Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 4, 2024 p: 117-128

OPEN ACCESS

Research Paper

A Study on the Possibility of Molecular Communication between Honey Bees and Sunflower through the Interspecies Transfer of Small RNAs

Leila Gharehdaghi[1], Gholamhosein Tahmasbi[2] and Taher Harkinezhad[3]

1- Assistant Professor, Department of Animal Science Research, East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran, (Corresponding author: l.gharedagi@areeo.ac.ir)
2- Professor, Department of Honey Bee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: 24 January, 2024 Accepted: 30 April, 2024

Extended Abstract

Background: Honeybees play a crucial role in nature, primarily through their involvement in pollination, which significantly enhances agricultural productivity and contributes to environmental restoration. It is estimated that nearly one-third of global food production is directly or indirectly reliant on insect pollination, with honeybees being the most prominent among them. Studies indicate that the contribution of honeybees to agricultural output in various countries is 69-143 times greater than their direct production. Over a decade has passed since the initiation of research on the interspecies transfer of dietary microRNAs (miRNAs) and their regulatory roles in host organisms, yet this topic remains vibrant and current. Limited studies have been conducted on the role of dietary miRNAs in honeybees, which are critical pollinators in agricultural industries and natural ecosystems. The potential for gene expression regulation among different species via dietary miRNAs could provide significant benefits in the interactions between plants and their pollinators, allowing plants to modulate the gene expression of pollinating insects through small RNA transfer. In other words, miRNAs can be transferred not only between cells and tissues within an organism but also across different species while maintaining their regulatory functions. Given the vital role of honeybees in plant pollination, this insect may serve as a more suitable model for studying these interactions. Therefore, the present study aims to investigate the molecular relationship between this beneficial social insect and its host plants through the dietary transfer of exogenous miRNAs, potentially illuminating new and extensive dimensions of the beneficial effects of this interaction.

Methods: Pollens were collected using pollen traps from honeybee hives located on a sunflower farm in the Shal region of Qazvin, Iran, during thepeak flowering days of the plant. The collected pollens were immediately examined morphologically and transferred to liquid nitrogen tanks to preserve freshness and prevent RNA degradation. For nutritional experiments, four hives were utilized to gather nurse bees under controlled conditions. Approximately 100 young bees from each hive were transferred into specially designed cages. Two cages served as controls (fed with sugar syrup) while the two others were treated with sunflower pollens. To maintain natural hive conditions (queen pheromone, temperature, and humidity) during the experiment, the cages containing nurse bees were placed on the upper level of the hive. To cleanse the digestive system of the bees, all treatments were fed with sugar syrup for 48 h. Subsequently, to encourage further feeding, the bees were kept hungry for about 3 h. In the following 24 h, the control group continued receiving sugar syrup while the treatment group was fed a solution consisting of 30% sugar and 70% sunflower pollen. After completing the nutritional experiments, the bees were anesthetized using cold temperatures, and their midgut tissues were collected, homogenized in Trizol, and stored at -80 °C until extraction. RNA from both pollen and honeybee midgut tissues was extracted using a miRNeasy mini Kit from Qiagen, and samples were sent to Novogene in Beijing, China, for sequencing. Following successful Small RNA-Seq sequencing, bioinformatics analyses were conducted to identify sunflower-derived miRNAs and track their presence in bees from different feeding groups. Subsequently, RT-qPCR was employed to validate results obtained from bioinformatics analyses.

Results: The results of bioinformatics analysis indicated the identification of 11 plant miRNAs (miR-148a, miR-26a, miR-21-5p, miR-143, miR-27a, miR-203, let-7g, miR-126, miR-30d, miR-101, and miR-103) in honeybees fed with sunflower pollen while no plant miRNAs were found

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

Copyright ©2024 Gharehdaghi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

in the control group of bees. To validate the results obtained from the bioinformatics analysis, the expression patterns of four randomly selected transferred miRNAs (let-7g, miR-21-5p, miR-126, and miR-148) were confirmed using RT-qPCR, indicating a potential regulatory role for the identified plant miRNAs in honeybee gene expression.

Conclusion: These findings provide compelling evidence for the successful transfer of miRNAs from the host plant to the body of honeybees through dietary means. This phenomenon highlights the intricate connections between honeybees and the plants they pollinate, emphasizing the vital role that honeybees play in maintaining ecosystem health and agricultural productivity. The ongoing discussion regarding the dietary transfer of plant miRNAs across various species underscores their potential regulatory roles in influencing gene expression within the host organism. The discovery of a molecular relationship between honeybees and their host plants via miRNAs opens new avenues for understanding the complex interactions that occur in ecosystems, particularly between pollinating insects and flowering plants. As we delve deeper into the extensive dimensions of this molecular relationship, it becomes increasingly clear that these interactions could serve as a roadmap for future breeding studies. Such research could focus on enhancing hive production through selective breeding of plants that optimize the nutritional and genetic benefits for honeybees. Additionally, understanding how these transferred miRNAs influence the immune systems of honeybees may lead to improved strategies for disease resistance, ultimately benefiting both bee populations and agricultural practices reliant on their pollination services.

Keywords: Diet-derived transmission of MicroRNAs, Honey bees, RT-qPCR**,** Sunflower pollen

How to Cite This Article: Gharehdaghi, L., Tahmasbi, Gh, & Harkinezhad, T. (2024). A Study on the Possibility of Molecular Communication between Honey Bees and Sunflower through the Interspecies Transfer of Small RNAs. *Res Anim Prod,* 15(4), 117-128. DOI: 10.61186/rap.15.4.117

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

مقاله پژوهشی

مطالعه امکان ارتباط مولکولی بین زنبور عسل و گیاه آفتابگردان از طریق انتقال بین گونه‌ای RNAهای کوچک

لیلا قره‌داغی[۱]، غلامحسین طهماسبی[۲] و طاهر هرکی‌نژاد[۳]

۱- استادیار، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران، (نویسنده مسوول: l.gharedagi@areeo.ac.ir)

۲- استاد، بخش تحقیقات زنبور عسل، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۱

صفحه: ۱۱۷ تا ۱۲۸

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: زنبورعسل افزون بر تولید محصولات گوناگون مهمترین نقش خود را در طبیعت با دخالت در عمل گرده‌افشانی و افزایش تولید محصولات کشاورزی و احیای محیط زیست ایفا می‌کند، به‌طوری‌که تقریباً یک سوم تولید منابع غذایی بشر مستقیم یا غیرمستقیم به گرده‌افشانی حشرات (زنبورعسل در رأس آنها) بستگی دارد. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که در کشورهای مختلف، نقش زنبورعسل در افزایش تولیدات کشاورزی ۶۹ تا ۱۴۳ برابر تولیدات مستقیم آن می‌باشد. با گذشت بیش از یک دهه از شروع مطالعات مربوط به انتقال غذایی miRNAها بین موجودات مختلف و نقش تنظیمی آن‌ها در موجود میزبان، این بحث همچنان داغ و به‌روز می‌باشد. به‌طوری‌که مطالعات محدودی در مورد نقش مصرف خوراکی miRNAها در زنبورعسل به‌عنوان یک گرده‌افشان مهم در صنعت کشاورزی و اکوسیستم طبیعی انجام شده است. امکان تنظیم بیان ژن بین گونه‌های مختلف از طریق miRNAهای خوراکی، می‌تواند سود ویژه‌ای در رابطه متقابل گیاهان و گرده‌افشان‌های آن‌ها داشته باشد به‌طوری‌که گیاهان می‌توانند بیان ژن حشرات گرده‌افشان را از طریق انتقال RNAهای کوچک کنترل کنند. به بیان دیگر، miRNAها نه‌تنها بین سلول‌ها و بافت‌های یک ارگانیسم، بلکه بین گونه‌های مختلف نیز قابلیت انتقال داشته و همچنان عملکرد تنظیمی خود را حفظ می‌کنند. با توجه به نقش حیاتی زنبورعسل در گرده‌افشانی گیاهان، این حشره می‌تواند به‌عنوان مدل بهتری در این زمینه مطرح شود. بدین‌منظور، مطالعه حاضر که با هدف بررسی وجود ارتباط مولکولی بین این حشره مفید اجتماعی و گیاه میزبان از طریق انتقال غذایی miRNAهای با منشأ خارجی بوده، می‌تواند ابعاد جدید و گسترده‌ای از اثرات مفید این ارتباط را روشن کند.

مواد و روش‌ها: جمع‌آوری گرده توسط تله گرده از کندوهای زنبورعسل واقع در مزرعه آفتابگردان در منطقه شال قزوین-ایران در روزهای اوج گلدهی گیاه مزبورانجام گرفت. گرده جمع‌آوری شده بلافاصله از لحاظ مورفولوژیکی بررسی و به‌منظور حفظ تازگی و جلوگیری از تخریب RNA، به تانک ازت مایع منتقل شد. به‌منظور انجام آزمایشات تغذیه‌ای از چهار عدد کندو برای جمع‌آوری زنبور پرستار و تغذیه تحت شرایط کنترل شده استفاده شد. بدین‌ترتیب حدود صد عدد زنبور جوان از هرکدام از کندوها به داخل قفس‌های مخصوص طراحی شده، منتقل شد. دو عدد از قفس‌ها به‌عنوان شاهد (تغذیه با شربت شکر) و دو قفس به‌عنوان تیمار تغذیه شده با گرده آفتابگردان در نظر گرفته شد. همچنین برای برقراری شرایط طبیعی کندو (فرمون ملکه، دما و رطوبت) در حین آزمایش، قفس‌های حاوی زنبورهای پرستار در طبقه بالای کندو قرار داده شد. به‌منظور شستشوی دستگاه گوارش زنبور، همه تیمارها به‌مدت ۴۸ ساعت با شربت شکر تغذیه شده، بعد از آن برای تشویق تغذیه بعدی حدود ۳ ساعت زنبورها گرسنه نگه داشته شدند و در ۲۴ ساعت بعدی تیمار شاهد همچنان با شربت شکر و تیمار بعدی با محلول ۳۰ درصد شکر و ۷۰ درصد گرده آفتابگردان تغذیه شد. بعد از اتمام آزمایشات تغذیه‌ای، زنبوران با استفاده از سرما بیهوش شده و بافت روده میانی آن‌ها جمع‌آوری و در ترایزول هموژنیزه شده و در دمای منفی هشتاد درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج ذخیره گردید. استخراج RNA از گرده و بافت روده میانی زنبورعسل با استفاده از کیت miRNeasy mini Kit از شرکت کیاژن انجام گرفت و نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت Novogene بیجینگ چین فرستاده شد. بعد از توالی‌یابی موفیت‌آمیز Small RNA-Seq، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، miRNAهای گرده آفتابگردان شناسایی و ردیابی آن‌ها در زنبورهای گروه‌های مختلف تغذیه شده انجام گرفت. در گام بعد، از تکنیک RT-qPCR برای تأیید نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی، استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی حاکی از ردیابی یازده miRNAی گیاهی(miR-148a، miR-26a، miR-21-5p، miR-143، miR-27a، miR-203، let-7g، miR-126، miR-30d، miR-101 و miR-103)در زنبوران تغذیه شده با گرده آفتابگردان بود در حالی‌که در زنبوران گروه کنترل هیچ miRNA گیاهی یافت نشد. برای راستی آزمایی نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی، به‌طور تصادفی الگوی بیان چهار مورد از miRNAهای منتقل شده (let-7g، miR-21-5p، miR-126 و miR-148) با روش RT-qPCR تأیید شد که نشانگر نقش احتمالی miRNAهای گیاهی ردیابی شده در تنظیم بیان ژن زنبورعسل می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها شواهد قانع‌کننده‌ای را برای انتقال موفق میکروRNAها (miRNAها) از گیاه میزبان به بدن زنبورهای عسل از طریق رژیم غذایی ارائه می‌دهند. این پدیده به ارتباطات پیچیده بین زنبورهای عسل و گیاهانی که گرده‌افشانی می‌کنند، تأکید می‌کند و نقش حیاتی زنبورهای عسل در حفظ سلامت اکوسیستم و تولیدات کشاورزی را برجسته می‌سازد. بحث جاری درباره انتقال رژیمی miRNAهای گیاهی در گونه‌های مختلف، پتانسیل نقش‌های تنظیمی آن‌ها در تأثیرگذاری بر بیان ژن در موجودات میزبان را نشان می‌دهد. کشف یک رابطه مولکولی بین زنبورهای عسل و گیاهان میزبان از طریق miRNAها، راه‌های جدیدی را برای درک تعاملات پیچیده‌ای که در اکوسیستم‌ها رخ می‌دهد، به‌ویژه بین حشرات گرده‌افشان و گیاهان گلدار، باز می‌کند. با پیشرفت بیشتر در ابعاد گسترده این رابطه مولکولی، به‌طور فزاینده‌ای روشن می‌شود که این تعاملات می‌توانند به‌عنوان یک نقشه راه برای مطالعات آینده عمل کنند. چنین تحقیقاتی می‌تواند بر روی افزایش تولید کندو از طریق پرورش انتخابی گیاهانی که مزایای تغذیه‌ای و ژنتیکی را برای زنبورهای عسل بهینه می‌کنند، متمرکز شود. علاوه بر این، درک اینکه چگونه این miRNAهای منتقل‌شده بر سیستم ایمنی زنبورهای عسل تأثیر می‌گذارند، ممکن است منجر به توسعه استراتژی‌های بهبودی برای مقاومت در برابر بیماری‌ها شود که در نهایت به نفع هر دو جمعیت زنبور و شیوه‌های کشاورزی وابسته به خدمات گرده‌افشانی آن‌ها خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: انتقال غذایی miRNA، زنبورعسل، گرده آفتابگردان، RT-qPCR

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

مقدمه

از ابتدای آفرینش گیاهان و حشـــرات، پیوند نزدیکی بین آن‌ها برقرار شـــده که تکامل و بقاء آن‌ها را تضـــمین می‌کند. به‌عبارت دیگر، گیاهان برای تولیدمثل، انتشـار و پایداری خود، به گرده‌افشانی وابسته‌اند. از سوی دیگر، حشرات گرده‌افشان مانند زنبورعسل نیز برای تغذیه از شهد و گرده گل‌ها به آن‌ها وابسـته می‌باشـند (Ebadi & Ahmadi, 2004). زنبورعسـل به‌دلیل داشـتن ویژگی‌های خاص، مهمترین گرده‌افشـان روی کره زمین محسوب می‌شود به‌طوری‌که تقریباً یک سوم غذای بشـر به‌طور مسـتقیم و غیرمسـتقیم وابسـته به گرده‌افشـانی زنبورعســـل اســـت (Wallberg *et al.*, 2014). حشـــرات گرده‌افشـــان به‌طور چشـــم‌گیری روابط اکولوژیک، حفاظت و پایداری اکوســـیســـتم‌ها، تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی، تنوع گل‌ها و تکامل را متاثر می‌ســـازند (Bahador *et al.*, 2016). زنبورهـــای عســـــل همچنین نقش مهمی در اکوسیستم‌های خاکی یعنی جایی‌که پوشش گیاهی سبز برای حداقل سه تا چهار ماه در سال وجود دارد را دارا می‌باشند. در صورتی‌که زنبورهای عسل از بین بروند بسیاری از گونه‌های گیاهی و حیوانی با خطر انقراض مواجه خواهند شـــد. این امر بدان دلیل است که تولید دانه، هسته و میوه‌ها به‌میزان زیادی وابســـته به گرده‌افشـــانی حشـــرات اســـت و در بین حشـــرات گرده‌افشان، زنبورهای عسل از گرده‌افشان‌های اصلی هستند (Bahador *et al.*, 2016). از ســـوی دیگر اســـتفاده از زهر زنبورعسل، ژل رویال و پروتئین ژل رویال در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان، کاربرد گسترده پیدا کرده است (Taheri *et al.*, 2022)، با این حال نقش گرده‌افشـــانی زنبور عســـل به قدری پررنگ است که ارزش اقتصادی تولیدات مستقیم زنبور عسـل از قبیل عسـل، گرده، ژل رویال و سـایر تولیدات آن، در مقایسه با نقش گرده‌افشانی آن بسیارناچیز است. به طوری که در مطالعات مختلف نقش زنبور عســـل در افزایش تولیدات کشـــاورزی دنیا را ۶۰ تا ۱۴۳ برابر ارزش تولیدات مســـتقیم کندوهای زنبور عسل، برآورد کرده‌اند (Klein *et al.*, 2007). از طرفی، بررســـی های به عمل آمده روشـــن نموده که مکانیســـم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشـتمل بر همانندسـازی DNA، رونویسـی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هســـتند (Arabpour *et al.*, 2021; Mohamadipoor *et al.*, 2021). ماده ژنتیکی[1] یک سـلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشـــد که هیچ‌گاه به‌طور هم‌زمان بیان نمی‌شـــوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Masoudzadeh *et al.*, 2020). نیاز به بیان ژن توســـط محیطی که در آن رشـد می‌کند کنترل می‌شـود و در صـورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به‌صـورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد مـاند (Mohammadabadi, 2019). تنها یک مجموعه نسـبتاً کوچک از تمام ژنوم در هریک از انواع بافت‌ها بیان می‌شـــود و بیان ژن‌ها نیز به مرحله نمو بســـتگی دارد (Mohammadabadi & Asadollahpour, 2021). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصـــاصـــی اســـت. همچنین مقدار محصـــولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شـــود (Mohammadabadi *et al.*, 2021). یکی از اقدامات اساسی در موجودات، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صـــفات مهم و مطالعه آنها در ســـطح سلولی یا کروموزومی است (Shahsavari *et al.*, 2021).

میکروRNAهـا، RNAهـای کوچـک غیر کـدکننـده‌ای هســـتند که تقریباً ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید طول دارند. در میان RNAهای کوچک شناخته شده، میکروRNAها بهترین گروه طبقه‌بندی شـــده به‌لحاظ تعداد، تنوع، روش بیان و عملکرد هســـتند. این RNAهای کوچک غیر کدکننده تنظیم بیان ژن‌ها را با متصـــل شـــدن به چارچوب خوانش باز[2] یا ناحیه ترجمه نشـــده‌ی[3] mRNAهای مخصـــوص با تجزیه و یا جلوگیری از ترجمه mRNA هدف انجام می‌دهند (Bartel, 2004). حدود ۶۰ درصـــد ژن‌های کد کننده پروتئین توســـط miRNAها مورد هـدف قرار گرفتـه و تعـدیـل می‌شـــونـد (Friedman *et al.*, 2009)، به‌گونه‌ای که miRNAها دارای نقش کلیدی در بســـیاری از فرآیندهای بیولوژیکی شـــامل تکوین، تمایز ســـلولی، تکثیر و خزان یاخته‌ای[4] و... می‌باشـــند (Rusek *et al.* 2015). همچنین از miRNAهـا می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی، اهداف تشخیصی، پیش‌آگهی و درمانی برای مدیریت بیماری‌هااســـتفاده کرد (Seyeddokht *et al.*, 2023). در دهه گذشـته کشـف وجود فعل و انفعالات بین گونه‌های مختلف از طریق انتقال غذایی miRNAها یکی از مهمترین دسـتاوردهای بشـر می‌باشـد، که از بین مطالعات انجام شده در این زمینه شاید مهمترین‌شان مربوط به مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2012) بود که نشـان دادند miRNA 168a می‌تولند در خون و بافت پســـتلنداران تغذیه شده با برنج یافت شود و به‌طور شگفت‌انگیزی به‌شکل فعال باقی‌مانده و در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با متابولیســـم کلسترول نقش ایفا کند. تحقیقات ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2012)، محققـان زیـادی را برای بررســـی عمیق‌تر موضـوع انتقال غذایی miRNAها بین ارگانیسـم‌های مختلف سوق داد که نتایج مختلفی توسط گروه‌های تحقیقاتی مستقل، گزارش شد. صرف‌نظر از مطالعات با نتایج متناقض، گزارشات متعـددی در جهت تأییـد انتقال بین گونـه‌ای miRNAهـای گیاهی وجود دارد (Zhang *et al.*, 2012; Petrick *et al.*, 2013; Hirschi, 2012; Witwer, 2012). در مطالعـه‌ای ردیابی miR159 گیاهی با مصـرف منابع غذایی مشـخص در سرم انسان مشاهده شد که به‌طور معکوسی با بروز و پیشرفت سـرطان سـینه مرتبط می‌باشـد. علاوه بر آن تجویز خوراکی miR159 سنتز شده به‌طور معنی‌داری رشد تومورهای پستانی را در موش‌ها مهار می‌کند (Chin *et al.*, 2016). همچنین یکی از شـگفت‌انگیزترین نتایج گزارش شـده در زمینه انتقال غذایی miRNAها در شـاخه بندپایان، مربوط به زنبورعسـل می‌باشد که حاکی از انتقال موفقیت‌آمیز miRNAهای گیاهی از طریق غذا به لارو زنبورعسـل بوده و متعاقباً منجر به تنظیم بیان ژن آن و تغییر فنوتیپی زنبور می‌شـود (Kegan *et al.*, 2017).

1- DNA 2- Open reading frame (ORF) 3- Untranslated region (UTR) 4- Apoptosis

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

با توجه به رابطه اجتناب‌ناپذیر گیاهان و حشرات گرده‌افشان مخصوصاً زنبورعسل (مهمترین حشره گرده‌افشان) از یک طرف و گزارشات مکرر انجام شده در زمینه انتقال غذایی miRNAها بین ارگانیسم‌های مختلف و متعاقباً نقش تنظیمی آن‌ها درموجود میزبان از طرف دیگر، بررسی امکان انتقال غذایی miRNAهای گرده آفتابگردان به بدن زنبور عسل که هدف مطالعه حاضر می‌باشد حائز اهمیت فراوان می‌باشد که در درجه اول منجر به درک وسیعی از فعل و انفعالات صورت گرفته بین این حشره مفید اجتماعی و گیاه میزبان شده و متعاقباً زمینه برای تحقیقات بیشتر در مورد نقش تنظیمی miRNAهای انتقال یافته در موجود میزبان را فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها

آزمایشات مزرعه‌ای، جمع‌آوری گرده آفتابگردان

برای تهیه‌ی گرده آفتابگردان، بعد از اطمینان از سالم بودن کندوهای زنبورعسل از هرگونه بیماری باکتریایی، قارچی و ویروسی، همزمان با گلدهی این گیاه در شهریور ماه ۱۳۹۷، تعدادی کندو به منطقه وسیعی از مزرعه آفتابگردان در منطقه شال قزوین-ایران منتقل شد. در روزهای اوج گلدهی آفتابگردان، تله گرده در ورودی کندوها نصب و گرده به‌محض گیر افتادن در تله گرده جمع‌آوری و به تانک ازت منتقل شد.

جمع‌آوری و تغذیه‌ی زنبورعسل تحت شرایط کنترل شده

آزمایشات تغذیه‌ای زنبورعسل 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 به‌جز 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) درست شده بود و به‌منظور 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. به‌منظور تغذیه زنبورهای داخل قفس، دو سوراخ در قسمت بالایی قفس‌ها برای گذاشتن تیوپ تغذیه و آب تعبیه شده بود (شکل ۱).

شکل ۱- جمع‌آوری زنبورهای پرستار جوان از روی قاب لارو جوان و انتقال آن به داخل قفس
Figure 1. Collecting young nurse bees from the frame of the young larva and transferring it into the cage

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 وتغذیه تحت شرایط کنترل شده استفاده شد. بدین‌ترتیب حدود صد عدد زنبور جوان از هرکدام از کندوها به داخل قفس‌ها منتقل شد. دو عدد از قفس‌ها به‌عنوان شاهد و دو قفس به‌عنوان تیمار تغذیه شده با گرده آفتابگردان در نظر گرفته شد. تیمارها به‌مدت 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 آفتابگردان تغذیه شدند. بعد از اتمام آزمایشات تغذیه‌دهی، با استفاده از سرما زنبورهای تغذیه شده بیهوش شدند و از بافت شکمی زنبورها، قسمت روده میانی[1] برداشته شد و تمامی نمونه‌ها در داخل محلول ترایزول هموژنیزه شد و برای آنالیزهای بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه ذخیره شدند.

استخراج RNA وتوالی‌یابی Small RNA

استخراج RNA کل از گرده آفتابگردان و بافت روده میانی زنبور عسل با استفاده از کیت miRNeasy mini Kit

1- midgut

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

از شرکت کیاژن[1] و طبق دستورالعمل انجام شد. تخریب و آلودگی RNA بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت و خلوص RNA با استفاده از نانوفتومتر (NanoPhotometer® spectrophotometer (IMPLEN, CA, USA)) ارزیابی شد. غلظت RNA با استفاده از کیت Qubit® RNA Assay Kit in Qubit® 2.0 Flurometer انجام گرفت (Life Technologies, CA, USA) و یکپارچگی[2] 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 2500/2000 انجام گرفت. بدین‌ترتیب 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 خوشه‌بندی نمونه‌های کدگزاری شده شاخص بر روی سیستم ایجاد cBot cluster با استفاده از TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumia) طبق دستورات شرکت سازنده ایجاد شد. بعد از ایجاد کلاستر، کتابخانه آماده‌سازی شده بر روی پلت‌فرم ایلومینا Hiseq 2500 و خوانش‌های ۵۰ جفت باز single-end توالی‌یابی شدند.

شناسایی miRNAها

توالی‌های خوانده شده توسط دستگاه توالی‌یابی، توالی‌های خام[1] نامیده می‌شوند. در ادامه دو نوع خوانش اضافی از داده‌های خام miRNAseq حذف شدند: آداپتورهای تعیین توالی وخوانش‌های با پیچیدگی پایین[2] (Martin & Wang, 2011). برای کنترل کیفیت داده‌ها در مطالعه‌ی حاضر از نرم‌افزار FASTQC استفاده شد (Schmiedder & Edwars, 2011)، سپس از نرم‌افزار Trimmomatic برای پیرایش داده‌ها، حذف بازهای با کیفیت پایین و حذف توالی‌های سازگار شده (آداپتوری) استفاده شد (Bolger *et al.*, 2014). به‌طور خلاصه، داده‌های پاک بعد از حذف توالی‌های آداپتورها، توالی Poly-N، توالی‌های با کیفیت پایین وخوانش‌هایی با طول نوکلئوتیدی کمتر از ۱۶ و بیشتر از ۳۰ نوکلئوتید به‌دست آمد. در مرحله بعد توالی‌های پاک گرده آفتابگردان با استفاده از ابزار همردیفی Bowtie (v1.1.2) با پایگاه داده‌های Silva، GtRNAdb، Rfam و Repbase برای فیلتر کردن RNAهای ریبوزومی (rRNA)، RNAهای انتقال دهنده (tRNA)، RNAهای کوچک هسته‌ای (snRNA)، RNA هستکی کوچک (snoRNA)، توالی‌های تکراری و سایر RNAهای غیر کدکننده همردیف شدند. توالی‌های فیلتر شده‌ی پاک برای پیش‌بینی miRNAهای محافظت شده در گرده آفتابگردان با توالی‌های miRNAهای گیاهی بالغ موجود در پایگاه داده miRBase نسخه ۲۲ (http://www.mirbase.org) با استفاده از ابزار همردیفی Bowtie با یک عدم تطابق همردیف شدند. توالی‌های همردیف نشده با miRNAهای گیاهی پایگاه داده miRBase برای پیش‌بینی miRNAهای جدید در آفتابگردان با استفاده از نرم‌افزار miRDeep-P2 (V1.1.3) با یک عدم تطابق به‌کار رفت. برای ردیابی miRNAهای گرده آفتابگردان در بافت روده میانی زنبورعسل از ابزار همردیفی Bowtie با یک عدم تطابق استفاده شد بدین‌ترتیب توالی‌های پاک فیلتر شده زنبورهای گروه تیمار (تغذیه شده با گرده آفتابگردان) و گروه کنترل (تغذیه شده با شربت شکر) با miRNAهای بالغ حشرات از پایگاه داده miRBase برای حذف miRNAهای حفاظت شده حشرات همردیف شدند. توالی‌های همردیف نشده از مرحله‌ی قبل به‌منظور حذف miRNAهای جدید زنبورعسل با ژنوم (ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/metazoa/release-45/fasta/apis_mellifera/dna) این موجود همردیف شدند. در مرحله آخر برای ردیابی miRNAهای آفتابگردان در روده میانی زنبورعسل تغذیه شده با آن، توالی‌های همردیف نشده با ژنوم زنبورعسل با miRNAهای شناسایی شده گرده آفتابگردان در مطالعه حاضر همردیف شدند.

RT-qPCR

جهت راستی‌آزمایی نتایج حاصل از NGS از روش RT-qPCR استفاده شد. برای انجام RT-qPCR از کیت miDETECT A TRACKTM miRNA qRT-PCR Starter (RiboBio Co., Ltd., Guangzhou, China) استفاده شد. برای رونویسی معکوس (RT) از آغازگر برگشت دارای توالی عمومی miDETECT A TRACK TM Uni-RT (Guangzhou RiboBio Co., Ltd., Guangzhou, China) و برای qPCR از آغازگر رفت دارای توالی اختصاصی و آغازگر برگشت دارای توالی عمومی miDETECT A TRACK TM Forward Primer and Uni-Reverse Primer (TCGTATCCAGTGCGTCGAGT) استفاده شد. واکنش RT-qPCR با معرف سایبرگرین در یک پلیت ۹۶ چاهکی با دو تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی با استفاده از ژن کنترل‌گر داخلی اکتین (پرایمر رفت: TGCCAACACTGTCCTTTCTG و پرایمر برگشت: AGAATTGACCCACCAATCC) انجام شد. برنامه زمانی PCR شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم: ۴۰ چرخه شامل: دو ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، مرحله سوم یک چرخه برای ایجاد منحنی ذوب می‌باشد و الگوی بیان نسبی miRNAها با روش CT و ΔCT محاسبه شد (Schmittgen *et al.*, 2008).

نتایج و بحث

شناسایی miRNAهای گرده آفتابگردان

دو نمونه گرده آفتابگردان توسط شرکت Novoene بیجینگ چین با استفاده از Illumina Hiseq 2500/2000 با موفقیت توالی‌یابی شد. خوانش‌ها به صورت single-end بوده و طول آن‌ها ۵۰ جفت باز بود. در مجموع ۳۸۱۶۵۳۱ (نمونه اول گرده آفتابگردان) و ۲۶۴۱۸۴۱ (نمونه دوم گرده آفتابگردان) خوانش خام ایجاد شد که بعد از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، خوانش‌های آلوده، آداپتورهای '3 و '5، و توالی‌های Poly-A ، ۳۷۱۰۴۸۵ و ۲۵۵۹۰۸۰ خوانش پاک در

1-(Qiagen, Valencia, CA, USA)
2- RNA integrity

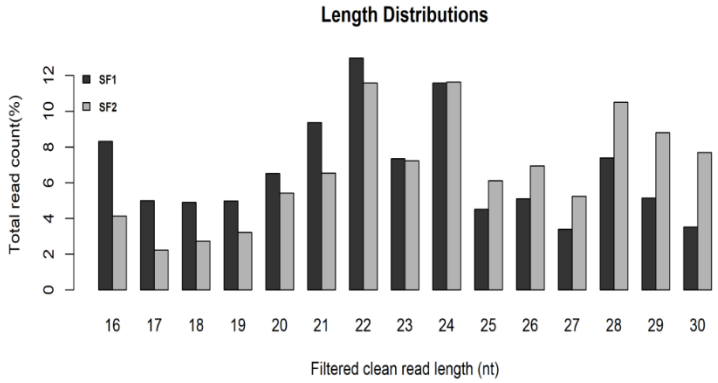
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

نمونه‌های اول و دوم به‌دست آمد. در مرحله بعد، پس از فیلتر کردن خوانش‌های مربوط به rRNAs، tRNAs، snRNAs، snoRNAs، خوانش‌هایی با پیچیدگی پایین و خوانش‌های کمتر از ۱۶ و بیشتر از ۳۰ نوکلئوتید نهایتاً ۲۵۳۰۱۴۴ و ۱۸۰۳۱۷۵ خوانش به‌دست آمد که مرتبط با خوانش‌های شناسایی نشده به‌علاوه خوانش‌های مربوط به miRNAهای گیاهی محافظت شده بود (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های آماری داده‌های RNA کوچک در نمونه‌های گرده آفتابگردان
Table 1. Statistics of small RNA sequences in Sunflower pollen samples

نمونه دوم گرده آفتابگردان The second sample of sunflower pollen	نمونه اول گرده آفتابگردان The first sample of sunflower pollen	انواع Types
2641841	3816531	خوانش خام Raw reads
2559080	3710485	خوانش پاک Clean reads
365507	679142	خوانش‌های مرتبط با rRNA The reads related to rRNAs
106852	106238	خوانش‌های مرتبط با tRNAs The reads related to tRNAs
1439	1001	خوانش‌های مرتبط با snRNA The reads related to snRNA
591	965	خوانش‌های مرتبط باsnoRNA The reads related to snoRNA
883	1677	خوانش‌هایی با پیچیدگی پایین Law Complexity reads
741237	1124634	خوانش‌های مرتبط باmiRNAs The reads related to miRNAs
67	133	خوانش‌های آلوده Contaminated reads
1061938	1405511	خوانش‌های حاشیه نویسی نشده No annotation reads
29186	106904	خوانش‌های منطبق شده با miRNAهای شناخته شده گیاهی Aligned reads against known mature plant miRNAs
495	866	miRNAهای شناخته شده Known miRNAs

توزیع طول RNAهای کوچک فیلتر شده مربوط به گرده آفتابگردان مطابق شکل ۲ می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود در هر دو نمونه بیشترین تعداد فراوانی مربوط به توالی‌های ۲۲ نوکلئوتیدی و سپس توالی‌های ۲۴ نوکلئوتیدی می‌باشد.



شکل ۲- توزیع طول خوانش‌های مربوط به small RNAها در دو نمونه گرده آفتابگردان (SF1, SF2)
Figure 2. Length distribution of small RNA reads in two samples of sunflower pollen

برای شناسایی miRNAهای آفتابگردان، خوانش‌های فیلتر شده‌ی پاک با miRNAهای بالغ گیاهی همردیف شدند که منجر به شناسایی ۸۶۶ و ۴۹۵ miRNA محافظت شده در نمونه‌های اول و دوم گردید. برای دقت بیشتر در مطالعه حاضر، میکروRNAهایی که در هر دو نمونه مشترک بودند برای آنالیز مرحله‌ی بعدی در نظر گرفته شدند که نمونه اول تمام میکروRNAهای نمونه دوم را نیز در برداشت. بنابراین ۴۹۵ میکروRNA شناخته شده برای گرده آفتابگردان در مطالعه حاضر شناسایی شد که این میکروRNAها در آفتابگردان یا سایر گیاهان قبلاً شناسایی شده و در پایگاه miRBase موجود می باشند (جدول ۱). آن دسته از خوانش‌هایی که با میکروRNAهای گیاهی miRBase منطبق نشدند برای پیش‌بینی میکروRNAهای جدید در آفتابگردان به‌کار رفتند. برای این منظور از به‌روزترین، با دقت‌ترین و سریع‌ترین نرم‌افزار پیش‌بینی میکروRNA در گیاهان با نام miRDeep-P2 استفاده شد که خوانش‌های موجود را با ژنوم آفتابگردان هم‌ردیف کرده و میکروRNAها را پیش‌بینی می‌کند، همچنین این نرم‌افزار قادر به پیش‌بینی ساختار دوم RNA با استفاده از بسته Veienna می‌باشد. شانزده میکروRNA جدید توسط این نرم‌افزار برای گرده

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

آفتابگردان مشخص شد. miRNAهای مشترک بین دو نمونه گرده آفتابگردان که متعلق به ۱۰ خانواده بوده و با عنوان Han-novel-miR100-110 نام‌گذاری شدند، که همه این miRNAها ساختار سنجاق سری داشتند. اندازه miRNAهای جدید پیش‌بینی شده بین ۲۰ تا ۲۲ نوکلئوتید بودند (جدول ۲).

جدول ۲- ویژگی‌های miRNAهای جدید شناسایی شده در گرده آفتابگردان
Table 2. Characteristics of novel miRNAs in sunflower pollen

میکروRNAها miRNAs	خانواده family	توالی miRNAها miRNAs sequence	شناسه کروموزوم chromosome id	جهت رشته strand direction	طول length	حداقل انرژی آزاد minimum free energy
Han-novel-miR-100-5P	Han-novel-miR-100	CGGGCTCAGACACCTGTGCTG	17	-	21	-54.8
Han-novel-miR-101-3P	Han-novel-miR-101	CCCGCCTTGCATCAAGTGAAT	6	+	21	-40.4
Han-novel-miR-102-5P	Han-novel-miR-102	GGAATGTTGTCTGGCTCGAGG	3	+	21	-58.3
Han-novel-miR-102-5P		GGAATGTTGTCTGGCTCGAGA	6	-	21	-48.5
Han-novel-miR-103-3P	Han-novel-miR-103	CCCGCCTTGCATCAAGTGAAT	17	-	21	-42.3
Han-novel-miR-104-3P	Han-novel-miR-104	AAGGTGTAGTTTTTTTGAAA	8	-	21	-36.3
Han-novel-miR-105-3P-a	Han-novel-miR-105	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT	11	+	21	-69.4
Han-novel-miR-105-3P-b		TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT	7	-	21	-64.4
Han-novel-miR-105-3P-c		TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT	14	+	21	-68.9
Han-novel-miR-106	Han-novel-miR-106	CGGGCTCAGACACCTGTGCTG	17	+	21	-54.8
Han-novel-miR-107	Han-novel-miR-107	TCGGACCAGGCTTCATTCCTC	10	-	21	-41.1
Han-novel-miR-108	Han-novel-miR-108	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	14	+	22	-56.7
Han-miR-novel-109	Han-miR-novel-109	TCGGACCAGGCTTCATTCCCCC	2	+	22	-75.1
Han-miR-novel-110-a	Han-miR-novel-110	TTCAATAAAGCTGTGGGAAGA	3	+	21	-34.9
Han-miR-novel-110-b		TTCAATAAAGCTGTGGGAAGA	12	+	21	-32
Han-miR-novel-110-c		TTCAATAAAGCTGTGGGAAGA	9	+	21	-38

مطالعات نشان می‌دهد که انرژی منفی پایین یکی از ویژگی‌های مهم miRNAها می‌باشد (Bonnet *et al.*, 2004). در مطالعه حاضر حداقل انرژی آزاد پیش‌روهای میکروRNAهای جدید پیش‌بینی شده بین ۳۲- تا ۷۵/۱- می‌باشد که به‌طور متوسط ۵۰/۹۹ - کیلوکالری بر مول درنظر می‌گیریم که پایین‌تر از انرژی آزاد rRNAها و tRNAهاست.

نتایج حاصل از توالی‌یابی تیمارهای زنبورعسل

در مجموع ۲۰۳۰۱۴۲ (نمونه اول تیمار تغذیه شده با آفتابگردان)، ۳۹۷۵۲۶۷ (نمونه دوم تیمار تغذیه شده با آفتابگردان)، ۲۶۶۰۲۶۰ (کنترل ۱) و ۴۲۵۱۵۰۵ (کنترل ۲) خوانش خام در توالی‌یابی با توان بالا توسط پلت‌فرم ایلومینا Hiseq 2500 در تیمار تغذیه شده با گرده آفتابگردان و تیمار تغذیه شده با شربت شکر به‌عنوان کنترل هرکدام با دو تکرار بیولوژیکی ایجاد شد. بعد از پیش‌پردازش داده‌ها یعنی حذف آداپتورهای 3′ و 5′، توالی‌های حاوی poly-A، خوانش‌های با کیفیت پایین و خوانش‌های آلوده به‌ترتیب ۱۶۹۶۶۹۷ (تیمار اول)، ۳۴۴۹۵۹۹ (تیمار دوم)، ۲۵۵۸۹۱۶ (کنترل اول)، ۴۰۹۳۲۴۴ (کنترل دوم) خوانش پاک به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳- ویژگی‌های آماری داده‌های small RNA در زنبورهای عسل تغذیه شده با گرده آفتابگردان (تیمار) و زنبورهای تغذیه شده با شربت شکر (گروه کنترل) برای ردیابی miRNAهای گیاهی
Table 3. Statistics of small RNA sequences in sunflower pollen-treated and sugar syrup-treated (control) honey bees for detection of plant miRNAs

تکرار دوم تیمار *Treatment 2	تکرار اول تیمار *Treatment 1	تکرار دوم کنترل Control 2	تکرار اول کنترل Control 1	انواع Types
3975267	2030142	4251505	2660260	خوانش خام (Raw reads)
3449599	1696697	4093244	2558916	خوانش پاک (Clean reads)
1079158	642603	1336965	1096486	خوانش‌های مرتبط با rRNA Reads related to rRNA
319453	144150	108148	68118	خوانش‌های مرتبط با tRNA Reads related to tRNA
39478	16751	27042	40226	خوانش‌های مرتبط با snRNA Reads related to snRNA
6974	2920	4814	5071	خوانش‌های مرتبط با snoRNA Reads related to snoRNA
3269	1414	10068	4176	خوانش‌های با پیچیدگی پایین Law complexity reads
850	505	4851	938	خوانش‌های آلوده Contaminated reads
140928	65904	573125	111446	خوانش‌های مرتبط با miRNAهای زنبورعسل Reads related to Apis mellifera miRNAs
2899	1483	21525	6097	خوانش‌های مرتبط باmiRNA های دیگر حشرات Reads related to other insect miRNAs
1421167	623295	1202178	801690	خوانش‌های شناسایی نشده No annotation reads
543661	226332	735370	410890	خوانش‌های منطبق شده با ژنوم زنبورعسل Reads mapped against Apis mellifera genome
10632	4520	73	56	خوانش‌های منطبق شده با miRNAهای گرده آفتابگردان Aligned reads to sunflower pollen_miRNAs
31	11	0	0	شمار miRNAهای ردیابی شده در زنبورعسل تغذیه شده با گرده آفتابگردان Count of detected miRNAs in sunflower pollen-treated honey bees

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

*Honey bees fed with Sunflower Pollen (first and second replication)

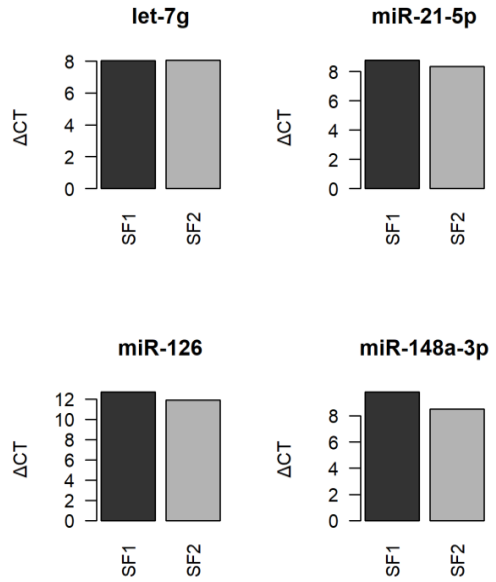
برای ردیابی miRNAهای گیاهی در بافت زنبورعسل باید مرحله به مرحله تمام توالی‌های دیگر به‌غیر از miRNAهای گیاهی از این داده‌ها حذف شود، برای این‌منظور براساس سلسله مراتب ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها، شناسایی و حذف سایر RNAهای کوچک به‌غیر از miRNAها، miRNAهای محافظت شده مرتبط باحشرات

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

کـه در پـایگـاه داده miRbase ثبـت شـــده و همچنین miRNAهای جدید مرتبط با زنبورعســـل نهایتاً ۳۹۶۹۶۳ (نمونه اول تیمار تغذیه شـــده با آفتابگردان)، ۸۷۷۵۰۶ (نمونه دوم تیمار تغذیه شـــده با آفتابگردان)، ۳۹۰۸۰۰ (کنترل اول) و ۴۶۶۸۰۸ (کنترل دوم) خوانش برای هم‌ردیفی با miRNAهای گیاهی به‌دســـت آمد. در اثر همردیفی خوانش‌های مربوط به تیمار تغذیه شده با گرده آفتابگردان و تیمار کنترل زنبورعسل با miRNAهای شـناسـایی شـده برای گرده آفتابگردان در مطالعه حاضـــر (۴۹۵ میکروRNA حفاظت شـــده و ۱۶ میکروRNA جدید) ۴۵۲۰، ۱۰۶۳۲، ۵۶، ۷۳ خوانش به‌ترتیب در تکرار اول و دوم تیمـار گرده آفتـابگردان و تیمـار کنترل هم‌ردیف شـدند که منجر به ردیابی ۱۱ و ۳۱ میکروRNA در دو تکرار بیولوژیکی مربوط بـه تیمـار تغـذیـه شـــده بـا گرده آفتابگردان شـــد و در گروه کنترل هیچ miRNA مشـــترکی ردیـابی نشـــد (جـدول ۳). برای افزایش صـــحـت آنـالیز، miRNAهای مشـــترک ردیابی شـــده در دو تکرار مربوط به تیمار آفتابگردان برای مرحله بعدی آنالیز انتخاب شـــدند که یازده miRNAی تکرار اول تیمار گرده آفتابگردان در تکرار دوم نیز موجود بود. miRNAهای مشترک شناسایی شده در دو نمونه تیمار تغذیه شـده با آفتابگردان شـامل: miR-148a، miR-26a، miR-21-5p، miR-143، miR-27a، miR-203، let-7g، miR-126، miR-30d، miR-101 و miR-103 بودند.

راســـتی آزمایی نتایج حاصـــل از NGS بـا اســـتفاده از روش RT-qPCR

بررســـی الگوی بیان چهار مورد (let-7g، miR-21-5p، miR-126 و miR-148a) از miRNAهای آفتابگردان منتقل شده به بدن زنبورعسل با استفاده از روش RT-qPCR نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی را تأیید کرد. به‌عبارت دیگر این miRNAها تنها در گروه تیمار بیان داشـتند و در گروه کنترل هیچ بیانی برای آن‌ها ثبت نشد (شکل ۳).



شکل ۳- الگوی بیان miRNAهای آفتابگردان منتقل شده از طریق غذا به بافت روده میانی زنبورعسل که تنها در گروه تیمار بیان داشتند (SF1 و SF2 نمونه‌های اول و دوم آفتابگردان هستند).

Figure 3. The expression pattern of sunflower miRNAs transferred through food to the body of honey bees, which were expressed only in the treatment group. (SF1 and SF2 are the first and second samples of sunflower)

فرضـــیه انتقال غذایی میکروRNAها هم‌زمان با ظهور گیاهان و حیوانات مهندسی ژنتیک شده و پیامدهای ناشناخته مصـرف انسـان از جیره‌ها پر رنگ‌تر شـده اسـت. این مسـأله تأثیرات عمیقی بر درک تأثیر غذاهای طبیعی و تغییر ژنتیکی شـــده در همه ارگانیســـم‌ها دارد به‌عنوان مثال اخیراً علاقه قابل‌توجهی در به‌کارگیری dsRNA[1] و miRNA بالقوه بیان شـــده در گیاهان برای کنترل آفات حشـــرات (Mao *et al.*, 2007; Huvenne & Smagghe, 2010) و تـأثیر عملکرد حشـرات سـودمند مانند زنبورعسـل وجود دارد. پاسـخ به این سـوال که مکانیسـم جذب miRNAهای اندوژنوس در غذای معمول ارگانیسم‌های مختلف چقدر رایج و مؤثر می‌باشد بدون جواب مانده است. برای این منظور Jonathan *et al* (2013) در مطالعـه‌ای ابتـدا miRNAهـایی بـا ســـطوح بـالای بیـان (miR156a،miR159 و miR169) را در غـذاهـای معمول مصرفی در سه ارگانیسم انسان، موش و زنبورعسل پیدا کرده و بعد از تغذیه ارگانیســـم‌ها با این غذاها، مقدار ناچیزی از miRNAهای گیاهی در بافت‌های هر سه ارگانیسم مشاهده شد. بعد از تغذیه زنبورعسل با گرده و عسل که حاوی سطوح

[1] Double stranded RNA

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

بالایی از سه miRNA ذکر شده بودند فقط miR156a در بافت شکمی زنبور پرستار و چراگر به‌مقدار کمی دیده شد درحالی‌که miR159a و miR169a وجود نداشتند. در پژوهشی دیگر، بعد از تغذیه کنترل شده زنبوران پرستار با گرده، افزایش miRNAهای گیاهی در روده میانی مشاهده شد، ولی هیچ‌گونه شواهد بیولوژیکی مرتبط با وجود این مولکول‌ها در بافت‌های proximal و distal زنبورهای تغذیه شده با گرده مشاهده نشد (Masood *et al.*, 2016). در حالی‌که مطالعه‌ی حاضر شواهدی را مبنی بر انتقال موفقیت‌آمیز تعدادی از miRNAهای آفتابگردان به روده میانی زنبورعسل ارائه می‌دهد. ما نشان دادیم که انتقال غذایی miRNAهای گیاهی به روده میانی زنبورعسل تحت شرایط تغذیه کنترل شده اتفاق می‌افتد.

توانایی miRNAها برای تنظیم بیان ژن بین فرمانروهای مختلف در ویروس‌ها و پارازیت‌ها نشان داده شده است (Pfeffer *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016). در سال ۲۰۰۹، محققان شرکت مونسانتو[1] نشان دادند که بسیاری از miRNAهای درون‌زاد[2] گیاهی، مکمل ژن‌های انسانی و سایر پستانداران بوده و آن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد (Ivashuta *et al.*, 2009). به‌دنبال این مطالعه تیم تحقیقاتی پروفسورژانگ (2011) از دانشگاه نانجینگ[3] تأیید کردند که miR-168a گیاهی می‌تواند توسط دستگاه گوارش در سلول‌های کبدی جذب شده و بیان آداپتور گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین پروتئین ۱[4] (LDLRAP1) در انسان و موش را مهار کرده و سرانجام باعث کاهش حذف LDL از پلاسمای موش می‌شود (Zhang *et al.*, 2012). مطالعات اخیر در شاخه بندپایان حاکی از انتقال موفقیت آمیز RNAهای کوچک از طریق غذا به بدن شماری از حشرات بوده که منجر به تنظیم بیان ژن آن‌ها 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 به‌سمت زنبور ملکه یا زنبور کارگر تعیین می‌کند (Kegan *et al.*, 2017). این محققان دریافتند که RNAهای گیاهی مخصوصاً میکروRNAها که در نان زنبور نسبت به ژله‌رویال بیشتر وجود دارند، رشد و تمایز زنبور را به تأخیر انداخته، باعث کاهش اندازه‌بدن و کاهش اندازه تخمدان در لارو زنبور عسل کارگر می‌شود. بررسی‌های بیشتر نشان داد که ژن amTOR که به‌عنوان عامل محرک در تمایز نوع زنبور عسل (کارگر یا ملکه) معرفی شده، هدف مستقیم miR162a گیاهی است. برای تأیید نتایج به‌دست آمده آزمایش مشابه در دروزوفیلا انجام گرفت به‌طوری‌که در دروزوفیلای تغذیه شده با میکروRNA گیاهی، کاهش اندازه بدن و کاهش اندازه تخمدان مشاهده شد. به‌عبارت دیگر، منابع غذایی مهم در لارو کارگر و ملکه که به‌ترتیب نان زنبور (مخلوطی از عسل و گرده) و ژله‌رویال (ماده ترشحی از غذذ ملندیبولار زنبورهای پرستار) می‌باشد منشأ گیاهی و حیوانی داشته، پس می‌توان گفت که میکروRNAهای غذای لارو از منشأهای متفاوت در نمو و تمایز زنبورعسل مؤثر بوده و باعث تغییر شکل فنوتیپ زنبور عسل می‌شوند. نقش بالقوه miRNAهای گیاهی در گرو این حقیقت هست که با توجه به نوع حیوانی، آن‌ها به‌وسیله‌ی نوکلئوتید انتهایی 3' که قند در موقعیت ۲ متیله می‌شود مشخص می‌شوند که این ویژگی miRNAهای گیاهی را بسیار پایدار و مقاوم در برابر شرایط سخت محیطی (pH پایین و تغییرات دمایی) کرده و باعث جذب آن‌ها به‌وسیله‌ی موکوس روده می‌شود (Zhang *et al.*, 2012; Vickers *et al.*, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

با گذشت تقریباً یک دهه از شروع مطالعات مربوط به انتقال غذایی miRNAها بین گونه‌های مختلف، گزارشات متناقضی در این زمینه وجود دارد و این بحث همچنان چالش برانگیز بوده و نیاز به تحقیقات گسترده‌ای دارد. نتایج پژوهش حاضر، به‌طور واضح انتقال miRNAهای گیاهی به بدن زنبور عسل تحت شرایط تغذیه کنترل شده را تأیید می‌کند با توجه به ارتباط ناگسستنی زنبور عسل و گیاهان و نقش اساسی این حشره در گرده‌افشانی از یک طرف و همچنین بحث داغ انتقال غذایی miRNAهای گیاهی بین گونه‌های مختلف و نقش تنظیمی آن‌ها در بیان ژن موجود میزبان از طرف دیگر، وجود ارتباط مولکولی بین این حشره مفید و گیاه میزبان از طریق miRNAها می‌تولند ابعاد گسترده‌ای از فواید این ارتباط را روشن کرده و زمینه را برای مطالعات گسترده‌تر فراهم می‌کند.

References

Arabpour, Z., Mohammadabadi, M., & Khezri, A. (2021). The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal*, *13* (4), 183-200.

Ashby, R., Forêt, S., Searle, I., & Maleszka, R. (2016). MicroRNAs in honey bee caste determination. *Scientific Reports*, *6*(1), 1-5.

Bahador, Y., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Asadi, M., & Medhati, L. (2016). Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. *Research on Animal Production*, *7*(13), 192-186. [In Persian]

Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*, 281-97.

Chin, A. R., Fong, M. Y., Somlo, G., Wu, J., Swiderski, P., Wu, X., & Wang, S.E. (2016). Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant MIR159. *Cell Research*, *26*, 217–228.

[1] Monsanto Company
[2] Endogenous
[3] Nanjing University
[4] Low-density lipoprotein receptor adapter protein 1

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, *19*(2), 43–51.

Ebadi, R., & Ahmadi, A. (2004). Honey bee culture. First edition, Arkan Press. [In Persian]

Fire, A., Xu, S., Montgomery, MK., Kostas, SA., Driver, SE., & Mello, C C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, *391(*6669), 806.

Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92-105.

Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S., & Sela, I. (2012). Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and Varroa destructor: Varroa gene silencing reduces Varroa population. *PLoS Pathogen*, *8*, e1003035.

Hirschi, K. D. (2012). New foods for thought. *Trends Plant Science*, *17*, 123-5.

Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L., Schmittgen, T.D., & Nana-Sinkam, S.P. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS One*, *3*(11), e3694.

Huvenne, H., & Smagghe, A. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, *56*, 227-35.

Ivashuta, S. I., Petrick, J. S., Heisel, S. E., Zhang, Y., Guo, L., Reynolds, T. L., Rice, J.F., Allen, E., & Roberts, J. K. (2009). Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 353–360.

Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B.E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., Meyer, S.E., Kerstetter, R. A., McNulty, B. C., Bolognesi, R., & Heck, G.R. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, *21*(5), 840-50.

Jarosch, A., & Moritz, R. F. A. (2011). Systemic RNA-interference in the honeybee Apis mellifera: tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. *Journal of Insect Physiology*, *57*, 851-7.

Jonathan, W. S., Andrew, E., Stephanie, K., Aaron., L. B., & Stephen, Y. C. (2013). Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biology*, *10*(7), 1107-1116.

Klein, A. M., Vaissiere, B.E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Imortance of pollinators in changing landscape for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1608), 303-313.

Lee, H. R., Mitra, J., Lee, S., Gao, S. J., Oh, T. K., Kim, M. H., Ha, T., & Jung, J. U. (2016). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 (virf4) perturbs the g1-s cell cycle progression via deregulation of the cyclin d1 gene. *Journal of Virology*, *90*, 1139–1143.

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.

Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., Huang, Y. P., & Chen, X. Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, *25*(11), 1307-13.

Masood, M., Everett, C. P., Chan, S. Y., & Snow, J. W. (2016). Negligible uptake and transfer of diet-derived pollen microRNAs in adult honey bees. *RNA Biology*, *13*(1), 109-18.

Masoudzadeh, S. H., Mohammadabadi, M. R., Khezri, A., Kochuk-Yashchenko, O. A., Kucher, D. M., Babenko, O. I., ... & Titarenko, I. V. (2020). *Dlk1* gene expression in different Tissues of lamb. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *10*, 669-677.

Mohamadipoor Saadatabadi, L., Mohammadabadi, M., Amiri Ghanatsaman, Z., Babenko, O., Stavetska, R., Kalashnik, O., ... & Asadollahpour Nanaei, H. (2021). Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Veterinary Research*, *17*(1), 1-9.

Mohammadabadi, M., Masoudzadeh, S. H., Khezri, A., Kalashnyk, O., Stavetska, R. V., Klopenko, N. I., ... & Tkachenko, S. V. (2021). Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon*, *7*(12).

Mohammadabadi, M. (2019). Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal*, *11*, 219-235.

Mohammadabadi, M., & Nanaei, H. A. (2021). Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using real time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal*, *13*, 197-214.

Nazzi, F., Brown, S. P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., & Pennacchio, F. (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens*, *8*(6), e1002735.

Petrick, J. S., Brower-Toland, B., Jackson, A. L., & Kier, L. D. (2013). Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNAmediated gene regulation to achieve desired traits: a scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *66*, 167-76.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., & Sander, C. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, *304*, 734–736.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]

Rusek, A. M., Abba, M., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Niklinski, J. & Allgayer, H. (2015). MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. *Molecular Cancer*, *14*(1), 34.

Seyeddokht, A., Rahmaninia, J., Karami, H. (2023). Classification of microRNA precursors using reduced features of dinucleotide repeats in cattle (*Bos Taurus*). *Research on Animal Production, 14*(41), 33-44. [In Persian]

Shahsavari, M., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Asadi Fozi, M., Babenko, O., Kalashnyk, O., ... & Tkachenko, S. (2023). Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Animal Biotechnology*, *34*(4), 882-892.

Taheri, M., & Rezaei, M. (2022). The Effect of using Organic Acid, Prebiotics and Probiotics as a Supplement in Stimulant Syrup on the Performance of Iranian Bee Colonies. *Research on Animal Production*, *13*(36), 172-178. [In Persian]

Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans. *Gene*, *263*, 103-12.

Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, *13*, 423-433.

Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., & Dahle, B. (2014). Worldwidw survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, *46*, 1081-1088.

Wang, Z. Z., Ye, X. Q., Shi, M., Li, F., Wang, Z. H., & Zhou, Y. N. (2018). Parasitic insect-derived miRNAs modulate host development. *Nature Communication*, *9*(1),1-9.

Waster, N. M., & Ollerton, J. (2006). Plant-pollinator interactions: From specialization to generalization. University of Chicago Press, *98*(4), 899-900.

Witwer, K. W. (2012). XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease: evidence that diet and dietary miRNAs directly and indirectly influence circulating miRNA profiles. *RNA Biology*, *9*, 1147-54.

Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., & Caccia, S. (2012). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, *20*, 4-14.

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., & Zhang, Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, *22*(1), 107-26.

Zhang, Y., Wiggins, B. E., Lawrence, C., Petrick, J., Ivashuta, S., & Heck, G. (2012). Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics*, *13*, 1-1.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-05-01]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.117]