داده‌های RNAهای کوچک حتی بدون استفاده از ژنوم می‌باشد به کار رفت که منجر به شناسایی نه miRNA جدید در گرده کنار شد که توالی‌های مربوط به miRNAهای پیش‌بینی شده و ویژگی‌های عمق پوشش هر یک از miRNAها در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. شناسایی miRNAهای جدید در گرده کنار

Table 2. Identification of novel miRNAs in Sidr pollen

| ویژگی‌های پوشش دهی miRNAهای جدید | توالی miRNAها |
|----------------------------------|---------------------------|
| Novel miRNAs coverage features | miRNAs sequence |
| >#cluster_17_x53988 | TAGGTTCTTTTGTGCGTTGGGGCTT |
| >#cluster_2510_x274 | TGGATCTTGTGTTGACAGCACT |
| >#cluster_2454_x240 | TTCCACAGCTTTCTTGAAC |
| >#cluster_1923_x99 | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT |
| >#cluster_2401_x84 | TTAGTGATCCGCTGGAATATC |
| >#cluster_1758_x54 | TTAGATTCACGCACAAACTC |
| #cluster_3669_x679 | TGGAATGTAAGAAGTATGGAG |
| >#cluster_4755_x174 | TCGATAAACCTCTGCATCCAG |
| >#cluster_3240_x125 | TTGACTAGAGAACGCGTTTTT |

نتایج حاصل از توالی‌یابی تیمارهای زنبورعسل: در مجموع ۲۲۳۷۹۵۵ (نمونه اول تیمار تغذیه شده با گرده کنار)، ۲۲۳۸۲۰۰ (نمونه دوم تیمار تغذیه شده با گرده کنار)، ۲۶۶۰۲۶۰ (کنترل اول) و ۴۲۵۱۵۰۵ (کنترل دوم) خوانش خام در توالی‌یابی با توان بالا توسط پلت‌فرم ایلومینا HiSeq 2500 در تیمار تغذیه شده با گرده کنار و تیمار تغذیه شده با شربت شکر به عنوان کنترل هر کدام با دو تکرار بیولوژیکی ایجاد شد. بعد از پیرایش داده‌ها به ترتیب ۲۰۷۷۸۰۸ (تکرار اول تیمار)، ۲۱۷۲۲۸۵ (تکرار دوم تیمار)، ۲۵۵۸۹۱۶ (تکرار اول کنترل) و ۴۰۹۳۲۴۴ (تکرار دوم کنترل) خوانش پاک بدست آمد. برای ردیابی miRNAهای گیاهی

در بافت بدن زنبور عسل بعد از حاشیه‌نویسی داده‌های پاک به منظور حذف سایر RNAهای کوچک، باید مرحله به مرحله تمام توالی‌های دیگر به غیر از miRNAهای گیاهی از داده مورد آزمایش حذف می‌شدند. miRNAهای شناخته شده و محافظت شده حشرات (موجود در پایگاه داده miRBase) و miRNAهای جدید در زنبور عسل دو گروه از خوانش‌هایی بودند که بر اساس سلسله مراتب ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها از داده‌ها حذف شدند. بعد از انجام مراحل ذکر شده، در کل ۷۷۲۸۲۳ (تکرار اول تیمار)، ۵۹۷۴۸۹ (تکرار دوم تیمار)، ۳۹۰۸۰۰ (تکرار اول کنترل) و ۴۶۶۸۰۸ (تکرار دوم کنترل) خوانش برای هم‌ردیفی با miRNAهای گرده کنار بدست آمد. در اثر هم‌ردیفی خوانش‌های مربوط به تیمار تغذیه شده با گرده کنار و تیمار کنترل زنبور عسل با miRNAهای شناسایی شده در گرده کنار در مطالعه حاضر (432 miRNAs) ۵۶۷۰، ۴۱۰۰، ۴۵ و ۶۰ خوانش به ترتیب در تکرار اول و دوم تیمار تغذیه شده با گرده کنار و تیمار کنترل هم‌ردیف شدند که منجر به ردیابی ۱۵ و ۱۱ miRNA در دو تکرار بیولوژیکی مربوط به تیمار تغذیه شده با گرده کنار شد و در گروه کنترل miRNA مشترک ردیابی نشد (جدول ۳). برای افزایش صحت آنالیز، miRNAهای مشترک ردیابی شده در دو تکرار به عنوان miRNA نهایی در نظر گرفته شد که یازده miRNA تکرار دوم در تکرار اول نیز موجود بود. miRNAهای مشترک ردیابی شده در دو نمونه تیمار تغذیه شده با گرده کنار شامل: miR-203، miR-30d، miR-126، let-7g، miR-27a، miR-143، miR-21-5p، miR-26a، miR-148a، miR-206 و miR-199b-3p بودند.

پیش‌بینی ژن‌های هدف: miRNAها در فرآیندهای بیولوژیکی مختلفی از طریق ژن‌های هدفشان شرکت می‌کنند. برای روشن ساختن عملکرد miRNAها از سه نرم‌افزار بیولوژیکی miRanda، RNAhybrid و PITA برای پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNAهای گیاهی منتقل شده به بدن زنبور عسل به کار گرفته شد. ژن‌های هدفی که به وسیله حداقل دو نرم افزار از سه نرم افزار پیش‌بینی کننده تأیید شدند برای مرحله بعدی آنالیز انتخاب شدند. ژن‌های هدفی برای miR-148a و miR-21-5p که توسط دو نرم افزار تأیید شده باشد یافت نشد. برای نه miRNA دیگر ۹۹ ژن هدف پیش‌بینی شد. به طور خلاصه: miR-203 تنها یک ژن هدف داشت. برای let-7g، miR-143، miR-199b، miR-126، miR-27a، miR-26 و miR-30d به ترتیب ۱۱، ۸، ۷، ۷، ۶، ۴ و ۲ ژن هدف پیش‌بینی شد و بیشترین تعداد ژن هدف پیش‌بینی شده مرتبط با miR-206 بود که ۵۳ ژن را تأثیر قرار می‌دهد. جدول ۴ خلاصه‌ای از آنالیز هستی‌شناسی ژن برای هشت miRNA گیاهی ردیابی شده در بدن زنبور عسل را نشان می‌دهد با توجه به اینکه miR-203 تنها یک ژن هدف دارد بنابراین در جدول GO آورده نشده است. همانطور که مشاهده می‌شود به غیر از miR-30d که همه ژن‌های هدف آن در ژنوم مرجع حاشیه‌نویسی شده بودند، تعداد ژن‌های هدف حاشیه‌نویسی شده در سایر miRNAها کمتر از تعداد ژن‌های پیش‌بینی شده بودند. بنابراین درک ما از عملکرد واقعی آن

ژن‌ها محدود می‌شود. آنالیز هستی‌شناسی نشان می‌دهد که ژن‌های هدف در سه دسته^{۲۵} اصلی: فرآیندهای بیولوژیکی^{۲۶}، عملکرد مولکولی^{۲۷} و اجزای سلولی^{۲۸} طبقه‌بندی می‌شوند. به غیر از miR-30d که ژن‌های هدف آن در دسته اجزای سلولی درگیر نیستند مابقی ژن‌های هدف در هر سه دسته حضور دارند.

جدول ۳. ویژگی‌های آماری داده‌های small RNA در زنبورهای عسل تغذیه شده با گرده کنار(تیمار) و زنبورهای تغذیه شده با شربت شکر بعنوان گروه کنترل برای ردیابی miRNAهای گیاهی

Table 3. Statistics of small RNA sequences in sidr pollen-treated and sugar syrup-treated (control) honey bees for detection of plant miRNAs

| انواع | تکرار اول | تکرار دوم | تکرار اول | تکرار دوم |
|---|-----------|-----------|--------------|--------------|
| Types | کنترل | کنترل | تیمار | تیمار |
| | 1 Control | 2 Control | *Treatment 1 | *Treatment 2 |
| Raw reads خوانش خام | 2660260 | 4251505 | 2237955 | 2238200 |
| Clean reads خوانش پاک | 2558916 | 4093244 | 2077808 | 2172285 |
| Reads related to rRNA خوانش‌های مرتبط با rRNA | 1096486 | 1336965 | 439323 | 681660 |
| Reads related to tRNA خوانش‌های مرتبط با tRNA | 68118 | 108148 | 187744 | 169690 |
| Reads related to snRNA خوانش‌های مرتبط با snRNA | 40226 | 27042 | 14056 | 15065 |
| Reads related to snoRNA خوانش‌های مرتبط با snoRNA | 5071 | 4814 | 2945 | 3504 |
| Law complexity reads خوانش‌های با پیچیدگی پایین | 4176 | 10068 | 1263 | 1991 |
| Contaminated reads خوانش‌های آلوده | 938 | 4,651 | 623 | 598 |
| خوانش‌های مرتبط با miRNAهای زنبور عسل | 111446 | 573125 | 79284 | 124621 |
| Reads related to Apis mellifera miRNAs | | | | |
| خوانش‌های مرتبط با miRNAهای دیگر حشرات | 3097 | 21525 | 1413 | 1685 |
| Reads related to other insect miRNAs | | | | |
| No annotation reads خوانش‌های شناسایی نشده | 801690 | 1202178 | 1071775 | 887345 |
| خوانش‌های منطبق شده با ژنوم زنبور عسل | 410890 | 735370 | 298952 | 289856 |
| Reads mapped against Apis mellifera genome | | | | |

^{۲۵} Category

^{۲۶} Biological Process

^{۲۷} Molecular Function

^{۲۸} Cellular Component

| | | | | |
|--|----|----|------|------|
| خوانش‌های منطبق شده با miRNAهای گرده کنار | 45 | 69 | 5670 | 4100 |
| Aligned reads to Sidr poleen_miRNAs | | | | |
| شمار miRNAهای ردیابی شده در زنبور عسل تغذیه شده با گرده کنار | 0 | 0 | 15 | 11 |
| Count of detected miRNAs in sidr pollen-treated honey bees | | | | |

*زنبورهای عسل تغذیه شده با گرده کنار (تکرار اول و دوم)

تعداد واژه‌های GO در دسته فرایندهای بیولوژیکی از هشت عدد در miR-30d تا ۸۷ عدد در miR-206 متغیر است. ژن‌های هدف همه miRNAها به غیر از miR-30d در فرایند متابولیک^{۳۰} و فرایند سلولی^{۳۱} دخیل هستند. در دسته اجزای سلولی، ژن‌های هدف miRNAهای let-7g، miR-199b، و miR-206 مرتبط با موجودیت آناتومیک سلولی^{۳۲}، کمپلکس حاوی پروتئین^{۳۳} و عملکرد درون سلولی^{۳۴} هستند. در حالیکه ژن‌های هدف miR-26، miR-27، miR-30d، miR-126 و miR-143 مرتبط با عملکرد کمپلکس حاوی پروتئین نیستند. در دسته عملکرد مولکولی: ژن‌های هدف هر هشت miRNA مرتبط با باند شدن^{۳۵} و فعالیت کاتالیزوری^{۳۶} هستند علاوه بر آن ژن‌های هدف miR-126 و miR-206 به ترتیب مرتبط با فعالیت مولکولی ساختاری^{۳۷} و فعالیت تنظیم کننده عملکرد مولکولی^{۳۸} می‌باشند (جدول ۴). با توجه به اینکه عمده ژن‌های هدف پیش‌بینی شده (۵۳ ژن از ۹۹ ژن) مربوط به miR-206 گیاهی بود آنالیز GO آن با جزئیات در شکل ۲ آورده شده است. از بین ۵۳ ژن هدف پیش‌بینی شده برای miR-206، ۳۵ ژن با BLASTx حاشیه‌نویسی شدند و در مجموع ۱۶۳ واژه GO متعلق به ۱۵ گروه عملکردی و سه دسته تولید شد (جدول ۴). در دسته فرایندهای بیولوژیکی ۸۷ واژه GO در نه گروه عملکردی قرار گرفته‌اند که گروه فرایندهای سلولی (GO:0009987) و فرایندهای متابولیکی^{۳۹} (GO:0008152) که به ترتیب مرتبط با ۱۷ و ۱۲ ژن هدف می‌باشند بیشترین بیان را در این دسته دارند. ژن‌های مرتبط با دسته عملکرد مولکولی مرتبط با سه گروه باند

^{۲۹} Go Term

^{۳۰} Metabolic Process

^{۳۱} Cellular Process

^{۳۲} Cellular Anatomic Entity

^{۳۳} Protein Containing Complex

^{۳۴} Intracellular Function

^{۳۵} Binding

^{۳۶} Catalytic Activity

^{۳۷} Structural Molecular Activity

^{۳۸} Molecular Function Regulator Activity

^{۳۹} Metabolic Process

شدن (GO:0005488)، تنظیم کننده عملکرد مولکولی^{۴۰} (GO:0098772) و فعالیت کاتالیزوری (GO:0003824) می‌باشند که گروه باند شدن بیشترین بیان را در این دسته داراست. دسته اجزای سلولی به گروه‌های عملکردی کمپلکس حاوی پروتئین (GO:0032991)، (GO:0005622) intracellular و موجودیت آناتومیک سلولی (GO:0110165) تقسیم بندی شده است که گروه آخری بیشترین بیان را در این دسته داراست (شکل ۲). برای نشان دادن عملکرد بالقوه ژن‌های هدف miRNAهای گیاهی منتقل شده به بدن زنبور عسل، تجزیه و تحلیل مسیر KEGG انجام شد. نتایج آنالیز Gene Enrichment، حاکی از معنی‌دار بودن (P<0.1) ۲۳ مسیر مولکولی مرتبط با هفت miRNA منتقل شده از رژیم غذایی می‌باشد (جدول ۵).

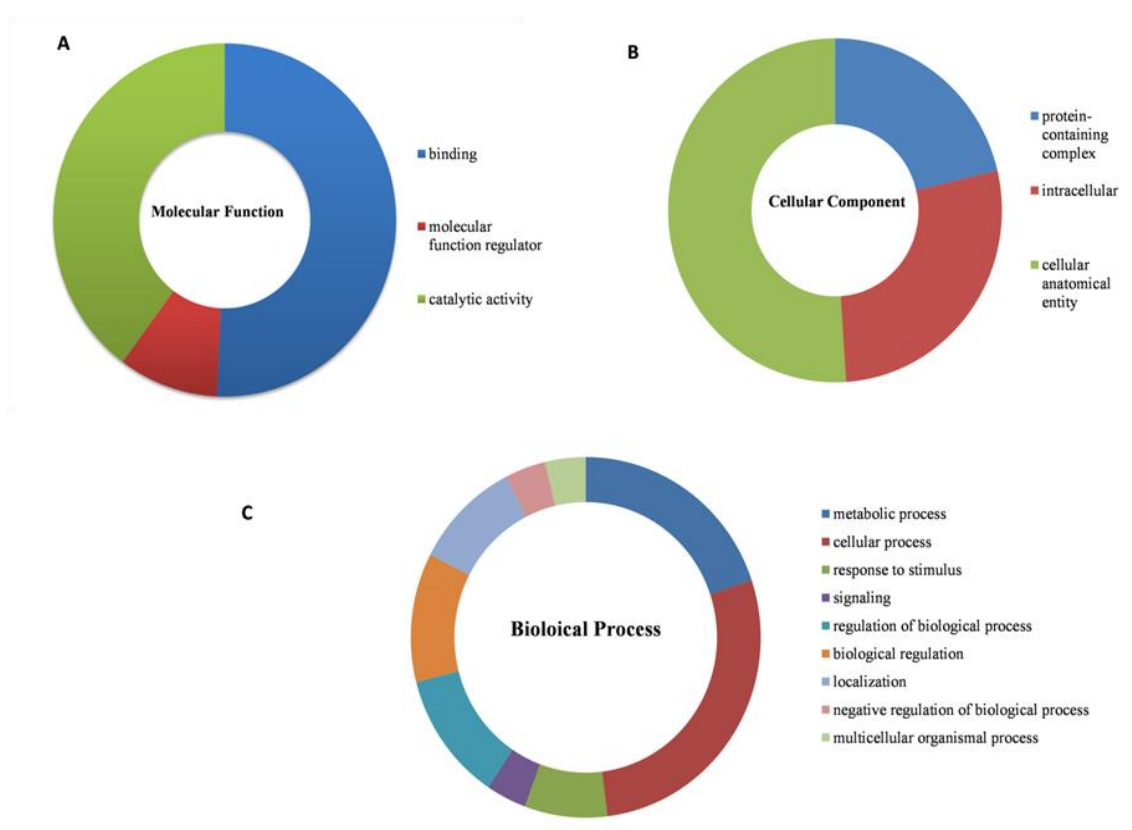
جدول ۴. آنالیز هستی‌شناسی ژن برای miRNAهای جدید ردیابی شده در مطالعه حاضر

Table 4. Gene Ontology (GO) analyses of Individual novel miRNAs detected in this study

| | miR-let-7g | miR-26 | miR-27 | miR-30d | miR-126 | miR-143 | miR-199b | miR-206 |
|------------------------------------|------------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|
| No. of target genes | 11 | 4 | 6 | 2 | 7 | 8 | 7 | 53 |
| No. of annotated genes | 9 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | 6 | 35 |
| No. of categories | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| biological process category | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| No. of GO terms | 12 | 33 | 23 | 8 | 45 | 55 | 70 | 87 |
| Metabolic process | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Cellular process | ✓ | ✓ | ✓ | × | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Localization | × | × | ✓ | × | ✓ | × | ✓ | ✓ |
| Signaling | × | × | × | × | × | × | × | ✓ |
| Regulation of biological process | × | × | × | × | × | × | × | ✓ |
| Biological regulation | × | × | × | × | × | ✓ | × | ✓ |
| Response to stimulus | × | × | × | × | × | ✓ | × | ✓ |
| Negative regulation | × | × | × | × | × | × | × | ✓ |
| Multicellular organismal process | × | × | × | × | × | ✓ | ✓ | ✓ |
| Cellular component category | ✓ | ✓ | ✓ | × | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| No. of GO terms | 8 | 10 | 9 | 0 | 15 | 6 | 22 | 32 |
| Cellular anatomical entity | ✓ | ✓ | ✓ | × | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Protein containing complex | ✓ | × | × | × | × | × | ✓ | ✓ |
| intracellular | ✓ | ✓ | ✓ | × | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Molecular function category | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| NO. GO terms | 14 | 11 | 8 | 17 | 24 | 40 | 38 | 44 |

^{۴۰} Molecular Function Regulator

| | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Functional groups molecular function category | binding | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Catalytic activity | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Transporter activity | × | × | × | × | × | × | × |
| | Structural molecule activity | × | × | × | × | ✓ | × | × |
| | Molecular function regulator | × | × | × | × | × | × | ✓ |
| | Translation regulator activity | × | × | × | × | × | × | × |



شکل ۲. توزیع واژه‌های GO ژن‌های هدف miR-206 در سه دسته: A) Molecular function، B) Cellular Component و C) Biological process

Figure 2. Distribution of gene ontology terms of miR-206 target genes in the three categories: A) Molecular Function, B) Cellular Component and C) Biological process

انتقال مولکول‌های RNA کوچک (miRNA و siRNA) از یک گونه به گونه‌ی دیگر یک مکانیسم تازه کشف شده برای انتشار سیگنال‌های خاموش کننده ژن و تسهیل ارتباط بین ارگانیسم‌های مختلف حتی در سطح فرمانروها^{۴۱} می‌باشد (Zhou et al. 2017). انتقال متقابل RNAهای کوچک بین گونه‌های مختلف مانند از باکتری‌ها به نماتودها (Liu et al. 2012)، از پاتوژن قارچی به گیاهان (Weiberg et al. 2013)، از گیاهان به میکروب‌های بیماری‌زا و همزیست (Koch et al. 2013; Zhang et al. 2014)، از گیاهان به نماتودها (Ibrahim et al. 2011)، از گیاهان به مهره‌داران (Zhang et al. 2012; Zhou et al. 2015) به طور مکرر گزارش شده است. در سال ۱۹۹۸، برای اولین بار کشف شد که RNAهای موجود در رژیم غذایی نماتود از طریق RNA مداخله‌گر^{۴۲} می‌تواند بیان ژن این موجود را تنظیم کند (Fire et al. 1998).

جدول ۵. مسیرهای KEGG معنی‌دار توسط ژن‌های هدف miRNAهای گیاهی مشتق شده از رژیم غذایی

Table 5. Significant KEGG pathways in the target genes of the detected diet-derived plant miRNAs

| miRNAs | مسیر PATHWAY | نام ژن Gene Name | P-Value | P-Value تصحیح شده Correcte d-P- Value |
|---------|--|---------------------|----------|--|
| Let-7g | ame04310:Wnt signaling pathway | GB54903, GB49269 | 1.70e-3 | 1.53e-2 |
| | ame00620:Pyruvate metabolism | GB40280 | 2.95e-2 | 5.94e-2 |
| | ame00020: Citrate cycle (TCA cycle) | GB40280 | 3.22e-2 | 5.94e-2 |
| | ame00562: Inositol phosphate metabolism | GB50211 | 4.27e-2 | 5.94e-2 |
| | ame04070:Phosphatidylinositol signaling | GB50211 | 4.62e-2 | 5.94e-2 |
| | ame04391:Hippo signaling pathway-fly | GB55164 | 4.62e-2 | 5.94e-2 |
| | ame01230:Biosynthesis of amino acids | GB40280 | 4.62e-2 | 5.94e-2 |
| | ame01200: Carbon metabolism | GB40280 | 8.030e-2 | 9.04e-2 |
| miR-126 | ame00830:Retinol metabolism | GB53086 | 3.95e-3 | 1.18e-2 |
| | ame00350: Tyrosine metabolism | GB53086 | 4.94e-3 | 1.18e-2 |
| | ame00982:Drug metabolism-cytochrome P450 | GB53086 | 5.27e-3 | 1.18-2 |
| | ame00980:Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 | GB53086 | 5.92e-3 | 1.18e-2 |

^{۴۱} Kingdom

^{۴۲} Rna Interference

| | | | | |
|---------|--|---------------------|---------|---------|
| | ame00071:Fatty acid degradation | GB53086 | 8.22e-3 | 1.32e-2 |
| | ame00010: Glycolysis Gluconeogenesis | GB53086 | 1.41e-2 | 1.88e-2 |
| | ame01200: Carbon metabolism | GB53086 | 3.00e-2 | 3.43e-2 |
| miR-143 | ame00970:Aminoacyl-tRNA biosynthesis | GB40563 | 1.68e-2 | 1.68e-2 |
| miR-199 | ame03040-Spliceosome | GB52855 | 3.42e-2 | 3.71e-2 |
| | ame04141:Protein processing in endoplasmic reticulum | GB415 ^{۸۶} | 3.71e-2 | 3.71e-2 |
| miR-26a | ame00510:N-Glycan biosynthesis | GB54846 | 5.77e-3 | 5.77e-3 |
| miR-203 | ame00230:Purin metabolism | GB44602 | 6.19e-3 | 1.24e-2 |
| | ame01100:Metabolic pathways | GB44602 | 6.70e-2 | 6.70e-2 |
| miR-27a | ame04145:Phagosome | GB54140 | 9.87e-3 | 1.82e-2 |
| | ame04144:Endocytosis | GB54140 | 1.82e-2 | 1.82e-2 |

همچنین در پژوهشی دیگر، مصرف خوراکی miRNA و جذب آن در بافت‌های گیرنده نامتود مؤثر واقع شده است (Timmons et al. 2001). در مطالعات دیگر، هدف قرار دادن بیان ژن حشرات از طریق مصرف خوراکی dsRNA^{۴۳} به طور موفقیت آمیز گزارش شده است. به هر حال بازده جذب بسته به رفتار گونه بسیار متغیر است (Yu et al. 2012). در زنبور عسل تزیق دز بالای dsRNA به داخل همولنف برای مهار ژن‌های هدف در بافت‌های گوناگون استفاده شده است (Jarosch. 2011). مطالعات بیشتر نشان دادند که مصرف خوراکی dsRNA در زنبور عسل، ژن‌های هدف در ناحیه گوارشی (Nazzi et al. 2012) و دیگر بافت‌های ناحیه پشتی را از کار می‌اندازد (Garbian et al. 2012). در حقیقت این موضوع می‌تواند انتقال بین گونه‌ای dsRNA در زنبور عسل باشد که زنبورهای تغذیه شده با dsRNA می‌توانند این مولکول را به کنه (mite) *V. destructor* که از همولنف زنبور تغذیه می‌کند منتقل کرده و از کنه هم به سایر زنبورها منتقل شده و منجر به خاموش شدن عامل ژن کنه و باعث مرگ و میر کنه‌ها می‌شود (Garbian et al., 2012). در مطالعات پیشین انتقال غذایی miRNAها به بدن زنبور عسل گیرنده، ناچیز گزارش شده است (Masood et al. 2016). این محققان انتقال غذایی miR-156a (miRNA) گیاهی بسیار محافظت شده در گرده گل) را در بافت‌های مختلف زنبور عسل پرستار و چراگر مورد بررسی قرار داده و افزایش قابل توجهی از miRNA گیاهی را در روده میانی زنبور عسل بعد از مصرف گرده مشاهده کردند، ولی در بافت پروکسیمال^{۴۴} و دیستال^{۴۵} زنبورهای مورد مطالعه هیچ گونه شواهد بیولوژیکی مبنی بر تحویل این مولکول‌های RNA کوچک پیدا نکردند. در حالی که مطالعه‌ی حاضر شواهدی را مبنی بر انتقال موفقیت آمیز تعدادی از miRNAهای گیاهی به روده میانی زنبور عسل ارائه

^{۴۳} Double-Stranded Rna

^{۴۴} Proximal

^{۴۵} Distal

می‌دهد ما نشان دادیم که انتقال غذایی miRNA های گیاهی به روده میانی زنبور عسل تحت شرایط تغذیه کنترل شده اتفاق می‌افتد. Let-7 یکی از اولین miRNA های کشف شده در نماتود *Caenorhabditis elegans* هست (Reinhart et al. 2000) که نقش آن در فرآیندهای تکوینی مختلف در *Bombyx mori* و *Drosophila melanogaster* نشان داده شده است (Sempere et al. 2003; Liu et al. 2007). مطالعات پیشین در زنبور عسل نشان دادند که let-7 یکی از معدود نشانگرهای حفاظت شده محسوب می‌شود که با تغییر رفتار زنبور عسل از پرستاری به چراگری در ارتباط هست (Behura and Whitfield 2010; Greenberg et al. 2012; Liu et al. 2012). در مطالعه‌ی حاضر، ژن‌های هدف let-7g گیاهی منتقل شده به بدن زنبور عسل مانند ژن LOC107963993^{۴۶} و ژن LOC552168^{۴۷} به طور معنی‌داری در مسیر wnt signaling نقش ایفا می‌کنند. wnt signaling یک مورفوژن بسیار حیاتی برای توسعه‌ی سیستم عصبی مرکزی محسوب می‌شود که عملکرد آن مرتبط با ایجاد و حفظ عملکرد عصبی و ساختار سیناپسی می‌باشد (Olive et al. 2018). اخیراً آنالیزهای بیوانفورماتیکی پیشنهاد می‌کند که مسیر wnt-signaling نقش مهمی را در بلوغ رفتاری زنبور عسل ایفا می‌کند (Liu et al. 2019). برای مشخص کردن رابطه‌ی بین عملکرد پرستاری زنبور عسل و فعالیت‌های عصب شناسی، مطالعات فسفوپروتئوم در مغز زنبور عسل نشان داد که مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول^{۴۸} و متابولیسم اینوزیتول فسفات^{۴۹} و wnt signaling pathway برای بلوغ مغز، رشد، انتقال سیگنال و فرآیندهای یادگیری بویایی در مراحل اولیه زندگی زنبور کارگر برای افزایش عملکرد وظیفه پرستاری آن‌ها ضروری است (Ramadan and Li 2019). با توجه به یافته‌های مطالعات پیشین، می‌توان چنین استنباط کرد که در مطالعه حاضر مسیر معنی‌دار شده‌ی wnt signaling، فسفاتیدیل اینوزیتول سیگنالینگ و متابولیسم اینوزیتول فسفات توسط miRNA گیاهی let-7 احتمالاً در بهبود رفتار زنبور عسل با تنظیم عملکرد عصبی در مغز آن‌ها مرتبط باشد. به هر حال مطالعات جامعی برای تأیید نقش ژن‌های هدف let-7 در عملکرد وظیفه پرستاری زنبور عسل لازم است.

آنالیز بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که miR-103 گیاهی، ژن LOC408552^{۵۰} زنبور عسل که در مسیر-ECM receptor interaction درگیر هست را مورد هدف قرار می‌دهد. در مطالعات قبلی نقش این مسیر در رابطه با تولید ژله رویال بیشتر در زنبور عسل عنوان شده است (Nie et al. 2017). نقش مسیرهای مولکولی endocytosis و phagosome درگیر توسط ژن‌های هدف شناسایی شده در مطالعه حاضر در مطالعات قبلی مرتبط با افزایش فعالیت ایمنی زنبور ذکر شده است (Kim

^{۴۶} Palmitoleoyl-Protein Carboxylesterase Notum

^{۴۷} Palmitoleoyl-Protein Carboxylesterase Notum-Like

^{۴۸} Phosphatidylinositol Signaling Pathway

^{۴۹} Inositol Phosphate Metabolism

^{۵۰} Collagen Alpha-1 (Iv) Chain

et al. 2018). miR-206 یکی از miRNAهای جالب توجه شناسایی شده در مطالعه‌ی حاضر بوده و تأثیر قابل توجهی بر مکانیسم دینامیکی ریتم شبانه روزی پستانداران دارد که تقریباً در تمام موجودات زنده از سیانوباکتری‌ها گرفته تا گیاهان، حشرات و پستانداران با دوره‌ای نزدیک به ۲۴ ساعت اتفاق می‌افتد (Zhou et al. 2011). اگرچه هنوز به نقش miR-206 در کنترل ساعت شبانه روزی حشرات اشاره نشده است، اما نتایج مطالعه حاضر می‌تواند گام مؤثری برای ارزیابی این ایده باشد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که miR-206 گیاهی حدود ۵۳ ژن زنبور عسل را مورد هدف قرار می‌دهد که در ۲۱ مسیر بیولوژیکی مختلف درگیر هستند. مجموع این یافته‌ها درک ما را از فعل و انفعالات مولکولی بین زنبور عسل و گیاهان گلدار افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: فرضیه انتقال افقی و فعالیت‌های تنظیمی miRNAهای غذایی در حیوانات هنوز چالش برانگیز است به طوری که مطالعات محدودی در مورد نقش مصرف همراه خوراکی miRNAها در زنبور عسل به عنوان یک گرده‌افشان مهم در صنعت کشاورزی و اکوسیستم طبیعی انجام شده است. پژوهش حاضر شواهدی را مبنی بر انتقال موفقیت‌آمیز miRNAهای گیاهی از گیاه کنار به بدن زنبور عسل ارائه می‌دهد. نتایج آنالیز RNA-Seq حاکی از ردیابی برخی از miRNAهای گیاهی در بدن زنبور عسل می‌باشد. miRNAها عمدتاً از طریق ژن‌های هدفشان در فرآیندهای مختلف شرکت می‌کنند در مطالعه‌ی حاضر ۹۹ ژن هدف برای miRNAهای گیاهی ردیابی شده در بدن زنبور عسل پیش‌بینی شد. کمترین ژن هدف مربوط به miR-203 با یک ژن هدف و بیشترین ژن‌های هدف پیش‌بینی شده مرتبط با miR-206 بود که ۵۳ ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنالیز KEGG برای miR-206 نشان داد که ژن‌های هدف این miRNAها در ۲۱ مسیر مختلف مولکولی درگیر هستند. درگیری ژن‌های هدف در مسیرهای مختلف بیولوژیکی ممکن است به ایجاد شرایط برای یک تعامل سازگار کمک کند. بنابراین یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، انتقال افقی miRNAهای گیاهی از گرده کنار به بدن زنبور عسل و نقش تنظیمی miRNAهای گیاهی منتقل شده از طریق غذا در تنظیم بیان ژن زنبور عسل و وجود یک رابطه مولکولی بین گیاه میزبان و این حشره مفید اجتماعی را تأیید می‌کند. لذا این نتایج در درجه اول آگاهی ما را از فعل و انفعالات صورت گرفته بین زنبور عسل و گیاه میزبان افزایش داده و متعاقباً می‌تواند بعنوان گام تازه‌ای برای پیشبرد برنامه‌های اصلاح نژادی زنبور عسل در جهت بهبود تولیدات آن، افزایش ایمنی بدن در مقابل انواع بیماری‌ها و غیره به کار گرفته شود.

سپاسگزاری: از پرسنل گروه زنبور عسل مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع کرج جهت همکاری صمیمانه در امر نمونه‌گیری و انجام آزمایشات تغذیه‌ای تشکر و قدردانی می‌شود.

- بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی، ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.
- طهماسبی غلامحسین، پورقرایی حسین (۱۳۷۹) بررسی نقش زنبورعسل در گرده‌افشانی و افزایش تولید محصولات کشاورزی ایران. مجله اقتصاد کشاورزی و توسعه. دوره ۸، شماره ۳۰، صفحه ۱۳۱-۱۴۴.
- عرب‌پور رق‌آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت‌های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محمدآبادی محمدرضا، سفلی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

References

- Anders S, Huber W (2012) Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package. Heidelberg, Germany: EMBL 10, f1000research.
- Arabpour Z, Mohammadabadi MR, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. Agric Biotechnol J 13 (4), 183-200 (In Persian).
- Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R (2016) MicroRNAs in honey bee caste determination. Sci Rep 6(1), 1-5.
- Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7 (13), 186-192 (In Persian).
- Behura SK, Whitfield CW (2010) Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. Insect Mol Biol 19(4), 431-9.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics Btu 170, 1-7.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol 19(2), 43–51.
- Du J, Li M, Yuan Z et al. (2016) A decision analysis model for KEGG pathway analysis. BMC Bioinform 17(1), e407.
- Enright AJ, John B, Gaul U. et al. (2003) MicroRNA targets in Drosophila. Genome Biol 5, R1 e2003.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391(6669), e806.

- Garbian Y, Maori E, Kalev H et al. (2012) Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and Varroa destructor: Varroa gene silencing reduces Varroa population. PLoS Pathog 8, e1003035.
- Ghag SB, Shekhawat UK, Ganapathi TR (2014) Host - induced post - transcriptional hairpin RNA - mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. Plant Biotechnol J 12(5), 541-53.
- Greenberg JK, Xia J, Zhou X et al. (2012) Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. Genes Brain Behav 11(6), 660-70.
- Ibrahim HM, Alkharouf NW, Meyer SL et al. (2011) Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. Exp Parasitol 127(1), 90-9.
- Ivashuta S, Zhang Y, Wiggins BE et al. (2015) Environmental RNAi in herbivorous insects. RNA 21(5), 840-50.
- Jarosch A, Moritz RFA (2011) Systemic RNA-interference in the honeybee *Apis mellifera*: tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. J Insect Physiol 57, 851-857.
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U et al. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat Genet 39, 1278-1284.
- Kim K, Kim JH, Kim YH et al. (2018) Pathway profiles based on gene-set enrichment analysis in the honey bee *Apis mellifera* under brood rearing-suppressed conditions. Genomics 110(1), 43-9.
- Koch A, Kumar N, Weber L et al. (2013) Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to Fusarium species. PNAS 110(48), 19324-9.
- Li X, Zhang M, Zhang H (2011) RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. PloS One 6(3), e17788.
- Liu F, Peng W, Li Z et al. (2012) Next - generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. Insect Mol Biol 21(3), 297-303.
- Liu F, Shi T, Qi L et al. (2019) lncRNA profile of *Apis mellifera* and its possible role in behavioural transition from nurses to foragers. BMC Genom 20(1), e101.
- Liu H, Wang X, Wang HD et al. (2012) Escherichia coli noncoding RNAs can affect gene expression and physiology of *Caenorhabditis elegans*. Nat Commun 3(1), e1073.
- Liu S, Xia Q, Zhao P et al. (2007) Characterization and expression patterns of let-7 microRNA in the silkworm (*Bombyx mori*). BMC Dev Biol 7(1), 1-7.

- Martin JA, Wang Z (2011) Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet* 12(10), 671-682.
- Masood M, Everett CP, Chan SY, Snow JW (2016) Negligible uptake and transfer of diet-derived pollen microRNAs in adult honey bees. *RNA Biol* 13(1), 109-118.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Morse RA, Calderone NW (2000) The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee culture* 28(3), 1-15.
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D et al. (2012) Synergistic parasite/pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog* 8, e1002735.
- Nie H, Liu X, Pan J et al. (2017) Identification of genes related to high royal jelly production in the honey bee (*Apis mellifera*) using microarray analysis. *Genet Mol* 40(4), 781-9.
- Oliva CA, Montecinos-Oliva C, Inestrosa NC (2018) Wnt signaling in the central nervous system: new insights in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 153, 81-130.
- Ramadan H, Li J (2019) In-Depth Brain Phosphoproteome Study Reveals Neurobiological Underpinnings For Nurse Honeybee Workers (*Apis mellifera ligustica*). *Fayoum J Agric Res Dev* 33(1), 589-597.
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10, 1507–1517.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M et al. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772), 901-906.
- Rusek A M, Abba M, Eljaszewicz A et al. (2015) MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. *Mol Cancer* 14(1), e34.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864.
- Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB (2003) Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Dev Biol* 259(1), 9-18.
- Tahmasebi Gh, Porgharaei H (2000) Investigating the role of bee in pollination and increasing the production of agricultural products in Iran. *Agric Econ Dev J* 8(30), 131-144 (In Persian).

- Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112.
- Vitsios DM, Kentepozidou E, Quintais L et al. (2017) Mirnovo: genome-free prediction of microRNAs from small RNA sequencing data and single-cells using decision forests. *Nucleic Acids Res* 45(21), e177.
- Wang ZZ, Ye XQ, Shi M et al. (2018) Parasitic insect-derived miRNAs modulate host development. *Nat Commun* 9 (1), 1-9.
- Waster NM, Ollerton J (2006) Plant-pollinator interactions: From specialization to generalization. University of Chicago Press. 98(4), 899-900.
- Weiberg A, Wang M, Lin FM et al. (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342(6154), 118-23.
- Yu N, Christiaens O, Liu J et al. (2012) Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Sci* 20, 4-14.
- Zhang L, Hou D, Chen X et al. (2012) Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 22(1), 107-126.
- Zhou G, Zhou Y, Chen X (2017) New insight into inter-kingdom communication: horizontal transfer of mobile small RNAs. *Front Microbiol* 8, e768.
- Zhou W, Li Y, Wang X et al. (2011) MiR-206-mediated dynamic mechanism of the mammalian circadian clock. *BMC Syst Biol* 5(1), 1-7.
- Zhou Z, Li X, Liu J et al. (2015) Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res* 25(1), 39.
- Zhu K, Liu M, Fu Z et al. (2017) Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *Plos Genet* 13(8), e1006946.

