



موسسه تحقیقات علوم دامی کشور



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

نحوه ردیابی و تأیید miRNA های گیاهی در بدن زنبور عسل تغذیه شده با آن گیاه

نویسنده: لیلا قره داغی

۱۴۰۳

عنوان: نحوه ردیابی و تأیید miRNAهای گیاهی در بدن زنبور عسل تغذیه شده با آن گیاه

نویسنده: لیلا قره‌داغی

همکاران: طاهر هرکی نژاد، غلامحسین طهماسبی

صفحه‌آرا: رقیه شکری

مدیر داخلی: ویدا همتی

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور- دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی

ناشر: نشر آموزش کشاورزی

شمارگان: ۱۰۰۰

نوبت چاپ: اول / ۱۴۰۳

قیمت: رایگان

مسئولیت صحت مطالب با نویسنده است.

شماره ثبت در مرکز فن‌آوری اطلاعات و اطلاع‌رسانی کشاورزی ۶۵۷۸۴ به تاریخ ۱۴۰۳/۰۴/۳۰ است.

نشانی: تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، پلاک ۱ و ۲، معاونت ترویج،

صندوق پستی: ۱۱۱۳-۱۹۳۹۵، تلفکس: ۲۲۴۱۳۹۲۳-۰۲۱

فهرست مطالب

۱	مقدمه
۴	عملیات صحرائی
۴	جمع‌آوری گرده
۵	جمع‌آوری زنبور عسل برای انجام آزمایشات تغذیه‌ای
۱۰	عملیات آزمایشگاهی
۱۰	استخراج RNA
۱۱	تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده
۱۲	آماده‌سازی کتابخانه برای توالی‌یابی small RNA
۱۳	خوشه‌بندی و توالی‌یابی
۱۴	آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها
۱۴	تجزیه و تحلیل مقدماتی توالی‌ها
۱۴	حاشیه‌نویسی توالی‌های پاک با استفاده از نرم‌افزار یونیتاس
۱۵	پیش‌بینی miRNAها در گرده مورد مطالعه
۱۵	شناسایی miRNAهای شناخته شده در گرده مورد مطالعه
۱۶	پیش‌بینی miRNAهای جدید در گرده مورد مطالعه
۱۶	ردیابی miRNAهای گیاهی در بافت بدن زنبور عسل تغذیه شده با گرده گیاه موردنظر
۱۷	پیش‌بینی ژن‌های هدف برای miRNAهای گیاهی منتقل شده از طریق غذا به بدن زنبور عسل
۱۸	آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO) و آنالیز مسیر (Pathway Analysis)
۱۹	اعتبارسنجی نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی با روش آزمایشگاهی RT-qPCR
۲۰	مراحل انجام واکنش Real time PCR
۲۳	نتیجه‌گیری کلی
۲۵	منابع

مقدمه

ارزش زنبور عسل و نقش آن در گرده‌افشانی و بارور ساختن محصولات کشاورزی و گونه‌های مختلف گیاهی (زراعی، باغی و مرتعی) و همچنین کاربردهای فراوان محصولات آن مانند عسل، موم، بره‌موم، ژله رویال، گرده و زهر به عنوان مواد خوراکی، دارویی، آرایشی و بهداشتی در سطوح مختلف تولید و مصرف خانگی و صنعتی بر همگان شناخته شده است. 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 (عبادی و احمدی، ۱۳۸۳). در آزمایشات مختلف برای تعیین نقش عوامل مختلف در گرده‌افشانی گیاهان، مشخص شده که یک درصد مجموع گرده‌افشانی‌ها توسط باد، شش درصد آن توسط بقیه حشرات منهای زنبور عسل و ۹۳ درصد باقیمانده را زنبور عسل به تنهایی انجام می‌دهد. همچنین در بررسی‌های مختلف ارزش گرده‌افشانی زنبور عسل را از حدود ۶۰ تا ۱۴۳ برابر ارزش تولیدات مستقیم آن برشمرده‌اند (امانی، ۱۳۹۲). امکان تنظیم بیان ژن بین فرمانروهای^۱ مختلف از طریق miRNAهای خوراکی می‌تواند سود ویژه‌ای در رابطه متقابل گیاهان و گرده افشان‌های آن‌ها داشته

باشد. گیاهان می‌توانند بیان ژن حشرات گرده افشان را از طریق انتقال RNAهای کوچک کنترل کنند. زنبور عسل یکی از مهمترین حشرات گرده افشان می‌باشد که میتواند مدل بهتری در زمینه‌ی انتقال غذایی RNAهای کوچک در تعامل بین گیاه و این حشره باشد (Waster et al., 2006).

میکرو RNAها، RNAهای کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که تقریباً ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید طول دارند. در میان RNAهای کوچک شناخته شده، میکرو RNAها بهترین گروه طبقه‌بندی شده به لحاظ تعداد، تنوع، روش بیان و عملکرد هستند. این RNAهای کوچک غیر کد کننده تنظیم بیان ژن‌ها را با متصل شدن به چارچوب خوانش باز یا ناحیه ترجمه نشده‌ی^۱ mRNAهای مخصوص با تجزیه و یا جلوگیری از ترجمه mRNA هدف انجام می‌دهند (Bartel, 2004). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که حدود ۶۰ درصد ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین توسط miRNAها مورد هدف قرار گرفته و تعدیل می‌شوند (Friedman et al., 2009).

miRNAها دارای نقش کلیدی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی شامل تکوین، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز و... می‌باشند (Rusek et al., 2015). پیشرفت‌های روز افزون نشان می‌دهند که miRNAها علاوه بر نقش اندوژنوس^۲، دارای نقش اگزوژنوس^۳ نیز می‌باشند. miRNAهای گیاهی به وسیله‌ی چندین مسیر اگزوژنوس درون سلولی و انتقال بین سلولی از طریق اجسام^۴ P (اجسام سیتوپلاسمی^۵)،

1- Untranslated region (UTR)

2- Endogenous

3- Exogenous

4- P bodies

5- Cytoplasmic bodies

اجسام چندگانه‌ی وزیکولی^۱ و اندوزوم‌ها^۲، به حیوانات منتقل می‌شوند (Hunther et al., 2008; Cocucci et al., 2009).

miRNAهای اگزوزنوس گیاهی اهداف مکمل خود را در حیوانات پیدا کرده و فرآیندهای رونویسی یا پس از رونویسی را در آن‌ها تعدیل می‌کنند. فعل و انفعالات بین گونه‌ای شکل گرفته به وسیله‌ی miRNA گیاهی و mRNA میزبان ممکن هست منجر به تغییرات بیان ژنتیکی در میزبان شود (Sanchita et al., 2018). تا به امروز، انتقال RNAهای کوچک حاصل از رژیم غذایی در بین گونه‌های مختلف در مهره‌داران (Zhang et al., 2012) و بی‌مهرگان (Ivashuta et al., 2015; Wang et al., 2018) نشان داده شده است. مطالعات اخیر 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 به سمت زنبور ملکه یا زنبور کارگر تعیین می‌کند (Zhu et al., 2017). فرضیه انتقال و فعالیت‌های تنظیمی میکرو RNAهای غذایی در حیوانات هنوز چالش برانگیز هست. به طوری که مطالعات بسیار محدودی در مورد نقش مصرف خوراکی miRNAها در زنبور عسل به عنوان یک گرده افشان مهم در صنعت کشاورزی و اکوسیستم طبیعی انجام شده است. بنابراین شناسایی miRNAهای گیاهی در بافت بدن زنبور عسل و نقش تنظیمی آن‌ها در بیان ژن‌ها و مکانیسم‌های مولکولی درگیر، حائز اهمیت فراوان می‌باشد.

1- Multi vesicular bodies (MVBs)

2- Endosomes



عملیات صحرائی:

جمع‌آوری گرده

برای سهولت ردیابی miRNAهای گرده در بدن زنبور عسل تغذیه شده با آن، بهتر است از گرده تک گل استفاده شود بدین صورت که گیاه مورد نظر، پوشش گیاهی غالب منطقه مورد مطالعه باشد. به منظور جمع‌آوری گرده، بعد از اطمینان از سالم بودن کندوهای زنبور عسل از هرگونه بیماری باکتریایی، قارچی و ویروسی، همزمان با گلدهی گیاه مذکور، تعدادی کندو به مجاورت منطقه مورد مطالعه منتقل شده و در روزهای اوج گلدهی آن گیاه، تله گرده در ورودی کندوها نصب و گرده به محض جمع‌آوری در تله گرده، برداشت شده و به تانک ازت منتقل شد. بعد از انتقال نمونه‌های جمع‌آوری شده با تانک ازت از مزرعه به آزمایشگاه، نمونه‌های گرده با استفاده از محلول ترايزول^۱ هموژنیزه می‌شوند و برای آنالیز، در دمای منفی هشتاد درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. هموژنیزه نمونه‌های گرده با روش مکانیکی صورت می‌گیرد.

جمع‌آوری زنبور عسل برای انجام آزمایشات تغذیه‌ای

برای انجام آزمایشات تغذیه‌ای زنبور، از قفس‌هایی دارای ابعاد خارجی $15 \times 11 \times 15$ سانتی‌متر که به جز قسمت جلویی بقیه‌ی قسمت‌های آن از چوب ساخته شده استفاده می‌شود. قسمت جلویی قفس‌ها از صفحه هشت مشی (عرض سلول‌های صفحه $1/5$ میلی‌متر) درست شده و به منظور گذاشتن زنبورهای جمع‌آوری شده در داخل قفس، یکی از طرفین قفس حالت کشویی دارد و همچنین قطعه‌ای از شان خالی برای استراحت زنبورها در داخل قفس تعبیه می‌شود. به منظور تغذیه زنبورهای داخل قفس، دو سوراخ در قسمت بالایی قفس‌ها برای گذاشتن تیوپ تغذیه و آب تعبیه شده است (شکل ۱ و ۲).

در مطالعات قبلی مشخص شد که از بین زنبورهای کندو با سنین مختلف، زنبورهای پرستار جوان بیشترین مقدار مصرف کرده را دارند (Masood et al., 2016) لذا برای بالا بردن احتمال ردیابی miRNAهای گیاهی در بدن زنبور عسل تغذیه شده با گیاه مورد نظر، زنبور پرستار جوان بهترین گزینه می‌باشد. بدین منظور زنبورهایی که روی قاب لارو جوان در حال غذا دادن به لاروها هستند جمع‌آوری و به قفس‌های آزمایشی منتقل می‌گردد (شکل ۱ و ۲). برای آزمایشات تغذیه‌ای قفس‌های حاوی زنبورهای پرستار در طبقه بالای کندو مطابق شکل ۳ قرار داده می‌شود تا شرایط طبیعی کندو (فرمون ملکه، دما و رطوبت) در حین آزمایش فراهم باشد.



شکل ۱- جمع آوری زنبورهای پرستار از روی قاب لارو جوان و انتقال آن به داخل قفس



شکل ۲- نمونه‌ای از قفس‌های مورد مطالعه و تیوپ‌های آب و شربت تعبیه شده در آن

به منظور طراحی مناسب‌ترین روش انجام آزمایشات تغذیه‌ای برای ردیابی miRNAهای گیاهی در بدن زنبور عسل تغذیه شده با آن گیاه، باید گروه تیمار و کنترل را در نظر گرفت. بدین ترتیب در گروه تیمار زنبورها با گرده مورد مطالعه تغذیه شدند و در گروه کنترل زنبورها در طول آزمایش با شربت شکر تغذیه شدند. در مطالعات معمول توالی‌یابی RNA، حداقل از سه تکرار بیولوژیکی استفاده می‌شود لذا از شش عدد کندو برای جمع‌آوری زنبور پرستار و تغذیه تحت شرایط کنترل شده استفاده گردید. بدین منظور

حدود صد عدد زنبور جوان از هر کدام از کندوها به داخل قفس‌ها منتقل شد. سه عدد از قفس‌ها بعنوان کنترل و سه عدد نیز بعنوان تیمار تغذیه شده با گرده گیاه مورد مطالعه در نظر گرفته شد. به منظور شستشوی دستگاه گوارش زنبوران، همه‌ی تیمارها به مدت ۴۸ ساعت با شربت شکر تغذیه شدند، بعد از آن برای تشویق تغذیه بعدی حدود ۳ ساعت زنبورها گرسنه نگه داشته شده و در ۲۴ ساعت بعدی زنبوران گروه کنترل همچنان با شربت شکر و گروه تیمار با محلول ۳۰ درصد شکر و ۷۰ درصد گرده مورد مطالعه تغذیه شدند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود برای هر کدام از قفس‌ها، دو تیوپ برای تغذیه و آب دهی تعبیه شده بود. بعد از آماده کردن محلول تغذیه مورد نظر برای هر کدام از قفس‌ها، محلول آماده در تیوپ‌ها ریخته شده و سپس در تیوپ با چسب پارافیلیم مطابق شکل ۳ بسته و با سوزن نازک چند عدد سوراخ ریز ایجاد شد. طوریکه موقع تغذیه زنبور از تیوپ با برخورد سر زنبور، مایع از آن قطره قطره بیرون می‌ریخت. بعد از اتمام آزمایشات تغذیه‌ای، با استفاده از سرما زنبورهای تغذیه داده شده بیهوش شده و از بافت شکمی زنبورها، قسمت روده میانی^۱ برداشته شده و تمامی نمونه‌ها در داخل محلول تریزول هموژنیزه و در دمای منفی ۸۰ درجه ذخیره شدند.



شکل ۳- آماده سازی محلول گرده و شکر برای تغذیه ی زنبورهای محصور شده در قفس

عملیات آزمایشگاهی

استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت miRNeasy mini Kit از شرکت کایژن^۱ و طبق دستورالعمل انجام شد. ابتدا ۷۰۰ میکرولیتر محلول QIAzol Lysis Reagent به هر کدام از نمونه‌ها اضافه کرده و با میله‌ی شیشه‌ای هموژنیزه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شدند، سپس ۱۴۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه کرده و در تیوپ را محکم بسته و به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۲ الی ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با نیروی $12000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. آن گاه مایع رویی را به تیوپ جدیدی منتقل کرده و از انتقال مایع میانی جلوگیری شد. و حدود ۵۲۵ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد به مایع اضافه کرده و کاملاً مخلوط شد. در مرحله‌ی بعد حدود ۷۰۰ میکرولیتر از محلول را به تیوپ‌های فیلتردار ۲ میلی لیتری RNeasy® Mini column منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه در دمای اتاق با نیروی بیشتر از $8000 \times g$ سانتریفیوژ شد و مایع رویی حذف شد. این مرحله‌ی سانتریفیوژ برای محلول باقی‌مانده دوباره تکرار شد. سپس حدود ۷۰۰ میکرولیتر بافر RWT به تیوپ RNeasy Mini column اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه با نیروی بیشتر از $8000 \times g$ سانتریفیوژ کرده و مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله‌ی بعد، ۵۰۰ میکرولیتر بافر RPE به تیوپ فیلتردار RNeasy Mini column اضافه کرده و به مدت ۲ دقیقه با نیروی بیشتر از $8000 \times g$ سانتریفیوژ شد. تیوپ RNeasy Mini column را به تیوپ جدید ۱/۵ میلی لیتری منتقل کرده

1- (Qiagen, Valencia, CA, USA)

و ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب عاری از RNase مستقیماً به وسط تیوپ ریخته شد و سپس در آن را بسته و به مدت ۱ دقیقه با نیروی بیشتر از $8000 \times g$ برای شستشو سانتریفیوژ شد (Masood et al., 2016).

تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

✓ تخریب و آلودگی RNA روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.
✓ خلوص RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر نانوفتومتر (NanoPhotometer® spectrophotometer (IMPLEN, CA, USA) صورت گرفت.

✓ غلظت RNA با استفاده از کیت Qubit® RNA Assay Kit in Qubit Fluorometer انجام شد (Life Technologies, CA, USA).
✓ یکپارچگی RNA^۱ با استفاده از کیت RNA Nano 600 As- say of the Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies).

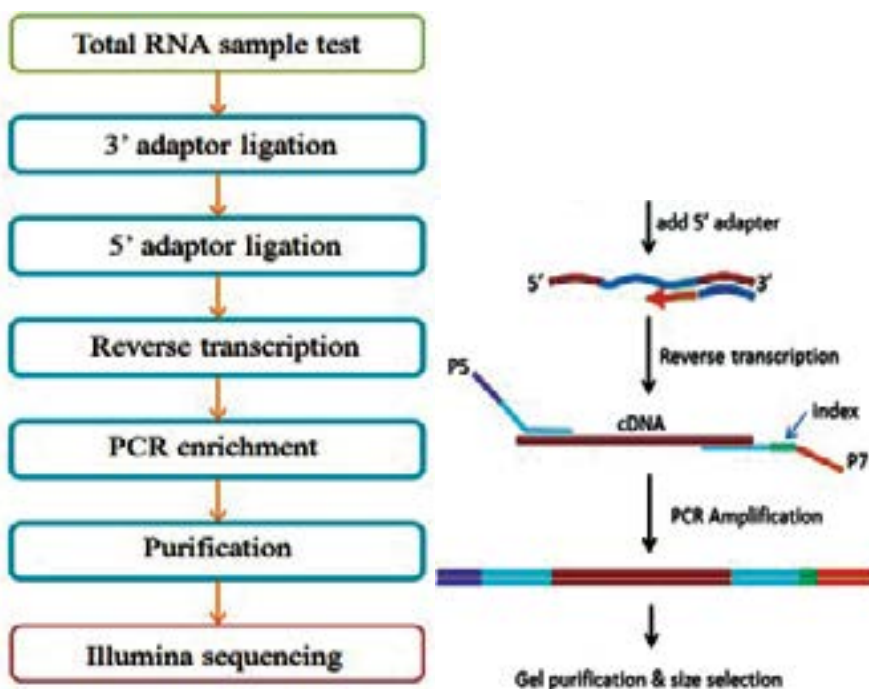
برای تهیه‌ی کتابخانه small RNA ها، غلظت نمونه‌ها باید بیشتر از ۲ میکروگرم بوده، (Agilent 2100) RNA integrity number برای نمونه‌های گیاهی بیشتر از ۷ و برای نمونه‌های حیوانی بیشتر از ۷/۵ باشد.
نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ که به منظور بررسی خلوص RNA با استفاده از نانودراپ محاسبه می‌شود باید در محدوده ۱/۸ تا ۲/۲ باشد. کاهش در این نسبت نشان دهنده حضور پروتئین، فنول و یا سایر ناخالصی‌ها می‌باشد. همچنین نسبت ۲۳۰ به ۲۶۰ باید بیشتر از ۱/۸ باشد و کمتر از این محدوده نشان دهنده وجود آلودگی در نمونه RNA است.

آماده‌سازی کتابخانه‌ها برای توالی‌یابی small RNA

حدود ۳ میکروگرم از RNA کل از هر نمونه برای تهیه‌ی کتابخانه Small RNA بکار می‌رود. توالی‌یابی کتابخانه‌ها با استفاده از [®]NEBNext[®] Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB, USA) ایجاد می‌شود. بر طبق توصیه‌ی شرکت سازنده، کدهای شاخص به توالی‌های هر نمونه اضافه می‌شود. به طور خلاصه، آداپتور NEB ۳' SR به طور مستقیم و اختصاصی به انتهای ۳' miRNA، siRNA و piRNA می‌چسبد. بعد از واکنش اتصال ۳'، پرایمر SR RT به آداپتور ۳' SR اضافی هیبرید می‌شود (که بعد از واکنش اتصال ۳' آزاد می‌ماند) و آداپتور DNA تک رشته‌ای به مولکول DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌شود. این مرحله برای جلوگیری از تشکیل آداپتور-دایمر مهم هست. علاوه بر آن، dsRNAها برای اتصال به واسطه‌ی T4 RNA لیگاز بستر نمی‌شوند و بنابراین به آداپتور ۵' SR در مرحله اتصال بعدی نمی‌چسبند. آداپتور انتهای ۵' به انتهای ۵' miRNA، siRNA و piRNA می‌چسبد و اولین رشته cDNA با استفاده از رونویسی معکوس M-MuLV (RNaseH⁻) سنتز می‌شود. تکثیر PCR با استفاده از SR، LongAmp Taq 2X Master Mix، پرایمر برای ایلومینا و ایندکس (X) پرایمر انجام می‌شود. محصولات PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد خالص‌سازی می‌شوند (۱۰۰ ولت و ۸۰ دقیقه). قطعه‌های ۱۴۰ تا ۱۶۰ جفت باز DNA (طول RNAهای کوچک غیر کد کننده بعلاوه آداپتورهای ۳' و ۵') در بافر شستشو ۸ میکرولیتر بازیابی و حل می‌شوند (Gharehdaghi et al., 2021). در آخر، کیفیت کتابخانه روی سیستم Agilent Bioanalyzer 2100 با استفاده از تراشه‌های DNA با حساسیت بالا سنجش می‌شود (شکل ۴).

خوشه‌بندی^۱ و توالی‌یابی

خوشه‌بندی نمونه‌های کدگذاری شده شاخص 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 روی پلت فرم ایلومینا Hiseq 2500/2000 و خوانش‌های ۵۰ جفت باز single-end توالی‌یابی شدند (<http://en.Novogene.com/>).



شکل ۴- مراحل تهیه کتابخانه RNAهای کوچک

آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها

تجزیه و تحلیل مقدماتی توالی‌ها

خوانش‌های انجام شده توسط دستگاه توالی‌یابی، توالی‌های خام^۱ نامیده می‌شوند. به طور کلی، دو نوع خوانش اضافی باید از داده‌های خام miRNAseq حذف شوند: آداپتورهای تعیین توالی و خوانش‌های با پیچیدگی پایین^۲ (Martin and Wang., 2011). یکی از نرم افزارهای مورد استفاده برای کنترل کیفیت داده‌ها نرم‌افزار FASTQC می‌باشد (Schmiedder and Edwards., 2011)، از نرم‌افزار Trimmomatic برای پیرایش داده‌ها، حذف بازهای با کیفیت پایین و حذف توالی‌های سازگار شده (آداپتوری) استفاده می‌شود (Bolger et al., 2014). به طور خلاصه، داده‌های پاک بعد از حذف توالی‌های آداپتورها، توالی Poly-N، توالی‌های با کیفیت پایین و خوانش‌هایی با طول نوکلئوتیدی کمتر از ۱۶ و بیشتر از ۳۰ نوکلئوتید به دست می‌آید.

حاشیه‌نویسی^۳ توالی‌های پاک با استفاده از نرم‌افزار یونیتاس^۴

پس از دریافت آخرین نسخه نرم افزار یونیتاس از سایت <https://sourceforge.net/projects/unitas/>، طبقه‌بندی RNAها انجام می‌شود. هدف از انجام حاشیه‌نویسی در مطالعات این چینی، شناسایی و حذف سایر RNAهای کوچک به غیر از میکرو RNAها از داده‌های مورد آزمایش می‌باشد.

1- Raw Reads

2- Low-complexity reads

3- Annotation

4- Unitas

این مرحله برای داده‌های گرده مورد مطالعه و تیمارهای مختلف زنبور عسل هر کدام با سه تکرار بیولوژیکی به طور جداگانه انجام می‌شود.

پیش‌بینی miRNAها در گرده مورد مطالعه

شناسایی miRNAهای شناخته شده^۱ در گرده مورد مطالعه

بعد از حاشیه نویسی داده‌های RNAهای کوچک گرده مورد نظر با نرم‌افزار یونیتاس، از خروجی نرم‌افزار برای هر مجموعه داده‌ی ورودی، مجموع خوانش‌های مربوط به میکروRNAهای شناخته شده در گونه مورد نظر که در داده مورد آزمایش موجود هست، میکروRNAهای حفاظت شده که در سایر گیاهان به غیر از گونه مورد آزمایش شناسایی و ثبت شده و میکروRNAهای شناسایی نشده که در واقع میکروRNAهای جدید می‌باشد برداشته شده و برای آنالیز بعدی با هم ادغام شدند. به عبارت دیگر، از داده RNAهای کوچک گرده مورد مطالعه، خوانش‌های دیگر به غیر از میکروRNAها حذف شدند. برای شناسایی میکروRNAهای شناخته شده، فایل ادغام شده‌ی حاصل از خروجی یونیتاس را با آخرین نسخه از میکروRNAهای گیاهی دریافت شده از پایگاه داده miRBase (<http://www.mirbase.org/>, Release 22) توسط ابزار هم‌ردیفی Bowtie (v1.1.2) با در نظر گرفتن حداکثر یک عدم تطابق^۲ هم‌ردیف می‌شوند. در اثر این هم‌ردیفی دو پوشه به دست می‌آید که پوشه اول شامل آن دسته از میکروRNAهای داده مورد آزمایش که با میکروRNAهای گیاهی دریافت شده از پایگاه داده miRBase

1- Known miRNAs

2- Mismatch



منطبق شده‌اند، به عبارت دیگر این میکروRNAها متعلق به میکروRNAهای حفاظت شده در گیاهان می‌باشد. پوشه دوم شامل آن دسته از میکروRNAهایی هستند که با میکروRNAهای گیاهی دریافت شده منطبق نشدند که در واقع میکروRNAهای جدید در گونه مورد نظر می‌باشند.

پیش‌بینی miRNAهای جدید در گرده مورد مطالعه

آن دسته از خوانش‌هایی که با میکروRNAهای گیاهی دریافت شده از پایگاه miRBase هم‌ردیف نشدند برای پیش‌بینی miRNAهای جدید در گرده مورد مطالعه به کار می‌روند که بدین منظور با توجه به اینکه گرده مورد مطالعه از کدام گیاه هست و آیا ژنوم آن شناخته شده است یا خیر، باید از مناسب‌ترین نرم‌افزار پیش‌بینی‌کننده miRNAهای گیاهی استفاده کرد.

ردیابی miRNAهای گیاهی در بافت بدن زنبور عسل تغذیه شده با گرده گیاه مورد نظر

برای ردیابی miRNAهای گرده مورد مطالعه در بافت بدن زنبور عسل تغذیه شده با آن، بدین طریق عمل می‌شود:

۱- حاشیه نویسی داده‌های RNAهای کوچک تیمارهای مختلف زنبور عسل به منظور حذف سایر RNAهای کوچک به غیر از miRNAها از داده‌های توالی یابی شده

۲- حذف miRNAهای شناخته شده و حفاظت شده در زنبور عسل: به منظور حذف miRNAهای شناخته شده و محافظت شده در زنبور عسل، داده‌های تیمارهای مختلف با آخرین نسخه از miRNAهای شناخته شده

حشرات که از پایگاه داده miRBase (<http://www.mirbase.org/Release 22>) دریافت می‌شوند با استفاده از ابزار همردیفی Bowtie v1.1.2 و حداکثر یک عدم تطابق همردیف می‌شوند.

۳- در مرحله بعد، برای حذف miRNAهای جدید زنبورعسل، خوانش‌های منطبق نشده با miRNA حشرات با ژنوم زنبورعسل (ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/metazoa/release-45/fasta/apis_mellifera/dna) همردیف می‌شود.

۴- در مرحله آخر برای ردیابی miRNAهای گیاهی در بافت زنبور عسل تغذیه شده با آن گیاه، خوانش‌هایی که با ژنوم زنبور عسل همردیف نشدند با miRNAهای شناسایی شده گرده مورد مطالعه، همردیف شده و منجر به ردیابی miRNAهای گیاهی در تیمار زنبور عسل تغذیه شده با آن گیاه خاص می‌گردد.

پیش‌بینی ژن‌های هدف برای miRNAهای گیاهی منتقل شده از طریق غذا به بدن زنبورعسل

برای پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNAها، بخش ۳' UTR ژن‌های گزارش شده‌ی زنبورعسل و برای ژن‌هایی که ۳' UTR پیش‌بینی شده ندارند ۵۰۰ جفت باز پایین دستی کدون توقف، انتخاب می‌شوند (Ashby et al., 2016). پیشنهاد می‌شود برای حداقل کردن اثر مثبت کاذب، از سه نرم افزار پیش‌بینی ژن‌های هدف از قبیل: PITA (Kertesz et al., 2007)،

Miranda (Enright et al., 2003) و

RNAHybrid (Rehmsmeier et al., 2004) با حداکثر انرژی آزاد



۱۵ kcal/mol- استفاده شود. ژن‌هایی که توسط حداقل دو مورد از نرم‌افزارهای پیش‌بینی‌کننده تأیید شوند بعنوان ژن هدف نهایی در نظر گرفته می‌شود.

آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO) و آنالیز مسیر (Pathway Analysis)

آنالیزهای GO یک راه جدید برای درک عمیق‌تر بیان و عملکرد ژن را فراهم می‌کند که می‌تواند در زمینه استراتژی انتخاب ژن مبتنی بر کیفیت مورد استفاده قرار گیرد (Fruzangohar et al., 2014). ابزارهای متعددی برای انجام آنالیز GO در دسترس می‌باشند که از آن جمله می‌توان EasyGO، GOMiner، GOstat، GOToolBox، topGO، GSEA و DAVID را نام برد (Soldatos et al., 2015). آنالیز هستی‌شناسی ژن با استفاده از یک مدل آماری انجام می‌شود که این مدل‌ها عبارتند از hypergeometric، توزیع نرمال، توزیع کای اسکوئر و آزمون فیشر (Khatrri and Draghici, 2005)، اما معمولاً آزمون فیشر قضاوت در مورد اینکه تفاوت مشاهده شده معنی‌دار است یا نه مورد استفاده قرار می‌گیرد و در انتهای آنالیز مقدار p-value برای هر ترم GO محاسبه می‌شود سپس ترم‌های GO که به طور معنی‌داری افزایش حضور نشان داده‌اند برای شرح ویژگی‌های عملکردی مشترک بین مجموعه ژن ورودی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Soldatos et al., 2015).

آنالیز مسیر معمولاً با هدف غنی‌سازی ژن و نمایش اطلاعات عملکردی آن‌ها و آشکار ساختن مکانیسم‌های بیولوژیکی هدایت شده توسط این ژن‌ها، انجام می‌شود. آنالیز مسیر نه تنها مسیرهای بیولوژیکی یک مجموعه

خاص از ژن‌های بیان شده را دنبال می‌کند بلکه روابط بین این ژن‌ها را نیز مشخص می‌کند.

اعتبارسنجی نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی با روش آزمایشگاهی

RT-qPCR

در صورت ردیابی miRNAهای گیاهی تغذیه شده در بافت زنبور عسل با روش NGS، برای تأیید نتایج حاصل می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد. یکی از روش‌های استفاده شده qRT-PCR می‌باشد. برای انجام RT-qPCR از کیت RT-qPCR miRNA qRT TRACK™ A miDETECT (RiboBio Co., Ltd., Guangzhou, China) استفاده می‌شود. برای رونویسی معکوس (RT) از آغازگر برگشت دارای توالی عمومی miDETECT A TRACK™ 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™ Forward Primer and Uni-Reverse Primer استفاده می‌شود.



مراحل انجام واکنش Real time PCR

دم پلی A (Poly (A) Tailing)

به منظور جلوگیری از تخریب محصول تمامی مراحل آماده‌سازی روی یخ انجام می‌شود.

جدول ۱- مواد لازم برای واکنش Poly (A) Tailing

مقدار مصرف (سیستم ۱۰ میکرولیتر)	معرف
۱ میکروگرم	RNA کل
۲ میکرو لیتر	بافر A (5X Poly) پلی‌مراز (آبی)
۱ میکرو لیتر	پلی‌مراز پلی (A) (قرمز)
تا حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر	RNase-free water

بعد از مخلوط کردن مواد بر اساس جدول ۱ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرده و سپس تا شروع مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره می‌گردد.

واکنش رونویسی معکوس

تمامی مراحل واکنش روی یخ و بر اساس نسبت‌های جدول ۲ آماده‌سازی می‌گردد.

جدول ۲ - مواد لازم برای واکنش تهیه cDNA

میزان مصرف	معرف
۴ میکرولیتر	RTase mix (زرد)
۴ میکرولیتر	بافر RTase ۵x (بنفش)
۴ میکرولیتر	mi DETECT A Track Uni-RT Primer
۱۰ میکرولیتر	محصول Poly (A) Tailing

برای انجام واکنش، مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انکوبه می شود. بعد از تمام شدن واکنش، cDNA به دست آمده برای استفاده در مراحل بعدی به فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد منتقل می شود.

واکنش RT-qPCR

بر طبق جدول ۳ مقدار و نوع مواد مصرفی آماده می گردد.

جدول ۳- مواد لازم برای واکنش qPCR

مقدار ماده مصرفی	معرف
۰/۵ میکرولیتر	mi DETECT A Track TM miRNA Forward Primer (10 μ M)
۰/۵ میکرولیتر	mi DETECT A Track TM Uni-Reverse Primer (10 μ M)
۱۰ میکرولیتر	۲X SYBR Green Mix (قهوه ای)
۲ میکرولیتر	cDNA
تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر	RNase-free water



جدول ۴- چرخه دمایی واکنش Real time PCR

مرحله	برنامه	تعداد چرخه
۱	۹۵ °C	۱۰ دقیقه
۲	۹۵ °C	۲ ثانیه
	۶۰ °C	۲۰ ثانیه
	۷۰ °C	۱۰ ثانیه
۳	ایجاد منحنی ذوب	۱

واکنش در یک پلیت ۹۶ چاهکی طبق برنامه حرارتی در جدول ۳ و در سه مرحله انجام شد.

آغازگرهای miRNAهای استفاده شده در RT-qPCR به وسیله RiboBio Co., Ltd سنتز می شود و توالی های پرایمرها از نظر تجاری محدود می شوند. محصولات حاصل از RT-qPCR با استفاده از یک آغازگر رفت اختصاصی برای هر miRNA و آغازگر برگشت universal تکثیر می شوند. برای هر یک از نمونه ها سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته می شود، و از یک ژن کنترل گر داخلی مانند اکتین (پرایمر رفت: TGCCAACACTGTCCTTTCTG و پرایمر برگشت: AGAATTGACCCACCAATCC) برای نرمال سازی نتایج حاصل از این مرحله به دلیل بیان نسبی یکسان در تیمار و کنترل استفاده می شود. الگوی بیان نسبی miRNAها با روش CT و ΔCT محاسبه می شود (Schmittgen et al., 2008).

نتیجه گیری کلی:

وجود رابطه مستحکم بین گیاهان و حشرات گرده افشان آن‌ها مخصوصاً زنبور عسل به عنوان مهمترین حشره گرده افشان در صنعت کشاورزی و اکوسیستم طبیعی از یک سو و بحث مطرح شدن انتقال و فعالیت‌های تنظیمی miRNA های غذایی در موجودات مختلف در طول دهه گذشته از سوی دیگر، محققان زنبور عسل را ترغیب به گردآوری و تدوین چهارچوب مشخص در جهت کشف ابعاد جدیدی از ارتباط حشرات گرده افشان (زنبور عسل) و گیاه میزبان آن کرد.

مطالعات بسیار محدودی در مورد نقش مصرف خوراکی miRNA ها در زنبور عسل بعنوان یک گرده افشان مهم در صنعت کشاورزی و اکوسیستم طبیعی انجام شده است. امکان تنظیم بیان ژن بین فرمانروهای مختلف از طریق miRNA های خوراکی، می تواند سود ویژه‌ای در رابطه متقابل گیاهان و گرده افشان‌های آن‌ها داشته باشد طوری که گیاهان می توانند بیان ژن حشرات گرده افشان را از طریق انتقال RNA های کوچک کنترل کنند که با توجه به نقش حیاتی زنبور عسل در گرده افشانی گیاهان، این حشره می تواند به عنوان مدل بهتری در این زمینه مطرح شود. بنابراین نتایج حاصل از تأیید رابطه مولکولی بین زنبور عسل و گیاه میزبان می تواند گام تازه ای برای پیشبرد برنامه های اصلاح نژادی زنبور عسل در جهت بهبود تولیدات آن، افزایش ایمنی بدن در مقابل انواع بیماری ها و غیره به کار گرفته شود.

منابع

- ۱- امانی، م. و اکبرپور، ح. ۱۳۹۲. نقش زنبور عسل در گرده افشانی. مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان ساری.
- ۲- عبادی، ر. و احمدی، ع. ا. ۱۳۸۳. پرورش زنبور عسل، چاپ اول. انتشارات ارکان.

- 3- **Ashby R**, Forêt S, Searle I, Maleszka R. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–5.
- 4- **Bartel D P.** and Chen C Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5: 396-400.
- 5- **Bolger A M**, Lohse M. and Usadel B.. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, btu. 2014; 170, 1-7.
- 6- **Cocucci E**, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43–51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>.
- 7- **Enright AJ**, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 5, R1. 2003. <https://doi.org/10.1186/gb-5-1-r1>.
- 8- **Friedman RC**, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*.



2009;19(1):92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>.

9- **Fruzangohar M**, Ebrahimie E. and Adelson D L. Application of global transcriptome data in gene ontology classification and construction of a gene ontology interaction network.2014; bioRxiv: 004911.

10- **Gharehdaghi L**, Bakhtiarizadeh MR, He K. et al. Diet-derived transmission of MicroRNAs from host plant into honey bee Midgut. BMC Genomics. 2021; 22, 587 (<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07916-4>)

11- **Hunter MP**, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS One. 2008;3(11):e3694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>.

12- **Ivashuta SI**; Petrick JS; Heisel SE; Zhang Y; Guo L; Reynolds TL; Rice JF; Allen E; Roberts J K. Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. Food Chem. Toxicol.2009; 47, 353–360. [CrossRef] [PubMed].

13- **Kertesz M**, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat Genet.2007; 39, 1278–1284.

14- **Khatri P**. and Draghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. Bio-

informatics. 2005; 21(18): 3587-3595.

15- **Li X**, Zhang M, Zhang H. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One*. 2011;6(3):e17788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017788>.

16- **Martin JA**. and Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 2011; 12(10): 671-682.

17- **Masood M**, Everett CP, Chan SY, Snow JW. Negligible uptake and transfer of diet-derived pollen microRNAs in adult honey bees. *RNA Biol*. 2016;13(1): 109–18. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1128063>.

18- **Rehmsmeier M**, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R.. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*. 2004; 10, 1507–1517

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

20- **Sanchita T. R**, Asif MH, Trivedi PK. Dietary plant miRNAs as an augmented therapy: cross-kingdom gene regulation. *RNA Biol*. 2018;15(12):1433–9. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1551693>.

21- **Schmieder R**. and Edwards R. Quality control and preproc-



essing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011; 27, 863-864.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

22- **Soldatos TG**, Perdigão N, Brown NP, Sabir KS, O'Donoghue SI. How to learn about gene function: text-mining or ontologies? *Methods*, 2015; 74: 3-15.

23- **Wang ZZ**, Ye XQ, Shi M, Li F, Wang ZH, Zhou YN, et al. Parasitic insect-derived miRNAs modulate host development. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–9.

24- **Waser NM** and Ollerton J. Plant-pollinator interactions: From specialization to generalization. University of Chicago Press. 2006;98(4):899-900.

25- **Zhang L**, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDL-RAP1: evidence of crosskingdom regulation by microRNA. *Cell Res*. 2012;22(1):107–26. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.158>.

26- **Zhu K**, Liu M, Fu Z, Zhou Z, Kong Y, Liang H, et al. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genet*. 2017;13(8): e1006946. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006946>.