

مطالعه بیان افتراقی ژن‌های بافت جنین زنبورعسل در ساعات پس از تخم‌گذاری با استفاده از داده‌های

ترانسکریپتومیکس

شماره صفحات

۳۱-۴۰

میلاد غلامی طاحونه^{۱*}، حسین مرادی شهر بابک^۲ و مهدی فرضی^۳

۱، ۲ و ۳) گروه علوم دامی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

نویسنده مسئول: *gholami.milad@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۰

چکیده

رشد جنینی زنبورعسل نتیجه یک توالی دقیق کنترل‌شده از رویدادهاست که توسط سیگنال‌های محیطی و درون سلولی تعدیل شده‌اند؛ با این حال، استراتژی‌های رشد زنبورهای عسل در طول جنین‌زایی اولیه ناشناخته است. در پژوهش حاضر با هدف مطالعه پروفایل بیان ژن و تعیین ژن‌های شاخص با بیان متفاوت و معنی‌دار در هر یک از دو گروه و بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده در سه زیرگروه ساعات پس از تخم‌گذاری (۱۰ الی ۱۵ ساعت (زیرگروه ۱)، ۲۵ الی ۴۰ ساعت (زیرگروه ۲) و ۵۵ الی ۷۰ ساعت (زیرگروه ۳)) پس از اخذ و ذخیره داده‌های خام، مراحل آنالیز به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای FastQC، dump، Trimmomatic، Hisat2، Samtools و Cufflinks انجام شده و در نهایت آنالیز هستی‌شناسی به وسیله پایگاه‌های اطلاعاتی DAVID و Ensemble صورت گرفت. طبق نتایج پروفایل بیان ژن، ۱۷۷۸۶ شناسه ژن مشخص شد، که در نهایت جهت مقایسه در هر یک از دو گروه با در نظر گرفتن $\log_2(\text{fold_change}) > +10$ و $\log_2(\text{fold_change}) < -10$ در گروه ماده‌ها بین زیرگروه‌های ۱ و ۲، شش ژن، زیرگروه‌های ۱ و ۳، ۲۳ ژن و زیرگروه‌های ۲ و ۳، ۱۲ ژن شاخص و در گروه نرها بین زیرگروه‌های ۱ و ۲، دو ژن، زیرگروه‌های ۱ و ۳، ۲۵ ژن و زیرگروه‌های ۲ و ۳، شش ژن شاخص با بیان متفاوت و معنی‌دار شناسایی شد و در مقایسه بین دو گروه با در نظر گرفتن $\log_2(\text{fold_change}) > +4$ و $\log_2(\text{fold_change}) < -4$ در زیرگروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب، چهار، ۲۶ و یک ژن شاخص با بیان متفاوت و معنی‌دار شناسایی شد ($q_value < 0.05$). نتایج هستی‌شناسی ژن‌های شاخص نشان داد که در متابولیسم اسیدآمینه و کربوهیدرات، بیوسنتز هورمون حشرات، ساختاری کوتیکول و اتصال یون‌های کلسیم، روی و آهن نقش دارند.

کلمات کلیدی : آنالیز هستی‌شناسی ژن، بیان افتراقی ژن، ترانسکریپتوم، زنبورعسل و ژن شاخص.

مقدمه

زنبورعسل از شناخته‌ترین اعضای اکوسیستم‌های طبیعی در میان حشرات گرده‌افشان است و نیز نقش مهمی در اکوسیستم‌های خاکی یعنی جایی که پوشش گیاهی سبز وجود دارد، دارا می‌باشد (Bahador *et al.*, 2016)؛ بنابراین بررسی این حشره مفید از جهت‌های مختلف فیزیولوژی، رفتارشناسی و ژنتیک حائز اهمیت است. یک کلنی زنبورعسل از زنبورهای نر، کارگر و ملکه، تشکیل شده‌است؛ تفاوت تغذیه در تخم لقاح یافته باعث ایجاد دو فنوتیپ ملکه و کارگر از یک ژنوتیپ یا سلول تخم می‌شود و لاروهای نر نیز از تخم‌های لقاح نیافته به وجود می‌آیند؛ از این جهت با بررسی ژن‌های متفاوت بیان شده می‌توان روند ایجاد این دو فنوتیپ از ژنوتیپ را مشخص نمود (Barchuk *et al.*, 2007). رشد جنینی زنبورعسل نتیجه یک توالی دقیق کنترل شده از رویدادهاست که توسط سیگنال‌های محیطی و درون سلولی تعدیل شده‌اند؛ با این حال، استراتژی‌های رشد زنبورهای عسل در طول جنین‌زایی اولیه هنوز ناشناخته است. مطالعات بیان ژن به تولید حجم زیادی از داده‌ها در زمینه بیان ژن منجر شده‌است؛ در میان انواع متعدد داده‌های بیان ژن، داده‌های RNA-seq به سبب پُربرونداد بودن و شامل شدن توالی نواحی رونویسی شده و پوشش دادن همه این نواحی دارای مزیت زیادی نسبت به سایر انواع داده‌ها هستند (Gan *et al.*, 2010; Sultan *et al.*, 2008). تاکنون پژوهش‌های مختلفی روی آنالیز بیان ژن زنبورعسل نر و ماده در سنین مختلف تخمک (Pires *et al.*, 2016) و زنبور عسل کارگر و ملکه (Chen *et al.*, 2012) انجام شده‌است. در پژوهش حاضر، هدف مطالعه پروفایل بیان ژن و تعیین ژن‌های شاخص با بیان متفاوت و معنی‌دار در هر یک از دو گروه و بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده در سه زیرگروه ساعات پس از تخم‌گذاری (۱۰ الی ۱۵ ساعت (زیرگروه ۱)، ۲۵ الی ۴۰ ساعت (زیرگروه ۲) و ۵۵ الی ۷۰ ساعت (زیرگروه ۳)) و بررسی هستی‌شناسی ژن‌های شاخص شناسایی شده است.

مواد و روش‌ها

پس از اخذ و ذخیره ۱۲ نمونه داده خام تک سویه RNA-seq با طول ۱۰۱ جفت باز حاصل شده از جنین کامل زنبورعسل *Apis mellifera carnica* در دو گروه جنس نر و ماده، هر گروه شامل سه زیرگروه ساعات پس از تخم‌گذاری (۱۰ الی ۱۵ ساعت (زیرگروه ۱)، ۲۰ الی ۴۵ ساعت (زیرگروه ۲) و ۵۵ الی ۷۰ ساعت (زیرگروه ۳))، هر زیرگروه حاوی دو تکرار بیولوژیکی از پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی GSM4827617، تمامی مراحل تجزیه و تحلیل آن‌ها در محیط سیستم عامل Linux Ubuntu (v21.04) نسخه ۶۴ بیت بر روی کامپیوتر شخصی به ترتیب مراحل انجام شد: تبدیل فرمت داده‌ها از sra به fastq با استفاده از نرم‌افزار sratoolkit (v2.10.2) انجام شد؛ سنجش کیفیت داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار fastQC (v0.11.9) انجام شد (Andrews, 2010). جهت ویرایش داده‌ها با در نظر گرفتن حداقل طول خوانش‌ها ۵۰ جفت باز و نیز استفاده از فایل توالی آداپتوری از نوع Illumina Universal Adaptor از نرم‌افزار Trimmomatic (v0.39) استفاده شد (Bolger *et al.*, 2014) و به منظور اطمینان از ویرایش صحیح، کیفیت‌سنجی مجدد با نرم‌افزار fastQC انجام گرفت. به منظور هم‌ردیفی و مکان‌یابی

خوانش‌ها، آخرین نسخه به‌روز شده در دسترس ژنوم مرجع زنبورعسل *Apis mellifera* به همراه فایل حاشیه‌نویسی مربوطه (release-53)، از بانک اطلاعاتی Ensemble دریافت شد. ایندکس کردن ژنوم مرجع و نیز هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار Hisat2 (v2.2.1) انجام شد (Kim et al., 2015). جهت تولید فایل با فرمت BAM و نیز مرتب و ایندکس کردن فایل‌های BAM تولید شده، از پکیج نرم‌افزاری samtools استفاده شد. به منظور هم‌ردیفی خوانش‌ها و سرهم کردن ترانسکریپتوم‌های موجود، از بسته نرم‌افزار Cufflinks (v2.2.1) استفاده شد، سپس ترانسکریپتوم‌های تشکیل شده از هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار cuffmerge با یکدیگر ادغام شده و برای تست آماری میزان بیان ژن بین دو زیرگروه موردنظر، از نرم‌افزار cuffdiff استفاده شد. در انتها، آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص به وسیله پایگاه‌های DAVID و Ensemble انجام شد.

نتایج و بحث

طبق گزارش سنجش کنترل کیفیت، توالی‌های بین ۷۰ تا ۸۸ میلیون خوانش کوتاه تک سویه برای نمونه‌ها وجود داشت، که پس از ویرایش ۶۸ تا ۸۵ میلیون خوانش با کیفیت مناسب برای نمونه باقی ماند. طبق اطلاعات خروجی در انتهای آنالیز هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع، میانگین درصد مکان‌یابی خوانش‌ها بیش از ۹۹ درصد و خوانش‌های با محل هم‌ردیفی چندگانه کمتر از پنج درصد بودند.

گروه جنین زنبورعسل ماده

با تشکیل پروفایل بیان ژن، ۱۷۷۸۶ شناسه ژن شناسایی شد؛ که از این تعداد، پس از آنالیز بیان افتراقی و با در نظر گرفتن معیار $\log_2(\text{fold_change})$ با مقادیر بیشتر از ۱۰+ و کمتر از ۱۰- بین زیرگروه‌های ۱ و ۲، زیرگروه‌های ۱ و ۳، زیرگروه‌های ۲ و ۳ در این گروه به ترتیب شش ژن (جدول ۱)، ۲۳ ژن (جدول ۲) و ۱۲ ژن شاخص (جدول ۳) با بیان متفاوت و معنی‌دار شناسایی شد ($q_value < 0.05$).

جدول ۱- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی‌دار بین زیرگروه‌های ۱ و ۲ در گروه جنین زنبورعسل ماده

Table 1. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes between subgroups 1 and 2 in the female honey bee embryo group

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
LOC726629	CM009939.2:8481383-8483045	11/05
LOC100578532	CM009937.2:13787242-13788394	10/92
LOC409512	CM009941.2:8305073-8311070	10/50
LOC409827	CM009943.2:4412873-4430065	10/47
LOC102656497, LOC107965005, LOC411330	CM009939.2:8460196-8473671	10/22
LOC412825	CM009938.2:4014982-4058666	10/10

طبق نتایج آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص بین این دو زیرگروه، ژن LOC409512 در مسیر فعال سازی فاکتورهای توسعه عصبی نقش دارد که با توجه به افزایش بیان ۱۴۶۰ برابری این ژن در ساعات ۲۵ الی ۴۰ نسبت به ۱۰ الی ۱۵ ساعت پس از تخم گذاری، عاملی بر افزایش توسعه عصبی در جنین زنبورعسل ماده در این دور زمانی می‌باشد. ژن LOC409827 با نقش در فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین، با افزایش بیان ۱۴۲۰ برابری خود در زیرگروه ۲ نسبت به زیرگروه ۱، عاملی بر افزایش هضم و پردازش پروتئین، تنظیم فعالیت پروتئین و بهبود گوارشی پروتئین‌های غذایی دارد. ژن LOC102656497 با نقش در تولید پروتئین مرتبط با کراتین با افزایش بیان خود می‌تواند در بخش پوششی و اسکلتی زنبورعسل نقش داشته باشد.

جدول ۲- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی دار بین زیر گروه‌های ۱ و ۳ در گروه جنین زنبورعسل ماده

Table 2. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes between subgroups 1 and 3 in the female honey bee embryo group

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
CPR21	CM009932.2:2947712-2949976	12/78
LOC409962	CM009943.2:4851039-4853788	12/68
CSP3	CM009935.2:2779892-2781325	12/22
LOC724721	CM009931.2:6488672-6491733	12/17
LOC100576170	CM009939.2:2032179-2034772	12/15
LOC725823	CM009945.2:4537809-4539797	11/71
LOC100576161	CM009939.2:10070967-10072348	11/02
LOC552277	CM009932.2:14003970-14007168	10/93
LOC726229	CM009945.2:4604121-4605717	10/90
LOC113219006, LOC724477	CM009939.2:2992355-3008901	10/80
LOC413936	CM009934.2:2735355-2801809	10/68
LOC107964997	CM009939.2:8484061-8489673	10/62
LOC724236	CM009931.2:15261404-15335925	10/59
LOC100577908, LOC410058	CM009942.2:1462143-1478179	10/58
LOC100576901, LOC410944	CM009933.2:6026075-6075595	10/50
LOC410452	CM009943.2:5988747-5993569	10/47
LOC411273	CM009938.2:7831568-7840699	10/46
LOC408961	CM009938.2:5142433-5265565	10/37
LOC726995	CM009943.2:1090053-1095897	10/30
JHBP-1	CM009937.2:1964641-1971930	10/24
LOC411569	CM009945.2:5103489-5150961	10/22
LOC100577504	CM009941.2:171597-192617	10/14
LOC725541	CM009942.2:4235636-4253032	10/11

طبق نتایج آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص بین این دو زیرگروه، دو ژن CPR21 و LOC726995 در مسیر بیان اجزای ساختاری کوتیکول نقش دارند که با بیان بیشتر خود در زیرگروه ۵۵ الی ۷۰ ساعت پس از تخم گذاری، می‌تواند عاملی بر تکمیل پوشش و سطح بیرونی جنین باشد. ژن LOC724721 با نقش در فرآیند بیوسنتز هورمون حشرات، با افزایش بیان بیش از ۴۶۴۰ برابری در زیرگروه ۳ نسبت به زیرگروه ۱، دلیلی بر افزایش سنتز این نوع هورمون در جنین زنبورعسل است. ژن‌های LOC113219006 و LOC724236 با نقش در مسیر فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین، عاملی بر افزایش هضم و پردازش پروتئین، تنظیم فعالیت پروتئین هستند. ژن‌های LOC100577908، LOC410452 و LOC411569 با بیان خود در مسیر اتصال

یون‌های روی و کلسیم نقش دارند، که با افزایش بیان خود در زیرگروه ۳ نسبت به زیرگروه ۱، بیانگر افزایش، تکامل و بهبود کارایی این دو یون بوده که در نهایت در بخش‌های مختلفی از جمله سیستم ایمنی، سیستم بویایی و سیستم حرکتی زنبورعسل نقش مثبت خواهند داشت. ژن LOC100576901 با نقش خود در مکانیسم دفاعی حشره، با افزایش بیان خود، عاملی بر تکامل سیستم و مکانیسم دفاعی در جنین زنبورعسل است.

جدول ۳- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی دار بین زیر گروه‌های ۲ و ۳ در گروه جنین زنبورعسل ماده

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
LOC725823	CM009945.2:4537809-4539797	11/61
LOC107965773	CM009943.2:1190473-1192276	11/25
CPR1	CM009941.2:6504969-6506682	11/13
CPR21	CM009932.2:2947712-2949976	10/73
LOC726206	CM009945.2:4601354-4602416	10/71
LOC100577908, LOC410058	CM009942.2:1462143-1478179	10/49
LOC726185	CM009945.2:4598217-4599359	10/36
LOC726995	CM009943.2:1090053-1095897	10/34
CPR2	CM009941.2:6511776-6512902	10/30
LOC724721	CM009931.2:6488672-6491733	10/30
LOC726229	CM009945.2:4604121-4605717	10/29
LOC408538	CM009945.2:4563488-4567608	10/09

طبق نتایج آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص بین این دو زیرگروه، ژن‌های CPR1، CPR21، CPR2 و LOC726995 در مسیر بیان اجزای ساختاری کوتیکول نقش دارند که با بیان بیشتر خود در زیرگروه ۵۵ الی ۷۰ ساعت پس از تخم‌گذاری، می‌تواند عاملی بر تکمیل پوشش و سطح بیرونی جنین باشد. ژن LOC100577908 با بیان خود در مسیر اتصال یون‌های روی و کلسیم نقش دارد، که با افزایش بیان خود در زیرگروه ۳ نسبت به زیرگروه ۲، بیانگر افزایش، تکامل و بهبود کارایی این دو یون است. ژن LOC724721 با نقش در فرآیند بیوسنتز هورمون حشرات دلیلی بر افزایش سنتز این نوع هورمون در جنین زنبورعسل است.

گروه جنین زنبورعسل نر

با تشکیل پروفایل بیان ژن، ۱۷۷۸۶ شناسه ژن شناسایی شد؛ که از این تعداد، پس از آنالیز بیان افتراقی و با در نظر گرفتن معیار $\log_2(\text{fold_change})$ با مقادیر بیشتر از ۱۰+ و کمتر از ۱۰- بین زیرگروه‌های ۱ و ۲، زیرگروه‌های ۱ و ۳، زیرگروه‌های ۲ و ۳ در این گروه به ترتیب دو ژن (جدول ۴)، ۲۵ ژن (جدول ۵) و شش ژن شاخص (جدول ۶) با بیان متفاوت و معنی‌دار شناسایی شد ($q_value < 0.05$).

جدول ۴- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی دار بین زیر گروه‌های ۱ و ۲ در گروه جنین زنبورعسل

Table 4. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes between subgroups 1 and 2 in the male honey bee embryo group

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
LOC100578920	CM009944.2:2601944-2612476	10/16
LOC409827	CM009943.2:4412873-4430065	10/08

با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های شاخص بین این دو زیرگروه مشخص گردید ژن LOC409827 با نقش در مسیر

فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین، عاملی بر افزایش هضم و پردازش پروتئین، تنظیم فعالیت پروتئین است.

جدول ۵- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی دار بین زیر گروه‌های ۱ و ۳ در گروه جنین زنبورعسل

نر

Table 5. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes between subgroups 1 and 3 in the male honey bee embryo group

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
LOC408538	CM009943.2:4492568-4511062	11/95
LOC725823	CM009945.2:5103489-5150961	11/82
LOC409962	CM009931.2:15261404-15335925	11/40
LOC725729	CM009939.2:2032179-2034772	11/30
LOC100578617, LOC408414	CM009931.2:6481219-6485582	11/25
LOC411569	CM009932.2:14369040-14527631	11/18
LOC724236	CM009938.2:5142433-5265565	11/18
LOC100576170	CM009931.2:6488672-6491733	11/15
LOC412458	CM009939.2:2032179-2034772	11/06
TpnI	CM009945.2:4598217-4599359	11/06
LOC408961	CM009941.2:6511776-6512902	11/04
LOC724721	CM009932.2:2920895-2925787	10/97
LOC100576170	CM009934.2:3482599-3485558	10/91
LOC726185	CM009942.2:1462143-1478179	10/86
CPR2	CM009934.2:8067739-8101998	10/77
CPR17	CM009931.2:14233501-14243986	10/74
LOC726980	CM009943.2:4394431-4412453	10/57
LOC100577908, LOC410058	CM009936.2:5459330-5663854	10/55
LOC100578446, LOC113218719	CM009937.2:13434188-13448355	10/35
LOC724636	CM009932.2:14003970-14007168	10/25
LOC409826	CM009937.2:10732892-10751840	10/18
LOC100577819	CM009943.2:4492568-4511062	10/12
LOC551089	CM009945.2:5103489-5150961	10/11
LOC552277	CM009931.2:15261404-15335925	10/05
LOC409619	CM009939.2:2032179-2034772	10/02

با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های شاخص بین این دو زیرگروه مشخص گردید ژن‌های LOC411569 و

LOC100577908 با بیان خود در نهایت در مسیر اتصال یون روی و کلسیم نقش خواهند داشت. ژن LOC724236 با نقش

در مسیر فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین، با افزایش بیان ۲۳۲۰ برابری در ساعات ۵۵ الی ۷۰ نسبت به ۱۰ الی ۱۵ پس از تخم

گذاری در جنین جنس نر، می‌توان گفت افزایش هضم و پردازش پروتئین، تنظیم فعالیت پروتئین و بهبود گوارشی پروتئین‌های

غذایی در این دوره زمانی افزایش می‌یابد. ژن‌های LOC408961، LOC100578446 و LOC724636 با بیان خود در مسیر

فرآیند همانندسازی DNA نقش دارند، که با افزایش بیان در زیرگروه ۳ نسبت به زیرگروه ۱، عاملی بر بهبود و تسریع فرآیند

همانندسازی در تمامی سلول‌ها می‌تواند باشند. ژن‌های LOC724721 و LOC412458 با افزایش بیان خود در ساعات ۵۵ الی ۷۰ پس از تخم‌گذاری، تأثیر افزایشی بر بیوسنتز هورمون حشرات در زنبورعسل نر دارند. ژن‌های CPR2 و CPR17 در مسیر هستی‌شناسی اجزای ساختار کوتیکول نقش دارند، که در نهایت تأثیر ریخت‌ناشی بر روی سطح بیرونی بدن خواهند داشت.

جدول ۶- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی‌دار بین زیر گروه‌های ۲ و ۳ در گروه جنین زنبورعسل نر

Table 6. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes between subgroups 2 and 3 in the male honey bee embryo group

میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$	موقعیت	نام ژن
11/20	CM009945.2:4537809-4539797	LOC725823
10/76	CM009945.2:4563488-4567608	LOC408538
10/58	CM009931.2:15261404-15335925	LOC724236
10/36	CM009932.2:2920895-2925787	CPR17
10/28	CM009945.2:4601354-4602416	LOC726206
10/21	CM009945.2:9516191-9526640	LOC724917

با توجه به نتایج هستی‌شناسی ژن‌های شاخص بین این دو زیر گروه مشخص گردید ژن LOC724236 در فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین و ژن CPR17 در مسیر فعالیت و تشکیل اجزای ساختاری کوتیکول نقش دارند، که هر دو ژن در ساعات ۵۵ الی ۷۰ نسبت به ۲۵ الی ۴۰ پس از تخم‌گذاری افزایش بیان چشمگیری داشته‌اند.

بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده

با تشکیل پروفایل بیان ژن، ۱۷۷۸۶ شناسه ژن شناسایی شد؛ که از این تعداد، پس از آنالیز بیان افتراقی و با در نظر گرفتن معیار $\log_2(\text{fold_change})$ با مقادیر بیشتر از +۴ و کمتر از -۴ بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده در زمان‌های ۱۰ الی ۱۵، ۲۵ الی ۴۰ و ۵۵ الی ۷۰ ساعت پس از تخم‌گذاری به ترتیب چهار ژن (جدول ۷)، ۲۶ ژن (جدول ۸) و یک ژن شاخص (جدول ۹) با بیان متفاوت و معنی‌دار شناسایی شد ($q_value < 0.05$).

جدول ۷- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی‌دار زیر گروه ۱ بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده
Table 7. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes of subgroup 1 between the two groups of male and female honey bee embryos

میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$	موقعیت	نام ژن
-4/71	CM009937.2:13516652-13628255	LOC100577498
-4/059	CM009932.2:10576693-10650279	LOC102656216
4/01	CM009931.2:10227100-10460226	LOC408600
4/11	CM009936.2:1643402-1646323	LOC413204

جدول ۸- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی دار زیرگروه ۲ بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده
 Table 8. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes of subgroup 2 between the two groups of male and female honey bee embryos

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
LOC724796	CM009931.2:14442379-14450434	-4/76
LOC726677	CM009943.2:2836481-2839738	-4/48
LOC725903	CM009939.2:10117120-10119708	-4/31
LOC100577696	CM009943.2:5614910-5637762	-4/08
LOC726150	CM009941.2:11178040-11199306	-4/06
LOC726554	CM009932.2:32252-45921	4/00
LOC408817	CM009934.2:5036831-5045401	4/01
LOC113219293	CM009946.2:338750-595938	4/08
Obp9	CM009945.2:6324936-6335391	4/17
LOC410370	CM009942.2:8215683-8218566	4/20
LOC409203	CM009941.2:10422252-10522338	4/21
LOC100576513	CM009942.2:4273819-4276506	4/23
LOC551632	CM009932.2:23380-31238	4/24
LOC102655223, LOC413270	CM009940.2:3229705-3254728	4/30
LOC409650	CM009940.2:10889540-10900273	4/33
LOC409557	CM009938.2:9160104-9500553	4/45
LOC100576096	CM009938.2:3541294-3550361	4/57
LOC100578316, LOC107965070	CM009940.2:10938053-10944354	4/60
LOC100578389	CM009931.2:13215322-13282394	4/60
LOC100576271	CM009939.2:6751155-6764653	4/61
LOC102656871	CM009938.2:5542105-5548397	4/62
LOC102654271	CM009934.2:4195154-4213961	4/67
LOC102654646	CM009945.2:3850379-3853959	4/71
LOC408959	CM009938.2:4506405-4555900	5/03
LOC102654070	CM009940.2:10678688-10769226	5/09
LOC551805	CM009937.2:10610889-10614738	5/65

جدول ۹- نام، موقعیت و میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$ ژن‌های شاخص معنی دار زیرگروه ۳ بین دو گروه جنین زنبورعسل نر و ماده
 Table 9. Name, position and $\log_2(\text{fold_change})$ criterion of significant indicator genes of subgroup 3 between the two groups of male and female honey bee embryos

نام ژن	موقعیت	میزان معیار $\log_2(\text{fold_change})$
LOC727522	CM009931.2:13311174-13319041	-4/16

طبق نتایج آنالیز هستی‌شناسی در پایگاه‌های داده، در زیرگروه ۱۰ الی ۱۵ ساعت پس از تخم‌گذاری، ژن LOC408600 با بیان بیش از ۱۶ برابری در جنس نر نسبت به جنس ماده، در عملکرد مربوط به اتصال و ذخیره سازی یون کلسیم نقش دارد که خود بیانگر آن است که در این دوره جنینی، نیاز اتصال و ذخیره‌سازی کلسیم در جنس نر بیشتر است. در خصوص دیگر ژن‌های شاخص شناسایی شده در این زیر گروه، در پایگاه‌های داده هستی‌شناسی اطلاعاتی ثبت نشده بود. در زیرگروه ۲۵ الی ۴۰ ساعت پس از تخم‌گذاری، دو ژن LOC724796 و LOC726150 به ترتیب با بیان بیش از ۲۷ و ۱۶ برابری در جنس ماده نسبت به نر، در فعالیت‌های مربوط به اتصال DNA و تنظیم رونویسی نقش دارند و این تفاوت نشانگر اهمیت بیشتر انجام رونویسی به علت دیپلوئید بودن جنس ماده را بیان می‌کند؛ دو ژن LOC408817 و LOC409203 به ترتیب با بیان بیش از ۱۶ و ۱۸ برابری در جنس نر نسبت به ماده، به ترتیب در عملکرد مربوط به انتقال و متابولیسم اسیدهای آمینه و کربوهیدرات نقش دارند که خود نشانگر سوخت‌وساز بالاتر جنس نر نسبت به ماده در این بازه زمانی جنینی است؛ ژن LOC551632 با بیان بیش از ۱۹

برابری در جنس نر نسبت به ماده، در فعالیت‌های اتصال یون روی و آهن، فعالیت اکسیدوردوکتاز و بیوسنتز هورمون حشرات نقش دارد که بیانگر کارایی بالای این ژن، نقش آن در سنتز هورمون حشرات و نیز اهمیت بیشتر هورمون حشرات در جنس نر نسبت به ماده است؛ ژن Obp9 با بیان بیش از ۱۸ برابری در جنس نر نسبت به ماده، در فعالیت‌های مربوط به حسگر بویایی و تشخیص فرمون مخصوص حشرات نقش دارد که با بیان بیشتر در جنس نر، اهمیت تقویت این ویژگی در این جنس را بیان می‌کند و رونوشت این ژن در تخمدان ملکه و جنین‌های ابتدایی قابل تشخیص است (Foret, 2006). ژن LOC409557 با بیان بیش از ۲۲ برابری در جنس نر نسبت به جنس ماده، در فعالیت اتصال DNA و تنظیم خاموشی ژن نقش دارد که بیانگر آن است جنس نر با توجه به مونوپلوئید بودن نیاز بیشتر به تنظیم بیان ژن (خاموش و روشن کردن) وجود دارد؛ دو ژن LOC726554 و LOC551805 به ترتیب با بیان بیش از ۱۶ و ۵۰ برابری در جنس نر نسبت به جنس ماده، به ترتیب در فعالیت‌های پروتئولیز و فسفولیپاز (هیدرولیز گلیسروفسفولیپید) نقش دارند که هر دو با فعالیت خود ایجاد مونومر و افزایش سطح انرژی قابل مصرف بیشتر برای بدن در جنس نر نسبت به ماده می‌شوند؛ ژن LOC409650 با بیان بیش از ۲۰ برابری در جنس نر نسبت به جنس ماده، در فعالیت‌های اتصال پروتئین و تشکیل ماکرومولکول‌های بزرگتر نقش دارد؛ ژن LOC100578389 در مطالعه شناسایی نشانه‌های انتخاب ژنتیکی در زنبورعسل ایبری (*Apis mellifera iberiensis*)، یکی از ژن‌های شناسایی شده بوده است (Chávez-Galarza et al., 2013). از مابقی ژن‌های شاخص شناسایی شده در پایگاه‌های داده اطلاعات ثبت شده‌ای یافت نشد. در زیرگروه ۵۵ الی ۷۰ ساعت پس از تخم‌گذاری تنها یک ژن شاخص تعیین گردید، که فعالیت هستی‌شناسی این ژن در پایگاه‌های داده یافت نشد.

نتیجه‌گیری

با انجام آنالیز بیان افتراقی ژن‌های بافت کامل جنین زنبورعسل نر و ماده و نیز بین دو جنس نر و ماده تا ۷۰ ساعت پس از تخم‌گذاری، به ترتیب در مجموع ۳۳ ژن، ۴۱ ژن و ۳۱ ژن با بیان متفاوت و معنی‌دار مشخص گردید ($\log_2(\text{fold_change}) > 4$). $\log_2(\text{fold_change}) < -4$ و $q_value < 0.05$ و طبق نتایج آنالیز هستی‌شناسی عمدتاً در اتصال DNA، متابولیسم اسیدآمین و کربوهیدرات، بیوسنتز هورمون حشرات، اجزای ساختاری کوتیکول، فعالیت اندوپیتیداز نوع سرین و اتصال یون‌های کلسیم، روی و آهن نقش دارند.

منابع

- Andrews, Simon. (2010). "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data." In.: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Bahador, Y., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Asadi, M. and Medhati, L., (2016). Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. *Research on Animal Production*, 7(13), pp.192-186.

Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simões, Z.L. and Maleszka, R., (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC developmental biology*, 7(1), p.70.

Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B., (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), pp.2114-2120.

Chávez-Galarza, J., Henriques, D., Johnston, J.S., Azevedo, J.C., Patton, J.C., Muñoz, I., De la Rúa, P. and Pinto, M.A., (2013). Signatures of selection in the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) revealed by a genome scan analysis of single nucleotide polymorphisms. *Molecular ecology*, 22(23), pp.5890-5907.

Chen, X., Hu, Y., Zheng, H., Cao, L., Niu, D., Yu, D., Sun, Y., Hu, S. and Hu, F., (2012). Transcriptome comparison between honey bee queen-and worker-destined larvae. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(9), pp.665-673.

Foret, S., (2006). Function and evolution of putative odorant carriers in the honey bee (*Apis mellifera*).

Gan, Q., Chepelev, I., Wei, G., Tarayrah, L., Cui, K., Zhao, K. and Chen, X., (2010). Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in *Drosophila* gonads revealed by RNA-seq. *Cell research*, 20(7), pp.763-783.

Jiang, S., (2013). *Differential gene expression of varroa-tolerant and varroa-susceptible honey bees (Apis mellifera) in response to Varroa destructor infestation* (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).

Kim, D., Langmead, B. and Salzberg, S.L., (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12(4), pp.357-360.

Pires, C.V., Freitas, F.C.D.P., Cristino, A.S., Dearden, P.K. and Simões, Z.L.P., (2016). Transcriptome analysis of honeybee (*Apis Mellifera*) haploid and diploid embryos reveals early zygotic transcription during cleavage. *PloS one*, 11(1), p.e0146447.

Pizzorno, M.C., Field, K., Kobokovich, A.L., Martin, P.L., Gupta, R.A., Mammone, R., Rovnyak, D. and Capaldi, E.A., (2021). Transcriptomic responses of the honey bee brain to infection with deformed wing virus. *Viruses*, 13(2), p.287.

Sultan, M., Schulz, M.H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D. and Schmidt, D., (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*, 321(5891), pp.956-960.