

Investigation of the MRJP1 Gene Polymorphism Associated with Royal Jelly Production Trait in Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda*) and Its Association Analysis with Royal Jelly Production

Hajieh Lotfi¹ , Mahdi Mokhber^{2*}  and Ali Hashemi³ 

1. Graguated Student (MS), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. hajieh.lotfi@gmail.com
2. Corresponding author, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. m.mokhber@urmia.ac.ir
3. Associated Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. a.hashemi@urmia.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 29 March 2026
Received in revised from 21
May 2026
Accepted 21 May 2026
Available online 23 May 2026

Keywords:
Apis mellifera Meda,
MRJP1,
Polymorphism,
Royal jelly,
SSCP

ABSTRACT

Objective: As the most abundant protein in royal jelly, the MRJP1 gene plays a key role in larval differentiation into the queen caste and determines the quality of this valuable product. The present study was designed and conducted to investigate the polymorphism of the MRJP1 gene in the Iranian honey bee population (*Apis mellifera meda*) and analyze its association with royal jelly production trait.

Method: Sampling was performed from 120 honey bee colonies located in an apiary in Bostanabad County (East Azerbaijan Province). DNA was extracted from worker pupae using an optimized CTAB method, and the Nanodrop assessed sample quality and quantity, and 1% agarose gel electrophoresis. A 443 bp fragment of the *MRJP1* gene was amplified using specific primers and polymerase chain reaction (PCR). Polymorphism of this fragment was investigated using the SSCP technique on 12% polyacrylamide gel.

Results: DNA extraction from all samples yielded favorable quality and quantity (concentration >150 ng/μl, 260/280 ratio ~1.8, and 260/230 ratio ~2). The target fragment was successfully amplified with no non-specific bands observed. Analysis of SSCP banding patterns was identical across all 120 samples, indicating the absence of polymorphism in the studied region of the MRJP1 gene in the Iranian honey bee population.

Conclusions: The MRJP1 gene is highly conserved in the studied population and shows no polymorphism in the examined coding region. This is likely due to the vital role of this gene in larval survival and differentiation, which subjects it to purifying selection. However, further studies with larger sample sizes, broader geographical coverage, investigation of regulatory regions, and analysis of post-translational modifications of the *MRJP1* protein are necessary for a more comprehensive understanding of the genetic diversity of this gene in native Iranian populations.

Cite this article: Lotfi, Hajieh., Mokhber, Mahdi., & Hashemi, Ali. (2026). Investigation of the *MRJP1* Gene Polymorphism Associated with Royal Jelly Production Trait in Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda*) and Its Association Analysis with Royal Jelly Production. *New Approaches in Animal Sciences*, 1 (2), 1-15. <http://doi.org/10.22098/naas.2026.19482.1013>

Publisher: University of Mohaghegh Ardabili.

DOI: <http://doi.org/10.22098/naas.2026.19482.1013>



Introduction

Honey bees are indispensable insects that provide essential pollination services for agricultural crops while maintaining the balance of natural ecosystems. In this ecological role, they produce valuable products, including honey, beeswax, propolis, and, particularly, royal jelly, which holds exceptional economic and nutritional significance. Royal jelly is a gelatinous, yellowish-white substance secreted from the hypopharyngeal and mandibular glands of nurse worker bees. This secretion serves as the exclusive food source for the queen honey bee throughout her lifespan. It constitutes the primary nourishment for all larvae during their first three days of development, exercising decisive control over caste differentiation. The unique biochemical composition of royal jelly includes water, proteins, carbohydrates, lipids, vitamins, minerals, and numerous bioactive compounds, conferring antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and immunomodulatory properties beneficial to both honey bees and humans.

The main Royal Jelly Proteins (MRJPs) represent the most abundant protein fraction in royal jelly, constituting approximately 82-90% of its total protein content. These proteins are encoded by the MRJP multigene family, with nine distinct members (MRJP1-9) identified in the honey bee genome, predominantly located on chromosome 11. Within this family, the MRJP1 gene is particularly significant, as it encodes the most abundant royal jelly protein, royalactin, which functions as a primary factor directing larval development toward the queen caste and serves as a molecular marker for assessing royal jelly freshness and authenticity. The MRJP1 gene spans approximately 3038 base pairs, with six exons and five introns, and encodes a mature protein of 432 amino acids. Despite its well-established biological and economic importance, information regarding its genetic diversity remains limited, particularly within native Iranian honey bee populations (*Apis mellifera meda*). This investigation was designed to examine the MRJP1 gene polymorphism in Iranian honey bee populations and to evaluate potential associations with royal jelly production characteristics, aiming to assess existing genetic variation and to explore the use of MRJP1 as a candidate molecular marker for selecting superior royal jelly-producing colonies.

Method

The experimental population comprised 120 honey bee colonies maintained at an apiary in Bostanabad County, East Azerbaijan Province. Royal jelly production data were systematically recorded for each colony following harvest. For genetic analysis, worker pupae were collected and preserved in 70% ethanol solution before transport to the Genetics Laboratory at Urmia University. Genomic DNA extraction was performed using an optimized CTAB-based protocol, with DNA quantity and quality evaluated through NanoDrop spectrophotometry and electrophoresis on 1% agarose gels.

For molecular characterization, specific primers were designed to amplify a 443-base-pair fragment of the MRJP1 gene from the reference sequence. Primer sequences were forward: 5'-

GATGCAACGCTGGTCATGTG-3' and reverse: 5'-TCACTTTGAGCGACGGTACG-3'. PCR amplification was conducted in 20 µL volumes using a commercial master mix, with thermal cycling including initial denaturation at 95°C for 5 minutes, 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 5 minutes. PCR products were evaluated on 1.5% agarose gels. Genetic polymorphism was investigated using Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis on 12% polyacrylamide gels with vertical electrophoresis at 330 volts for 5 hours.

Results

DNA extraction from all 120 samples yielded high-quality genomic DNA with concentrations exceeding 150 ng/µL. Purity evaluation revealed 260/280 ratios of approximately 1.8, indicating minimal protein contamination, and 260/230 ratios of approximately 2.0, confirming the absence of phenolic or carbohydrate contamination. PCR amplification of the 443 bp MRJP1 fragment was successful for all samples, with clear, sharp bands at the expected molecular weight and no non-specific products. SSCP analysis revealed remarkably uniform banding patterns across all 120 samples, with identical electrophoretic mobility and no evidence of conformational variants indicating sequence polymorphisms. This complete absence of variation demonstrates that the examined MRJP1 region is monomorphic within the studied Iranian honey bee population.

The principal finding is the complete absence of detectable polymorphism in the MRJP1 gene fragment examined. This contrasts with findings for other MRJP family members, in which substantial polymorphism has been documented in MRJP3, MRJP5, and MRJP8, whereas MRJP2 exhibits monomorphism similar to MRJP1. This heterogeneous pattern reflects distinct evolutionary mechanisms governing different members of this gene family. The pronounced conservation of MRJP1 can be attributed to purifying selection acting throughout the evolutionary history of honey bees. As the gene encoding the most abundant royal jelly protein, with established roles in caste determination and larval development, MRJP1 plays a critical biological role. Any non-synonymous mutations that alter the protein sequence would likely disrupt these essential functions, interfere with larval differentiation, and compromise colony social structure, and would be efficiently eliminated by natural selection. This interpretation is consistent with molecular evidence indicating MRJP1 conservation at nucleotide sequence, promoter architecture, and regulatory levels.

The essential functions of MRJP1 extend beyond caste differentiation to include contributions to the physical properties of royal jelly. The protein forms oligomeric complexes with apisimin, contributing to the characteristic high viscosity that enables royal jelly to support the development of queen larvae. Mutations disrupting protein structure would compromise these complex-formation capabilities, thereby providing additional selective pressure to maintain sequence integrity. Even without DNA sequence variation, phenotypic diversity could potentially arise through post-translational modifications. Research has documented that MRJP1 undergoes methylation, phosphorylation, and deamidation, generating multiple protein

isoforms with potentially distinct functional properties without requiring underlying gene sequence variation. Such modifications may influence royal jelly characteristics while remaining invisible to DNA-based polymorphism screening. The sample size of 120 colonies, while substantial, may have been insufficient to detect rare polymorphisms present at very low frequencies. Investigations of larger European honey bee populations have identified polymorphic sites within MRJP1, demonstrating that variation at this locus is not absent across all populations. The presence or absence of polymorphism may depend on the specific population examined, geographic sampling scale, and gene regions targeted. Additionally, MRJP gene expression can be modulated by environmental and nutritional factors, suggesting that phenotypic variation in royal jelly production may arise from differences in gene expression regulation rather than structural variation. Even with a completely monomorphic MRJP1 sequence, variation in expression levels in response to environmental conditions could produce significant differences in royal jelly characteristics.

Conclusions

In the Iranian honey bee population studied, the MRJP1 gene appears to be highly conserved, with no detectable polymorphism in its coding region. This uniformity likely results from strong selective pressure on this locus, given the gene's crucial role in larval caste determination and the structural integrity of royal jelly. However, the lack of DNA-level variation does not imply a lack of functional diversity; post-translational modifications and differences in gene expression levels may also give rise to phenotypic variation related to royal jelly production. Given the growing economic importance of royal jelly, further investigation of this gene in native Iranian populations seems necessary. Future research should focus on broader sampling, examination of promoter and intronic regions, study of post-translational modifications, and analysis of gene expression under various environmental and nutritional conditions. Such an integrated approach would help clarify the molecular mechanisms of this gene and pave the way for marker-assisted breeding programs.

Keywords: *Apis mellifera Meda*, MRJP1, Polymorphism, Royal jelly, SSCP

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Not applicable

Acknowledgements

The authors would like to thank the anonymous reviewers for their valuable suggestions during the manuscript revision.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

بررسی چندشکلی ژن MRJP1 مرتبط با صفت تولید ژل رویال در زنبور عسل ایرانی (Apis Mellifera Meda) و تحلیل ارتباط آن با تولید ژل رویال

حاجیه لطفی^۱، مهدی مخبر^{۲*} و علی هاشمی^۳

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد پرورش زنبور عسل، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: hajieh.lotfi@gmail.com

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه:

m.mokhber@urmia.ac.ir

۳- دانشیار، دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: a.hashemi@urmia.ac.ir

چکیده

اطلاعات مقاله

هدف: ژن MRJP1 به عنوان فراوان ترین پروتئین ژل رویال، نقشی کلیدی در تمایز لاروها به سوی کاست ملکه و تعیین کیفیت این فرآورده ارزشمند ایفا می کند. پژوهش حاضر با هدف بررسی چندشکلی ژن MRJP1 در جمعیت زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) و تحلیل ارتباط آن با صفت تولید ژل رویال طراحی و اجرا گردید.

روش پژوهش: نمونه برداری از ۱۲۰ کلنی زنبور عسل مستقر در زنبورستان شهرستان بستان آباد (استان آذربایجان شرقی) انجام شد. استخراج DNA از شفیقه های کارگر با استفاده از روش بهینه شده CTAB صورت گرفت و کیفیت و کمیت نمونه ها با نانودراپ و ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. تکثیر قطعه ای به طول ۴۴۳ جفت باز از ژن MRJP1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام گردید. بررسی چندشکلی این قطعه با استفاده از تکنیک SSCP روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ صورت پذیرفت.

یافته ها: استخراج DNA از تمامی نمونه ها از کیفیت و کمیت مطلوبی برخوردار بود (غلظت بالای ۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر، نسبت های ۲۸۰/۲۶۰ ~ ۱/۸ و ۲۳۰/۲۶۰ ~ ۲). تکثیر قطعه هدف انجام شد و هیچ گونه باند غیر اختصاصی مشاهده نگردید. بررسی الگوهای باندی حاصل از SSCP در تمامی ۱۲۰ نمونه یکسان بود که بیانگر عدم وجود چندشکلی در ناحیه مورد بررسی ژن MRJP1 برای جمعیت زنبور عسل ایرانی است.

نتیجه گیری: ژن MRJP1 در جمعیت مورد مطالعه از حفاظت شدگی بالایی برخوردار بوده و فاقد چندشکلی در ناحیه کدکننده بررسی شده است. این مسئله احتمالاً ناشی از نقش حیاتی این ژن در بقا و تمایز لاروها و فشار انتخاب پالایند بر آن می باشد. با این حال، انجام مطالعات تکمیلی با حجم نمونه بالاتر، پوشش مناطق جغرافیایی وسیع تر، بررسی نواحی کدکننده و اینترون ها و نیز نواحی تنظیمی ژن و نیز مطالعه تغییرات پس از ترجمه پروتئین MRJP1 برای درک جامع تر تنوع ژنتیکی این ژن در جمعیت های بومی ایران ضروری به نظر می رسد. حتی تنوع ژنتیکی در ناحیه تکراری ژن مورد نظر می تواند به عنوان یک نشانگر برای انتخاب زنبور عسل در تولید ژل رویال استفاده شود.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی،

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۳۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۰۲

کلیدواژه ها:

چندشکلی،

ژل رویال،

زنبور عسل ایرانی،

ژن MRJP1

استاد: لطفی، حاجیه؛ مخبر، مهدی؛ و هاشمی، علی. (۱۴۰۵). بررسی چندشکلی ژن MRJP1 مرتبط با صفت تولید ژل رویال در زنبور عسل ایرانی (Apis

Mellifera Meda) و تحلیل ارتباط آن با تولید ژل رویال. *یافته های نوین علوم دامی*، ۱ (۲)، ۱۵-۱.



<http://doi.org/10.22098/naas.2026.19482.1013>

© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه محقق اردبیلی.

۱. مقدمه

زنبور عسل نقش کلیدی در گرده افشانی محصولات کشاورزی و پایداری اکوسیستم دارد و به تأمین امنیت غذایی و تولید ناخالص ملی کمک می‌کند (Klein و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mokhber و Ghaffari، ۲۰۱۹). افزون بر این، با تولید مستقیم محصولاتی همچون عسل، موم، ژل رویال و بره موم (به‌ویژه ژل رویال به‌عنوان یک غذای فراسودمند)، ارزش افزوده‌ی چشمگیری برای انسان ایجاد می‌نماید (Klein و همکاران، ۲۰۰۷). ژل رویال^۱ (RJ) ماده‌ای ژلاتینی است که توسط غدد حلقی و فکی زنبوران کارگر پرستار ترشح شده و نقشی حیاتی در تغذیه ملکه و تمایز لاروها به ملکه یا کارگر ایفا می‌کند (Schmitzová و همکاران، ۱۹۹۸؛ Buttstedt و همکاران، ۲۰۱۳).

خانواده ژنی MRJP^۲ مسئول کدگذاری پروتئین‌های اصلی ژل رویال هستند که حدود ۸۲-۹۰٪ از کل پروتئین‌های آن را تشکیل می‌دهند (Scarselli و همکاران، ۲۰۰۵؛ Simuth، ۲۰۰۱). تاکنون ۹ عضو از این خانواده (MRJP1 تا MRJP9) در ژنوم زنبور عسل شناسایی شده که بر روی کروموزوم ۱۱ قرار داشته و حاصل تکثیر ژنی از یک ژن اجدادی هستند (Drapeau و همکاران، ۲۰۰۶؛ Consortium، ۲۰۰۶). در میان آن‌ها، ژن MRJP1 به‌عنوان فراوان‌ترین عضو، بیان اختصاصی بالایی در غدد هیپوفارنکس زنبوران پرستار دارد و از آنجایی که مستقیماً با کیفیت و کمیت ژل رویال تولیدی مرتبط است، کاندیدای مناسبی برای بررسی چندشکلی‌های ژنتیکی مرتبط با صفت تولید ژل رویال محسوب می‌شود (Park و همکاران، ۲۰۱۹؛ Kim و همکاران، ۲۰۱۹).

ژن MRJP1 فراوان‌ترین پروتئین ژل رویال (رویال اکترین) را کد می‌کند که عامل اصلی تمایز لاروها به ملکه و نیز نشانگری برای تازگی و اصالت ژل رویال است (Kamakura، ۲۰۱۱؛ Shen و همکاران، ۲۰۱۵؛ Zhao و همکاران، ۲۰۲۵). این ژن به طول ۳۰۳۸ جفت‌باز، شامل شش اگزون و پنج اینترون بوده و پروتئینی با ۴۳۲ اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند (Malecová و همکاران، ۲۰۰۳). پروتئین MRJP1 در محیط اسیدی ژل رویال با آپی‌زی‌مین کمپلکس الیگومری تشکیل می‌دهد (Buttstedt و همکاران، ۲۰۱۸).

باوجود حفاظت نسبتاً بالای MRJP1 در برخی جمعیت‌ها، مطالعاتی در چین بر روی سه جمعیت زنبور عسل اروپایی موفق به شناسایی چندین جایگاه چند شکل در ژن MRJP1 و ارتباط

برخی ژنوتیپ‌ها با میزان پروتئین MRJP1 گردید (Liu، ۲۰۱۰). در ایران، Karimi و همکاران (۲۰۲۳) عدم وجود چندشکلی را در ژن MRJP2 گزارش کردند، اما اطلاعات محدودی در خصوص تنوع ژنتیکی MRJP1 به‌ویژه در جمعیت بومی زنبور عسل ایران (*Apis mellifera meda*) موجود است.

تولید ژل رویال صفتی چندعاملی است و تحت تأثیر عوامل محیطی، نژاد، مدیریت و ساختار ژنتیکی جمعیت قرار می‌گیرد (Nemati و همکاران، ۲۰۲۴؛ Lotfi و همکاران، ۲۰۲۴؛ Corona و همکاران، ۲۰۲۲). از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی چندشکلی ژن MRJP1 در جمعیت زنبور عسل ایرانی و تحلیل ارتباط آن با تولید ژل رویال طراحی شده است تا امکان استفاده از این ژن را به‌عنوان نشانگر کاندیدا در گزینش کلنی‌های برتر تولیدکننده ژل رویال واکاوی نماید.

۲. مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های مرتبط با جمع‌آوری ژل رویال

تمام زنبورهای مورد مطالعه در این پژوهش از نژاد زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) بودند. نمونه‌برداری به صورت متمرکز از یک زنبورستان (واقع در شهرستان بستان‌آباد، استان آذربایجان شرقی) و تنها از یک منطقه جغرافیایی انجام شد. علت انتخاب چنین رویکردی، ضرورت رکورد برداری دقیق و سیستماتیک از عملکرد تولید ژل رویال در تعداد نسبتاً مناسبی از کلنی‌ها (۱۲۰ کندو) بود تا بتوان از تنوع موجود در همین جمعیت به عنوان پایه‌ای برای برنامه‌های آینده به‌گزینی استفاده کرد.

برای بررسی تولید ژل رویال، اندازه جرمی ژل رویال هر کندو پس از برداشت اندازه‌گیری و ثبت شد. همچنین رکورد برداری از صفات مرتبط با ژل رویال به صورت منظم و طبق روال استاندارد انجام گرفت.

نمونه‌گیری و استخراج DNA

جهت بررسی پلی‌مورفیسم جایگاه ژن MRJP1، نمونه‌های مورد نظر (شفره‌های کارگر) از زنبورستان تحت رکورد واقع در شهرستان بستان‌آباد استان آذربایجان شرقی، تهیه شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده به محض برداشت در فالکن‌های حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده شده و به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشگاه زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه منتقل گردید.

²-Major Royal Jelly Proteins

¹ - Royal Jelly

استخراجی از دستگاه اسپکتوفتومتری (نانودراپ) مدل Epoch2 Bio tek استفاده شد (شکل ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

یک جفت پرایمر براساس اطلاعات توالی ژن MRJP1 موجود در بانک جهانی ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) و با استفاده از ابزار NCBI-BLAST برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۴۳ جفت‌باز طراحی شد. این پرایمرها توسط شرکت بیومجیک ژن (BMG) سنتز شدند (جدول ۱). تکثیر قطعه هدف ژن گیرنده‌ی تیرامین از طریق تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام گرفت.

استخراج DNA از تمام بافت‌های لاروهای زنبور، به‌جز ناحیه شکمی و با استفاده از روش CTAB (مطابق با تغییرات استخراج اوانس و همکاران در سال ۲۰۱۳)، انجام گرفت. کلاف ته‌نشین شده با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شده و در نهایت با توجه به حجم کلاف، بافر TE (Tris-EDTA) به آن اضافه شد. در نهایت میکروتیوب‌های حاوی DNA برای نگهداری به دمای فریزر منفی ۲۰ درجه‌ی سلسیوس (-20°C) منتقل شدند. کیفیت و کمیت DNA استخراجی در دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱ درصد موردبررسی قرار گرفت. جهت تعیین کمیت DNA

جدول ۱- توالی پرایمرهای به‌کاربرده شده جهت تکثیر قطعه ۴۴۳ جفت‌بازی ژن MRJP1

Table 1- Sequences of primers used to amplify the 443 bp fragment of the MRJP1 gene

5'- GATGCAACGCTGGTCATGTG -3'	پرایمر رفت (forward)
5'- TCACCTTTGAGCGACGGTACG -3'	پرایمر برگشت (Reverse)

گردید. سپس، نمونه‌های DNA به این میکروتیوب‌ها اضافه شده و در دستگاه ترموسایکلر تحت برنامه دمایی مشخص (مطابق جدول ۲) قرار گرفتند.

برای کاهش خطای آزمایش و تسریع در فرایند کار، از مسترمیکس 8X امپیکلون شرکت DNABiotec استفاده شد. در ابتدا، محلول مسترمیکس به همراه آب استریل و پرایمرهای رفت و برگشت آماده و در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری تقسیم

جدول ۲ - برنامه دمایی-زمانی جهت تکثیر ژن MRJP1

Table 2 - Temperature-time program for amplification of the MRJP1 gene

مرحله ۱-۱ چرخه		مرحله ۲-۳۵ چرخه		مرحله ۳-۱ چرخه
Stag 1(1 cycle)		Stage 2(35 cycles)		Stage 3(1 cycle)
واسرشته‌سازی اولیه	واسرشت سازی	اتصال	توسعه	توسعه نهایی
Pre-Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
95 °C(5min)	95°C(30s)	58°C(30s)	72°C(1min)	72°C(5min)

۳. نتایج و بحث

جمع‌آوری داده‌های عملکردی تولید ژل رویال

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که صفات مرتبط با تولید ژل رویال از تنوع نسبتاً بالایی در بین کندوها برخوردارند. تعداد شاخون‌های پذیرش شده به طور میانگین ۲۷/۸۹ عدد با انحراف معیار ۴/۶ و ضریب تغییرات ۱۶/۵ درصد بود که دامنه آن از ۱۷ تا ۳۶ عدد متغیر بود. درصد پذیرش شاخون نیز میانگین ۷۷/۲ درصد و انحراف معیار ۰/۱۰۹ را نشان داد و ضریب تغییرات آن ۱۴ درصد

برای ارزیابی صحت تکثیر قطعه هدف و بررسی کیفیت محصول PCR، از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE (Tris Borate EDTA) و نشانگر مولکولی (Ladder 100 bp) استفاده شد.

شناسایی چندشکلی با استفاده از نشانگر چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)

بررسی چندشکلی جایگاه تکثیر یافته مورد نظر، با استفاده از نشانگر SSCP روی ژل آکریل آمیل ۱۲ درصد به مدت ۵ ساعت و ۳۳۰ ولت انجام گرفت.

جدول ۳ - آماره‌های توصیفی برای صفات مرتبط با تولید ژل رویال

Table 3 – Descriptive statistics for traits related to royal jelly production

صفات	میانگین Means	انحراف معیار Standard Deviation	ضریب تغییرات Coefficient Variable	حداقل Minimum	حداکثر Maximum	دامنه عملکرد Performance Range
تعداد شاخون پذیرش شده (تعداد) Number of Accepted Queen Cells (Count)	27.89	4.6	16.5	17	36	19
درصد شاخون پذیرش شده (%) Percent of Accepted Queen Cell (%)	77.2	0.109	14	8.3	100	91.67
میانگین تولید ژله رویال - به ازای هر فنجانک (گرم) Mean Royal Jelly Production per Cell Cup(g)	0.25	0.035	14.1	0.16	0.31	0.15
میانگین تولید ژله رویال - به ازای هر کندو برای یک دوره (گرم) Mean Royal Jelly Production per Hive per Production Cycle(g)	7.02	1.31	18.7	2.8	9.6	6.8

که تأیید می‌کند صفات با چنین سطوحی از تنوع فنوتیپی، قابلیت بهبود ژنتیکی از طریق گزینش هدفمند را دارند.

نتایج آنالیز کمی و کیفی DNA استخراج شده

نتایج استخراج DNA نشان‌دهنده وضوح بالا، عدم وجود کشیدگی یا اسمیر و فقدان هرگونه آلودگی در تمامی نمونه‌ها بود. تمام نمونه‌های استخراج شده از کیفیت مطلوب و غلظت مناسب برای آزمایش‌های ژنتیکی بعدی برخوردار بودند.



شکل ۱- ژل آگارز DNA استخراج شده از بافت زنبور عسل

نتایج حاصل از تکثیر ژن *AmTYR1* به روش PCR

یکنواختی و کیفیت بالای نمونه‌ها، کارایی روش استخراج و دقت عملیات را تأیید می‌کند. از نظر کمی، غلظت تمام نمونه‌ها بالای ۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. نسبت جذبی ۲۸۰/۲۶۰ (شاخص آلودگی پروتئینی) حدود ۱/۸ و نسبت ۲۳۰/۲۶۰ (شاخص آلودگی فنل، الکل و کربوهیدرات) حدود ۲ به دست آمد که همگی در دامنه مطلوب قرار داشتند (شکل ۱).

برای حصول اطمینان از تکثیر قطعه‌ی مورد نظر ژن *MRJP1*، محصول PCR به همراه یک DNA استاندارد (Lader) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. تصاویر مربوط به قطعه‌ی تکثیری به همراه لدر (نشانگر) DNA استاندارد با فواصل ۱۰۰ جفت‌باز در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که در تصویر

محاسبه شد؛ کمترین و بیشترین درصد پذیرش به ترتیب ۸/۳ و ۱۰۰ درصد بود. میانگین تولید ژل رویال به ازای هر فنجانک ۰/۲۵ گرم با انحراف معیار ۰/۰۳۵ و ضریب تغییرات ۱۴/۱ درصد ثبت شد که مقدار آن از ۰/۱۶ تا ۰/۳۱ گرم در نوسان بود. همچنین میانگین تولید ژل رویال به ازای هر کندو در یک دوره ۷/۰۲ گرم با انحراف معیار ۱/۳۱ و ضریب تغییرات ۱۸/۷ درصد به دست آمده و دامنه عملکرد آن ۲/۸ تا ۹/۶ گرم بود. این نتایج حاکی از وجود تنوع فنوتیپی قابل ملاحظه در صفات ارزیابی شده است که می‌تواند مبنای گزینش در برنامه‌های بهنجاری قرار گیرد (جدول ۳).

مقادیر ضریب تغییرات (CV) محاسبه شده برای صفات تولید ژل رویال در این مطالعه که از ۱۴ درصد برای تولید به ازای هر فنجانک تا ۱۸/۷ درصد برای تولید به ازای هر کندو متغیر بود، مطابقت کامل با تعریف علمی مقادیر ضریب تغییرات متوسط تا بالا در منابع علمی معتبر دارد. این مقادیر از آستانه ۱۵ درصد برای تغییرپذیری متوسط فراتر رفته و در محدوده‌ای قرار دارند که در منابع علمی، نشان‌دهنده پتانسیل قابل توجه برای پاسخ به انتخاب در برنامه‌های اصلاحی است (Pimentel-Gomes، ۱۹۸۵؛ Arnhold و Lung، ۲۰۱۱؛ همکاران، ۲۰۲۴). مقایسه نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Basso و همکاران (۲۰۲۴) نشان می‌دهد که ضریب تغییرات ثبت شده برای صفات مختلف تولید ژل رویال در جمعیت زنبور عسل ایرانی (۱۴ تا ۱۸/۷ درصد) در دامنه‌ای قرار دارد که در برنامه‌های اصلاحی موفق بین‌المللی نیز مشاهده شده است. در برنامه اصلاحی فرانسه که در بازه زمانی ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۴ اجرا شد، وراثت‌پذیری تولید ژل رویال بین ۰/۱۹ تا ۰/۳۵ و نرخ پیشرفت ژنتیکی سالانه ۳/۵ درصد گزارش گردید

تکنیک SSCP در تمامی ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه یکسان بود که بیانگر عدم وجود چندشکلی در این جایگاه ژنی برای جمعیت زنبورعسل ایرانی مورد بررسی است.

این یافته در حالی به دست آمده است که پروتئین‌های اصلی ژل رویال (MRJPs) به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات زیست‌فعال این ماده، نقشی اساسی در تعیین مسیر تمایز لاروها به‌سوی کاست ملکه و همچنین برخوردار از خواص متعدد سلامت‌بخش برای انسان ایفا می‌کنند (Alu'datt و همکاران، ۲۰۲۵). از میان این خانواده، ژن MRJP1 فراوان‌ترین پروتئین ژل رویال است که در غدد هیپوفارنکس زنبورهای پرستار سنتز شده و ساختار آن به صورت الیگومرهای پیچیده همراه با پروتئین آپیزی‌مین و مولکول‌های لیپیدی در ژل رویال حضور دارد (Mattei و همکاران، ۲۰۲۰؛ Tian و همکاران، ۲۰۱۸). مطالعات پیشین روی سایر اعضای خانواده ژنی MRJP در جمعیت زنبورعسل ایران نتایج متفاوتی را نشان داده‌اند؛ به‌گونه‌ای که Asadnejad (۲۰۲۲) چندشکلی‌های متعددی را در ژن‌های MRJP3، MRJP5 و MRJP8 گزارش کردند که با یافته‌های قبلی مبنی بر چند شکل بودن بالای این ژن‌ها همسو بود (Schmitzová و همکاران، ۱۹۹۸). در مقابل، کریمی و همکاران (۱۴۰۲) همانند مطالعه حاضر، عدم وجود چندشکلی را برای ژن MRJP2 در جمعیت‌های مورد بررسی خود مشاهده نمودند. این الگوی ناهمگون از تنوع در میان اعضای یک خانواده ژنی، بیانگر مکانیسم‌های تکاملی و عملکردی متفاوت حاکم بر این ژن‌ها است. شواهد فیلوژنتیک نشان می‌دهد که تکرارهای ژنی و واگرایی عملکردی در طول تکامل MRJP ها رخ داده و حتی اعضای نزدیک به هم نیز نقش‌های فیزیولوژیک متنوعی را بر عهده گرفته‌اند (Malecová و همکاران، ۲۰۰۳؛ Drapeau و همکاران، ۲۰۰۶).

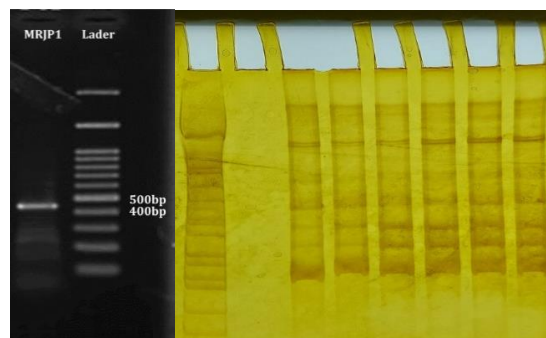
۱- حفاظت‌شدگی بالا و فشار انتخاب پالاینده

در تبیین علت عدم مشاهده چندشکلی در ژن MRJP1 در جمعیت ایرانی، چندین توجیه علمی قابل طرح است: نخست آنکه ژن‌های MRJP1 و MRJP2 به‌عنوان اعضای اصلی این خانواده، بالاترین میزان شباهت توالی را در میان سایر اعضا دارا بوده و هر دو در مسیر تکامل از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردارند. شواهد مولکولی نشان می‌دهد که MRJP1 نه تنها در سطح توالی نوکلئوتیدی، بلکه در ساختار پروموتور و مکانیسم‌های تنظیمی نیز حفاظت‌یافته است. به عنوان مثال، مقایسه توالی ژنومیک MRJP1 ارجاعاتی درون آگزونها و ناحیه پروموتور را نشان می‌دهد که در طول

مشخص است هیچ گونه باند غیراختصاصی و یا آلودگی در طی فرایند تکثیر، که اهمیت بسیاری دارد، دیده نمی‌شود؛ زیرا هرگونه تکثیر غیراختصاصی در این مرحله باعث ایجاد اشتباه در انجام مراحل بعدی خواهد شد و با تبعیت از این مرحله نتایج نیز به‌صورت صحیح تفسیر نخواهند شد.

نتایج حاصل الکتروفورز عمودی با ژل پلی آکریل آمید

نشانگر مولکولی SSCP تکنیکی موثر و مناسب برای تشخیص وجود چندشکلی‌های ژنتیکی در جایگاه‌هایی با قطعات کوچک به شمار می‌رود، به‌طوری‌که که حتی وجود یک جهش در جایگاه مورد نظر را می‌توان با این تکنیک تشخیص داد. در هر صورت در این تکنیک صرفاً الگوهای ژنتیک قابل تشخیص هستند و با انجام صرف SSCP محقق هیچ شناختی در خصوص آلل‌های موجود در هر ژنگاه ندارد. در شرایط تشخیص چندشکلی، بایستی نمونه‌ها جهت توالی‌یابی به شرکت‌های مربوطه ارسال گردد و این اطلاعات تکمیلی قابلیت استناد بیشتری در خصوص چندشکلی فراهم خواهد آورد. در مطالعه‌ی حاضر، جایگاه مورد مطالعه، بعد از انجام تکنیک SSCP، پس از بررسی الگوی‌های بانندی (شکل ۲) حاصل از الکتروفورز عمودی مشخص شد که توالی‌های مورد مطالعه برای جایگاه مذکور در زنبورعسل نژاد ایرانی تک‌شکل شناسایی شد که بیانگر عدم وجود جهش در جایگاه مذکور در جمعیت مورد مطالعه است. احتمالاً با نمونه‌گیری از جمعیت‌های دیگر این جایگاه می‌تواند تحت تاثیر قرار بگیرد.



شکل ۲- تصاویر (سمت راست): مربوط به تکثیر قطعه‌ی ۴۴۳ جفت‌بازی ژن MRJP1 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد: (سمت چپ): مربوط به الگوهای بانندی شناسایی‌شده برای قطعه ۴۴۳ جفت‌بازی ژن MRJP1 روی ژل اکریلامید ۱۲ درصد

در پژوهش حاضر، قطعه‌ای ۴۴۳ جفت‌بازی از ژن MRJP1 زنبورعسل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده بر اساس توالی مرجع (NCBI Accession: NM_001011579.1) تکثیر گردید. الگوی بانندی حاصل از

آگلوتینین‌مانند این پروتئین را توضیح می‌دهد، در حالی که پپتیدهای ژلین مسئول خاصیت لیز سلولی و باکتری‌کشی ژل رویال هستند. این یافته‌ها توجیه محکمی برای حفاظت از توالی ژن MRJP1 فراهم می‌آورد، چرا که هرگونه تغییر می‌تواند بر تولید صحیح این پپتیدهای عملکردی تأثیر منفی بگذارد (Bíliková و همکاران، ۲۰۱۵؛ Brudzynski و Sjaarda، ۲۰۱۵).

۴- محدودیت‌های مطالعه و امکان وجود چندشکلی‌های نادر

محدودیت حجم نمونه از نقاط ضعف تحقیق حاضر است. همان‌طور که در روش‌شناسی تحقیق نیز اشاره شد، محدودیت نمونه‌برداری عمدتاً به دلیل امکان رکورد برداری دقیق از صفات تولید ژل رویال بود و در صورتی که هدف اصلی مطالعه صرفاً بررسی چندشکلی‌های ژنتیکی می‌بود، گسترش دامنه نمونه‌برداری می‌توانست شانس مشاهده تنوع را افزایش دهد. ممکن است چندشکلی‌های نادر در ژن MRJP1 با فراوانی بسیار پایین در طبیعت وجود داشته باشند که در یک نمونه‌برداری محدود، شانس مشاهده آن‌ها بسیار کم است.

در تأیید این دیدگاه، برخی پژوهش‌ها در جمعیت‌های بزرگ‌تر موفق به شناسایی چندشکلی در ژن MRJP1 شده‌اند. برای نمونه، مطالعه‌ای در چین با استفاده از تکنیک PCR-SSCP روی سه جمعیت مختلف زنبورعسل اروپایی، چندین جایگاه چند شکل را در این ژن شناسایی و ارتباط بین برخی ژنوتیپ‌ها را با میزان پروتئین MRJP1 موردبررسی قرارداد (Liu، ۲۰۱۰). این یافته مؤید آن است که تنوع در این ژن کاملاً منتفی نیست، بلکه ممکن است وابسته به جمعیت مورد مطالعه و وسعت نمونه‌برداری باشد.

۵- تنظیم بیان MRJP1 توسط عوامل محیطی و تغذیه‌ای

پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که بیان ژن‌های MRJP تحت تأثیر عوامل محیطی و تغذیه‌ای قرار گرفته و مصرف پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها می‌تواند سطح بیان این ژن‌ها را تغییر دهد. در مطالعه‌ای که توسط Oliveira و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد، استفاده از مکمل غذایی حاوی پروتئین، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک منجر به تغییرات معنی‌دار در سطح بیان MRJP3 شد. با این حال، نکته جالب توجه آن است که در این مطالعه، MRJP3 به عنوان یک نشانگر میکروساتلایت برای انتخاب ملکه‌های با تولید ژل

تکامل به شدت حفاظت‌شده است (Malecová و همکاران، ۲۰۰۳؛ Albert و Klaudivy، ۲۰۰۳)؛ بنابراین وقوع جهش‌های غیر خاموش در نواحی کدکننده این ژن احتمالاً با عملکرد حیاتی آن در بقا و تمایز لاروها تداخل ایجاد کرده و توسط انتخاب طبیعی حذف می‌شوند؛ به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد ژن MRJP1 تحت فشار انتخاب پالاینده^۱ قرار داشته باشد که این امر موجب حفظ توالی آن در طول نسل‌ها شده است.

این یافته با گزارش‌های مربوط به نقش محوری MRJP1 در القای مسیرهای رشدی مرتبط با تمایز ملکه (Kamakura، 2011) و همچنین تشکیل کمپلکس‌های الیگومری با پروتئین آپیزی‌مین که زمینه‌ساز ویسکوزیته بالای ژل رویال و توانایی نگهداری لارو ملکه بر روی سطح ژل است (Buttstedt و همکاران، ۲۰۱۸)، همخوانی کامل دارد.

۲- تغییرات پس از ترجمه (PTMs) منبع تنوع عملکردی

دوم آنکه حتی در صورت عدم تنوع در سطح توالی DNA، منبع اصلی تنوع فنوتیپی و عملکردی MRJP1 می‌تواند ناشی از تغییرات پس از ترجمه^۲ باشد. مطالعات پروتئومیکس بر روی ژل رویال نشان داده‌اند که هر یک از اعضای خانواده MRJP1 تا MRJP5 مجموعه‌ای از ایزوفرم‌های اصلاح‌شده را در پروفایل پروتئومی از خود نشان می‌دهند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۲). مهم‌ترین این تغییرات شامل متیلاسیون، فسفوریلاسیون و دامیداسیون (به‌ویژه در شرایط نگهداری در دمای اتاق) است که منجر به ایجاد تنوع عملکردی بدون تغییر در توالی DNA می‌گردد. این تغییرات می‌توانند منبع مهمی برای تنوع عملکردی محسوب شوند و توجیه‌کننده حفظ توالی ژن در عین وجود تفاوت‌های عملکردی باشند.

۳- نقش پپتیدهای ضد میکربی Jellein

سوم، پپتیدهای ژلین^۳ که از پردازش ناحیه-C ترمینال MRJP1 حاصل می‌شوند، دارای خواص ضد میکروبی قابل توجهی هستند. شواهد نشان می‌دهد که مسیر پردازش این پپتیدها شامل هیدرولیز MRJP1 و سپس تبدیل Jellein-2 به Jellein-1 است. این پپتیدها نقش حیاتی در حفاظت از ژل رویال و لاروها در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند و به عنوان یک الگوی امیدوارکننده برای توسعه داروهای جدید مطرح‌شده‌اند (Ramos و همکاران، ۲۰۲۴). وجود قندهای با ساختار مانوز بالا^۴ در MRJP1 نیز فعالیت

³ - Jellein-I-IV

⁴ - High-Mannose

¹ - Purifying Selection

² - Post-translational Modifications, PTMs

۴. نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر برای اولین بار عدم وجود چندشکلی در ژن MRJP1 را در جمعیت زنبورعسل ایرانی نشان می‌دهد. این نتیجه را می‌توان به حفاظت‌شدگی بالای ناشی از نقش‌های حیاتی این ژن در تمایز ملکه، پایداری ساختاری ژل رویال و تولید پپتیدهای ضد میکربی نسبت داد. با این حال، این یافته به معنای نبود پتانسیل ژنتیکی برای بهبود تولید ژل رویال نیست، بلکه مسیرهای جایگزین از جمله بررسی تنوع در سایر اعضای خانواده MRJP (به‌ویژه MRJP3 و MRJP5)، تغییرات اپی ژنتیک و تنظیم بیان ژن را برای پژوهش‌های آینده و برنامه‌های بهنجاری پیشنهاد می‌کند.

تضاد منافع نویسندگان

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص نگارش و انتشار مطالب و نتایج این پژوهش ندارند.

دسترسی به داده‌ها

همه اطلاعات و نتایج در متن مقاله ارائه شده است.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان به طور مشترک در مفهوم‌سازی، انجام تحلیل‌های نرم‌افزاری/آماري، نگارش نسخه اولیه و نهایی مقاله مشارکت داشتند.

جمهوری اسلامی ایران. ۱۶ تا ۱۸ مهرماه ۱۴۰۲. مرکز همایش‌های بین‌المللی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
لطفی، حاجیه؛ مخبر، مهدی و هاشمی، علی (۱۴۰۲). بررسی چندشکلی ژن MRJP1 در زنبورعسل عسل ایرانی (*Apis mellifera Meda*). دومین همایش ملی علوم کشاورزی با محوریت تنش‌های زیستی. ۴ بهمن ۱۴۰۴. دانشگاه پیام نور استان آذربایجان غربی، ارومیه، ایران.

مخبر، مهدی و غفاری، مختار (۱۳۹۷). اهمیت اقتصادی گرده افشانی زنبور عسل و راهکارهای حفظ صنعت زنبورداری. ۹ (۱۷)، ۱۲-۱۶.
<https://doi.org/10.22092/hbsj.2019.118600>

رویال بالاتر معرفی شده است، در حالی که MRJP1 علی‌رغم فراوانی بسیار بالاتر، چنین پتانسیلی را نشان نداده است. این یافته به طور غیرمستقیم با نتیجه مطالعه حاضر که عدم وجود چندشکلی در ژن MRJP1 را گزارش می‌کند، همسو بوده و نشان می‌دهد که MRJP3 ممکن است هدف بهتری برای برنامه‌های بهنجاری باشد. این نتایج با پژوهش‌های گسترده‌تر روی نشانگرهای ریزماهواره MRJP3 برای تولید ژل رویال در کلنی‌های آفریقایی‌شده نیز مطابقت دارد (Baitala و همکاران، ۲۰۱۰؛ Ruvolo-Takasusuki و همکاران، ۲۰۱۶). علاوه بر این، بلع باکتری‌ها توسط زنبورهای پرستار، از طریق مسیر ویتلوژنین، منجر به القای بیان ژن‌های MRJP در غدد حلقی شده و نقش این پروتئین‌ها را در ایمنی اجتماعی و انتقال ایمنی بین‌نسلی^۱ آشکار می‌سازد (Kim و همکاران، ۲۰۲۲؛ Harwood و همکاران، ۲۰۲۱). این یافته‌ها حاکی از آن است که اگرچه تنوع در سطح توالی DNA ممکن است در ژن MRJP1 محدود باشد، اما تنظیم بیان این ژن تحت تأثیر عوامل محیطی می‌تواند منبع مهمی برای تغییرات فنوتیپی در تولید ژل رویال محسوب شود.

۶- نشانگرهای مولکولی MRJP3 علی‌رغم عدم تنوع در MRJP1

این یافته با گزارش‌های مربوط به نقش محوری MRJP1 در القای مسیرهای رشدی مرتبط با تمایز ملکه (Kamakura، ۲۰۱۱) و همچنین تشکیل کمپلکس‌های الیگومری با پروتئین آپیزی مین که زمینه‌ساز ویسکوزیته بالای ژل رویال و توانایی نگهداری لارو ملکه بر روی سطح ژل است (Buttstedt و همکاران، ۲۰۱۸).

۵. منابع

اسدنژاد، مولوده (۱۴۰۱). بررسی تنوع جایگاه‌های ژنی MRJP5، MRJP8، MRJP3 مرتبط با تولید ژله رویال در کلنی‌های زنبور عسل آذربایجان شرقی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای MRJP. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
کریمی، مجید؛ غفاری، مختار، و مخبر، مهدی (۱۴۰۲). بررسی چند شکلی ژن Mrip2 در زنبور عسل ایرانی (*Apis mellifera Meda*). پنجمین همایش بین‌المللی و سیزدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی

^۱ - Trans-generational Immune Priming, TGIP

- Experimental Biology*, 224(2), jeb231076. <https://doi.org/10.1242/jeb.231076>
- Kamakura, M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348), 478-483. <https://doi.org/10.1038/nature10093>
- Kanelis, D., Tananaki, C., Liolios, V., Dimou, M., Goras, G., Rodopoulou, M. A., Karazafiris, E., & Thrasyvoulou, A. (2015). A suggestion for royal jelly specifications. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(4), 275-284. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2651>
- Karimi, M., Ghaffari, M., & Mokhber, M. (2023). Investigation of *MRJP2* gene polymorphism in Iranian honey bee. In The 5th International Conference on Biotechnology of Iran (Article No. biotech-10840690). Tehran, Iran. [In Persian]
- Kim, Y. H., Kim, B. Y., Kim, J. M., Choi, Y. S., Lee, M. Y., Lee, K. S., & Jin, B. R. (2022). Differential expression of major royal jelly proteins in the hypopharyngeal glands of the honeybee *Apis mellifera* upon bacterial ingestion. *Insects*, 13(4), 334. <https://doi.org/10.3390/insects13040334>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kunugi, H., & Mohammed Ali, A. (2019). Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: From animal models to humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4662. <https://doi.org/10.3390/ijms20194662>
- Liu, M. (2010). Analysis of polymorphism, gene expression and content of *MRJP1* Alkindi, F. K. S. A., El-Keblawy, A., Ridouane, F. L., & Mirza, S. B. (2024). Factors influencing the quality of Royal jelly and its components: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 10(1), 2348253. <https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2348253>
- Alu'datt, M. H., Al-U'datt, D., Rababah, T., Gammoh, S., Alrosan, M., Bani-Melhem, K., Al-Widyan, Y., Kubow, S., AbuJalban, D., Al Khateeb, W., & Abubaker, M. (2025). Recent research directions on functional royal jelly: highlighting prospects in the food, nutraceutical, and pharmaceutical industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(28), 5652-5665. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2418892>
- Asadnejad, M (2022). Investigation of genetic diversity of *MRJP3*, *MRJP5*, and *MRJP8* gene loci associated with royal jelly production in East Azerbaijan honey bee colonies using microsatellite markers [Master's thesis]. Faculty of Agriculture, Urmia University. [In Persian]
- Buttstedt, A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2013). More than royal food: Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Frontiers in Zoology*, 10(1), 72. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-72>
- Cao, L. F., Zheng, H. Q., Pirk, C. W., Hu, F. L., & Xu, Z. W. (2016). High royal jelly-producing honeybees (*Apis mellifera ligustica*) (Hymenoptera: Apidae) in China. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 510-514. <https://doi.org/10.1093/jee/tow013>
- Harwood, G., Salmela, H., Freitak, D., & Amdam, G. (2021). Social immunity in honey bees: Royal jelly as a vehicle in transferring bacterial pathogen fragments between nestmates. *Journal of*

- 1645-1655. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00020>
- Mokhber, M., & Ghaffari, M. (2019). Economic value of pollination services of honeybee and solutions to conserve apiculture industry. *Honeybee Science Journal*, 9(17), 12-16. [In Persian]. <https://doi.org/10.22092/hbsj.2019.118600>
- Murat, E. (2020). Effect of harvesting period on chemical and bioactive properties of royal jelly from Turkey. *European Food Science Engineering and Mining Journal*, 1(1), 9-12. <https://izlik.org/JA49CS57CM>
- Nemati, S., Mokhber, M., Ghaffari, M., Tahmasbi, G., & Kalilvandi, H. (2024). The effect of fermented pollen supplements on the percentage of cell acceptance rate and royal jelly production in Iranian honey bees (*Apis mellifera meda*). *Journal of Apicultural Research*, 63(4), 680-687. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2135800>
- Oliveira, M. C. P. V., Pereira, E. M., Sereia, M. J., Lima, E. G., Silva, B. G., Toledo, V. A. A., & Ruvolo-Takasusuki, M. C. C. (2022). Expression of *MRJP3* and *HSP70* mRNA levels in *Apis mellifera* L. workers after dietary supplementation with proteins, prebiotics, and probiotics. *Insects*, 13(7), 571. <https://doi.org/10.3390/insects13070571>
- Park, H. G., Kim, B. Y., Park, M. J., Deng, Y., Choi, Y. S., Lee, K. S., & Jin, B. R. (2019). Antibacterial activity of major royal jelly proteins of the honey (*Apis mellifera*) royal jelly. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(3), 739-741. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.06.005>
- Ramos, O. S., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2024). Jelleines: A family of antimicrobial peptides from royal jelly: Structure, function, and biotechnological applications. *Peptides*, 172, 171236.
- gene in three Italian bee populations [Unpublished master's thesis]. Yangzhou University.
- Lotfi, H., Mokhber, M., & Hashemi, A. (2024). Investigation of *MRJP1* gene polymorphism in Iranian honeybee (*Apis mellifera meda*). In *The Second National Conference of Agricultural Sciences Focusing on Abiotic Stresses*. Payam Noor University. [In Persian]
- Ma, C., Ma, B., Li, J., & Fang, Y. (2022). Changes in chemical composition and antioxidant activity of royal jelly produced at different floral periods during migratory beekeeping. *Food Research International*, 155, 111091. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111091>
- Ma, Q., Huang, Z. Y., Hai, Q., Zhang, J., Tang, X., Dang, X., Xu, J., Ma, Z., & Zhou, Z. (2025). Multidimensional profiling of senescence in Eastern honey bee, *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae), workers: Morphology, microstructure, and transcriptomics. *Insects*, 16(9), 902. <https://doi.org/10.3390/insects16090902>
- Malecová, B., Ramser, J., O'Brien, J. K., Janitz, M., Júdová, J., Lehrach, H., & Šimúth, J. (2003). Honeybee (*Apis mellifera* L.) *MRJP* gene family: Computational analysis of putative promoters and genomic structure of *MRJP1*, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*, 303, 165-175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01174-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01174-5)
- Mandacaru, S. C., do Vale, L. H. F., Vahidi, S., Xiao, Y., Skinner O. S., Ricart, C. A. O., Kelleher, N. L., de Sousa, M. V., Konermann, L. (2017). Characterizing the structure and oligomerization of major royal jelly protein 1 (MRJP1) by mass spectrometry and complementary biophysical tools. *Biochemistry*, 56(11),

- University-Science B, 16(2), 155-166.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1400223>
- Simuth, J. (2001). Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32(1), 69-80.
<https://doi.org/10.1051/apido:2001112>
- Taheri, S., Bahari, H., Mirzavi, F., Rahbarinejad, P., Sajadi Hezaveh, Z., Doostparast, A., Zarban, A., & Nattagh-Eshtivani, E. (2025). Effects of royal jelly consumption on inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 14(4), 1264-1278. <https://doi.org/10.22038/ajp.2024.25139>
- Tian, W., Li, J., & Dong, Y. (2018). Structural characterization of apisin, a major royal jelly protein oligomer, and its interaction with lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(32), 8565-8573.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02544>
- Zhang, L., Fang, Y., Li, R., Feng, M., Han, B., Zhou, T., & Li, J. (2012). Towards posttranslational modification proteome of royal jelly. *Journal of Proteomics*, 75(17), 5327-5341. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.016>
- Zhao, Y., Chen, F., Wu, W., Sun, M., Bilal, M., & Hu, F. (2025). Major royal jelly proteins regulate caste differentiation in honey bees through epigenetic modifications. *Journal of Insect Physiology*, 162, 104712.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2024.104712>
- <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2024.171236>
- Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Pozza, A. P. B. C., Oliveira, A. P. N. Z., Parpinelli, R. S., Costa-Maia, F. M., Faquinello, P., & Toledo, V. A. A. (2016). Improvement and selection of honey bees assisted by molecular markers. In E. D. Chambó (Ed.), *Beekeeping and bee conservation: Advances in research* (pp. 63-75).
<https://doi.org/10.5772/62426>
- Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 16-21.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.4.1.01.04>
- Scarselli, R., Donadio, E., Giuffrida, M. G., Fortunato, D., Conti, A., Balestreri, E., Felicioli, R., Pinzauti, M., Sabatini, A. G., & Felicioli, A. (2005). Towards royal jelly proteome. *Proteomics*, 5(3), 769-776.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200401149>
- Schmitzová, J., Klaudiny, J., Albert, Š., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., & Šimúth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(9), 1020-1030.
<https://doi.org/10.1007/s000180050229>
- Shen, L. R., Wang, Y. R., Zhai, L., Zhou, W. X., Tan, L. L., Li, M. L., Liu, D. D., & Xiao, F. (2015). Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody. *Journal of Zhejiang*