

مطالعه بیان ژن های HSC70 و HSP90 و ارتباط آن با تنش های دمایی

در ملکه زنبور عسل

The study of HSC70 and HSP90 gene expression and its association with temperature stresses in queen bees

علیرضا درفش^۱، عبدالرضا صالحی^{۲*}، اسماعیل امیری^۳، محمدرضا بختیاری^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- به ترتیب دانشیار، دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه حشره شناسی، دانشکده کشاورزی میسیسیپی، ایالات متحده آمریکا

Derafsh A¹, Salehi AR^{*2}, Amiri E³, Bakhtiari M²

1- MSc Student, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Iran

2- Associate Professor, Associate Professor, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Mississippi, USA

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arsalehi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۵)

چکیده

پرورش ملکه همواره یکی از محورهای اصلی زنبورداری است که نیازمند تجربه و استفاده از تکنیک های نوین و علمی می باشد. استفاده از ابزارهای نوین در فرآیند پرورش ملکه، از جمله سلول های پرورش، بر ابعاد ملکه از نظر کیفیت و پارامترهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی تأثیرگذار است. همچنین، این واقعیت پذیرفته شده است که کیفیت ملکه ها مستقیماً با وزن و اندازه ملکه ها در زمان تولد ارتباط دارد. بنابراین هدف اصلی از مطالعه حاضر مقایسه پرورش ملکه با سه اندازه مختلف (کوچک، متوسط و بزرگ) تحت تأثیر تنش های دمایی بر بیان ژن های پروتئین های شوک گرمایی بود. برای دستیابی به این هدف، از ۳۶ ملکه در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳ با اندازه های مختلف ملکه (بزرگ، متوسط و کوچک) و در دو سطح تنش (دمای پایین تر از چهار درجه سانتی گراد و دمای بالای ۴۰ درجه سانتی گراد) به صورت کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۶ تکرار استفاده شد. برای استخراج RNA از نمونه های منجمد مخلوط قسمت قفسه سینه ۳ ملکه استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از ژل آگارز و نانودراپ بررسی شد. سپس cDNA سنتز شده و بیان نسبی ژن ها با استفاده از Real-Time PCR تحلیل شد. نتایج نشان داد که ملکه های با جثه بزرگ تر مقاومت بیشتری در مقابل تنش های گرمایی از خود نشان دادند (P=0.01)؛ اما در تنش های سرمایی، تفاوت معنی داری به لحاظ جثه ملکه مشاهده نشد. به طور کلی، اندازه سلول های پرورش ملکه بر تحمل استرس های گرمایی تأثیرگذار بود اما بر روی استرس های سرمایی مؤثر واقع نشد.

واژه های کلیدی

تنش دمایی
مقاومت به تنش
ملکه
HSC70
HSP90

مقدمه

زنبور عسل از شناخته شده‌ترین اعضای اکوسیستم‌های طبیعی در میان حشرات گرده‌افشان به حساب می‌آید (Bahador et al. 2016). حشرات گرده افشان به‌طور چشم‌گیری روابط اکولوژیک، حفاظت و پایداری اکوسیستم‌ها، تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی، تنوع گل‌ها و تکامل را متأثر می‌سازند (Bahador et al. 2016). زنبورهای عسل همچنین نقش مهمی در اکوسیستم‌های خاکی یعنی جایی‌که پوشش گیاهی سبز برای حداقل سه تا چهار ماه در سال وجود دارد را دارا می‌باشند. در صورتی‌که زنبورهای عسل از بین بروند بسیاری از گونه‌های گیاهی و حیوانی با خطر انقراض مواجه خواهند شد. این امر بدان دلیل است که تولید دانه، هسته و میوه‌ها به میزان زیادی وابسته به گرده افشانی حشرات است و در بین حشرات گرده‌افشان، زنبورهای عسل از گرده افشان‌های اصلی هستند (Bahador et al. 2016).

دیاپوز^۱ یک استراتژی توسعه‌ای است که به حشرات اجازه می‌دهد در شرایط دشوار زنده بمانند و تولید مثل کنند، تا بالاترین سطح زیستی و تولید مثلی را داشته باشند (Li et al. 2008). دیاپوز شامل یک برنامه رفتاری، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی است که توسط مجموعه خاصی از ژن‌ها تنظیم می‌شود. این تنظیمات در بقا و تولید مثل حشرات نقش اساسی دارد و به‌صورت مولکولی تحت اثر تنش‌های محیطی مانند دماهای شدید، گرسنگی و تنش انجام می‌شود (Denlinger 2008, Denlinger 2002, Denlinger 1992). مطالعات مختلف نشان داده است که موجودات برای محافظت در برابر تنش‌های محیطی مانند سرما، گرما، خشکی، سموم و عوامل بیماری‌زا پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPs)^۲ سنتز می‌کنند (Kregel 2002). پروتئین‌های شوک گرمایی گروهی از پروتئین‌های بسیار حفاظت شده هستند (Richter et al. 2010) که در بدن موجودات زنده برای جلوگیری از تجمع پروتئین، انجماد و دناتوره شدن در هنگام تنش‌های محیطی نقش اساسی دارند (Cheng et al. 2015). این پروتئین‌ها بر اساس شباهت توالی و اندازه مولکولی، HSPs به چهار دسته تقسیم می‌شوند که عبارتند از: ۱) خانواده کوچک

HSP با جرم مولکولی در محدوده ۱۲-۴۳ کیلو دالتون، ۲) خانواده HSP60 با جرم مولکولی تقریباً ۶۰ کیلو دالتون، ۳) خانواده HSP70 با جرم مولکولی تقریباً ۷۰ کیلو دالتون، و ۴) خانواده HSP90 با جرم مولکولی بالاتر (Shen et al. 2015).

در بین انواع پروتئین‌های شوک گرمایی، HSP90 فراوان‌ترین پروتئین بیان شده در شرایط تنش است (Xu et al. 2015). این پروتئین علاوه بر محافظت در مقابل تنش (Aamodt 2008) نقش‌های متنوع دیگری از جمله نقش بافر (Rutherford et al. 2007) و تنظیم‌کننده رشد (Rutherford et al. 2007) را در بسیاری از فرآیندهای سلولی نیز ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر، تعداد زیادی از مطالعات نشان داده است که بیان HSP نه تنها توسط تنش‌های مختلف القا می‌شود بلکه همچنین با دیاپوز حشرات نیز مرتبط است (MacRae 2010). به‌عنوان مثال، در مگس سرکه بیشترین سطح دیاپوز را ژن HSP70 دارا است (Ozbakir 2021). در مقابل، در طول دیاپوز، بیان ژن HSP90 در سطح پایین تنظیم شده است، اما پس از شروع توسعه جدید بازیابی می‌شود (Li and Denlinger 2009). با توجه به این مطالب می‌توان از سطح بیان ژن HSP90 به‌عنوان یک بیومارکر برای ملاحظه پاسخ‌های سلولی و فیزیولوژیکی در برابر انواع تحریکات محیطی استفاده کرد.

در بین گونه‌های مختلف، این پروتئین‌ها نقش‌های متفاوتی در از بین بردن حشرات دارند. بر این اساس، HSP90 در حین دیاپوز شفیرگی تنظیم می‌شود (Cheng et al. 2015). بنابراین، ژن HSP90 و بیان آن ارتباط مستقیمی با کیفیت پرورش در شفیرگی دارد. پروتئین شوک حرارتی ۷۱ کیلودالتونی (HSC70) که با نام HSPA8 نیز شناخته می‌شود، متعلق به خانواده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) است. برخلاف HSP70، این یک پروتئین چاپرون است که در فرآیندهای سلولی متنوعی از جمله تاخوردگی پروتئین و تخریب پروتئین نقش دارد (McKinstry et al. 2017). همچنین این چاپرون در زنبور عسل‌های در معرض گرما القاء می‌شود (McKinstry et al. 2017). در مطالعات مولکولی، بیان HSP90 و HSC70 در لاروهای تحت شرایط تنش دمایی قابل توجه بوده است (Cheng et al. 2015). بنابراین، دوران لاروی و شفیرگی در زنبور عسل و به‌ویژه ملکه که مادر

¹ Diapause² Heat shock protein

می‌گیرد (Mohammadabadi et al. 2023). بررسی بیان ژن می‌تواند بررسی یک ژن خاص با استفاده از روش‌هایی مثل Real-Time PCR و یا بررسی تعداد زیادی از ژن‌ها باشد (Mohammadabadi et al. 2023). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی بیان HSP90 و HSC70 تحت شرایط تنش دمایی در روش‌های مختلف پرورش مرتبط با جثه ملکه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ابتدای اردیبهشت ۱۴۰۱ شمسی در منطقه کهمره سرخی (29°36'40" N, 46°15'09" E) در فاصله ۳۰ کیلومتری شیراز به مدت یک ماه اجرا گردید. پس از پایان مرحله اول و آغاز فاز تخم‌گذاری ملکه‌ها، همراه با یک جمعیت یکسان، به منطقه کوهستانی دراک منتقل شدند و در اواخر مهرماه ۱۴۰۱، ملکه‌های هدف با انتقال هوایی در کمتر از ۴ ساعت به آزمایشگاه مرکزی دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان منتقل شدند. این تحقیق به صورت یک آزمایش طراحی و اجرا شد. بدین منظور، از ۳۶ ملکه زنده (۶ ماهه) در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳ با سه اندازه مختلف (بزرگ، متوسط و کوچک) و در دو سطح تنش (دمای پایین‌تر از چهار درجه سانتی‌گراد و دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. این آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۶ تکرار طراحی و اجرا شد.

تأثیر تنش محیطی بر سطوح بیان ژن‌های مرتبط با تنش گرمایی (HSC70 و HSP90) با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد. بدین منظور، از نمونه‌های منجمد (۷۰- درجه سانتی‌گراد) از تعداد ۳۶ ملکه در ۶ تیمار و دو تکرار و هر تکرار شامل ۳ ملکه که باهم مخلوط شدند (مخلوط قسمت قفسه سینه)، برای استخراج RNA استفاده شد. استخراج RNA از این نمونه‌ها با استفاده از محلول (Bioflux, Japan) انجام شد. سپس، کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. همچنین، با استفاده از دستگاه نانودراپ نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر و غلظت RNA هر نمونه محاسبه شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس توس (مشهد، ایران) انجام شد. توالی الیگونوکلوئید

تمام اعضاست، نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند (MacRae 2010). همچنین، حتی ملکه‌های بالغ در شرایط تنش‌های دمایی شدید تفاوت قابل توجهی در بیان ژن نشان داده‌اند (Li et al. 2008). به علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al. 2016a; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ گاه همه به طور هم‌زمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016b; Mohammadabadi et al. 2023). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Bordbar et al. 2022; Jafari Ahmadabadi et al. 2023). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Mohamadipoor et al. 2021; Masoudzadeh et al. 2020). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Masoudzadeh et al. 2020). 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; Shokri et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌هزادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). بنابراین در دسترس بودن ابزارهای ژنومی می‌تواند اصلاح موجودات را در زمان کوتاه‌تر تا حد زیادی افزایش دهد. این ابزارها از جمله آنالیز بیان ژن برای تسهیل شناسایی ژن‌های مقاوم در حال توسعه هستند و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به بیماری در این راستا انجام

¹ DNA

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون t-test با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و طبق مدل آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = هر یک از مشاهدات، μ = میانگین جامعه، T_i = اثر گروه‌های

آزمایشی، ε_{ij} = خطای آزمایشی مقایسات مستقل در سطح احتمال

۰/۰۵

پرایمر رفت و برگشت برای ژن‌های هدف مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار Primer3plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>) طراحی شد (جدول ۱). پرایمرهای طراحی‌شده توسط بررسی BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) با ژن مرجع در NCBI، تطابق ۱۰۰ درصدی داشتند. واکنش Real Time PCR نیز با استفاده از مسترمیکس SMOBIO انجام شد (جدول ۲). در جدول ۳ برنامه دمایی واکنش Real Time PCR آورده شده است. برای اطمینان از دقت بیان، روش بهبود یافته $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه تصحیح کارایی فردی استفاده شد (Rao et al. 2013). از ژن‌های خانه‌دار ACT و CAT برای کنترل نرمال‌سازی استفاده شد. جدول ۴ برنامه آنالیز منحنی ذوب را نشان می‌دهد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

ژن	پرایمر	توالی	طول قطعه
HSP90	رفت	CATGGCTAATGCCGGAGAGG	۲۰
HSP90	برگشت	CTGCACCAGCTTGAAGAGC	۱۹
HSC70	رفت	ACAGCTGCTGCAATTGCTTA	۲۰
HSC70	برگشت	TGATCCATCACGCGTAAATC	۲۰
CAT	رفت	GTATGCCAACACTGTCCTTTCTG	۲۳
CAT	برگشت	ATGGTGATGGTGCTAGGGC	۲۰
ACT	رفت	CTTGGCCCAACAATCTGCAAT	۲۲
ACT	برگشت	GACATTCTCTAGGCCACCA	۲۰

جدول ۲- ترکیب مخلوط واکنش Real time PCR

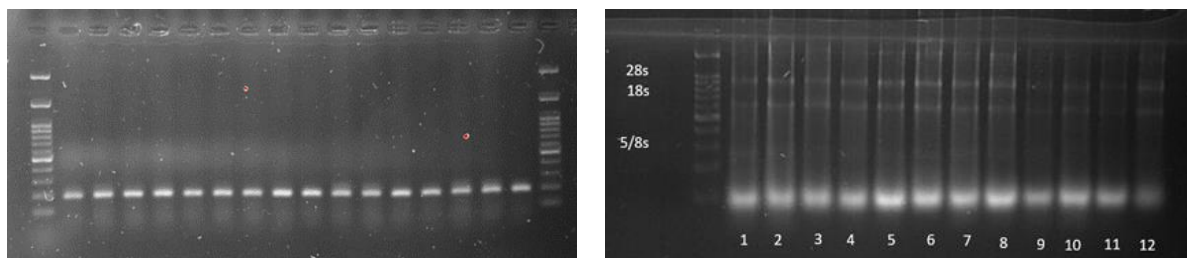
ترکیبات	مقدار (میکرولیتر)
cDNA (۵۰ نانوگرم)	۲
مستمیکس	۵
پرایمر مستقیم (۱۰ میکرومولار)	۱
پرایمر معکوس (۱۰ میکرومولار)	۱
آب دوبار تقطیر	۱
حجم نهایی	۱۰

جدول ۳- چرخه دمایی Real time PCR

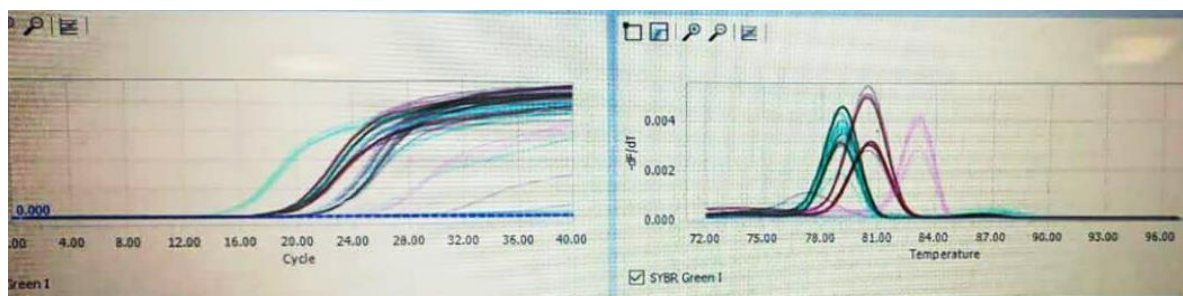
مرحله دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه: دقیقه)
واشرشته‌سازی اولیه ۹۵	۱۰:۰۰
واشرشته‌سازی ۹۵	۰:۱۵
اتصال ۵۷	۰:۱۰
بسط ۷۲	۰:۲۰
بسط نهایی ۷۲	۵:۰۰

جدول ۴- آنالیز منحنی ذوب برای Real time PCR

دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه: دقیقه)
۹۷	۰۰:۱۰
۳۷	۰۰:۳۰



شکل ۱- الکتروفورز RNA استخراج شده (سمت راست) و cDNA سنتز شده (سمت چپ) بر روی ژل آگارز.



شکل ۲- منحنی تکثیر (سمت راست) و ذوب (سمت چپ) Real Time PCR

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز ژل آگارز حاوی RNA استخراج شده و cDNA سنتز شده در شکل ۱ نشان داده شده است. با مقایسه‌ی ضخامت و شدت (وضوح) باندهای به‌دست آمده روی ژل، می‌توان به کیفیت RNA استخراج شده پی برد. شکستگی قطعه‌های RNA در طی استخراج که به‌صورت اسمیر روی ژل دیده می‌شود، به‌عنوان معیاری برای کیفیت پایین‌تر نمونه‌های استخراج شده است. در نتیجه وجود باندهای واضح ۲۸S، ۱۸S و ۵/۸S (شکل ۱) نشان از کیفیت بالای استخراج در این آزمایش می‌باشد. همچنین، منحنی‌های تکثیر و ذوب در شکل ۲ نشان داده شده است.

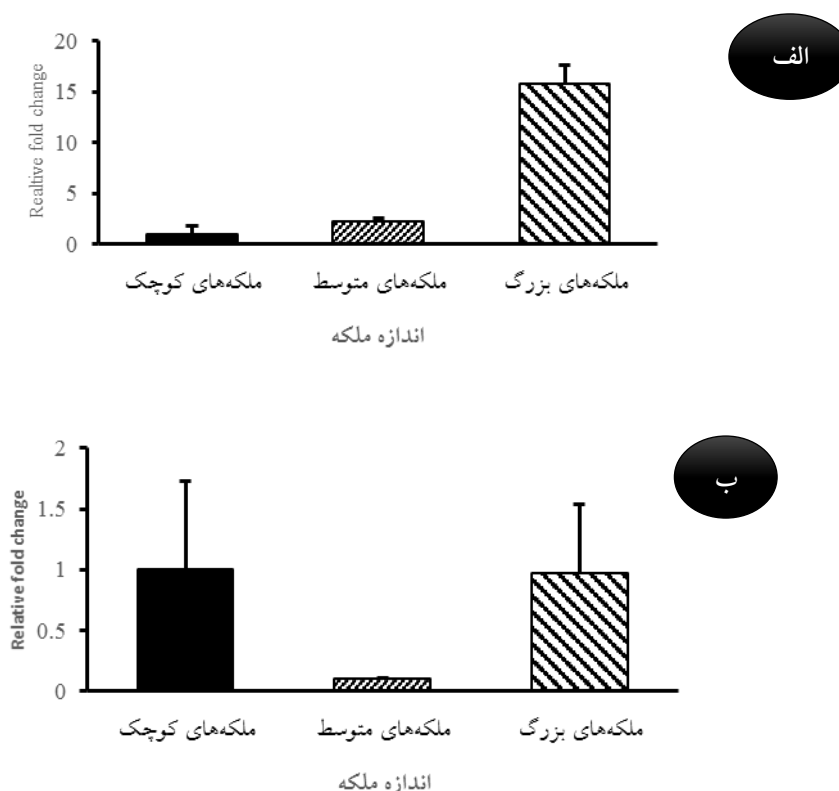
آنالیز بیان ژن HSP90، و ارتباط آن با جثه ملکه‌ها در شرایط مختلف تنش‌زای گرمایی و سرمایی در شکل ۳ و جدول ۵ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بیان ژن HSP90 با ابعاد جسمانی ملکه‌ها به‌طور مستقیم مرتبط بوده و در شرایط گرمایی، ملکه‌های با جثه بزرگ نشان‌دهنده بیشترین بیان این ژن بودند و

به‌ترتیب، ملکه‌های با جثه متوسط و کوچک دنبال می‌کردند (شکل ۳-الف). علی‌رغم عدم تفاوت معنی‌دار در میزان بیان HSP90 بین ملکه‌های کوچک و متوسط، ولی ملکه‌های با جثه بزرگ در مقابل گرما تحمل بیشتری ($P < 0.05$) نسبت به ملکه‌های کوچک جثه از خود نشان دادند. این نتایج ممکن است نشان‌دهنده توان بیشتر ملکه‌های با ابعاد بزرگ‌تر در مقابله با تنش‌های گرمایی باشد و به‌عبارت دیگر، افزایش بیان HSP90 در این ملکه‌ها ممکن است نقش اساسی در افزایش تحمل به تنش‌های گرمایی ایفا کند.

در مقابل، در نمونه‌های تحت تنش سرمایی (شکل ۳-ب)، زنبورهای با جثه بزرگ و کوچک اختلاف معنی‌داری در بیان ژن HSP90 نداشتند اما زنبورهای با جثه متوسط، نسبت به زنبورهای کوچک، بیان ژن کمتری داشتند ($P < 0.001$). این نتایج نشان می‌دهند که زنبورهای با جثه متوسط در مقایسه با زنبورهای

گرمایی کمتر است، استفاده از ملکه‌های با اندازه کوچک یا بزرگ تفاوت چندانی ایجاد نخواهد کرد. نتایج این پژوهش با یافته‌های مطالعات (Wu et al. 2018) و (Wing et al. 2016) همخوانی دارد.

بزرگ‌تر، تحمل کمتری نسبت به تنش‌های سرمای‌ی دارند. در نهایت، با ترکیب نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعات مشابه، درمی‌یابیم که در مناطقی با احتمال بروز تنش‌های گرمایی، ملکه‌های با جثه بزرگ عملکرد بهتری دارند و بهترین گزینه محسوب می‌شوند. اما در مکان‌هایی که احتمال بروز تنش‌های



شکل ۲- تغییرات نسبی بیان ژن HSP90. الف) ملکه‌های تحت تنش گرمایی (۴۰°C). ب) ملکه‌های تحت تنش سرمای‌ی (۴°C)

جدول ۵- مقایسه میزان بیان نسبی HSP90 در ملکه‌های کوچک، متوسط و بزرگ

سرمایی (۴°C)				گرمایی (۴۰°C)				نوع تنش
کوچک	متوسط	کوچک	بزرگ	کوچک	متوسط	کوچک	بزرگ	اندازه ملکه
۱	۰/۱۶	۱	۸۳/۱۵	۱	۲۴/۲	۱	۱	میانگین بیان نسبی
۱/۰۳	۰/۵۷ ^{ns}	۰/۰۳*	۰/۰۳*	۰/۲۵ ^{ns}				t-test

^{ns} عدم تفاوت معنی‌دار

* وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪

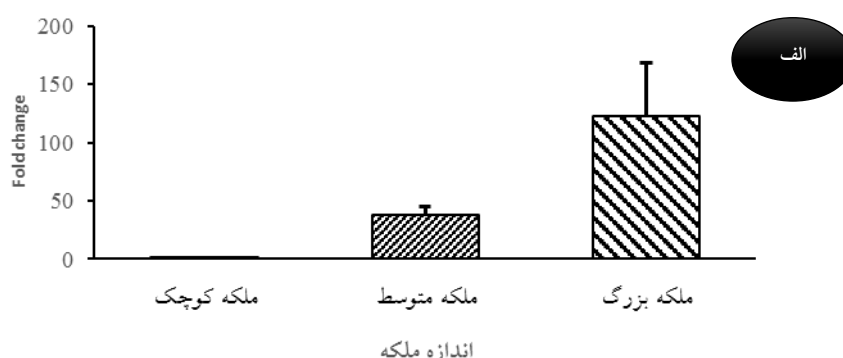
تفسیر پاسخ ملکه‌ها به تنش‌های سرمای‌ی و گرمایی ایفا می‌کنند. بررسی بیان ژن HSC70 نشان داد که در شرایط تنش سرمای‌ی، ملکه‌های با ابعاد بزرگ‌تر بیشترین میزان بیان این ژن را داشتند و

آنالیز بیان HSC70

نتایج مربوط به آنالیز بیان ژن HSC70 در شکل ۴ و جدول ۶ با دقت بالایی آورده شده است. این نتایج نقش مهمی را در تفهیم و

نتایج تا حد زیادی نشانگر اهمیت انتخاب ملکه‌های با ابعاد مناسب در پرورش زنبور عسل به منظور افزایش تحمل به تنش‌های محیطی می‌باشند. بر اساس مطالعه McAfee و همکاران، حتی ملکه‌های بالغ در شرایط استرس‌های دمایی شدید تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌ها نشان دادند (McAfee et al. 2021) که موافق با یافته‌های مربوط به اثر استرس سرمایی بر بیان ژن در مطالعه حاضر است.

پس از آن، ملکه‌های متوسط و کوچک به ترتیب در میزان بیان قرار گرفتند (شکل ۴-الف). با این حال، تحلیل آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان بیان HSC70 میان نمونه‌ها وجود نداشت. این نتایج نشان می‌دهند که ملکه‌های با جنه بزرگتر در مواجهه با تنش‌های سرمایی ممکن است عملکرد بهتری داشته باشند. همچنین، در شرایط تنش گرمایی، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن HSC70 مشاهده نشد (شکل ۴-ب)، که این موضوع نشان‌دهنده عدم وابستگی این ژن به شرایط گرمایی می‌باشد. این



شکل ۴- تغییرات نسبی بیان ژن HSC70. الف) ملکه‌های تحت تنش سرمایی (۴°C). ب) ملکه‌های تحت تنش گرمایی (۴۰°C)

جدول ۶- مقایسه میزان بیان نسبی HSC70 در ملکه‌های کوچک، متوسط و بزرگ

نوع تنش	سرمایی (۴°C)				گرمایی (۴۰°C)			
	کوچک	متوسط	کوچک	بزرگ	کوچک	متوسط	کوچک	بزرگ
اندازه ملکه	۱	۳۸/۴۱	۱	۰/۹۷	۱	۰/۱	۱	۱۲۲/۶۳
میانگین بیان نسبی								
t-test	۰/۳۷ ^{ns}		۰/۹۶ ^{ns}		۰/۱ ^{ns}		۰/۲۳ ^{ns}	

^{ns} عدم تفاوت معنی‌دار

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، هدف ما به چالش کشیدن فرضیات گوناگون در زمینه روش‌های پرورش و ارتباط آن‌ها با جثه ملکه‌ها و کیفیت آن‌ها، بود. در این راستا، نتایج نشان دادند که روش کلنی‌های شروع‌کننده و خاتمه‌دهنده مجزا، کیفیت ملکه‌های پرورشی (از نظر جثه و وزن در زمان تولد) را بهبود می‌بخشد و با وجود چالش‌هایی که با آرایش کلنی‌ها همراه است، مزیت قابل توجهی دارد. به علاوه، اندازه سلول‌های پرورش ملکه، ابعاد ملکه و همچنین اندازه ملکه زنده‌مانی، کیفیت ملکه و تحمل تنش‌های گرمایی را به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ ملکه‌های با جثه بزرگ‌تر مقاومت بیشتری در مقابل تنش‌های گرمایی از خود نشان می‌دهند. به‌طور کلی، اندازه سلول‌های پرورش ملکه بر تحمل استرس‌های گرمایی تأثیرگذار بود اما بر روی استرس‌های سرمایایی مؤثر واقع نشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ملکه‌های با ابعاد بزرگ‌تر، در مقابل تنش‌های گرمایی و سرمایایی، تحمل بیشتری از خود از آن خود نشان دادند. این نتایج با یافته‌های پژوهش‌گران قبلی نظیر Honek (۱۹۹۳) که به بررسی ژن HSC70 پرداخته بود و رابطه واضحی بین ابعاد جسمی ملکه و عملکرد بهتر آن را توجیح کرد، همخوانی دارد. همچنین، با مطالعه Wu et al. (2018) که تفاوت‌های ژنتیکی در ابعاد سلول و کیفیت ملکه را به شکل معنی‌داری در فیزیولوژی ملکه تأثیرگذار بیان کرد، مطابقت دارد. به‌طور کلی، ملکه‌های با جثه بزرگ‌تر نه تنها مقاومت مناسبی در مقابل شرایط گرمایی و سرمایایی از خود نشان دادند، بلکه همچنین توانستند دیدگاه سنتی مبنی بر اینکه ملکه‌های با ابعاد درشت توان بیشتری در مقابله با تنش‌های محیطی دارا هستند را به وضوح تأیید نمایند.

منابع

- Aamodt RM (2008) The caste-and age-specific expression signature of honeybee heat shock genes shows an alternative splicing-dependent regulation of HSP90. *Mechanisms of Ageing and Development* 129:632-637.
- Ahmadabadi SA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, Fozzi MA, Mansouri M (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Journal of Agricultural Biotechnology* 15: 217-234
- 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* 7:186-192.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 6:571-579.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech Journal of Animal Science* 61:487.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, Xu L, Li J, Zhang L (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals* 12:e1103.
- Cheng WN, Lei JX, Fox CW, Cheng WN, Lei JX, Fox CW, Spencer Johnston J, Zhu-Salzman KY (2015) Comparison of life history and genetic properties of cowpea bruchid strains and their response to hypoxia. *Journal of Insect Physiology* 75:5-11.
- Denlinger DL (2002) Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47:93-122.
- Denlinger DL (2008) Why study diapause? *Entomological Research* 38:1-9.
- Denlinger DL, Lee Jr RE, Yocum GD, Kukal O (1992) Role of chilling in the acquisition of cold tolerance and the capacitation to express stress proteins in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 21:271-280.
- Honek A (1993) Intraspecific variation in body size and fecundity in insects. *Oikos* 66:483-492.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15:217-234
- Kregel KC (2002) Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 92:2177-2186.
- Li A, Denlinger DL (2009) Pupal cuticle protein is abundant during early adult diapause in the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Medical Entomology* 46:1382-1386.
- Li WX, Li JC, Lu ZY, Liu XX, Zhang QW (2008) Critical photoperiod and sensitive stage of diapause induction in

- Microplitis mediator (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae). Acta Entomologica Sinica 51:635-639.
- MacRae TH (2010) Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. Cellular and Molecular Life Sciences 67:2405-2424.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) Dlk1 gene expression in different Tissues of lamb. Iranian Journal of Applied Animal Science 10:669-677.
- McAfee A, Tarpay DR, Foster LJ (2021) Queen honey bees exhibit variable resilience to temperature stress. PLoS one 16:e0255381.
- McKinstry M, Chung C, Truong H, Johnston BA, Snow JW (2017) The heat shock response and humoral immune response are mutually antagonistic in honey bees. Scientific Reports 7:8850.
- Mohamadipoor Saadatabadi L, Mohammadabadi M, Amiri Ghanatsaman Z, Babenko O, Stavetska R, Kalashnik O, Kucher D, Kochuk-Yashchenko O, Asadollahpour Nanaei H (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. BMC Veterinary Research 17:1-9.
- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. Journal of Agricultural Biotechnology 15:239-256.
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, Kalashnyk O, Stavetska RV, Klopenko NI, Oleshko VP, Tkachenko SV (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: e08542.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in Bos taurus, Ovis aries, and Sus scrofa. Animals 12:3471.
- Ozbakir GO (2021) Effects of rearing method on some morphological and reproductive organ characteristics of queen honey bees (*Apis mellifera* L.). Medycyna Weterynaryjna 77:89-94.
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. Molecular Cell 40:253-266.
- Rutherford S, Knapp JR, Csermely P (2007) Hsp90 and developmental networks. In: Molecular aspects of the stress Response: Chaperones, membranes and networks. Springer, pp 190-197.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, Asadi Fozi M, Babenko O, Kalashnyk O, Oleshko V, Tkachenko S (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. Gene Express 21:21-26.
- Shen Q, Zhao L, Xie G, Wei P, Yang M, Wang S, Zhang F, Tang B (2015) Cloning three Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) heat shock protein 70 family genes: regulatory function related to heat and starvation stress. Journal of Entomological Science 50:168-185.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyroodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. Journal of Agricultural Biotechnology 15:217-236.
- Wu X, Zhou L, Zou C, Zeng Z (2018) Effects of queen cell size and caging days of mother queen on rearing young honey bee queens *Apis mellifera* L. The Journal of Apicultural Science 62:215-222.
- Xu HJ, Xue J, Lu BO, Zhang XC, Zhuo JC, He SF, Ma XF, Jiang YQ, Fan HW, Xu JY, Ye YX (2015) Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. Nature 519:464.