

Research Paper

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

Leila Gharehdaghi¹, Gholamhosein Tahmasbi² and Taher Harkinezhad³

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 the peak 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



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

مقاله پژوهشی

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

لیلا قره‌داغی^{1b}، غلامحسین پهماسبی² و طاهر هرکی‌نژاد³

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 مسؤل: 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 پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۴

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، به طوری که 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. به طوری که 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 به طوری که گیاهان می‌توانند بیان ژن حشرات گرده‌افشان را از طریق انتقال RNAهای کوچک کنترل کنند. به بیان دیگر، miRNAها نه تنها 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. بدین منظور، مطالعه حاضر که با هدف بررسی وجود ارتباط مولکولی بین این حشره مفید اجتماعی و گیاه میزبان از طریق انتقال غذایی miRNAها 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 شمال قزوین-ایران در روزهای اوج گلدهی گیاه مذبور انجام 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. بدین ترتیب 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 به مدت 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 تریازول 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 کیازن انجام گرفت و نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت Novogene بیجینگ چین فرستاده شد. بعد از توالی‌یابی موفقیت‌آمیز 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 miRNA (miR-203, miR-27a, miR-143, miR-21-5p, miR-26a, miR-148a, miR-103, miR-101, miR-30d, miR-126, 7g, miR-21-1, det-7g) برای راستی‌آزمایی نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی، به‌طور تصادفی الگوی بیان چهار مورد از miRNAهای منتقل شده (miR-21-1, det-7g, miR-126, 5p, 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 رژیم 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

مقدمه

از ابتدای آفرینش گیاهان و حشرات، پیوند نزدیکی بین آن‌ها برقرار شده که تکامل و بقا آن‌ها را تضمین می‌کند. به عبارت دیگر، گیاهان برای تولیدمثل، انتشار و پایداری خود، به گرده‌افشانی وابسته‌اند. از سوی دیگر، حشرات گرده‌افشان مانند زنبور عسل نیز برای تغذیه از شهد و گرده گل‌ها به آن‌ها وابسته می‌باشند (Ebadi & Ahmadi, 2004). زنبور عسل به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص، مهمترین گرده‌افشان روی کره زمین محسوب می‌شود به طوری که تقریباً یک سوم غذای بشر به طور مستقیم و غیرمستقیم وابسته به گرده‌افشانی زنبور عسل است (Wallberg et al., 2014). حشرات گرده‌افشان به طور چشم‌گیری روابط اکولوژیک، حفاظت و پایداری اکوسیستم‌ها، تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی، تنوع گل‌ها و تکامل را متاثر می‌سازند (Bahador et al., 2016). زنبورهای عسل همچنین نقش مهمی در اکوسیستم‌های خاکی یعنی جایی که پوشش گیاهی سبز برای حداقل سه تا چهار ماه در سال وجود دارد را دارا می‌باشند. در صورتی که زنبورهای عسل از بین بروند بسیاری از گونه‌های گیاهی و حیوانی با خطر انقراض مواجه خواهند شد. این امر بدان دلیل است که تولید دانه، هسته و میوه‌ها به میزان زیادی وابسته به گرده‌افشانی حشرات است و در بین حشرات گرده‌افشان، زنبورهای عسل از گرده‌افشان‌های اصلی هستند (Bahador et al., 2016). از سوی دیگر استفاده از زهر زنبور عسل، 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 گرده‌افشانی زنبور عسل به قدری پررنگ است که ارزش اقتصادی تولیدات مستقیم زنبور عسل از قبیل عسل، گرده، ژل رویال و سایر تولیدات آن، در مقایسه با نقش گرده‌افشانی آن بسیار ناچیز است. به طوری که در مطالعات مختلف نقش زنبور عسل در افزایش تولیدات کشاورزی دنیا را ۶۰ تا ۱۴۳ برابر ارزش تولیدات مستقیم کندوهای زنبور عسل، برآورد کرده‌اند (Klein et al., 2007). از طرفی، بررسی‌های به عمل آمده روشن نموده که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Arabpour et al., 2021; Mohamadipoor et al., 2021). 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 (Masoudzadeh et al., 2020). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi, 2019). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هریک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و بیان ژن‌ها نیز به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi & Asadollahpour, 2021). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در

سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al., 2021). یکی از اقدامات اساسی در موجودات، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Shahsavari et al., 2021). میکروRNAها، RNAهای کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که تقریباً ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید طول دارند. در میان RNAهای کوچک شناخته شده، میکروRNAها بهترین گروه طبقه‌بندی شده به لحاظ تعداد، تنوع، روش بیان و عملکرد هستند. این RNAهای کوچک غیر کدکننده تنظیم بیان ژن‌ها را با متصل شدن به چارچوب خوانش باز^۲ یا ناحیه ترجمه نشده^۳ mRNAهای مخصوص با تجزیه و یا جلوگیری از ترجمه mRNA هدف انجام می‌دهند (Bartel, 2004). حدود ۶۰ درصد ژن‌های کدکننده پروتئین توسط miRNAها مورد هدف قرار گرفته و تعدیل می‌شوند (Friedman et al., 2009)، به گونه‌ای که miRNAها دارای نقش کلیدی در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی شامل تکوین، تمایز سلولی، تکثیر و خزان یاخته‌ای^۴ ... می‌باشند (Rusek et al., 2015). همچنین از miRNAها می‌توان به عنوان نشانگرهای زیستی، اهداف تشخیصی، پیش‌آگهی و درمانی برای مدیریت بیماری‌ها استفاده کرد (Seyeddokht et al., 2023). در دهه گذشته کشف وجود فعل و انفعالات بین گونه‌های مختلف از طریق انتقال غذایی miRNAها یکی از مهمترین دستاوردهای بشر می‌باشد، که از بین مطالعات انجام شده در این زمینه شاید مهمترین‌شان مربوط به مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2012) بود که نشان دادند miRNA 168a می‌تولند در خون و بافت پستانداران تغذیه شده با برنج یافت شود و به طور شگفت‌انگیزی به شکل فعال باقی‌مانده و در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم کلسترول نقش ایفا کند. تحقیقات ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2012)، محققان زیادی را برای بررسی عمیق‌تر موضوع انتقال غذایی miRNAها بین ارگان‌های مختلف سوق داد که نتایج مختلفی توسط گروه‌های تحقیقاتی مستقل، گزارش شد. صرف نظر از مطالعات با نتایج متناقض، گزارشات متعددی در جهت تأیید انتقال بین گونه‌ای miRNAهای گیاهی وجود دارد (Zhang et al., 2012; Petrick et al., 2012; Zhang et al., 2012; Hirschi, 2012; Witwer, 2012). در مطالعه‌ای ردیابی miR159 گیاهی با مصرف منابع غذایی مشخص در سرم انسان مشاهده شد که به طور معکوسی با بروز و پیشرفت سرطان سینه مرتبط می‌باشد. علاوه بر آن تجویز خوراکی miR159 سنتز شده به طور معنی‌داری رشد تومورهای پستانی را در موش‌ها مهار می‌کند (Chin et al., 2016). همچنین یکی از شگفت‌انگیزترین نتایج گزارش شده در زمینه انتقال غذایی miRNAها در شاخه بندپایان، مربوط به زنبور عسل می‌باشد که حاکی از انتقال موفقیت‌آمیز miRNAهای گیاهی از طریق غذا به لارو زنبور عسل بوده و متعاقباً منجر به تنظیم بیان ژن آن و تغییر فنوتیپی زنبور می‌شود (Kegan et al., 2017).

تعدادی کندو به منطقه وسیعی از مزرعه آفتابگردان در منطقه شمال قزوین-ایران منتقل شد. در روزهای اوج گلدهی آفتابگردان، تله‌گرده در ورودی کندوها نصب و گرده به‌محض گیر افتادن در تله‌گرده 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).

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 ارگانسیم‌های مختلف و متعاقباً نقش تنظیمی آن‌ها در موجود میزبان از طرف دیگر، بررسی امکان انتقال غذایی miRNAهای گرده‌افشان در 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،



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

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^۱ برداشته شد و تمامی نمونه‌ها در داخل محلول تریازول هموژنیزه شد و برای آنالیزهای بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه ذخیره شدند.

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

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 به‌عنوان شاهد و دو قفس به‌عنوان تیمار تغذیه شده با گرده استخراج RNA و توالی‌یابی Small RNA

تطابق به کار رفت. برای ردیابی miRNAهای گرده آفتابگردان در بافت روده میانی زنبورعسل از ابزار هم‌ردیفی Bowtie با یک عدم تطابق استفاده شد بدین ترتیب 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 به منظور حذف miRNAهای جدید زنبورعسل با <ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/metazoa/release-> 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 کیت-miDETECT A TRACK™ miRNA qRT-PCR Starter (RiboBio Co., Ltd., Guangzhou, China) استفاده شد. برای رونویسی معکوس (RT) از آغازگر برگشت دارای توالی عمومی miDETECT A TRACK™ Uni-RT (Guangzhou, China) و برای qPCR از آغازگر رفت دارای توالی اختصاصی و آغازگر برگشت دارای توالی عمومی miDETECT A (TCGTATCCAGTGCCTCGAGT) TRACK™ Forward Primer and Uni-Reverse Primer 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 کنترل گر 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

از شرکت کایژن^۱ 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 Fluorometer (Life Technologies, CA, USA) انجام گرفت. و یکپارچگی RNA با استفاده از کیت RNA Nano 600 Assay of the Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies) توالی‌یابی توسط شرکت Novogene بیجینگ چین (<https://en.novogene.com/>) با استفاده از Illumina Hiseq 2500/2000 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 خوشه‌بندی نمونه‌های کدگذاری شده شاخص بر روی سیستم ایجاد cBot cluster با استفاده از TruSeq SR (Illumia) Cluster Kit v3-cBot-HS 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^۱ نامیده می‌شوند. در ادامه دو نوع خوانش اضافی از داده‌های خام miRNAseq حذف شدند: آداپتورهای تعیین توالی و خوانش‌های با پیچیدگی پایین^۲ (Martin & Wang, 2011). برای کنترل کیفیت داده‌ها در مطالعه‌ی حاضر از نرم‌افزار FASTQC استفاده شد (Schmiedder & Edwards, 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، 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 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

۱۸۰۳۱۷۵ خوانش به‌دست آمد که مرتبط با خوانش‌های شناسایی نشده به‌علاوه خوانش‌های مربوط به miRNA گیاهی محافظت شده بود (جدول ۱).

نمونه‌های اول و دوم به‌دست آمد. در مرحله بعد، پس از فیلتر کردن خوانش‌های مربوط به rRNAs، tRNAs، snRNAs، و snoRNAs، خوانش‌هایی با پیچیدگی پایین و خوانش‌های کمتر از ۱۶ و بیشتر از ۳۰ نوکلئوتید نهایتاً ۲۵۳۰۱۴۴ و

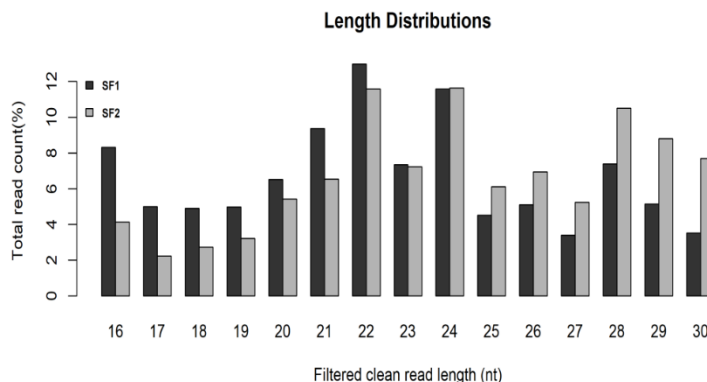
جدول ۱- ویژگی‌های آماری داده‌های RNA کوچک در نمونه‌های گرده آفتابگردان

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 با snoRNA The reads related to snoRNA
883	1677	خوانش‌هایی با پیچیدگی پایین Law Complexity reads
741237	1124634	خوانش‌های مرتبط با miRNAs 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

توالی‌های ۲۲ نوکلئوتیدی و سپس توالی‌های ۲۴ نوکلئوتیدی می‌باشد.

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



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 می‌باشند (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 Vienna می‌باشد. شانزده میکروRNA جدید توسط این نرم‌افزار برای گرده

آفتابگردان مشخص شد. miRNAهای مشترک بین دو نمونه 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 گرفته 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

میکرو miRNAها 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	CCCGCTTGCATCAAGTGAAT	6	+	21	-40.4
Han-novel-miR-102-5P	Han-novel-miR-102	GGAAATGTTGCTGGCTCGAGG	3	+	21	-58.3
Han-novel-miR-102-5P		GGAAATGTTGCTGGCTCGAGA	6	-	21	-48.5
Han-novel-miR-103-3P	Han-novel-miR-103	CCCGCTTGCATCAAGTGAAT	17	-	21	-42.3
Han-novel-miR-104-3P	Han-novel-miR-104	AAGTGTAGTTTTTTTGAAA	8	-	21	-36.3
Han-novel-miR-105-3P-a	Han-novel-miR-105	TGGACTGAAGGGAGCTCCCT	11	+	21	-69.4
Han-novel-miR-105-3P-b		TGGACTGAAGGGAGCTCCCT	7	-	21	-64.4
Han-novel-miR-105-3P-c		TGGACTGAAGGGAGCTCCCT	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	TCCGACCAGGCTTCATTCCTC	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	TCCGACCAGGCTTCATTCCTC	2	+	22	-75.1
Han-miR-novel-110-a	Han-miR-novel-110	TCAATAAAGCTGTGGGAAGA	3	+	21	-34.9
Han-miR-novel-110-b		TCAATAAAGCTGTGGGAAGA	12	+	21	-32
Han-miR-novel-110-c		TCAATAAAGCTGTGGGAAGA	9	+	21	-38

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 آدپتورهای 3' و 5'، توالی‌های حاوی poly-A، خوانش‌های با کیفیت پایین و خوانش‌های آلوده به ترتیب ۱۶۹۶۶۹۷ (تیمار اول)، ۳۴۴۹۵۹۹ (تیمار دوم)، ۲۵۵۸۹۱۶ (کنترل اول)، ۴۰۹۳۲۴۴ (کنترل دوم) خوانش پاک به‌دست آمد (جدول ۳).

مطالعات نشان می‌دهد که انرژی منفی پایین یکی از ویژگی‌های مهم miRNAها می‌باشد (Bonnet et al., 2004). در مطالعه حاضر حداقل انرژی آزاد پیش‌سروهای میکروRNAهای جدید پیش‌بینی شده بین ۳۲- تا ۷۵/۱- می‌باشد که به‌طور متوسط ۵۰/۹۹ - کیلوکالری بر مول در نظر می‌گیریم که پایین‌تر از انرژی آزاد tRNAها و rRNAهاست. نتایج حاصل از توالی‌یابی تیمارهای زنبور عسل 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)

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 زنبور عسل Reads related to Apis mellifera miRNAs
2899	1483	21525	6097	خوانش‌های مرتبط با miRNAهای 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 زنبور عسل 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 زنبور عسل 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)

براساس سلسله مراتب ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها، شناسایی و حذف سایر rRNAهای کوچک به‌غیر از miRNAها، miRNAهای محافظت شده مرتبط با حشرات

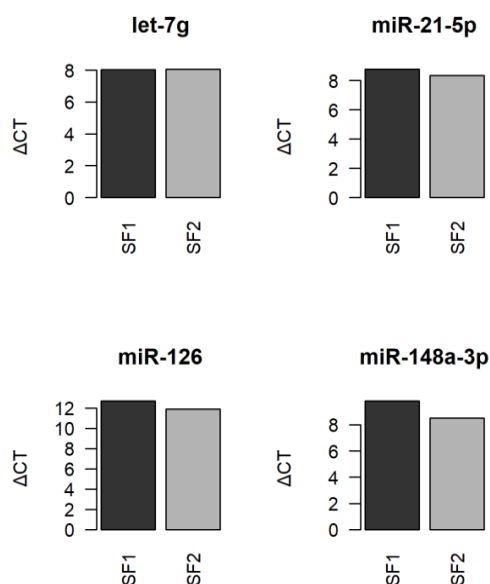
برای ردیابی miRNAهای گیاهی در یافت زنبور عسل باید مرحله به مرحله تمام توالی‌های دیگر به‌غیر از miRNAهای گیاهی از این داده‌ها حذف شود، برای این منظور

miRNAهای مشترک ردیابی شده در دو تکرار مربوط به تیمار آفتابگردان برای مرحله بعدی آنالیز انتخاب شدند که یازده miRNA تکرار اول تیمار گرده آفتابگردان در تکرار دوم نیز موجود بود. miRNAهای مشترک شناسایی شده در دو نمونه تیمار تغذیه شده با آفتابگردان شامل: miR-148a، miR-27a، miR-143، miR-21-5p، miR-26a، miR-203، let-7g، miR-126، miR-30d، miR-101 و miR-103 بودند.

راستی آزمایشی نتایج حاصل از NGS با استفاده از روش RT-qPCR

بررسی الگوی بیان چهار مورد (miR-21-5p، let-7g، 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. به عبارت دیگر این miRNAها تنها در گروه تیمار بیان داشتند و در گروه کنترل هیچ بیانی برای آنها ثبت نشد (شکل ۳).

که در پایگاه داده miRbase ثبت شده و همچنین miRNAهای جدید مرتبط با زنبورعسل نهایتاً ۳۹۶۹۶۳ (نمونه اول تیمار تغذیه شده با آفتابگردان)، ۸۷۷۵۰۶ (نمونه دوم تیمار تغذیه شده با آفتابگردان)، ۳۹۰۸۰۰ (کنترل اول) و ۴۶۶۸۰۸ (کنترل دوم) خوانش برای هم‌ردیفی با miRNAهای گیاهی به دست آمد. در اثر هم‌ردیفی خوانش‌های مربوط به تیمار تغذیه شده با گرده آفتابگردان و تیمار کنترل زنبورعسل با miRNAهای شناسایی شده برای گرده آفتابگردان در مطالعه حاضر (۴۹۵ میکروRNA حفاظت شده و ۱۶ میکروRNA جدید) ۴۵۲۰، ۱۰۶۳۲، ۵۶، ۷۳ خوانش به ترتیب در تکرار اول و دوم تیمار گرده آفتابگردان و تیمار کنترل هم‌ردیف شدند که منجر به ردیابی ۱۱ و ۳۱ میکروRNA در دو تکرار بیولوژیکی مربوط به تیمار تغذیه شده با گرده آفتابگردان شد و در گروه کنترل هیچ miRNA مشترکی ردیابی نشد (جدول ۳). برای افزایش صحت آنالیز،



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)

سوال که مکانیسم جذب miRNAهای اندوژنوس در غذای معمول ارگانیس‌های مختلف چقدر رایج و مؤثر می‌باشد بدون جواب مانده است. برای این منظور Jonathan *et al* (2013) در مطالعه‌ای ابتدا miRNAهایی با سطوح بالای بیان (miR156a، miR159 و miR169) را در غذاهای معمول مصرفی در سه ارگانیس‌های انسان، موش و زنبورعسل پیدا کرده و بعد از تغذیه ارگانیس‌ها با این غذاها، مقدار ناچیزی از miRNAهای گیاهی در بافت‌های هر سه ارگانیس مشاهده شد. بعد از تغذیه زنبورعسل با گرده و عسل که حاوی سطوح

فرضیه انتقال غذایی میکروRNAها هم‌زمان با ظهور گیاهان و حیوانات مهندسی ژنتیک شده و پیامدهای ناشناخته مصرف انسان از جیره‌ها پر رنگ‌تر شده است. این مسأله تأثیرات عمیقی بر درک تأثیر غذاهای طبیعی و تغییر ژنتیکی شده در همه ارگانیس‌ها دارد به‌عنوان مثال اخیراً علاقه قبلی توجهی در به‌کارگیری dsRNA¹ و miRNA بالقوه بیان شده در گیاهان برای کنترل آفات حشرات (Mao *et al.*, 2010; Huvenne & Smagghe, 2007) و تأثیر عملکرد حشرات سودمند مانند زنبورعسل وجود دارد. پاسخ به این

¹ Double stranded RNA

کاهش اندازه بدن 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 به طوری که در دروزوفیلا 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 ژله‌روپال (ماده ترش‌حی از غذای ملن‌دیولار زنبورهای پرستار) می‌باشد منشأ گیاهی و حیوانی داشته، پس می‌توان گفت که میکروRNAهای غذای لارو از منشأهای متفاوت در نمو و تمایز زنبور عسل مؤثر بوده و باعث تغییر شکل فنوتیپ زنبور عسل می‌شوند. نقش بالقوه miRNAهای گیاهی در گروه این حقیقت هست که با توجه به نوع حیوانی، آن‌ها به‌وسیله‌ی نوکلئوتید انتهایی 3' که قد در موقعیت ۲ میلیه 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 ناگسستگی 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 می‌تواند 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.

بالایی از سه miRNA ذکر شده بودند فقط miR156a در بافت شکمی زنبور پرستار و چراگر به‌مقدار کمی دیده شد درحالی که 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 حالی که مطالعه‌ی حاضر شواهدی را مبنی بر انتقال موفقیت‌آمیز تعدادی از miRNAهای آفتابگردان به روده میانی زنبور عسل ارائه می‌دهد. ما نشان دادیم که انتقال غذایی miRNAهای گیاهی به روده میانی زنبور عسل 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^۱ نشان دادند که بسیاری از miRNAهای درون‌زاد^۲ گیاهی، مکمل ژن‌های انسانی و سایر پستانداران بوده و آن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد (Ivashuta et al., 2009). به‌دنبال این مطالعه تیم تحقیقاتی پروفیسور ژانگ (2011) از دانشگاه نانجینگ^۳ تأیید کردند که miR-168a گیاهی می‌تواند توسط دستگاه گوارش در سلول‌های کبدی جذب شده و بیان آداپتور گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین پروتئین^۴ (LDLRAP1) در انسان و موش را مهار کرده و سرانجام باعث کاهش حذف LDL از پلاسما می‌شود (Zhang et al., 2012). مطالعات اخیر در شاخه بندپایان حاکی از انتقال موفقیت‌آمیز 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 ژله‌روپال بیشتر وجود دارند، رشد و تمایز زنبور را به تأخیر انداخته، باعث

¹ Monsanto Company

² Endogenous

³ Nanjing University

⁴ Low-density lipoprotein receptor adapter protein 1

- 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, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., & 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., & Smaghe, 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). Importance 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 (virk4) 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 RNA-mediated 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.

- 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.