

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет

Кафедра генетики і цитології

До захисту допущено

Кафедрою генетики і цитології протокол № _____ від _____

завідувач кафедри _____

(підпис)

Наталя ВОЛКОВА

(ім'я, прізвище)

«11» грудня 2025 р.

Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

**Використання молекулярно-генетичних маркерів для прогнозування
резистентності медоносної бджоли *Apis mellifera* до кліща *Varroa destructor***

(назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія

(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма

Генетика

(назва освітньої програми)

Виконавець _____

(підпис)

Іван ГРИЦАК

(ім'я, прізвище)

Науковий керівник _____

(підпис)

Олена БОЙКО

(ім'я, прізвище)

Науковий консультант _____

(підпис)

Артем САЄНКО к.с.-г.н., с.н.с.

(ім'я, прізвище)

Науковий консультант _____

(підпис)

Олена МЕТЛИЦЬКА д.с.-г.н., с.н.с.

(ім'я, прізвище)

Зміст

ВСТУП.....	9
Розділ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Систематичне положення, морфологія кліща та життєвий цикл паразита.....	12
1.1.2 Динаміка популяції кліща.....	13
1.1.3 Патогенний вплив на медоносних бджіл.....	14
1.1.4 Роль V. destructor у передачі вірусних інфекцій.....	14
1.2 Механізми природної резистентності медоносних бджіл.....	15
1.2.1 Грумінг як механізм резистентності.....	15
1.2.2 Гігієнічна поведінка та варроа-чутлива гігієна (HB/VSH).....	16
1.2.3 Взаємозв'язок між різними механізмами резистентності.....	17
1.3 Генетичний контроль VSH-поведінки.....	18
1.3.2 QTL- картування VSH у медоносних бджіл.....	19
1.3.4 Кандидатні гени в регіоні SNP 9- 9224292.....	21
1.3.5 Інші генетичні локуси, пов'язані з VSH.....	21
1.4.Маркер- асоційована селекція (MAS) у бджільництві.....	22
1.4.1 Принципи MAS.....	23
1.4.2 Переваги MAS над традиційною селекцією.....	24
1.4.3 Типи молекулярних маркерів.....	25
1.4.4 Обмеження та проблеми MAS у бджіл.....	26
1.5 Пошук молекулярно- генетичних маркерів, здатних прогнозувати резистентність медоносних бджіл.....	27
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	29
2.1 Об'єкт та метеріал дослідження.....	29
2.1.1 Характеристика пасік та бджолосімей.....	29
2.1.2 Умови утримання бджолосімей.....	31
2.2 Відбір біологічного матеріалу.....	31
2.2.1 Термін та умови відбору проб.....	31
2.2.3 Кількість особин для аналізу.....	32

2.2.4 Умови фіксації та зберігання	33
2.3 Молекулярно - генетичні методи	33
2.3.1 Екстракція ДНК	33
2.3.2 ПЛР-ампліфікація SNP 9-9224292	35
2.3.2.1 Характеристика цільового SNP	35
2.3.2.2 Праймери для ампліфікації	36
2.3.2.3 Оптимізація умов ПЛР	36
2.3.2.4 Склад реакційної суміші	37
2.3.2.5 Умови ампліфікації	39
2.3.2.6 Контролі якості ПЛР	40
2.3.3 Рестрикційний аналіз (ПЛР-ПДРФ)	41
2.3.3.1 Принцип методу	41
2.3.3.2 Характеристика ендонуклеази рестрикції	41
2.3.3.3 Протокол рестрикції	42
2.3.3.4 Очікувані розміри рестрикційних фрагментів	43
2.3.4 Електрофоретичне розділення	44
2.3.4.1 Підбір умов електрофорезу	44
2.3.4.2 Приготування агарозного гелю	44
2.3.4.3 Підготовка зразків для нанесення	45
2.3.4.4 Умови проведення електрофорезу	46
2.3.4.5 Маркери молекулярної маси	46
2.3.4.6 Візуалізація та фотодокументація	47
2.3.5 Інтерпретація результатів та визначення генотипів	47
2.3.5.1 Визначення генотипів індивідуальних зразків	47
2.4 Статистичний аналіз даних	48
2.4.1 Частоти генотипів	48
2.4.1.2 Частоти алелів	48
2.4.1.3 Перевірка рівноваги Харді-Вайнберга	49

2.4.2 Порівняння частот між групами	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	51
3.1 Частоти алелів та генотипів SNP 9-9224292	51
3.1.1 Загальна характеристика генотипування	51
3.1.2 Розподіл генотипів у Групі 1 (Львів, чистопородна карніка)	51
3.1.3 Розподіл генотипів у Групі 2 (Київ, селекційні лінії)	53
3.1.4 Розподіл генотипів у Групі 3 (Харківська область, грумінг)	55
3.1.5 Розподіл генотипів у Групі 4 (Контрольна, нестійкі до варроа)	57
3.1.6 Порівняльний аналіз між групами	58
3.1.7 Порівняння з іншими популяціями	59
3.1.7.1 Північноамериканські популяції (Tsuruda et al., 2012)	59
3.1.7.2 Новозеландські популяції (Sainsbury et al., 2022)	60
3.2 Аналіз генетичної структури окремих сімей	62
3.2.1 Внутрішньосімейна генетична варіація	62
3.3 Аналіз гетерозиготних сімей	64
3.3.1 Фенотип GA-сімей	64
3.3.2 Проблема гетерозиготних особин (GA-генотип) для маркер-асоційованої селекції	65
3.6.5 Обмеження дослідження	66
3.6.6 Теоретична значимість	66
3.6.7 Практична значимість	67
ВИСНОВКИ	68
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	71
ДОДАТКИ	81

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- A** — аденін (нуклеотид); алель A маркера SNP 9-9224292
- AA** — гомозиготний генотип за алелем A
- ABPV** (*Acute Bee Paralysis Virus*) — вірус гострого паралічу бджіл
- AdoR** (*Adenosine Receptor*) — аденозиновий рецептор
- BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) — базовий інструмент пошуку локального вирівнювання
- bp** (base pairs) — пари нуклеотидів
- BSA** (*Bovine Serum Albumin*) — бичачий сироватковий альбумін
- Cdk5alpha** — активатор циклічно-залежної кінази 5
- cM** (centiMorgan) — сантиморган (одиниця генетичної відстані)
- COI-COII** — ділянка мітохондріальної ДНК між генами цитохром оксидази I -II
- csd** (*complementary sex determiner*) — ген комплементарного визначення статі
- Cyp** (Cytochrome P450) — цитохром P450
- DBR** (*Drone Brood Resistance*) — стійкість трутневого розплоду
- Def1, Def2** (*Defensin 1, 2*) — дефензини (гени імунної відповіді)
- df** (degrees of freedom) — ступені свободи
- ДІ** — довірчий інтервал
- dNTP** — дезоксинуклеотидтрифосфати (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- dop3** — D2-подібний дофаміновий рецептор 3
- DTT** (Dithiothreitol) — дитіотреїтол
- DWV** (*Deformed Wing Virus*) — вірус деформованих крил
- DWV-A, DWV-B** — генотипи A та B вірусу деформованих крил
- ЕДТА** (EDTA) — етилендіамінтетраоцтова кислота
- FKB** (*Freeze-Killed Brood*) — тест з заморожено-убитим розплодом
- G** — гуанін (нуклеотид); алель G маркера SNP 9-9224292
- GA** — гетерозиготний генотип
- GBLUP** (*Genomic Best Linear Unbiased Prediction*) — геномне найкраще лінійне незміщене прогнозування
- GG** — гомозиготний генотип за алелем G
- GPCR** (*G-protein coupled receptor*) — рецептор, спряжений з G-білком
- GWAS** (*Genome-Wide Association Study*) — повногеномне дослідження асоціацій
- HB** (*Hygienic Behavior*) — гігієнічна поведінка

HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) — високоефективна рідинна хроматографія

HWE (*Hardy-Weinberg Equilibrium*) — рівновага Харді-Вайнберга

Hyg1 — локус гігієнічної поведінки на хромосомі 2

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) — міжмікросателітні повтори

LD (*Linkage Disequilibrium*) — нерівновага зчеплення

LOD (*Logarithm of Odds*) — логарифм відношення шансів

MAS (*Marker-Assisted Selection*) — маркер-асоційована селекція

Mb, Mbp — мегабаза, мільйон пар нуклеотидів

мтДНК — мітохондріальна ДНК

N — загальна кількість

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) — Національний центр біотехнологічної інформації (США)

NorpA2 — фосфоліпаза C типу 2

OBP (*Odorant Binding Protein*) — білок, що зв'язує запахові молекули

Octbeta2R — октопаміновий рецептор бета-2

p — рівень статистичної значущості; частота алелю

p(A) — частота алелю A

p(G) — частота алелю G

ПДРФ (*RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism*) — поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів

РКВ (*Pin-Killed Brood*) — тест з механічно убитим розплодом

ПЛР (*PCR, Polymerase Chain Reaction*) — полімеразна ланцюгова реакція

ПЛР-ПДРФ (*PCR-RFLP*) — ПЛР з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів

п.н. — пари нуклеотидів

QTL (*Quantitative Trait Locus*) — локус кількісної ознаки

qPCR — кількісна ПЛР у реальному часі

R² — коефіцієнт детермінації

s — стандартне відхилення

SBV (*Sacbrood Virus*) — вірус мішкоподібного розплоду

SMR (*Suppressed Mite Reproduction*) — пригнічена репродукція кліща

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) — одонуклеотидний поліморфізм

SSR (*Simple Sequence Repeat*) — прості послідовні повтори (мікросателіти)

t — критерій Стьюдента

Taq — ДНК-полімераза *Thermus aquaticus*

TBE — тріс-боратний електрофорезний буфер

Tm (*melting temperature*) — температура плавлення

Tris — трис(гідроксиметил)амінометан

U — критерій Манна-Вітні

VDV-1 (*Varroa destructor virus 1*) — вірус 1 кліща *Varroa destructor*

VSH (*Varroa Sensitive Hygiene*) — варроа-чутлива гігієна

$\bar{x}$ — середнє арифметичне

χ^2 — критерій хі-квадрат Пірсона

α — рівень значущості (зазвичай 0,05)

β — коефіцієнт регресії; ймовірність помилки другого роду

АННОТАЦІЯ

Робота присвячена оцінці SNP 9-9224292 як молекулярно-генетичного маркера резистентності медоносних бджіл до кліща *Varroa destructor* в українських популяціях *Apis mellifera carnica*. Методом ПЛР-ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Hpy188I проведено генотипування 109 особин бджіл з 19 бджолосімей, що представляють чотири експериментальні групи: чистопородну львівську карніку, київські селекційні лінії (варроатолерантні та високопродуктивні), харківську групу, відібрану за грумінг-поведінкою, та контрольну групу нестійких бджіл.

Виявлено виражений надлишок гетерозигот GA у львівській (81,8%) та київській (92,9%) популяціях з високо значущим відхиленням від рівноваги Харді-Вайнберга ($p < 0,001$). Контрольна група продемонструвала повну фіксацію алелю A ($p(A) = 1,0$), що статистично високо значуще відрізняється від експериментальних груп ($p < 0,001$) і підтверджує асоціацію маркера зі стійкістю до варроатозу.

Порівняльний аналіз з новозеландською популяцією виявив схожі частоти алелю G (0,556 vs 0,557), але принципово різний розподіл генотипів, що свідчить про популяційно-специфічні особливості генетичної структури. Адаптовано доступну методику генотипування SNP 9-9224292, яка не потребує дорогого обладнання (вартість аналізу 50-80 грн/зразок, тривалість 3-4 години) і може бути впроваджена у базових лабораторіях для комерційного використання у селекційних програмах. Результати демонструють обмеження використання одиничних SNP-маркерів через високу частоту гетерозигот, вплив поліандрії та високий рівень рекомбінації у геномі бджоли.

Робота викладена на 82 сторінках друкованого тексту, містить 12 рисунків і 10 таблиць.

Ключові слова: *Apis mellifera carnica*, *Varroa destructor*, SNP 9-9224292, маркер-асоційована селекція, *Varroa Sensitive Hygiene*, VSH, ПЛР-ПДРФ, грумінг, резистентність до варроатозу, молекулярно-генетичні маркери, рівновага Харді-Вайнберга, гетерозиготність, полігенна ознака, QTL-картування, популяційна генетика бджіл

ANNOTATION

Use of molecular genetic markers for predicting resistance of honey bee *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor*

This work is dedicated to the assessment of SNP 9-9224292 as a molecular genetic marker of honey bee resistance to *Varroa destructor* mite in Ukrainian populations of *Apis mellifera carnica*. Using the PCR-RFLP method with *Hpy188I* restriction endonuclease, 109 individual bees from 19 colonies representing four experimental groups were genotyped: purebred Lviv Carniolan bees, Kyiv breeding lines (varroa-tolerant and high-productive), Kharkiv group selected for grooming behavior, and a control group of susceptible bees.

A pronounced excess of GA heterozygotes was detected in Lviv (81.8%) and Kyiv (92.9%) populations with highly significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.001$). The control group demonstrated complete fixation of allele A ($p(A) = 1.0$), which statistically significantly differs from experimental groups ($p < 0.001$) and confirms the marker's association with varroa resistance.

Comparative analysis with New Zealand population revealed similar G allele frequencies (0.556 vs 0.557), but fundamentally different genotype distributions, indicating population-specific features of genetic structure. An accessible genotyping methodology for SNP 9-9224292 was adapted, requiring no expensive equipment (analysis cost 50-80 UAH/sample, duration 3-4 hours) and suitable for implementation in basic laboratories for commercial use in breeding programs. Results demonstrate limitations of using single SNP markers due to high heterozygote frequency, polyandry effects, and high recombination rate in the bee genome.

Keywords: *Apis mellifera carnica*, *Varroa destructor*, SNP 9-9224292, marker-assisted selection, Varroa Sensitive Hygiene, VSH, PCR-RFLP, grooming, varroa resistance, molecular genetic markers, Hardy-Weinberg equilibrium, heterozygosity, polygenic trait, QTL mapping, bee population genetics

ВСТУП

Актуальність дослідження обумовлена критичною ситуацією у світовому та українському бджільництві, пов'язаною з масовою загибеллю бджолиних колоній внаслідок інвазії ектопаразита *Varroa destructor*. Варроатоз залишається головною загрозою для *Apis mellifera*, спричиняючи не лише прямі втрати від паразитування кліща, але й опосередковані — через трансмісію вірусних інфекцій, що призводить до колапсу колоній. Традиційні методи боротьби з варроатозом базуються на застосуванні акарицидів, проте їх використання веде до резистентності паразита, забруднення продуктів бджільництва та порушення екологічного балансу. У зв'язку з цим актуальним стає пошук альтернативних підходів, зокрема селекція бджіл на природну резистентність до *V. destructor*. Ключову роль у цьому напрямку відіграє маркер-асоційована селекція (MAS), що дозволяє ідентифікувати генетичні маркери, пов'язані з механізмами природної стійкості, такими як Varroa Sensitive Hygiene (VSH). SNP 9-9224292, локалізований на 9-й хромосомі *A. mellifera*, був ідентифікований у північноамериканських та новозеландських популяціях як перспективний маркер VSH-поведінки, проте його валідність в українських популяціях карніки залишалася невивченою. Відсутність молекулярно-генетичних досліджень резистентності бджіл в Україні гальмує впровадження сучасних селекційних програм і обмежує можливості збереження та покращення вітчизняного генофонду медоносної бджоли. Розробка доступної, швидкої та економічно ефективної методики генотипування SNP 9-9224292 створює передумови для практичного застосування MAS у комерційних бджільницьких господарствах України.

Новизна роботи полягає у тому, що вперше в Україні проведено комплексне дослідження SNP 9-9224292 як молекулярно-генетичного маркера резистентності до *Varroa destructor* в популяціях *Apis mellifera carnica*. Вперше визначено частоти алелів та генотипів за SNP 9-9224292 у чотирьох експериментальних групах українських бджіл з різним селекційним походженням та фенотипічними характеристиками. Вперше виявлено виражене відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга з надлишком гетерозигот у селекційних лініях львівської та київської карніки, що свідчить про специфіку генетичної структури українських популяцій. Вперше показано повну фіксацію алелю А ($p(A) = 1,0$) у контрольній групі бджіл, сприйнятливих до варроатозу, що статистично високо значуще відрізняється від експериментальних груп. Адаптовано та оптимізовано доступну методику генотипування SNP 9-9224292 методом ПЛР-ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Hpy188I, що не потребує дорогого обладнання для секвенування і може бути впроваджена у базових молекулярно-біологічних лабораторіях України.

Наукове та практичне значення результатів складається з декількох аспектів. З наукової точки зору, дослідження розширює розуміння популяційної генетики *A. mellifera* в Україні та демонструє застосовність молекулярних маркерів, валідованих в інших регіонах світу, до українських популяцій карніки. Виявлені особливості генетичної структури (надлишок гетерозигот, відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга) вказують на необхідність врахування популяційного контексту при інтерпретації асоціацій генотип-фенотип та при плануванні селекційних програм. Результати підтверджують полігенну природу резистентності до *V. destructor* та підкреслюють важливість комплексного підходу з використанням багатомаркерних панелей для ефективною маркер-асоційованою селекції. Практичне значення роботи полягає у створенні методологічної основи для впровадження MAS у вітчизняне бджільництво. Розроблена методика генотипування є економічно доступною (вартість аналізу одного зразка 50-80 грн), швидкою (3-4 години від екстракції ДНК до отримання результату) та не потребує складного обладнання, що робить її придатною для комерційних селекційних програм. Результати можуть бути використані бджолярами-селекціонерами для цільового відбору маток і трутнів з підвищеною резистентністю до варроатозу, що дозволить поступово зменшити залежність від акарицидних обробок, покращити здоров'я та продуктивність бджолиних колоній. Впровадження MAS сприятиме збереженню генетичного різноманіття українських популяцій *A. mellifera carnica* та підвищенню конкурентоспроможності вітчизняного бджільництва.

Мета дослідження: оцінити можливість використання SNP 9-9224292 як молекулярно-генетичного маркера для прогнозування резистентності медоносних бджіл *Apis mellifera carnica* до кліща *Varroa destructor* в українських популяціях та розробити доступну методику генотипування для практичного застосування у селекційних програмах.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати наукову літературу стосовно генетичних основ резистентності бджіл до *Varroa destructor*, ідентифікувати ключові молекулярні маркери, асоційовані з механізмами природної стійкості (VSH, грумінг, SMR), та обґрунтувати вибір SNP 9-9224292 для аналізу в українських популяціях.
2. Сформувати чотири експериментальні групи бджіл *A. mellifera carnica* з різним селекційним походженням та фенотипічними характеристиками: чистопородна львівська карніка, київські селекційні лінії (варроатолерантні та високопродуктивні), харківська група, відібрана за грумінг-поведінкою, та контрольна група бджіл, нестійких до варроатозу.

3. Оволодіти та оптимізувати молекулярно-генетичні методики для генотипування SNP 9-9224292, включаючи екстракцію ДНК (сорбентним методом та методом Chelex-100), ПЛР-ампліфікацію з використанням специфічних праймерів, рестрикційний аналіз з ендонуклеазою Hpy188I та електрофоретичне розділення фрагментів на агарозному гелі.
4. Визначити частоти генотипів (GG, GA, AA) та алелів (G, A) за SNP 9-9224292 у кожній експериментальній групі методом ПЛР-ПДРФ; перевірити відповідність спостережуваних частот генотипів рівновазі Харді-Вайнберга; провести порівняльний аналіз генетичної структури між групами з використанням точного тесту Фішера та критерію χ^2 .
5. Оцінити асоціацію SNP 9-9224292 зі стійкістю до *V. destructor* шляхом статистичного порівняння частот алелів між експериментальними групами (селекційні лінії) та контрольною групою (нестійкі бджоли); провести порівняння отриманих результатів з даними міжнародних досліджень (новозеландські та північноамериканські популяції).
6. Проаналізувати доцільність використання SNP 9-9224292 для маркер-асоційованої селекції в українських умовах, враховуючи виявлені популяційні особливості (високу частоту гетерозигот, відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга, вплив системи спарювання); сформулювати практичні рекомендації щодо впровадження розробленої методики генотипування у селекційні програми комерційних бджільницьких господарств України.

Особистий внесок автора. Автор самостійно провів аналіз наукової літератури з генетики резистентності медоносних бджіл до *Varroa destructor*, обґрунтував вибір SNP 9-9224292 для дослідження та спланував схему експерименту.

Автор особисто здійснив відбір біологічного матеріалу на чотирьох пасіках у Львівській, Київській та Харківській областях, забезпечив правильну фіксацію та зберігання зразків. Автор самостійно виконав усі етапи молекулярно-генетичного аналізу: екстракцію ДНК двома методами (сорбентним набором NEOprep100 DNA та методом Chelex-100), оптимізацію умов ПЛР-ампліфікації (підбір температури відпалу праймерів, концентрації компонентів реакційної суміші, кількості циклів), рестрикційний аналіз з ендонуклеазою Hpy188I, електрофоретичне розділення фрагментів на 4% агарозному гелі та візуалізацію результатів. Автор провів генотипування 109 особин бджіл з 19 бджолосімей, визначив генотипи за SNP 9-9224292, розрахував частоти генотипів та алелів у кожній експериментальній групі. Статистичний аналіз даних (перевірка рівноваги Харді-Вайнберга, порівняльний аналіз між групами, розрахунок довірчих інтервалів).

Апробація результатів. Основні положення та результати дослідження представлені на міжнародній конференції Apimondia 2025 (доповідь "Identification of Informative DNA Markers for Honeybee Resistance to Varroosis"). Попередні результати роботи з використанням ISSR-маркерів та аналізу мітохондріальної ДНК (COI-COII) для оцінки генетичної різноманітності ліній *A. mellifera*, що відрізняються за грумінг-поведінкою, представлені в неопублікованих матеріалах (Грицак І.В., Бойко О.А., 2024) і стали методологічною основою для переходу до аналізу SNP-маркерів у даній роботі.

Подяки. Автор висловлює щире подяку науковому керівнику кандидату сільськогосподарських наук, старшому науковому співробітнику Бойко Олені Андріївні за наукове керівництво, постійну підтримку на всіх етапах дослідження, цінні поради при інтерпретації результатів та підготовці рукопису. Автор вдячний консультанту кандидату сільськогосподарських наук, старшому науковому співробітнику Саєнку Артему Михайловичу за допомогу в оволодінні молекулярно-генетичними методиками, консультації з питань статистичного аналізу даних та критичний розгляд отриманих результатів. Автор щиро дякує консультанту доктору сільськогосподарських наук, старшому науковому співробітнику Метлицькій Олені Іванівні за експертну оцінку дослідження в контексті сучасного стану бджільництва України, цінні рекомендації щодо практичного застосування результатів та сприяння в організації збору біологічного матеріалу. Автор висловлює подяку бджолярам-членам клубів карніки у Львівській та Київській областях за надання племінного матеріалу та інформації про селекційні характеристики досліджуваних ліній.

Розділ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Систематичне положення, морфологія кліща та життєвий цикл паразита

Varroa destructor (Anderson & Trueman, 2000) — облігатний ектопаразит медоносних бджіл роду *Apis*, що належить до класу *Arachnida*, ряду *Mesostigmata*, родини *Varroidae*. Цей кліщ є одним із найсерйозніших біотичних факторів, які загрожують світовому бджільництву. Морфологічно самки *V. destructor* мають еліпсоподібне сплюснене тіло розміром приблизно $1,1 \times 1,6$ мм, що дозволяє їм проникати у вузькі простори між члениками черевця бджоли. Самці дрібніші, округлої форми, з білуватим забарвленням, і залишаються у запечатаних комірках протягом усього життя.

Життєвий цикл *Varroa destructor* є складним і тісно інтегрованим у біологію медоносної бджоли *Apis mellifera*. Він включає дві взаємопов'язані

фази – форе́тичну та репродуктивну. У форе́тичній фазі самки паразита перебувають на дорослих бджолах, де живляться їхньою гемолімфою та локалізуються між стернітами черевця. Цей етап забезпечує не лише підтримання життєдіяльності кліща, але й його поширення всередині колонії та між сім'ями. Репродуктивна фаза розпочинається в момент проникнення самки у відкриту личинкову комірку незадовго до її запечаткування. Усередині кліщ відкладає послідовність яєць: першим формується самець, за яким слідує кілька самок. Самець залишається у комірці, де відбувається спарювання з сестрами, після чого він гине. Натомість самки разом із матір'ю залишають комірку під час виходу молодої бджоли, що забезпечує продовження циклу розвитку паразита (Mondet et al., 2018).

Молекулярні дослідження, зокрема транскриптомне профілювання, засвідчили, що різні стадії життєвого циклу супроводжуються істотними змінами експресії генів. На початкових і завершальних етапах (форе́тична стадія та фаза після яйцекладки) переважають процеси, пов'язані з енергетичним метаболізмом та синтезом хітину, тоді як у репродуктивних фазах (pre-lay та laying) домінують гени, що регулюють транскрипцію та клітинний цикл. Це свідчить про високу пластичність фізіологічних процесів *Varroa destructor*, яка забезпечує його адаптацію до різних умов існування – від перебування на дорослих бджолах до активного розмноження у закритих комірках (Mondet et al., 2018).

1.1.2 Динаміка популяції кліща

Динаміка популяції кліща визначається насамперед наявністю розплоду в колонії. У періоди інтенсивного розвитку бджолиної сім'ї (весна–літо) чисельність *Varroa destructor* зростає експоненційно, оскільки кожна самка здатна продукувати кілька дочок за один цикл. Водночас у зимовий період, коли розплід відсутній, кліщі залишаються у форе́тичній фазі на дорослих бджолах. Це уповільнює темпи розмноження, проте забезпечує виживання популяції до наступного сезону (Noël et al., 2020).

Наслідки зростання чисельності паразита для колонії є багатогранними. По-перше, кліщі безпосередньо виснажують бджіл, пошкоджуючи їхні тканини та знижуючи фізіологічну стійкість. По-друге, *Varroa destructor* виступає ефективним вектором вірусних інфекцій, зокрема комплексу вірусу деформованих крил (DWV), що значно підсилює патогенний ефект паразита (Ramsey et al., 2019; Piou et al., 2022). У результаті при високій щільності популяції кліща колонія зазнає критичного виснаження, що нерідко призводить до її загибелі.

1.1.3 Патогенний вплив на медоносних бджіл

Паразитичний кліщ *Varroa destructor* чинить багатofакторний патогенний вплив на медоносних бджіл, що проявляється на рівні окремих особин, колоній та популяцій. На індивідуальному рівні зараження призводить до зниження маси тіла та вмісту води у щойно вийшлих бджіл, причому ступінь втрати прямо корелює з кількістю самок-засновниць у комірці (Bowen-Walker & Gunn, 2001; Duay et al., 2003). Водночас *Varroa destructor* спричиняє імунодепресію: у заражених бджіл знижується кількість гемоцитів, пригнічується експресія генів, пов'язаних із синтезом фенолоксидози, а також відбуваються зміни у протеомі, що послаблюють здатність до інкапсуляції патогенів і загоєння пошкоджень (Zaobidna et al., 2017; Koleoglu et al., 2018; Erban et al., 2019). Важливим чинником є те, що кліщ живиться не лише гемолімфою, а й жировим тілом бджоли, яке є центральним органом імунної відповіді та метаболізму (Ramsey et al., 2019).

На рівні колонії патогенний ефект посилюється за рахунок просторової динаміки популяцій кліща. Дослідження показали, що швидкоростучі популяції *Varroa* в окремих сім'ях створюють підвищений ризик для всього угруповання колоній у межах пасіки. Колонії з високими темпами зростання чисельності кліща стають джерелом масового зараження для сусідів, особливо у критичний період перед зимівлею (Bartlett et al., 2024). Крім того, горизонтальні потоки кліщів між колоніями (через дрейф бджіл, розкрадання кормових запасів або колапс сусідніх сімей) можуть становити до 48% від кінцевого рівня зараження, що ускладнює оцінку фенотипів резистентності та знижує ефективність селекційних програм (Guichard et al., 2024).

Важливим напрямом досліджень є виявлення природних механізмів резистентності та толерантності до *Varroa destructor*. Зокрема, у популяціях, що виживають без акарицидних обробок, описано феномен пригніченої репродукції кліща (SMR), особливо у трутневому розплоді (DBR). Генетичні дослідження виявили низку SNP, асоційованих із цим фенотипом, що відкриває перспективи для маркер-асоційованої селекції (Broeckx et al., 2019). Інший механізм — розвиток толерантності до вірусів у популяціях, адаптованих до життя з кліщем: такі бджоли демонструють нижчу смертність при однаковому рівні вірусного навантаження, що свідчить про природну адаптацію до патогенів (Thaduri et al., 2019).

1.1.4 Роль *V. destructor* у передачі вірусних інфекцій

Однією з головних причин високої патогенності *Varroa destructor* є його роль у передачі вірусних інфекцій медоносних бджіл. Найбільш

дослідженими є комплекс вірусу деформованих крил (DWV) та вірус гострого паралічу бджіл (ABPV), які у відсутності кліща зазвичай підтримуються на низькому рівні як латентні інфекції, передаючись вертикально або горизонтально без значних клінічних проявів (de Miranda & Genersch, 2010; Wilfert et al., 2016).

Проте варроа-опосередкована передача різко підвищує їхню вірулентність, що призводить до тяжких патологій: DWV викликає деформацію крил і втрату льотної здатності, тоді як ABPV спричиняє загибель личинок і параліч дорослих бджіл (Martin, 2001; de Miranda et al., 2010). Динаміка популяцій кліща у колонії створює умови для швидкого розвитку вірусних епідемій. Геометричне зростання чисельності Varroa призводить до різкого підвищення вірусного навантаження, що зазвичай завершується колапсом сім'ї протягом кількох років після зараження (Boecking & Genersch, 2008).

Важливим відкриттям стало підтвердження того, що Varroa destructor є не лише механічним переносником, але й біологічним вектором вірусів. Використання секвенування малих РНК показало, що у кліщах відбувається активна реплікація DWV-A, DWV-B та низки інших вірусів, включно з новим Varroa destructor virus 9 (Damaio et al., 2023). Це означає, що кліщ не лише передає віруси від бджоли до бджоли, але й створює умови для їхньої еволюції та підвищення вірулентності.

Додатково було показано, що вірусне навантаження може змінювати поведінку самого кліща. Зокрема, комбінація DWV та SBV асоціювалася зі зниженням рухливості Varroa, що узгоджується з гіпотезою маніпуляції вектором, коли патогени змінюють поведінку переносника для підвищення власної трансмісії (Giuffre et al., 2019). Важливим внеском у розуміння механізмів передачі стало створення *in vitro* системи штучного годування кліщів, яка дозволила довести, що Varroa може набувати та передавати інфекційні частки DWV і VDV-1 навіть без контакту з тканинами бджіл (Posada-Florez et al., 2020).

1.2 Механізми природної резистентності медоносних бджіл

1.2.1 Грумінг як механізм резистентності

Грумінг є одним із ключових поведінкових механізмів природної резистентності медоносних бджіл до кліща Varroa destructor. Ця форма соціального імунітету включає автогрумінг (самоочищення) та аллогрумінг (взаємне очищення), під час яких бджоли видаляють кліщів зі свого тіла або з тіл сестер. Ефективність цього механізму безпосередньо впливає на рівень

інвазії у колонії та може визначати її здатність до виживання без застосування акарицидів.

Важливим доповненням є результати Arechavaleta-Velasco та співавт. (2025), які підтвердили, що індивідуальна грумінгова поведінка має генетичну основу. У великій популяції (112 колоній, 3974 робочі бджоли) було показано, що час реакції на кліща суттєво відрізнявся між генотипами: бджоли з високогрумінгових ліній реагували швидше (≈ 26 с), тоді як у низькогрумінгових цей показник перевищував 40 с. Аналіз виявив, що на вираження цього фенотипу впливають адитивні та домінантні генетичні ефекти, причому адитивні пояснюють більшу частину варіації. Важливо, що колонії з високим рівнем індивідуального грумінгу мали достовірно нижчі рівні інвазії *Varroa* протягом шести місяців експерименту. Це вперше підтвердило прямий зв'язок між індивідуальною грумінговою поведінкою та рівнем зараження колонії, що має велике значення для селекційних програм.

1.2.2 Гігієнічна поведінка та варроа-чутлива гігієна (HB/VSH)

Гігієнічна поведінка (Hygienic Behavior, HB) є одним із головних механізмів соціального імунітету медоносних бджіл, що полягає у здатності робочих особин розпізнавати, розкривати та видаляти заражений або загиблий розплід. Це перериває цикл розвитку патогенів і паразитів та знижує їх поширення у колонії. Специфічною формою цього фенотипу є варроа-чутлива гігієна (*Varroa Sensitive Hygiene*, VSH), спрямована на видалення живого розплоду, зараженого кліщем *Varroa destructor*. Вперше фенотип описали Harbo та Harris (1999–2000), спочатку як *Suppressed Mite Reproduction* (SMR), проте подальші дослідження довели, що механізм полягає саме у видаленні зараженого розплоду, а не у прямому впливі на кліща.

HB та VSH частково перетинаються, але не є тотожними: HB оцінюється за тестами FKB/PKB і стосується мертвого чи грибково ураженого розплоду, тоді як VSH потребує здатності розпізнавати тонкі хімічні та поведінкові сигнали від живого зараженого розплоду. Колонії з високим рівнем HB не завжди демонструють високий рівень VSH. SMR є результатом у популяції кліщів (зростання частки нерепродуктивних особин), який може виникати як завдяки VSH, так і через інші механізми. Проте дослідження Sprau et al. (2021) показали, що VSH і SMR є автономними процесами: бджоли видаляють заражений розплід незалежно від того, чи кліщ розмножувався.

Еволюційне значення VSH підтверджується прикладами паралельної еволюції: у різних регіонах світу незалежні популяції *Apis mellifera* розвинули подібні стратегії резистентності (Van Alphen & Fernhout, 2020; Locke et al., 2012). Молекулярні та сенсорні дослідження показали, що VSH має полігенну природу і пов'язана з нюховою перцепцією, нейронною

регуляцією та імунною відповіддю. Виявлено диференційну експресію білків-зв'язувачів запахових молекул (OBPs), нюхових рецепторів та протеїнових маркерів, асоційованих із VSH (Mondet et al., 2015; Guarna et al., 2015, 2017, 2021). GWAS-дослідження підтвердили полігенність фенотипу, а QTL-аналіз ідентифікував ділянки на 1-й та 9-й хромосомах (Tsuruda et al., 2012). Маркер-асоційована селекція (MAS) із використанням SNP-маркерів уже впроваджується у США, Новій Зеландії та Європі, прискорюючи відбір ліній із високим рівнем VSH (Brascamp et al., 2016; Kamler et al., 2022).

1.2.3 Взаємозв'язок між різними механізмами резистентності

Резистентність медоносних бджіл до *Varroa destructor* є результатом багаторівневої взаємодії кількох механізмів, які діють у різних просторово-часових масштабах життя колонії. Найбільш показовим у цьому контексті є дослідження Sprau та співавт. (2021), яке продемонструвало, що репродуктивний статус кліща не є визначальним сигналом для запуску варроа-чутливої гігієни (VSH) чи ресарпінгу. Бджоли видаляли заражений розплід незалежно від того, чи кліщ розмножувався, що означає: Suppressed Mite Reproduction (SMR) не можна вважати прямим наслідком VSH.

Масштабне європейське дослідження Mondet та співавт. (2020) підтвердило, що SMR є поширеним фенотипом у популяціях *Apis mellifera* різних країн. Було стандартизовано методику його оцінки, що дозволило виявити значну варіабельність між колоніями, але не між країнами чи підвидами. Огляд Spivak & Danka (2021) розширює розуміння взаємозв'язків, показуючи, що VSH є специфічним випадком загальної гігієнічної поведінки (НВ). Поведінковий патерн однаковий: розпізнавання → відкривання → видалення, але тригери різні.

У поєднанні з цими механізмами діють й інші фактори. Ресарпінг може знижувати репродуктивний успіх кліща навіть без видалення розплоду (Oddie et al., 2021). Grooming забезпечує захист на рівні дорослих бджіл. Скорочений період розвитку розплоду обмежує час, доступний кліщу для розмноження. Вірусна толерантність є критичною, оскільки навіть при високому рівні VSH кліщі залишаються векторами DWV та інших патогенів.

Ця багаторівнева інтеграція пояснює, чому природні популяції здатні виживати без лікування: у них одночасно діють кілька механізмів, які взаємно підсилюють один одного. Для селекційних програм це означає, що орієнтація лише на один фенотип не забезпечить довготривалої стійкості. Найбільш перспективним є комплексний підхід, що інтегрує VSH, SMR, ресарпінг, grooming та вірусну толерантність у єдину систему відбору.

1.3 Генетичний контроль VSH-поведінки

Варроатоз, спричинений кліщем *Varroa destructor*, є одним із найсерйозніших викликів для сучасного бджільництва. Селекція на резистентність стала ключовим напрямом, що дозволяє уникати використання акарицидів. Одним із найважливіших природних механізмів резистентності є варроа-чутлива гігієна (Varroa Sensitive Hygiene, VSH) — спеціалізований випадок гігієнічної поведінки, коли бджоли розпізнають і видаляють живий розплід, уражений кліщем.

Для оцінки VSH використовуються різні методи: класичні тести FKB (freeze-killed brood) та PKB (pin-killed brood), а також спеціалізовані методики із введенням зараженого розплоду та підрахунком відсотка розкритих і очищених комірок. Генетичний контроль VSH підтверджується як фенотипічними спостереженнями, так і молекулярними дослідженнями. Ідентифіковані локуси та гени, пов'язані з нюховою перцепцією, навчанням, пам'яттю та імунною відповіддю, свідчать про полігенний характер ознаки.

1.3.1 Полігенна природа VSH

Дослідження генетичних основ VSH показали, що ця поведінкова ознака має полігенний характер. Ідентифіковані кількісні локуси ознаки (QTL) та результати транскриптомних досліджень підтверджують залучення багатьох генів, що регулюють нюхову перцепцію, розвиток нервової системи, навчання, пам'ять та імунні реакції.

Зокрема, було виявлено локус *Hyg1* на хромосомі 2, асоційований із гігієнічною поведінкою (Oxley et al., 2010), а також локус на хромосомі 9, що містить ген *Norpa2* (фосфоліпаза C, пов'язана з формуванням пам'яті) та рецептор дофаміну *Dop3*, який відіграє ключову роль у формуванні відразливої пам'яті (Tsuruda et al., 2012). Подальші GWAS-дослідження (Spötter et al., 2016) ідентифікували SNP-панелі, асоційовані з VSH, серед яких виділяються гени *AdoR* (аденозиновий рецептор), *Cdk5alpha* (активатор циклічно-залежної кінази), *Octbeta2R* (рецептор октопаміну) та *Obp1* (білок, що зв'язує феромони у вусиках).

Транскриптомні дослідження показали, що у бджіл із VSH-фенотипом змінюється експресія генів нюхової системи (*Obp3*, *Obp4*, *Obp14*) та генів суперсімейства цитохрому P450 (*Cyp4g11*, *Cyp6AS11*), які беруть участь у деградації запахових молекул (Le Conte et al., 2011; Mondet et al., 2015; Boutin et al., 2015). Важливим є також зниження експресії генів імунної відповіді (*Def1*, *Def2*) у VSH-колоніях, що свідчить про перерозподіл ресурсів на поведінкові механізми захисту.

Додаткові підтвердження полігенності отримані у популяціях, які тривалий час співіснували з кліщем без акарицидної обробки. У таких колоніях було ідентифіковано локуси на хромосомах 7 та 15, що включають гени, пов'язані з метаболізмом екдизону, необхідного кліщу для активації репродуктивного циклу (Behrens et al., 2011; Conlon et al., 2018; Conlon et al., 2019).

1.3.2 QTL- картування VSH у медоносних бджіл

Картування кількісних локусів ознаки (QTL) стало одним із ключових методів для розкриття генетичної архітектури Varroa Sensitive Hygiene (VSH). У роботі Цуруди та співавт. було показано, що VSH контролюється кількома незалежними локусами, які пояснюють частину фенотипової варіації (Tsuruda et al., 2012). Основний QTL був ідентифікований на 9-й хромосомі, де локалізуються гени, пов'язані з сенсорними та когнітивними процесами, зокрема *NorpA2* та *dop3*, що беруть участь у формуванні пам'яті та нюховій перцепції. Другий QTL було знайдено на 1-й хромосомі, який включає гени одорантних рецепторів та білки, пов'язані з функціонуванням синаптичних везикул.

Ці результати підтвердили, що VSH має полігенну природу та власну специфічну генетичну архітектуру, відмінну від загальної гігієнічної поведінки. Високий рівень рекомбінації у геномі бджоли ускладнює використання віддалених маркерів, тому особливу увагу було приділено пошуку конкретних SNP, які можуть бути використані у маркер-асистованій селекції.

Саме у цьому контексті було ідентифіковано один із найбільш перспективних маркерів — **SNP 9-9224292**, розташований на 9-й хромосомі *Apis mellifera*. Цей маркер став центральним елементом подальших досліджень, спрямованих на підтвердження його асоціації з VSH-поведінкою та можливості практичного застосування у селекційних програмах.

1.3.3 SNP 9–9224292: відкриття, характеристика та практичне застосування

SNP 9–9224292 є одним із найбільш досліджених молекулярних маркерів, що асоціюється з варроа-чутливою гігієною (Varroa Sensitive Hygiene, VSH) у медоносних бджіл. Він локалізований на 9-й хромосомі *Apis mellifera* у позиції 9,224,292 (геномна збірка Amel 4.5; у сучасних анотаціях HAv3.1 — позиція 9,046,515), у регіоні, де було ідентифіковано кількісні локуси ознаки (QTL), пов'язані з гігієнічною поведінкою. Ця ділянка геному містить низку кандидатних генів, що беруть участь у сенсорних та

когнітивних процесах, зокрема у нюховій перцепції, навчанні та пам'яті, що узгоджується з поведінковою природою VSH.

Структурно SNP 9–9224292 є аденін-гуаніновим поліморфізмом, де алель G у північноамериканських популяціях асоціюється з підвищеним рівнем VSH-поведінки, тоді як алель A не має такого ефекту. У польових умовах Нова Зеландія стала одним із перших регіонів, де було перевірено практичну ефективність цього маркера у комерційних пасіках. Колонії, очолювані матками з генотипом GG, мали на 28,5% нижчий темп зростання популяції кліща порівняно з колоніями AA (Sainsbury et al., 2022). Це підтвердило його значення як інструмента маркер-асоційованої селекції. Водночас у російських лініях було виявлено протилежну асоціацію, де алель A мав зв'язок із VSH, що свідчить про популяційні відмінності у генетичній архітектурі ознаки та необхідність врахування локальних особливостей при використанні SNP у селекційних програмах.

Результати високороздільного QTL-аналізу, проведеного Tsuruda та співавт. (2012), показали, що основний QTL, асоційований із VSH, розташований саме на 9-й хромосомі, де локалізується SNP 9–9224292, і пояснює близько 6,1% фенотипової варіації поведінки. У межах цього регіону було знайдено 63 кандидатні гени, серед яких особливу увагу привернули *NorpA2*, що бере участь у процесах навчання та пам'яті, та **dop3**, D2-подібний дофаміновий рецептор, який регулює формування відразливої пам'яті у комах. Виявлення цих генів підтвердило, що VSH може бути пов'язаний із нюховими сигналами та когнітивними механізмами, які забезпечують здатність бджіл розпізнавати заражений розплід.

Високий рівень рекомбінації у геномі бджоли, що сягає понад 22 сМ/Мб і до 35 сМ/Мб на окремих ділянках, ускладнює використання віддалених маркерів. Тому SNP 9–9224292 має особливу цінність як безпосередньо асоційований із VSH і придатний для практичного застосування. Його використання у селекційних програмах дозволяє скоротити витрати на фенотипування, прискорити відбір маток і трутнів із бажаним генотипом та інтегрувати генетичний контроль у системи боротьби з вароатозом, оптимізуючи час проведення акарицидних обробок і зменшуючи навантаження на колонії.

1.3.4 Кандидатні гени в регіоні SNP 9-9224292

Регіон на 9-й хромосомі, де локалізується SNP 9-9224292, був ідентифікований як один із ключових для контролю Varroa Sensitive Hygiene (VSH) і пояснює значну частину фенотипової варіації поведінки (Tsuruda et al., 2012). У межах цього локусу було знайдено комплекс генів, що функціонально пов'язані із сенсорною перцепцією, нейротрансмісією та когнітивними процесами. До першої групи належать гени одорантних рецепторів та білків, що зв'язують запахові молекули (OBPs), які забезпечують здатність робочих бджіл розпізнавати хімічні сигнали зараженого розплоду. Експресійні дослідження показали, що у бджіл із високим рівнем VSH у антенах підвищена експресія OBP-генів (*Obr3*, *Obr4*, *Obr14*) та цитохромів P450 (*Cyp4g11*, *Cyp6AS11*), що забезпечує більш ефективне сприйняття запахових сигналів (Mondet et al., 2015; Boutin et al., 2015). Друга група включає гени нейротрансмісії, серед яких дофаміновий рецептор *dor3* та октопаміновий рецептор *Oc1beta2R*, що регулюють формування відразливої пам'яті та мотиваційні реакції у комах (Spötter et al., 2016). Третя група охоплює гени навчання та пам'яті, зокрема *NorpA2*, який кодує фосфоліпазу C і бере участь у сигнальних шляхах когнітивних процесів, та *dor3*, що забезпечує здатність бджіл формувати відразливу пам'ять і реагувати на повторювані сигнали зараження (Tsuruda et al., 2012). Експресія цих генів має тканинну специфічність: у мозку бджіл із VSH-фенотипом спостерігається знижена експресія генів імунної відповіді (*Def1*, *Def2*), що може свідчити про перерозподіл ресурсів на поведінкові механізми захисту (Le Conte et al., 2011), тоді як у гіпофарингеальних залозах відзначаються зміни експресії генів, пов'язаних із метаболізмом та регуляцією соціальної поведінки, що може впливати на комунікацію між робочими бджолами та координацію гігієнічних дій.

1.3.5 Інші генетичні локуси, пов'язані з VSH

Окрім регіону SNP 9-9224292 на 9-й хромосомі, у різних популяціях медоносних бджіл було ідентифіковано інші генетичні локуси, що асоціюються з проявами VSH. У дослідженні (Oxley et al., 2010) було описано локус Hyg1 на 2-й хромосомі, який впливає на загальну гігієнічну поведінку та може мати частковий зв'язок із VSH. У роботі (Behrens et al., 2011) було виявлено три QTL, що пригнічують репродукцію кліща, серед яких локуси на 7-й та 15-й хромосомах, пов'язані з метаболізмом екдизону, гормону, необхідного кліщу для активації репродуктивного циклу. Дослідження Conlon et al., 2018; 2019 підтвердили роль епістатичних взаємодій між кількома генами, які забезпечують комплексний контроль резистентності. GWAS-аналізи (Spötter et al., 2016) ідентифікували додаткові SNP-панелі, асоційовані з VSH, серед яких гени AdoR (аденозиновий рецептор), Cdk5alpha (активатор циклічно-залежної кінази) та інші GPCR-рецептори, що регулюють сенсорну перцепцію та нейронну пластичність. Ці результати підтверджують полігенну природу VSH та вказують на те, що резистентність до *Varroa destructor* формується завдяки взаємодії кількох генетичних механізмів, які охоплюють нюхову систему, когнітивні процеси та гормональну регуляцію розвитку кліща.

1.4. Маркер-асоційована селекція (MAS) у бджільництві

Маркер-асоційована селекція у бджільництві розглядається як сучасна методологія, що дозволяє перейти від трудомістких і часто неточних фенотипових оцінок до використання молекулярних маркерів, які безпосередньо асоційовані з ознаками резистентності до *Varroa destructor*. У дослідженні, проведеному у Фландрії, було показано, що фенотипування ознаки пригнічення репродукції кліща (Suppressed Mite Reproduction, SMR) є надзвичайно складним і потребує великої кількості інфікованих комірок для отримання достовірних результатів, що значно обмежує його практичне застосування у селекційних програмах. Використання SNP-маркерів у цьому контексті дозволяє швидко й ефективно визначати генотипи маток і трутнів, що суттєво спрощує процес відбору та робить його більш відтворюваним.

Особливе значення має SNP 9-9224292, ідентифікований у північноамериканських популяціях як маркер, асоційований із поведінкою Varroa Sensitive Hygiene (VSH). У дослідженні (Tsuruda et al., 2012) цей маркер був підтверджений за допомогою методу PCR-RFLP (ПДРФ, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів). Практична цінність цього підходу полягає у його простоті: ампліфікація ділянки геному, що містить SNP, подальше розрізання рестриктазою та електрофоретичний аналіз дозволяють швидко визначити генотип матки чи трутня. Методика не потребує дорогого обладнання і може бути реалізована у базових лабораторіях, які співпрацюють із бджолярами, що робить її доступною для практичного використання у селекційних програмах.

Цей приклад демонструє, що MAS може бути реалізована не лише через сучасні високопродуктивні технології (наприклад, qPCR із дволанцюговими пробами, застосоване у дослідженні (Lefebvre et al., 2024), але й через доступніші методи, які реально інтегрувати у практику.

Важливо зазначити, що у лініях *Apis mellifera mellifera* було виявлено протилежну асоціацію, де алель *A* мав зв'язок із VSH (Kirrane et al., 2015). Це свідчить про складну полігенну природу ознаки у різних популяціях. Суперечливість результатів пояснюється відмінностями у структурі лінкедж-дізеквілібріуму, епістатичними взаємодіями між локусами, різними протоколами фенотипування (VSH vs SMR), а також впливом середовища та менеджменту пасік на прояв поведінкових механізмів резистентності.

У дослідженні (Lefebvre et al., 2024) було показано, що з восьми раніше описаних SNP лише три (SNP2, SNP4 та SNP6) залишаються значущими предикторами ознаки «нерепродуктивність кліща у трутневому розплоді» (Drone Brood Resistance, DBR). На основі цих трьох маркерів було побудовано скорочену модель, яка класифікувала 76% фенотипів правильно. Це підтверджує, що навіть невелика кількість маркерів може бути достатньою для практичного застосування MAS у бджільництві, забезпечуючи баланс між точністю та економічною доцільністю.

Особливо важливим є те, що методика MAS може бути освоєна не лише у наукових лабораторіях, але й безпосередньо у практиці бджолярів. Використання доступних технологій, таких як PCR-RFLP чи qPCR із дволанцюговими пробами, дозволяє проводити генотипування маток і трупнів навіть у невеликих селекційних програмах. Це означає, що бджолярі отримують інструмент для цільового відбору колоній із підвищеною резистентністю, що у перспективі може стати частиною інтегрованої системи боротьби з вароатозом. MAS відкриває можливість для створення локальних програм селекції, де бджолярі зможуть самостійно відбирати маток із бажаними генотипами, зменшуючи залежність від трудомістких польових тестів. Це дозволить не лише підвищити ефективність боротьби з кліщем, але й зберегти генетичне різноманіття місцевих популяцій, оскільки у процес відбору можна включати більшу кількість колоній.

1.4.1 Принципи MAS

Маркер-асоційована селекція (MAS) у бджільництві розглядається як сучасна методологія, що дозволяє перейти від трудомістких і часто неточних фенотипових оцінок до використання молекулярних маркерів, асоційованих із резистентністю до *Varroa destructor*. Використання SNP-маркерів у цьому контексті значно спрощує процес відбору та робить його більш відтворюваним.

Особливе значення має SNP 9–9224292, ідентифікований у північноамериканських популяціях як маркер, пов'язаний із поведінкою *Varroa Sensitive Hygiene* (VSH). У дослідженні Tsuruda et al. (2012) цей маркер був підтверджений методом PCR-RFLP, що забезпечує просте й доступне генотипування маток і трутнів навіть у базових лабораторіях, які співпрацюють із бджолярами.

Подальші дослідження показали, що полігенна природа ознаки резистентності ускладнює інтерпретацію результатів, адже асоціації можуть відрізнятися між популяціями (Kerrane et al., 2015). Водночас Lefebvre et al. (2024) підтвердили практичну цінність лише трьох SNP (SNP2, SNP4, SNP6), які дозволили правильно класифікувати 76% фенотипів «Drone Brood Resistance» (DBR). Це свідчить, що навіть невелика кількість маркерів може бути достатньою для ефективного застосування MAS у бджільництві.

Використання доступних технологій, таких як PCR-RFLP чи qPCR, відкриває можливість інтеграції MAS у практику бджолярів, забезпечуючи цільовий відбір колоній із підвищеною резистентністю та збереження генетичного різноманіття місцевих популяцій.

1.4.2 Переваги MAS над традиційною селекцією

Традиційна селекція у бджільництві базується на фенотипових оцінках, які часто є трудомісткими, неточними та залежними від умов середовища. Наприклад, визначення рівня *Varroa Sensitive Hygiene* (VSH) чи *Suppressed Mite Reproduction* (SMR) потребує багатьох годин мікроскопічного аналізу заражених комірок, що робить процес відбору повільним і дорогим. Крім того, фенотипові прояви можуть бути змінені під впливом клімату, харчування чи менеджменту пасіки, що знижує надійність результатів.

Маркер-асоційована селекція (MAS) має низку переваг, які роблять її більш ефективною у порівнянні з традиційними методами.

По-перше, MAS забезпечує високу точність відбору, оскільки використовує молекулярні маркери, безпосередньо пов'язані з генами або QTL, що контролюють ознаку. Це дозволяє уникнути похибок, пов'язаних із впливом середовища.

По-друге, MAS значно скорочує час селекційного циклу. Генотипування можна проводити ще до прояву фенотипу, наприклад, у молодих маток чи трутнів. Це дає змогу швидко визначати бажані генотипи і використовувати їх у програмі розмноження без очікування кількох сезонів для підтвердження ознаки.

По-третє, MAS є особливо корисною для полігенних ознак. У випадку резистентності до *Varroa destructor* поведінкові механізми, такі як VSH чи SMR, контролюються багатьма генами. Використання маркерів дозволяє

пірамідувати кілька алелів у одному генотипі, створюючи лінії з комплексною стійкістю.

По- четверте, MAS забезпечує відтворюваність і стабільність результатів.

У дослідженні *Ruvolo-Takasusuki et al., 2016* показано, що використання маркера MRJP3 дозволило протягом десяти років підтримувати стабільно високий рівень продуктивності маточного молочка у відібраних лініях. Це свідчить про те, що маркерний відбір може гарантувати довготривалу ефективність селекційних програм.

По- п'яте, MAS економічно вигідна. Хоча сучасні методи, такі як qPCR, потребують спеціалізованого обладнання, простіші технології (PCR-RFLP) можуть бути реалізовані у базових лабораторіях, доступних для бджолярів. Це робить MAS придатною як для великих наукових центрів, так і для локальних програм селекції.

1.4.3 Типи молекулярних маркерів

У системі маркер-асоційованої селекції (MAS) ключову роль відіграють молекулярні маркери, які дозволяють ідентифікувати генетичні відмінності між особинами та пов'язати їх із проявом цільових ознак. У бджільництві найбільш поширеними є SNP, мікросателіти та ISSR. Інформація з файлу на сторінці (*Molecular Markers and Their Applications in Marker-Assisted Selection in Bread Wheat*) допомагає детально розкрити їхні властивості та практичне значення.

SNP є найпоширенішим типом генетичних варіацій у геномі, що виникають у результаті заміни одного нуклеотиду. Вони характеризуються високою щільністю розподілу по геному, стабільністю та відтворюваністю. У бджільництві SNP використовуються для пошуку маркерів, асоційованих із резистентністю до *Varroa destructor*. Прикладом є SNP9, який був підтверджений методом PCR-RFLP (*Tsuruda et al., 2012*) як маркер поведінки VSH. Практична цінність SNP полягає у можливості їхнього застосування як у високопродуктивних системах (SNP-чіпи, qPCR), так і у доступних методах, що можуть бути освоєні у базових лабораторіях.

Мікросателіти, або прості повтори послідовностей, складаються з коротких мотивів (2–6 пар основ), які повторюються багаторазово. Вони характеризуються високою поліморфністю та кодомінантністю, що дозволяє ефективно виявляти гетерозиготність і оцінювати генетичне різноманіття. У бджільництві SSR застосовувалися для визначення родинних зв'язків, структури колоній та оцінки генетичної диференціації популяцій *Apis mellifera*. У файлі підкреслюється, що SSR є інформативними маркерами для контролю чистопородності та збереження різноманіття, хоча їхня щільність у геномі нижча, ніж у SNP, і вони менш придатні для високопродуктивних систем.

ISSR-маркери базуються на ампліфікації ділянок між мікросателітними послідовностями. Їхня перевага полягає у тому, що вони не потребують попереднього знання геномної послідовності, що робить їх доступними для використання у різних видах, включно з бджолами. ISSR характеризуються високою відтворюваністю та здатністю виявляти поліморфізм у популяціях. У бджільництві ISSR застосовувалися для оцінки генетичної структури та різноманіття ліній *Apis mellifera*, а також для виявлення маркерів, пов'язаних із резистентністю до хвороб. У файлі зазначено, що ISSR є корисними для попереднього скринінгу та формування бази для подальших досліджень, хоча вони поступаються SNP у точності картування QTL.

1.4.4 Обмеження та проблеми MAS у бджіл

Маркер-асоційована селекція (MAS) у бджільництві стикається з низкою обмежень, що впливають із популяційної структури *Apis mellifera*, високої рекомбінації її геному та полігенної природи ознак резистентності (VSH, SMR, рекепінг, grooming). У практичних програмах ці фактори знижують переносність маркерів між регіонами та ускладнюють побудову стабільних багатомаркерних індексів. Популяційна специфічність проявляється в тому, що валідовані асоціації змінюються між підвидами та локальними лініями, що узгоджується з різною фазою лінкедж-дизеквілібріуму, історією добору та взаємодією генотипу з середовищем і менеджментом пасік (Tsuruda et al., 2012; Kirrane et al., 2015; Lefebvre et al., 2024).

Високий рівень рекомбінації у медоносної бджоли призводить до швидкого розриву блоків зв'язку та деградації асоціацій уже за кілька поколінь у відкритих популяціях. Це означає, що одиничні SNP швидко втрачають стабільність ефекту після інтрогресії нових ліній чи зміни селекційного фону. Для підвищення стійкості моделей потрібне щільніше маркерне покриття, регулярна переоцінка ефектів і «перенавчання» індексів на нових поколіннях (Wallberg et al., 2014; Jones et al., 2019).

Полігенний контроль ознак резистентності передбачає множину варіантів із малими ефектами, епістаз та плейотропію, тому жоден окремий маркер не може надійно класифікувати колонії. Багатомаркерні індекси підвищують точність, але вимагають великих вибірок, стандартизації фенотипування та моделювання на рівні колонії. Гібридні стратегії — поєднання доступних методів генотипування (PCR-RFLP/qPCR) із мінімально стандартизованими польовими фенотипами та сезонною переоцінкою індексів — є доцільними для локальних програм, тоді як для полігенних ознак поступово переходять до геномної селекції

(GBLUP/байєсівські моделі) на великих панелях SNP (Spötter et al., 2016; Lefebvre et al., 2024).

Довгострокова динаміка генетичної структури популяцій додає ще один рівень складності: торгівля матками, інтрогресія та тиск паразитів змінюють генетичне різноманіття й LD-структуру, що потребує регулярної ревалідації маркерів. Приклади зі США та Центрально-Східної Європи показують значні зсуви у складі популяцій, які вимагають популяційно-специфічних панелей маркерів і політик збереження різноманіття (Carpenter & Harpur, 2021; Meixner et al., 2010; Leroy et al., 2024).

Успішні програми MAS спираються на локальну валідацію ефектів у цільовій популяції, використання багатомаркерних індексів разом із стандартизованими фенотипами, регулярне оновлення моделей і роботу на рівні колонії як одиниці відбору. Такий підхід підтримує стабільність селекційних рішень та робить MAS практично придатною у реальних умовах пасіки (Muñoz et al., 2008; Lefebvre et al., 2024).

1.5 Пошук молекулярно-генетичних маркерів, здатних прогнозувати резистентність медоносних бджіл

У попередньому дослідженні (Грицак І.В Бойко О.А., неопубліковані дані, 2024) було проведено комплексне дослідження, спрямоване на пошук молекулярно-генетичних маркерів, здатних прогнозувати резистентність медоносних бджіл *Apis mellifera* до кліща *Varroa destructor*. Основна увага приділялася використанню ISSR-маркерів та аналізу мітохондріальної ДНК (мтДНК), що дозволило оцінити генетичну різноманітність та породну приналежність досліджуваних ліній.

ISSR-аналіз проводився із застосуванням праймерів S1, S6 та S8. Виявлено, що лише ISSR- S1 продемонстрував поліморфізм, який корелював із фенотипом стійкості: у бджіл із резистентних ліній були ідентифіковані специфічні ділянки розміром 500–600 п.н. та 100–200 п.н., тоді як у нестійких ліній ці ділянки були відсутні. Це свідчить про можливу асоціацію ISSR- S1 із фенотипом підвищеної резистентності, що робить його перспективним для подальшого використання у селекційних програмах. Інші ISSR-маркери (S6 та S8) не продемонстрували поліморфізму, що вказує на їхню обмежену інформативність у контексті прогнозування стійкості до *Varroa destructor*.

Аналіз мтДНК проводився за ділянкою COI-COII, яка традиційно використовується для визначення породної чистоти та екотипової приналежності бджіл. Усі досліджувані зразки незалежно від рівня стійкості мали однаковий розмір ампліфікованого фрагмента — 572 п.н. Це означає, що даний маркер не може бути використаний для прогнозування резистентності, оскільки не виявляє відмінностей між стійкими та

нестійкими лініями. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що серед досліджених маркерів лише ISSR-S1 має потенційну селекційну цінність у контексті прогнозування стійкості до *Varroa destructor*. Відсутність зв'язку інших маркерів (ISSR-S6, ISSR-S8 та COI-COII мтДНК) із резистентністю свідчить про необхідність подальшого пошуку більш інформативних молекулярних маркерів, зокрема SNP-варіантів, які вже показали свою ефективність у міжнародних дослідженнях.

Це попереднє дослідження стало важливим етапом у формуванні висновку про обмеженість традиційних маркерів та необхідність переходу до більш точних і відтворюваних методів, що базуються на одонуклеотидних поліморфізмах. Саме SNP-маркери, завдяки своїй стабільності, високій інформативності та можливості автоматизованого генотипування, відкривають перспективи для створення практичних інструментів у селекції бджіл. Вони дозволяють не лише прогнозувати резистентність, але й інтегрувати генетичний контроль у виробничі програми, зменшуючи залежність від трудомісткого фенотипування.

Перехід від ISSR та мтДНК-аналізу до використання SNP-маркерів логічно веде до наступного розділу, присвяченого маркер-асоційованій селекції (MAS). Саме MAS є сучасним підходом, що поєднує молекулярну генетику та практичне бджільництво, дозволяючи ефективно відбирати стійкі лінії та інтегрувати результати фундаментальних досліджень у прикладні програми.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об'єкт та матеріал дослідження

2.1.1 Характеристика пасік та бджолосімей

Дослідження проводилося на чотирьох експериментальних групах бджолосімей *Apis mellifera carnica*, які відрізнялися за походженням, географічним розташуванням та селекційними характеристиками **ДОДАТОК А**.

Група 1 (Львів, чистопородна карніка)

Група включала 6 бджолосімей чистопородної *Apis mellifera carnica*, отриманих від бджолярів-членів клубу карніки у Львівській області.

Сім'ї були розташовані на приватних пасіках в околицях міста Львова. Походження маток було підтверджено документацією селекційного клубу з відомою племінною історією. З кожної сім'ї відібрали по шість бджіл-кормилиць (загалом 36 особин). Після генотипування 32 зразки дали якісні результати; 4 зразки виключено через невдалу ампліфікацію. Номери досліджуваних сімей: 38, 45, 204, 400, 340, 442.

Група 2 (Київ, варроатолерантні та високопродуктивні лінії)

Експериментальна група з околиць Києва налічувала 5 бджолосімей, отриманих через клуб карніки та селекціонерів, які спеціалізуються на виведенні ліній зі специфічними господарсько-корисними ознаками. Група була неоднорідною за селекційним призначенням і включала три підгрупи:

- Дві сім'ї (№ 550, 549), що позиціонувалися як варроатолерантні, з підвищеною стійкістю до кліща *Varroa destructor*;
- Одна сім'я (№ 162) - результат комбінації варроатолерантних ліній;
- Дві сім'ї (№ 345, 978) - чемпіони по медозбору з високими показниками продуктивності.

З кожної сім'ї для індивідуального генотипування було відібрано по 6 бджіл-кормилиць (загалом 30 особин). Критерії попереднього відбору базувалися на продуктивних показниках та оцінці толерантності до варроатозу за рівнем заклецованості протягом попередніх сезонів.

Група 3 (Власна пасіка, селекція на грумінг)

Група складалася з 6 бджолосімей з власної експериментальної пасіки, розташованої в Харківській області с. Донець. Матки походили від сімей, попередньо відібраних за поведінковим принципом грумінг — здатністю бджіл до самоочищення та взаємного очищення від ектопаразитів. Спарювання маток відбувалося природним шляхом (вільне спарювання) на пасіці. Номери сімей: 3, 71, 25, 66, 75, 35.

Методика оцінки поведінки грумінг базувалася на спостереженні за частотою очисних рухів бджіл та їхньою здатністю видаляти кліщів з поверхні тіла, що описувало попереднє дослідження (Грицак І.В Бойко О.А., неопубліковані дані, 2024). Для індивідуального генотипування з кожної сім'ї було відібрано по 6 особин (загалом 36 бджіл).

Загалом з 19 бджолосімей відібрано 114 особин. П'ять зразків (4 з львівської групи та 1 з контрольної) виключено з аналізу через невдалу ампліфікацію або низьку якість електрофореграм. Кінцевий обсяг вибірки становив 109 особин: 32 (Львів), 30 (Київ), 36 (Грумінг), 11 (Контроль).

Група 4 (Контрольна, нестійкі до варроа)

Контрольна група включала 2 бджолосім'ї (№ 58, 119) без ознак стійкості до *Varroa destructor*. Сім'ї характеризувалися підвищеним рівнем заклещованості **ДОДАТОК Б.** та відсутністю виражених захисних механізмів проти кліща. Критеріями відбору як контрольної групи були: відсутність попередньої селекції на стійкість до варроатозу, типові для регіону показники ураженості кліщем, схожі умови утримання з експериментальними групами. З кожної сім'ї для індивідуального генотипування було відібрано по 6 бджіл (загалом 11 особин).

Загальна кількість сімей у дослідженні становила 19, загальна кількість особин для індивідуального генотипування - 114 бджіл. Узагальнену інформацію про всі експериментальні групи наведено у таблиці 2.

Таблиця 2 Характеристика експериментальних груп бджолосімей

Група	Локація	Характеристика	Кількість сімей	Кількість бджіл для генотипування	Номери сімей
1	Львів	Чистопородна карніка	6	36	38, 45, 204, 400, 340, 442
2	Київ	Варроатолерантні та	5	30	550, 549, 162, 345,

		високопродуктивні			978
3	Харківська обл.	Селекція на грумінг	6	36	3, 71, 25, 66, 75, 35
4	-	Контроль (нестійкі)	2	11	58, 119
Разом	-	-	19	109	-

Примітка: З групи 1 виключено 4 зразки через невдалу ампліфікацію, з групи 4 — 1 зразок.

2.1.2 Умови утримання бджолосімей

Усі досліджувані бджолосім'ї утримувалися в стандартних багатокорпусних вуликах Дадана-Блатта на 12 рамок розміром 435×300 мм з одним-двома корпусами залежно від сили сім'ї та періоду сезону. Під час активного періоду (червень-серпень) використовувалися магазинні надставки для відбору меду.

Ветеринарно-санітарний стан всіх пасік відповідав вимогам чинного законодавства України. Регулярно проводився моніторинг епізоотичної ситуації щодо варроатозу та інших хвороб бджіл.

Для контролю рівня заклещованості на всіх пасіках застосовувався уніфікований протокол обробки. Перша обробка проводилася на початку весни 2025 року (березень-квітень) після виставлення бджіл з зимівлі та початку активного розвитку сімей. Друга обробка здійснювалася після завершення медозбору у серпні 2025 року.

Для обробок використовувалися препарати на основі флувалінату або амітразу згідно з інструкціями виробників та рекомендаціями ветеринарної служби. Інтервал між другою обробкою та відбором проб біологічного матеріалу становив не менше 3 тижнів, що відповідає рекомендаціям щодо мінімізації впливу акарицидів на фізіологічний стан бджіл.

Кліматичні умови регіонів досліджень (Львівська, Київська та Харківська області) характеризуються помірно-континентальним кліматом з теплим літом та достатнім зволоженням. Медоносна база включала різнотрав'я природних лук, сільськогосподарські культури (соняшник, ріпак, гречка) та деревно-чагарникову рослинність.

2.2 Відбір біологічного матеріалу

2.2.1 Термін та умови відбору проб

Відбір біологічного матеріалу здійснювався в період червень-вересень 2025 року, що відповідає періоду активного розвитку бджолосімей та максимальної чисельності бджіл у гнізді. Вибір даного періоду обґрунтовувався необхідністю аналізу бджіл літньої генерації, які характеризуються активною участю у виконанні внутрішньогніздових робіт, включаючи догляд за розплодом.

Відбір проб проводився в сухі, теплі дні при температурі повітря не нижче +20°C та за відсутності опадів, що забезпечувало нормальну активність бджіл та мінімізувало стрес від втручання у гніздо.

2.2.2 Характеристика відібраних особин

Для молекулярно-генетичного аналізу відбиралися виключно бджоли-кормилиці віком 7-21 день. Визначення віку базувалося на локалізації бджіл на рамках з відкритим розплодом, оскільки саме в цей період життя бджоли виконують функції годівлі личинок та є фізіологічно активними кормилицями.

Вибір саме кормилиць обґрунтовувався декількома факторами. По-перше, бджоли цього вікового діапазону характеризуються високою метаболічною активністю та стабільною експресією генів, що забезпечує отримання якісного генетичного матеріалу. По-друге, кормилиці безпосередньо контактують з розплодом та можуть демонструвати поведінкові реакції, пов'язані з гігієнічною поведінкою та стійкістю до варроатозу (Arathi, H.S., 2000; Moshe N., et al., 2017)

Відбір проводився безпосередньо з рамок з розплодом шляхом акуратного захоплення бджіл за груди стерильним пінцетом та негайного поміщення у попередньо марковані пробірки.

2.2.3 Кількість особин для аналізу

Для індивідуального генотипування з кожної бджолосім'ї відбиралося по 6 бджіл-кормилиць. Така кількість особин забезпечувала достатню репрезентативність вибірки для оцінки генетичної структури сім'ї при балансі між точністю аналізу та економічною доцільністю. Загальна кількість проаналізованих особин становила 109 бджіл з 19 сімей.

Вибір кількості особин базувався на попередніх дослідженнях, які показали, що для надійного визначення частот алелів у бджолосім'ї достатньо аналізувати 5-10 особин за умови диплоїдності робочих бджіл.

2.2.4 Умови фіксації та зберігання

Відібрані бджоли одразу після вилучення з гнізда піддавалися евтаназії шляхом механічної іммобілізації та швидкого заморожування. Частина зразків (66 проб) фіксувалася заморожуванням при температурі -20°C у стерильних пробірках типу Eppendorf об'ємом 1,5 мл з відповідним маркуванням. Інша частина зразків (63 проби) фіксувалася у 96% етанолі в співвідношенні 1:10 (біоматеріал:етанол) для запобігання деградації ДНК.

Зразки зберігалися при температурі -20°C до моменту виділення ДНК.

Тривалість зберігання не перевищувала 6 місяців, що відповідає рекомендованим термінам для збереження якості нуклеїнових кислот. Транспортування зразків між пасіками та лабораторією здійснювалося в термоконтейнерах з охолодженими акумуляторами холоду для підтримання низької температури.

2.3 Молекулярно - генетичні методи

2.3.1 Екстракція ДНК

У дослідженні використовувалися два методи виділення геномної ДНК, які відрізнялися за принципом дії, вартістю та тривалістю процедури.

Метод 1: Сорбентний набір NEOprep100 DNA (NEOGEN)

Для 66 зразків виділення ДНК проводилося з використанням комерційного набору NEOprep100 DNA виробництва NEOGEN. Метод базується на селективній сорбції нуклеїнових кислот на силікатній мембрані в присутності хаотропних солей.

Підготовка біологічного матеріалу включала використання цілої бджоли або окремих частин тіла (грудний відділ та голова) загальною масою приблизно 20-30 мг. Тканини попередньо подрібнювалися механічно у стерильних умовах.

Протокол виділення здійснювався згідно з рекомендаціями виробника та включав наступні етапи:

- I. Лізис біологічного матеріалу у буфері, що містить гуанідин-тіоціанат, протягом 30-60 хвилин при температурі 56°C з додаванням протеїнази К для повного розщеплення білків.
- II. Сорбція ДНК на спін-колонці шляхом центрифугування при 10000 об/хв протягом 1 хвилини.

III. Серія відмивань сорбованої ДНК спеціальними буферами для видалення домішок, білків та солей (двічі по 500 мкл відмивного буфера з центрифугуванням).

IV. Елюція очищеної ДНК стерильною деіонізованою водою або елюційним буфером (10 мМ Трис-НСІ, рН 8,5) об'ємом 100 мкл з інкубацією 5 хвилин при кімнатній температурі та подальшим центрифугуванням.

В результаті виділення було отримано 85 мкл чистого супернатанту з високою концентрацією ДНК. Під час первинних експериментів з ампліфікацією було виявлено інгібування полімеразної ланцюгової реакції, яке було пов'язане з надмірно високою концентрацією матричної ДНК. Для усунення цього ефекту всі зразки розводилися у співвідношенні 1:10: до 1,5 мкл виділеної ДНК додавалося 8,5 мкл високоочищеної деіонізованої стерильної води **ДОДАТОК В.**

Метод 2: Виділення ДНК за допомогою смоли "Chelex-100"

Для 63 зразків застосовувався спрощений метод виділення ДНК з використанням хелатуючої смоли Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories). Вибір методу був обґрунтований його швидкістю (загальний час виділення близько 5 годин), низькою вартістю та достатньою ефективністю для подальшої ПЛР-ампліфікації коротких фрагментів ДНК.

Підготовка біологічного матеріалу мала свої особливості порівняно з сорбентним методом. Використовувалося все тіло бджоли за винятком брюшка та крил. Виключення брюшка було необхідним через високий вміст віску, смол та інших речовин у кишечнику, які можуть інгібувати ампліфікацію навіть після очищення. Видалення крил проводилося з метою зменшення хітинового навантаження у пробі, оскільки хітин може зв'язувати компоненти реакційної суміші та знижувати ефективність ПЛР.

Протокол виділення ДНК методом Chelex-100 включав наступні етапи:

- I. Підготовлені частини бджоли (голова, груди, ноги) поміщалися в стерильні пробірки Eppendorf об'ємом 1,5 мл.
- II. До кожної пробірки додавалося 250 мкл 5% суспензії Chelex-100. Суспензія готувалася шляхом змішування сухої смоли Chelex-100 (Bio-Rad) з деіонізованою водою до кінцевої концентрації 5% (г/об) з ретельним перемішуванням.
- III. Пробірки інкубувалися при температурі 56°C протягом 4 годин 30 хвилин. Під час інкубації проводилося періодичне перемішування вмісту на вортексі (5-10 секунд кожні 30-45 хвилин) для покращення контакту смоли з біологічним матеріалом та руйнування клітинних структур.
- IV. Після першої інкубації пробірки поміщалися у термостат при температурі 95°C на 8 хвилин. Висока температура забезпечувала інактивацію нуклеаз та денатурацію білків, а також сприяла вивільненню ДНК з комплексів зі смолою.

- V. Після термічної обробки пробірки знову перемішувалися на вортексі протягом 5-10 секунд.
- VI. Проводилося центрифугування при 10000-15000 об/хв протягом 2-3 хвилин для осадження смоли та клітинного дебрису.
- VII. Супернатант, що містив очищену ДНК, акуратно відбирався піпеткою без захоплення осаду смоли. Об'єм супернатанту, що використовувався для ампліфікації, залежав від схеми ПЛР та становив від 0,5 до 2 мкл на реакцію.
- VIII. Екстраговану ДНК зберігали при температурі -20°C у стерильних пробірках з відповідним маркуванням. Перед використанням зразки ретельно перемішувалися на вортексі та центрифугувалися протягом 5 хвилин при 10000 об/хв для осадження можливих преципітатів.

2.3.2 ПЛР-ампліфікація SNP 9-9224292

2.3.2.1 Характеристика цільового SNP

Об'єктом молекулярно-генетичного аналізу був одонуклеотидний поліморфізм SNP 9-9224292, локалізований на хромосомі 9 геному *Apis mellifera* у позиції 9224292 (референсна збірка Amel 4.0). Даний SNP являє собою заміну аденіну (A) на гуанін (G) та був ідентифікований як генетичний маркер, асоційований з поведінкою *Varroa Sensitive Hygiene* (VSH) у північноамериканських популяціях медоносних бджіл. Згідно з дослідженнями Tsuruda та співавторів, алель G у гомозиготному стані (генотип GG) корелює з підвищеною частотою VSH-поведінки та зниженим рівнем заклещованості колоній.

Функціональне значення SNP 9-9224292 пов'язане з генами, які контролюють нюхову чутливість, зір, навчання та пам'ять у бджіл. Передбачається, що алель G може впливати на здатність бджіл розпізнавати хімічні сигнали, що виділяються личинками, ураженими кліщами, що є першим етапом VSH-поведінки.

Очікувані фенотипічні прояви різних генотипів:

- **GG (гомозигота за алелем G):** високий рівень VSH-поведінки, підвищена стійкість до *Varroa destructor*, знижений рівень заклещованості;
- **GA (гетерозигота):** проміжний рівень VSH-поведінки та стійкості до варроатозу;
- **AA (гомозигота за алелем A):** низький рівень VSH-поведінки, підвищена сприйнятливості до *Varroa destructor*.

2.3.2.2 Праймери для ампліфікації

Для ампліфікації ділянки ДНК, що містить SNP 9-9224292, використовувалася пара специфічних олігонуклеотидних праймерів:

Forward праймер: 5'-CGCGTGTATGTGTGTATTTACAAAGTTCGG-3'

- Довжина: 30 нуклеотидів
- Температура плавлення (T_m): 61,2°C (розрахункова)
- GC-склад: 43,3%

Reverse праймер: 5'-ТАСТТГСТСГТССАТСГТССАТА-3'

- Довжина: 23 нуклеотиди
- Температура плавлення (T_m): 60,8°C (розрахункова)
- GC-склад: 47,8%

Температури плавлення праймерів були розраховані за допомогою онлайн-інструменту NCBI Primer-BLAST з урахуванням концентрації солей у ПЛР-буфері (50 мМ KCl) та концентрації праймерів (0,5 мкМ).

Очікуваний розмір ампліфікованого фрагмента становить 207 пар нуклеотидів. Специфічність праймерів була підтверджена *in silico* за допомогою програми BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) шляхом порівняння послідовностей праймерів з геномом *Apis mellifera*, що виключило можливість неспецифічної ампліфікації.

Дизайн праймерів був запозичений з публікації (Sainsbury et al. 2022), де ця пара праймерів успішно застосовувалася для генотипування SNP 9-9224292 у новозеландських медоносних бджіл.

Критичним аспектом методики є модифікація forward праймера. Заміна цитозину (C) на іншу основу в позиції 28 створює умовний сайт рестрикції, який стає функціональним тільки за наявності певного алелю SNP (Tsuruda et al., 2012). При наявності G-алелю в геномній ДНК утворюється повний сайт розпізнавання 5'-TCN▼GA-3' для Hpy188I, тоді як А-алель порушує цю послідовність. Ця стратегія "mismatched primer" забезпечує алель-специфічну рестрикцію без потреби у додатковому секвенуванні (Sainsbury et al., 2022).

Праймери були синтезовані комерційною компанією "ЮРІЯ ФАРМ" з ступенем очищення HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) та поставлялися у ліофілізованому вигляді. Робочі розчини праймерів готувалися розведенням до концентрації 10 мкМ у стерильній деіонізованій воді та зберігалися при -20°C.

2.3.2.3 Оптимізація умов ПЛР

Оптимізація умов полімеразної ланцюгової реакції проводилася на початковому етапі дослідження для забезпечення специфічної та ефективної ампліфікації цільового фрагмента.

Підбір температури відпалу:

Теоретична температура відпалу була розрахована за допомогою програми NCBI Primer-BLAST на основі температур плавлення обох праймерів. Експериментальна оптимізація проводилася шляхом серії ПЛР з градієнтом температур від 58°C до 64°C з кроком 1°C. Оптимальною була визнана температура 61°C, за якої спостерігалася максимальна інтенсивність цільового продукту при відсутності неспецифічних продуктів ампліфікації. Ця температура також відповідала рекомендаціям виробника Taq-полімерази щодо оптимальних умов для праймерів з розрахунковою T_m близько 60-62°C.

Оптимізація часу елонгації:

Час синтезу ланцюга ДНК розраховувався виходячи зі швидкості роботи стандартної Taq-полімерази, яка становить приблизно 1000 пар нуклеотидів за хвилину (1 кб/хв) за оптимальної температури 72°C. Для фрагмента розміром 207 пар нуклеотидів теоретично необхідний час становить близько 12 секунд. Однак для забезпечення повного синтезу всіх молекул та з урахуванням рекомендацій виробника був встановлений час елонгації 35 секунд, що забезпечувало достатній запас часу для завершення синтезу.

Оптимізація кількості циклів:

Кількість циклів ампліфікації була встановлена на рівні 31 циклу. Це значення було обрано як компроміс між отриманням достатньої кількості продукту для подальшого рестрикційного аналізу та мінімізацією неспецифічної ампліфікації, яка може посилюватися при надмірній кількості циклів.

Інші параметри, такі як концентрація іонів магнію (Mg^{2+}), були стандартизовані відповідно до складу комерційних буферів та Master Mix і становили 1,5-2,0 мМ у кінцевій реакційній суміші.

2.3.2.4 Склад реакційної суміші

У дослідженні використовувалися дві схеми приготування реакційної суміші для ПЛР, які відрізнялися ступенем автоматизації та застосовувалися на різних етапах роботи.

Схема 1 (для перших 24 зразків, період налагодження методу)

Загальний об'єм реакційної суміші становив 25 мкл (включаючи 15 мкл мінерального масла для запобігання випаровуванню) та включав наступні компоненти:

H₂O (деіонізована, стерильна) - 15 мкл Функція: доведення реакційної суміші до необхідного об'єму та створення водного середовища для ферментативної реакції.

10× ПЛР-буфер - 2,8 мкл Склад буфера: 500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl (pH 8,3 при 25°C), 15 мМ MgCl₂, 0,01% желатин. Буфер забезпечував оптимальні значення pH та іонної сили для роботи Taq-полімерази.

dNTP (суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів) - 1 мкл Концентрація stock-розчину: 10 мМ кожного dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Фінальна концентрація у реакції: 0,2 мМ кожного dNTP. Виробник: Thermo Fisher Scientific.

Праймер R (reverse) - 0,5 мкл Концентрація stock-розчину: 10 мкМ. Фінальна концентрація у реакції: 0,2 мкМ.

Праймер F (forward) - 0,5 мкл Концентрація stock-розчину: 10 мкМ. Фінальна концентрація у реакції: 0,2 мкМ.

Taq-полімераза - 0,125 мкл Активність: 5 од./мкл. Фінальна кількість одиниць у реакції: 0,625 од. Виробник: власне виробництво або Thermo Fisher Scientific.

Матрична ДНК - 0,5 мкл Концентрація варіювала залежно від методу виділення (10-100 нг/мкл). Орієнтовна кількість ДНК на реакцію: 5-50 нг.

Мінеральне масло - 15 мкл (нашарування поверх реакційної суміші) Функція: запобігання випаровуванню водної фази під час циклів нагрівання та охолодження у термоциклері без функції heated lid.

Схема 2 (автоматизований протокол для подальших зразків)

Для прискорення процесу та зменшення ризику помилок при приготуванні великої кількості реакцій була використана готова комерційна суміш PCR Master Mix (2×) виробництва Fermentas (Thermo Fisher Scientific). Загальний об'єм реакції становив 20 мкл.

Склад реакційної суміші:

PCR Master Mix (2×) виробництва Fermentas - 7,3 мкл Повна назва продукту: DreamTaq Green PCR Master Mix (2×). Склад Master Mix: 0,4 од./мкл DreamTaq DNA полімерази, 2× Dream Taq буфер, 0,4 мМ кожного dNTP, 4 мМ MgCl₂, буфери для стабілізації та зелений барвник для візуалізації нанесення проб. Номер каталогу: K1081. Переваги: готова до використання суміш значно скорочує час підготовки та знижує ризик контамінації, забезпечує стандартизацію умов між різними експериментами.

Праймер R (reverse) - 0,5 мкл Параметри ідентичні Схемі 1. Фінальна концентрація: 0,25 мкМ.

Праймер F (forward) - 0,5 мкл Параметри ідентичні Схемі 1. Фінальна концентрація: 0,25 мкМ.

H₂O (деіонізована, стерильна) - 9,5 мкл Функція: доведення до кінцевого об'єму.

Матрична ДНК - 2 мкл Концентрація після розведення 1:10 (для зразків, виділених методом NEOrper100) становила приблизно 10-30 нг/мкл. Для зразків, виділених методом Chelex-100, використовувався нерозведений супернатант. Орієнтовна кількість ДНК на реакцію: 20-60 нг.

Використання Master Mix дозволило спростити протокол та забезпечило високу відтворюваність результатів завдяки стандартизованому складу реагентів.

2.3.2.5 Умови ампліфікації

Полімеразна ланцюгова реакція проводилася на термоциклері Biometra (Німеччина) та Терцик виробництва “ДНКтехнология”.

Програма термоциклювання включала наступні етапи (Таблиця 3)

Таблиця 3 Програма ампліфікації для SNP 9-9224292

Етап	Температура	Тривалість	Кількість циклів	Мета етапу
Початкова денатурація	95°C	3 хв	1	Повна денатурація геномної ДНК та активація Taq-полімерази
Денатурація	94°C	30 с	31	Розплітання подвійного ланцюга ДНК
Відпал праймерів	61°C	35 с	31	Специфічне приєднання

				праймерів до комплементарних ділянок матриці
Елонгація	72°C	35 с	31	Синтез комплементарного ланцюга ДНК полімеразою
Фінальна елонгація	72°C	2 хв	1	Завершення синтезу незакінчених продуктів ампліфікації
Зберігання	4°C	∞	-	Підтримання низької температури до вилучення зразків

Після завершення програми пробірки з ампліфікованими зразками зберігалися при температурі 4°C до проведення рестрикційного аналізу або при -20°C для тривалого зберігання.

2.3.2.6 Контролі якості ПЛР

Для забезпечення достовірності результатів ампліфікації в кожную серію ПЛР включалися позитивні та негативні контролю.

Позитивний контроль:

Як позитивний контроль використовувалися зразки ДНК з попередньо визначеними генотипами (GG, GA, AA) на, отримані на етапі налагодження методу. Джерелом позитивних контролів були зразки бджіл з відомим генотипом з попередніх серій аналізів. Позитивний контроль включався у кожную серію ПЛР для підтвердження працездатності реагентів та правильності умов реакції.

Критерії успішності ампліфікації:

Результати ПЛР вважалися достовірними за наступних умов:

- Присутність чіткої специфічної смуги розміром 207 п.н. у позитивному контролі;
- Відсутність неспецифічних продуктів ампліфікації (додаткових смуг) у експериментальних зразках;

- Приблизно однакова інтенсивність смуг у всіх експериментальних зразках однієї серії **ДОДАТОК Г**.

2.3.3 Рестрикційний аналіз (ПЛР-ПДРФ)

2.3.3.1 Принцип методу

Для визначення генотипів SNP 9-9224292 застосовувався метод ПЛР-ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція - поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів). Метод базується на здатності ендонуклеаз рестрикції розпізнавати та розщеплювати ДНК у специфічних нуклеотидних послідовностях (сайтах рестрикції). Однонуклеотидна заміна у сайті розпізнавання може створювати або руйнувати такий сайт, що дозволяє розрізняти різні алелі за розмірами фрагментів, що утворюються після рестрикції.

У випадку SNP 9-9224292 алель G створює сайт розпізнавання для ендонуклеази Hpy188I, внаслідок чого ампліфікований фрагмент розміром 207 п.н. не розщеплюється. Алель A не створює цей сайт рестрикції, що призводить до розщеплення фрагмента на менший фрагмент розміром 178 п.н. Гетерозиготні зразки (GA) містять обидва алелі, тому після рестрикції виявляються обидва типи фрагментів.

Вибір методу ПЛР-ПДРФ для генотипування SNP 9-9224292 був обґрунтований його відносною простотою, економічною доступністю порівняно з секвенуванням та високою відтворюваністю результатів. Метод не потребує дорогого обладнання та може бути легко впроваджений у лабораторіях з базовим молекулярно-біологічним оснащенням.

2.3.3.2 Характеристика ендонуклеази рестрикції

У дослідженні використовувалася ендонуклеаза рестрикції **Hpy188I** виробництва New England Biolabs (NEB), USA.

Основні характеристики ферменту:

- Номер каталогу: R0619
- Сайт розпізнавання: 5'-TCN▼GA-3' / 3'-AGN▲CT-5' (де N - будь-який нуклеотид, ▼ та ▲ вказують місця розрізу)
- Температурний оптимум: 37°C

- Активність: 10000 од./мл (1 од. визначається як кількість ферменту, необхідна для повного розщеплення 1 мкг субстратної ДНК за 1 годину за оптимальних умов)
- Інактивація: 65°C протягом 20 хвилин

Механізм розпізнавання алелів SNP 9-9224292:

Аналіз нуклеотидної послідовності ампліфікованого фрагмента показав, що у позиції SNP 9-9224292 алель G створює повний сайт розпізнавання для Hpy188I (5'-TCG GA-3'), тоді як алель A порушує цю послідовність (5'-TCA GA-3'), унеможливаючи розпізнавання та розщеплення ферментом.

Для оптимальної роботи ферменту використовувався рекомендований виробником буфер NEBuffer 1.1 та рекомендувалося додавання BSA (бичачого сироваткового альбуміну) як стабілізатора білка до кінцевої концентрації 100 мкг/мл, хоча деякі партії ферменту вже містили BSA у складі.

2.3.3.3 Протокол рестрикції

Рестрикційний гідроліз ампліфікованих фрагментів проводився за загальною схемою (Brém et al. 1993) з модифікаціями відповідно до інструкцій виробника ферменту.

Склад реакційної суміші (загальний об'єм 18 мкл):

10× рестрикційний буфер NEBuffer 1.1 - 2,5 мкл Склад буфера: 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (дитіотреїтол), pH 7,0 при 25°C. Виробник: New England Biolabs.

H₂O (деіонізована, стерильна) - 7,3 мкл Функція: доведення реакційної суміші до необхідного об'єму.

Ендонуклеаза рестрикції Hpy188I - 0,2 мкл Активність: 10 од./мкл. Фінальна кількість ферменту у реакції: 2 одиниці, що забезпечує надлишок ферменту відносно рекомендованої кількості для гарантії повного розщеплення.

ПЛР-продукт - 8 мкл Містить приблизно 0,5-1 мкг ампліфікованої ДНК.

Умови інкубації:

Реакційна суміш ретельно перемішувалася піпетуванням та інкубувалася у термостаті при температурі 37°C протягом 3 годин 30 хвилин. Тривалість інкубації була збільшена порівняно зі стандартною рекомендацією (1 година) для забезпечення повного розщеплення всіх молекул ДНК, що містять сайт рестрикції, особливо враховуючи використання ПЛР-продуктів без попереднього очищення.

Інактивація ферменту не проводилася, оскільки зразки одразу після інкубації змішувалися з буфером для нанесення та аналізувалися методом електрофорезу. Нагрівання до 65°C для інактивації могло б призвести до руйнування частини ДНК.

2.3.3.4 Очікувані розміри рестрикційних фрагментів

Теоретичний аналіз нуклеотидної послідовності ампліфікованого фрагмента та позиції сайту рестрикції Hru188I дозволив передбачити розміри фрагментів для різних генотипів (Таблиця 4).

Таблиця 4 Очікувані розміри рестрикційних фрагментів для різних генотипів SNP 9-9224292

Генотип	Сайт рестрикції Hru188I	Фрагменти після рестрикції (п.н.)	Візуальна картина на гелі
GG (стійкий гомозигот)	Відсутній	207 (нерозщеплений)	Одна смуга 207 п.н.
AA (нестійкий гомозигот)	Присутній	178 (розщеплений) + 29*	Одна смуга 178 п.н.
GA (гетерозигота)	Частково присутній	207 + 178	Дві смуги: 207 і 178 п.н.

**Примітка: Фрагмент розміром 29 п.н. не візуалізується на 4% агарозному гелі через малий розмір та швидку міграцію до краю гелю.*

Позиція сайту рестрикції Hru188I у ампліфікованому фрагменті була визначена шляхом аналізу нуклеотидної послідовності з використанням інструментів біоінформатики (BLAST, NEBcutter). Сайт розпізнавання локалізований на відстані приблизно 29 нуклеотидів від одного з кінців фрагмента. При наявності алелю А фермент розрізає ДНК, утворюючи фрагменти 178 та 29 п.н. Фрагмент 29 п.н. є занадто малим для ефективної візуалізації на агарозному гелі та виходить за межі гелю під час електрофорезу.

Різниця між нерозщепленим фрагментом (207 п.н., генотип GG) та розщепленим фрагментом (178 п.н., генотип AA) становить 29 п.н., що є достатньою для надійного розділення при використанні 4% агарозного гелю

ДОДАТОК Д.

2.3.4 Електрофоретичне розділення

2.3.4.1 Підбір умов електрофорезу

Ключовим етапом у визначенні генотипів методом ПЛР-ПДРФ є електрофоретичне розділення рестрикційних фрагментів, які відрізняються лише на 29 пар нуклеотидів (207 та 178 п.н.). Для надійного розділення фрагментів такого розміру було проведено оптимізацію концентрації агарози.

Початково були протестовані стандартні концентрації агарози: 2%, 3% та 4%. При концентрації 2% роздільна здатність була недостатньою для чіткого розділення фрагментів 207 та 178 п.н., які мігрували занадто близько один до одного. Збільшення концентрації до 3% покращило розділення, однак смуги все ще перекривалися, особливо у зразках з високою концентрацією ДНК.

Оптимальна роздільна здатність була досягнута при використанні 4% агарозного гелю. За цієї концентрації фрагменти 207 та 178 п.н. розділялися на достатню відстань для однозначної інтерпретації генотипів. Висока концентрація агарози створює густішу сітку пор, яка ефективніше затримує менші фрагменти ДНК, збільшуючи різницю у швидкості міграції між фрагментами близького розміру.

Недоліками використання 4% агарозного гелю є збільшений час приготування через повільніше розчинення агарози, підвищена крихкість гелю та необхідність зниження напруги під час електрофорезу для запобігання перегріву. Однак ці недоліки повністю компенсуються підвищеною точністю визначення генотипів.

2.3.4.2 Приготування агарозного гелю

Для приготування 4% агарозного гелю необхідно 4 г агарози на 100 мл буфера. Для одного гелю стандартного розміру (10 см × 15 см) об'ємом приблизно 80 мл використовувалося 3,2 г агарози.

Буфер для гелю: Тріс-боратний електрофорезний буфер (TBE)

Склад 1× TBE буфера:

- 89 мМ Тріс (Tris base) - 10,78 г/л
- 89 мМ Борна кислота - 5,5 г/л
- 2 мМ ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота, динатрієва сіль) - 0,74 г/л

- рН 8,0 (коригування не потрібне, рН встановлюється автоматично при змішуванні компонентів)

ТВЕ буфер готувався як 10× концентрований stock-розчин та розводився до робочої концентрації 1× перед використанням.

I. Відважена кількість агарози поміщалася у колбу Ерленмейєра об'ємом 250-500 мл. Додавався необхідний об'єм 1× ТВЕ буфера. Суміш нагрівалася у мікрохвильовій печі з періодичним перемішуванням до повного розчинення агарози (розчин ставав прозорим, без видимих часточок). Температура розчину при повному розчиненні становила приблизно 95-100°C.

II. Гарячий розчин агарози охолоджувався до температури 50-60°C при постійному помішуванні для запобігання утворенню градієнта температури та забезпечення рівномірності гелю.

III. Охолоджений до 50-60°C розчин виливався у підготовлену форму для полімеризації з встановленим гребінцем.

Параметри гелю:

- Розмір гелю: 10 см (ширина) × 15 см (довжина)
- Товщина гелю: приблизно 5-7 мм
- Тип гребінки: 17 лунок
- Об'єм лунки: 10-15 мкл

Полімеризація гелю проходила за кімнатної температури протягом 30-45 хвилин до повного застигання.

2.3.4.3 Підготовка зразків для нанесення

Для візуалізації міграції зразків під час електрофорезу та забезпечення осідання ДНК у лунки використовувався буфер для нанесення.

Склад буфера для нанесення:

0,25% Бром феноловий синій (Bromophenol blue). Синій барвник, який мігрує в агарозному гелі зі швидкістю, еквівалентною фрагментам ДНК розміром приблизно 300-500 п.н. (залежно від концентрації агарози). Дозволяє візуально контролювати просування електрофорезу.

0,25% Ксиленціанол (Xylene cyanol FF), синьо-зелений барвник, який мігрує швидше за бром феноловий синій зі швидкістю, еквівалентною фрагментам близько 4000 п.н. у 1% агарозі або близько 100-200 п.н. у 4% агарозі.

30% Гліцерин. Збільшує щільність зразка, забезпечуючи його осідання на дно лунки при нанесенні та запобігаючи змішуванню з електрофорезним буфером.

До 8 мкл продукту рестрикції додавалося 4 мкл буфера для нанесення. Суміш ретельно перемішувалася піпетуванням і наносилася у лунки гелю у повному об'ємі.

2.3.4.4 Умови проведення електрофорезу

Як електрофорезний буфер використовувався той самий 1× TBE буфер, що й для приготування гелю (склад наведено вище). Використання однакового буфера забезпечувало стабільність рН та відсутність артефактів міграції ДНК. Об'єм буфера в електрофорезній камері повинен повністю покривати гель на висоту 2-5 мм над його поверхнею (зазвичай 300-500 мл залежно від розміру камери). Електрофорез проводився за наступними параметрами

- **Напруга:** 2 В/см довжини гелю. Для гелю довжиною 15 см застосовувалася напруга 30 В.
- **Потужність:** обмежувалася до 15 Вт для контролю перегріву гелю та буфера.
- **Тривалість:** 30-45 хвилин залежно від необхідної відстані розділення фрагментів.

Електрофорез вважався завершеним, коли барвник бром феноловий синій проходив приблизно 2/3 довжини гелю від місця нанесення зразків. За цих умов фрагменти розміром 178 та 207 п.н. мігрували приблизно посередині гелю та були оптимально розділені. Візуальна оцінка розділення проводилася шляхом короточасної візуалізації гелю в УФ-світлі (без фарбування) за наявності сильно концентрованих зразків або за розташуванням барвників.

2.3.4.5 Маркери молекулярної маси

Для точної ідентифікації розмірів рестрикційних фрагментів у кожний гель наносився маркер молекулярної маси pBR322 DNA-MspI Digest, виробник New England Biolabs, USA **ДОДАТОК Е.**

Розміри фрагментів:

622, 527, 404, 307, 242+238, 217, 201, 190, 180, 160+160, 147+147, 123, 110, 90, 76, 67 пар нуклеотидів.

Для визначення розмірів фрагментів 207 та 178 п.н. найбільш релевантними були смуги маркера 217, 201, 190 та 180 п.н., які фланкували цільові фрагменти.

2.3.4.6 Візуалізація та фотодокументація

Після завершення електрофорезу гель обережно виймався з камери та занурювався у ванночку з розчином бромистого етидію для фарбування з концентрацією розчину для фарбування 0,5 мкг/мл у дистильованій воді або 1× TBE буфері та тривалістю фарбування 5 хвилин. Бромистий етидій є інтеркалюючим барвником, що вбудовується між парами основ ДНК та флуоресцює помаранчевим світлом при опроміненні ультрафіолетом з довжиною хвилі 302 нм або 365 нм трансільюмінатору, де і відбувалась візуалізація фрагментів ДНК за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot IS-S3

2.3.5 Інтерпретація результатів та визначення генотипів

2.3.5.1 Визначення генотипів індивідуальних зразків

Аналіз електрофореграм проводився шляхом візуального порівняння розташування смуг ДНК у зразках зі смугами маркера молекулярної маси.

Генотип GG (гомозигота за алелем G). Одна смуга розміром 207 п.н., яка розташовується між смугами маркера 217 та 201 п.н. Обидва алелі представлені варіантом G, який не створює сайт рестрикції для Hpy188I, тому ампліфікований фрагмент залишається нерозщепленим. Генотип асоційований зі стійкістю до *Varroa destructor* через підвищену частоту VSH-поведінки.

Генотип AA (гомозигота за алелем A). Одна смуга розміром 178 п.н., яка розташовується між смугами маркера 180 та 160 п.н. Обидва алелі представлені варіантом A, який створює сайт рестрикції для Hpy188I, внаслідок чого ампліфікований фрагмент повністю розщеплюється на фрагменти 178 та 29 п.н. (останній не візуалізується). Генотип асоційований з нестійкістю до *Varroa destructor* через нижчу частоту VSH-поведінки.

Генотип GA (гетерозигота): Дві смуги розміром 207 п.н. та 178 п.н., присутні одночасно. Один алель представлений варіантом G (нерозщеплений фрагмент 207 п.н.), інший - варіантом A (розщеплений фрагмент 178 п.н.). При оптимальних умовах ампліфікації та рестрикції обидві смуги мають приблизно однакову інтенсивність, оскільки представляють рівну кількість алелів (по одному від кожної гомологічної хромосоми). Проміжний рівень стійкості до *Varroa destructor*.

2.4 Статистичний аналіз даних

2.4.1 Частоти генотипів

Для кожної експериментальної групи розраховувалися частоти трьох можливих генотипів за SNP 9-9224292 за формулами:

$$f(GG) = \frac{n_{GG}}{N} \quad f(AA) = \frac{n_{AA}}{N}$$

$$f(GA) = \frac{n_{GA}}{N}$$

де n_{GG} ; n_{AA} ; n_{GA} - кількість особин кожного генотипу у групі, N - загальна кількість проаналізованих особин у групі.

Частоти генотипів представлялися у вигляді таблиць для кожної групи окремо та для загальної вибірки. Для візуалізації використовувалися стовпчикові діаграми та кругові діаграми (pie charts), що відображали процентне співвідношення генотипів у кожній групі.

2.4.1.2 Частоти алелів

Частоти алелів G та A розраховувалися для кожної групи за формулами:

$$p(G) = \frac{2 \times n_{GG} + n_{GA}}{2 \times N}$$

$$p(A) = \frac{2 \times n_{AA} + n_{GA}}{2 \times N} = 1 - p(G)$$

де $p(A)$; $p(G)$ - частоти алелів G та A відповідно.

Множник 2 у знаменнику враховує диплоїдність робочих бджіл (кожна особина несе два алелі). Множник 2 у чисельнику для гомозигот враховує, що обидва алелі ідентичні, тоді як гетерозиготи вносять по одному алелю кожного типу.

Розрахунки проводилися для кожної експериментальної групи окремо та для загальної вибірки з усіх груп для оцінки загальної алельної структури досліджуваних популяцій.

2.4.1.3 Перевірка рівноваги Харді-Вайнберга

Перевірка відповідності спостережуваних частот генотипів очікуваним за рівновагою Харді-Вайнберга проводилася для кожної експериментальної групи. Закон Харді-Вайнберга стверджує, що в ідеальній популяції (велика чисельність, випадкове схрещування, відсутність мутацій, міграції та відбору) частоти генотипів залишаються постійними з покоління в покоління та можуть бути розраховані на основі частот алелів.

Очікувані частоти генотипів:

$$E(GA) = 2pq \times N$$

$$E(GG) = p^2 \times N$$

$$E(AA) = q^2 \times N$$

де $p = p(G)$; $q = p(A) = 1 - p$; N – загальна кількість особин

Тест хі-квадрат (χ^2)

Для статистичної оцінки відповідності спостережуваних та очікуваних частот використовувався критерій χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

де O_i - спостережувана частота i -го генотипу, E_i - очікувана частота i -го генотипу.

Ступені свободи: $df = 1$ (кількість генотипів - кількість незалежних алелів = $3 - 2 = 1$)

Рівень значущості: $\alpha = 0,05$

Якщо $p > 0,05$: популяція знаходиться у рівновазі Харді-Вайнберга, спостережувані відхилення від очікуваних частот є випадковими.

Якщо $p \leq 0,05$: популяція НЕ знаходиться у рівновазі. Можливі причини: направлений відбір за даним локусом, інбридинг, міграція, підструктурованість популяції, не випадкове схрещування.

Відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга може вказувати на дію природного відбору, що є важливим для інтерпретації адаптивного значення SNP 9-9224292.

2.4.2 Порівняння частот між групами

Для порівняння частот алелів та генотипів між різними експериментальними групами використовувався точний тест Фішера або критерій χ^2 для таблиць спряженості 2×3 або 2×2 . Вибір тесту залежав від розміру вибірок та очікуваних частот у комірках таблиці. При умовах коли очікувана частота в будь-якій комірці таблиці < 5 , а при критерію χ^2 всі очікувані частоти ≥ 5 . Рівень значущості встановлювався на рівні $\alpha = 0,05$. Результати з $p < 0,05$ вважалися статистично значущими.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Частоти алелів та генотипів SNP 9-9224292

3.1.1 Загальна характеристика генотипування

Генотиповано 109 особин *Apis mellifera carnica* з 19 бджолосімей за SNP 9-9224292 методом ПЛР-ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Hru188I. Електрофорез на 4% агарозному гелі забезпечив чітке розділення фрагментів 207 п.н. (алель G) та 178 п.н. (алель A).

П'ять зразків зі 114 первинно відібраних виключено з аналізу через невдалу ампліфікацію або слабкі сигнали на електрофореграмах: чотири зразки з львівської групи (сім'ї 45, 400, 340) та один зразок з контрольної групи (сім'я 119). Успішність генотипування становила 95,6% (109/114). Негативні контролю показали 100% специфічність реакції, що підтверджує надійність методу генотипування.

3.1.2 Розподіл генотипів у Групі 1 (Львів, чистопородна карніка, n=32)

Група чистопородної карніки з Львівської області включала 32 особини з шести бджолосімей (№38, 45, 204, 400, 340, 442). Аналіз генотипів виявив виражене переважання гетерозиготного генотипу GA та повну відсутність гомозигот AA (Таблиця 5).

Таблиця 5. Розподіл генотипів SNP 9-9224292 у львівській популяції за сім'ями

Сім'я	n	GG	GA	AA	p(G)	95% ДІ
38	6	0	6	0	0,5	0,21—0,79
45	4	1	3	0	0,63	0,26—0,90
204	6	1	5	0	0,58	0,29—0,84
400	5	2	3	0	0,7	0,37—0,92
340	5	0	5	0	0,5	0,20—0,80
442	6	0	6	0	0,5	0,21—0,79

Разом	32	4	28	0	0,563	0,44—0,68
-------	----	---	----	---	-------	-----------

Позначення: n — кількість проаналізованих особин у сім'ї; GG, GA, AA — абсолютна кількість особин кожного генотипу; $f(GG), f(GA), f(AA)$ — частоти генотипів у відсотках; $p(G)$ — частота алелю G (резистентного); $p(A)$ — частота алелю A (чутливого); DI — довірчий інтервал для частоти алелю G

Частоти генотипів у львівській групі: $f(GG) = 12,5\%$, $f(GA) = 87,5\%$, $f(AA) = 0\%$. Співвідношення $GG:GA:AA$ дорівнює $4:28:0$. Виражене переважання гетерозигот GA ($87,5\%$) є характерною особливістю цієї популяції. Повна відсутність гомозигот AA свідчить про високу частоту алелю G у досліджуваних львівських лініях.

Частота алелю G :

$$p(G) = (2 \times 4 + 28) / (2 \times 32) = 36 / 64 = 0,563$$

Частота алелю A : $p(A) = 0,438$

95% довірчий інтервал для $p(G)$: $0,44—0,68$.

Перевірка рівноваги Харді—Вайнберга:

Очікувані частоти генотипів при рівновазі:

- $E(GG) = 32 \times 0,563^2 = 10,14$
- $E(GA) = 32 \times 2 \times 0,563 \times 0,438 = 15,77$
- $E(AA) = 32 \times 0,438^2 = 6,14$

Значення χ^2 :

$$\chi^2 = (4 - 10,14)^2 / 10,14 + (28 - 15,77)^2 / 15,77 + (0 - 6,14)^2 / 6,14 = 3,72 + 9,50 + 6,14 = 19,36$$

При $df = 1$ та критичному значенні $\chi^2_{0.05} = 3,84$, отримане значення $\chi^2 = 19,36$ свідчить про високо значуще відхилення від рівноваги Харді—Вайнберга ($p < 0,001$). Виявлене відхилення характеризується надлишком гетерозигот ($87,5\%$ спостережуваних проти $49,3\%$ очікуваних) та дефіцитом обох типів гомозигот.

Відхилення від рівноваги може пояснюватися кількома факторами:

- **Селекційний тиск.** Активна селекція карніки у львівському регіоні спрямована на підтримання генетичного різноманіття для уникнення інбридингової депресії. Бджоларі-селекціонери свідомо уникають близькоспоріднених схрещувань, що сприяє збереженню гетерозиготності.

- **Проміжний фенотип GA.** Якщо генотип GA забезпечує оптимальне поєднання VSH-активності та інших адаптивних ознак, це може підтримувати надлишок гетерозигот через балансуєчий відбір.

Між окремими сім'ями спостерігалася варіація частоти алелю G від 0,50 (сім'ї 38, 340, 442) до 0,70 (сім'я 400), проте більшість сімей демонстрували переважання або виключну присутність генотипу GA. Найвища частота алелю G (0,70) у сім'ї 400 пояснюється присутністю двох гомозигот GG при трьох гетерозиготах

3.1.3 Розподіл генотипів у Групі 2 (Київ, селекційні лінії, n=30)

Київська група включала 30 особин з п'яти селекційних сімей, які були неоднорідними за призначенням: варроатолерантні лінії (№550, 549), комбінація варроатолерантних ліній (№162) та високопродуктивні лінії (№345, 978).

Таблиця 6. Розподіл генотипів SNP 9-9224292 у київській популяції за сім'ями та підгрупами

Підгрупа	Сім'я	n	GG	GA	AA	p(G)
Варроатол.	550	6	0	5	1	0,42
Комбінац.	162	6	0	6	0	0,5
Варроатол.	549	6	1	4	1	0,5
Високопрод.	345	6	0	6	0	0,5
Високопрод.	978	6	0	6	0	0,5
Разом		30	1	27	2	0,483

Позначення: *n* — кількість проаналізованих особин у сім'ї; **GG, GA, AA** — абсолютна кількість особин кожного генотипу; **f(GG), f(GA), f(AA)** — частоти генотипів у відсотках; **p(G)** — частота алелю G (резистентного); **p(A)** — частота алелю A (чутливого); **ДИ** — довірчий інтервал для частоти алелю G

Частоти генотипів: $f(GG) = 3,3\%$, $f(GA) = 90,0\%$, $f(AA) = 6,7\%$.
Співвідношення GG:GA:AA = 1:27:2.

Київська група характеризується найвищою частотою гетерозигот GA (90,0%) серед усіх досліджуваних груп та майже повною відсутністю обох типів гомозигот.

Частота алелю G:

$$p(G) = (2 \times 1 + 27) / (2 \times 30) = 29 / 60 = 0,483$$

Частота алелю A: $p(A) = 0,517$

95% довірчий інтервал для $p(G)$: 0,36—0,61.

Варроатолерантні лінії (550, 549). У двох сім'ях, позиціонованих селекціонерами як варроатолерантні, спостерігалася частота алелю G близько 0,46 (середня для двох сімей). Всупереч очікуванням підвищеної частоти алелю G у варроатолерантних лініях, спостережувані значення були близькими до загальної популяційної частоти. Присутність гомозигот AA у обох варроатолерантних сім'ях (по одній особині) вказує на неповну селекційну фіксацію стійкості на молекулярно-генетичному рівні.

Сім'я 549 демонструє змішаний склад: 1 GG, 4 GA, 1 AA. Така структура може пояснюватися специфічним генетичним походженням матки та особливостями спарювання з генетично різноманітними трутнями.

Комбінація варроатолерантних ліній (162). Сім'я 162 показала 100% частоту генотипу GA (частота алелю G = 0,50). Відсутність гомозигот може свідчити про гібридне походження цієї лінії від батьківських форм з контрастними частотами алелів.

Високопродуктивні лінії (345, 978). Дві сім'ї-чемпіони по медозбору (162, 345) демонстрували 100% частоту генотипу GA. Частота алелю G = 0,50. Відсутність зв'язку між високою продуктивністю та підвищеною частотою алелю G узгоджується з функціональною специфічністю SNP 9-9224292 для поведінки VSH, а не для медопродуктивності.

Точний тест Фішера для порівняння частот алелів між варроатолерантними та високопродуктивними підгрупами не виявив статистично значущих відмінностей ($p = 0,88$). Це свідчить про те, що в даній вибірці селекція за різними ознаками не призвела до диференціації за SNP 9-9224292.

Рівновага Харді—Вайнберга:

Очікувані частоти при $p(G) = 0,483$:

- $E(GG) = 30 \times 0,483^2 = 7,00$
- $E(GA) = 30 \times 2 \times 0,483 \times 0,517 = 14,95$

- $E(AA) = 30 \times 0,517^2 = 8,02$

Значення χ^2 :

$$\chi^2 = (1-7,00)^2/7,00 + (27-14,95)^2/14,95 + (2-8,02)^2/8,02 \\ = 5,14 + 9,72 + 4,52 = 19,38$$

При $df = 1$, $p < 0,001$ — значуще відхилення від рівноваги через виражений надлишок гетерозигот (90,0% спостережуваних проти 49,8% очікуваних).

Надзвичайно високий рівень гетерозиготності (90,0%) у київській групі може бути наслідком:

- **Підтримання генетичного різноманіття у селекційній програмі.** Селекціонери свідомо уникають інбридингу та практикують схрещування різних ліній для зберігання гібридної сили та адаптивності.
- **Гетерозису при схрещуванні ліній.** Селекційні лінії могли походити з популяцій з контрастними частотами алелів, що при схрещуванні призводить до підвищеної гетерозиготності у F_1 .
- **Ефекту засновників.** Обмежена кількість материнських ліній у селекційній програмі може створювати специфічну генетичну структуру з переважанням певних генотипів.

3.1.4 Розподіл генотипів у Групі 3 (Харківська область, грумінг, $n=36$)

Група з експериментальної пасіки в Харківській області включала 36 особин з шести сімей (№3, 71, 25, 66, 75, 35), відібраних за грумінг-поведінкою.

Таблиця 7. Розподіл генотипів SNP 9-9224292 у групі грумінг

Сім'я	n	GG	GA	AA	f(GG)	f(GA)	f(AA)	p(G)	p(A)	GG:GA:AA ^[OBJ]
3	6	0	3	3	0%	50%	50%	0,25	0,75	0:03:03 ^[OBJ]
71	6	4	2	0	66,70%	33,30%	0%	0,83	0,17	4:02:00 ^[OBJ]
25	6	4	2	0	66,70%	33,30%	0%	0,83	0,17	4:02:00 ^[OBJ]
66	6	3	3	0	50%	50%	0%	0,75	0,25	3:03:00 ^[OBJ]
75	6	2	3	1	33,30%	50%	16,70%	0,58	0,42	2:03:01 ^[OBJ]
35	6	2	3	1	33,30%	50%	16,70%	0,58	0,42	2:03:01 ^[OBJ]

Разом	36	15	16	5	41,70%	44,40%	13,90%	0,639	0,361	15:16:05 ^[ОВ]
-------	----	----	----	---	--------	--------	--------	-------	-------	--------------------------

Позначення: n — кількість проаналізованих особин у сім'ї; GG, GA, AA — абсолютна кількість особин кожного генотипу; $f(GG), f(GA), f(AA)$ — частоти генотипів у відсотках; $p(G)$ — частота алелю G (резистентного); $p(A)$ — частота алелю A (чутливого); DI — довірчий інтервал для частоти алелю G

Частоти генотипів: $f(GG) = 41,7\%$, $f(GA) = 44,4\%$, $f(AA) = 13,9\%$.
Співвідношення $GG:GA:AA = 15:16:05$.

Частота алелю G :

$$p(G) = (2 \times 15 + 16) / (2 \times 36) = 46 / 72 = 0,639$$

Частота алелю A : $p(A) = 0,361$

95% довірчий інтервал для $p(G)$: 0,52—0,75.

На відміну від львівської та київської груп, група грумінг демонструвала значно більш рівномірний розподіл всіх трьох генотипів. Ця група характеризувалася:

- **Найвищою частотою гомозигот GG (41,7%)** серед усіх груп, що майже у 3,3 рази перевищує показник львівської групи (12,5%) та у 12,6 разів — київської (3,3%).
- **Присутністю всіх трьох генотипів у більшості сімей:** три сім'ї (№75, 35, 3) мали всі три генотипи; три сім'ї (№71, 25, 66) — два генотипи.
- **Високою міжсімейною варіацією частоти алелю G** від 0,25 (сім'я 3) до 0,83 (сім'ї 71, 25), що відображає генетичну гетерогенність групи.
- Спостережувана генетична структура може бути наслідком:
- **Гібридного походження.** Природне вільне спарювання на пасіці з різноманітним генофондом трутнів могло призвести до схрещування карніки з іншими лініями або підвидами, що збільшило генетичне різноманіття.
- **Відсутності інтенсивної селекції за чистопородністю.** На відміну від Групи 1, де підтримувалася чистопородна карніка, селекція на грумінг фокусувалася виключно на поведінковій ознаці без урахування породної приналежності.
- **Вільного спарювання.** Матки спарювалися природним шляхом з локальною популяцією трутнів, що могла включати різні генетичні лінії з різними частотами алелів.

Рівновага Харді—Вайнберга:

Очікувані частоти при $p(G) = 0,639$:

- $E(GG) = 36 \times 0,639^2 = 14,69$
- $E(GA) = 36 \times 2 \times 0,639 \times 0,361 = 16,58$
- $E(AA) = 36 \times 0,361^2 = 4,69$

Значення χ^2 :

$$\chi^2 = (15-14,69)^2/14,69 + (16-16,58)^2/16,58 + (5-4,69)^2/4,69 \\ = 0,007 + 0,020 + 0,020 = 0,047$$

При $df = 1$, $p = 0,83$ — популяція знаходиться у рівновазі Харді—Вайнберга.

Відповідність рівновазі вказує на відсутність сильного направленного відбору за даним локусом та/або на випадкове схрещування у цій групі.

Частота алелю G у групі грумінг (0,639) була числово вищою порівняно з львівською (0,563, $p = 0,45$, точний тест Фішера) та київською (0,483, $p = 0,09$) групами, проте відмінності не досягли статистичної значущості при $\alpha = 0,05$. Це може свідчити про:

- **Можливий слабкий зв'язок** SNP 9-9224292 з грумінг-поведінкою, який потребує більшої вибірки для підтвердження.
- **Плейотропний ефект** SNP на різні типи гігієнічної поведінки (як VSH, так і грумінг), хоча первинні дослідження не виявляли такого зв'язку.
- **Непряму асоціацію** через зчеплення з іншими локусами, що впливають на грумінг.

3.1.5 Розподіл генотипів у Групі 4 (Контрольна, нестійкі до варроа, $n=11$)

Контрольна група включала 11 особин з двох сімей (№58, 119) з Харківської області, які характеризувалися підвищеною сприйнятливістю до варроатозу. Усі особини належали до генотипу AA **ДОДАТОК Б**.

Частоти генотипів: $f(GG) = 0$, $f(GA) = 0$, $f(AA) = 1,0$ (100%).

Частота алелю G: $p(G) = 0$ (95% ДІ: 0—0,26 за методом Клоппера—Пірсона)

Частота алелю A: $p(A) = 1,0$

Повна фіксація алелю A ($p(A) = 1,0$) у контрольній групі, підтверджує відповідність критеріям контрольної групи. Сім'ї, що демонструють підвищену сприйнятливість до варроатозу, характеризуються повною відсутністю алелю G, асоційованого зі стійкістю. Різниця між контрольною та експериментальними групами є максимальною на генетичному рівні. А також, підтримує гіпотезу про зв'язок SNP 9-9224292 зі стійкістю до варроа: відсутність алелю G корелює з фенотипом нестійкості, що узгоджується з даними міжнародних досліджень.

Необхідно відзначити, що малий розмір контрольної групи (n=11) обмежує можливість широких узагальнень. Однак однастайність генотипу AA у всіх 11 особинах з двох незалежних сімей підвищує надійність спостереження.

3.1.6 Порівняльний аналіз між групами

Таблиця 8. Зведена таблиця частот генотипів та алелів у всіх групах

Група	n	GG	GA	AA	f(GG)	f(GA)	f(AA)	p(G)	p(A)	95% ДІ для p(G)
Львів	32	4	28	0	0,125	0,875	0	$\frac{0,56}{3}$	0,438	0,44—0,68
Київ	30	1	27	2	0,033	0,9	0,067	$\frac{0,48}{3}$	0,517	0,36—0,61
Грумінг	36	15	16	5	0,417	0,444	0,139	$\frac{0,63}{9}$	0,361	0,52—0,75
Контроль	11	0	0	11	0	0	1	0	1	0—0,26
Разом	$\frac{109}{9}$	20	71	18	0,183	0,651	0,165	$\frac{0,50}{9}$	0,491	0,44—0,58

Позначення: n — кількість проаналізованих особин у сім'ї; GG, GA, AA — абсолютна кількість особин кожного генотипу; f(GG), f(GA), f(AA) — частоти генотипів у відсотках; p(G) — частота алелю G (резистентного); p(A) — частота алелю A (чутливого); ДІ — довірчий інтервал для частоти алелю G

Критерій χ^2 для таблиці спряженості 4×3 (4 групи × 3 генотипи) виявив високо значущі відмінності між групами: $\chi^2 = 98,7$, df = 6, p < 0,001.

Попарні порівняння між групами (точний тест Фішера для частот алелів):

Порівняння	p-value	Значущість ($\alpha=0,0083$)*
Львів vs Київ	0,427	Ні
Львів vs Грумінг	0,447	Ні
Львів vs Контроль	<0,001	Так
Київ vs	0,086	Ні

Грумінг		
Київ vs Контроль	<0,001	Так
Грумінг vs Контроль	<0,001	Так

Групи 1, 2 та 3 не відрізняються значуще між собою за частотами алелів після корекції на множинні порівняння, хоча група грумінг демонструє тенденцію до підвищеної частоти алелю G. Контрольна група статистично високо значуще відрізняється від усіх експериментальних груп ($p < 0,001$ у всіх випадках), що підтверджує її особливий генетичний статус.

Львівська та київська групи практично однакові за частотами алелів ($p(G) = 0,563$ vs $0,483$, $p = 0,427$), незважаючи на різне походження та селекційну історію. Обидві групи демонструють виражений надлишок гетерозигот (87,5% та 90,0% відповідно) та значуще відхилення від рівноваги Харді—Вайнберга.

У досліджуваних українських популяціях *A. m. carnica* виявлено значну генетичну варіацію за SNP 9-9224292, з частотою алелю G від 0 (контрольна група) до 0,639 (група грумінг). Контрольна група демонструє повну фіксацію алелю A ($p(A) = 1,0$), що корелює з її фенотипом нестійкості до варроатозу.

Експериментальні групи (Львів, Київ) характеризуються переважанням гетерозигот GA (87—90%), що значно перевищує очікування за рівновагою Харді—Вайнберга. Група грумінг виділяється найвищою частотою гомозигот GG (41,7%) та знаходиться у рівновазі Харді—Вайнберга, на відміну від львівської та київської груп.

Відхилення від рівноваги Харді—Вайнберга у групах 1 і 2 вказує на можливу дію відбору, або селекційного тиску на підтримання генетичного різноманіття. Статистично значущі відмінності виявлено лише між контрольною та експериментальними групами, що підтримує гіпотезу про зв'язок SNP 9-9224292 зі стійкістю до *V. destructor*.

3.1.7 Порівняння з іншими популяціями

3.1.7.1 Північноамериканські популяції (Tsuruda et al., 2012)

У північноамериканських популяціях медоносних бджіл проведено одне з перших високороздільних досліджень генетичної архітектури VSH.

Для цього використовували контрольовані схрещування ліній із високим та низьким проявом VSH, що дозволило сформувати мапінгові сім'ї з чітко визначеним генетичним походженням.

Фенотипування здійснювали шляхом введення заражених донорських стільників у приймаючі сім'ї та обліку розкритих і очищених комірок через 5—7 діб, а також за допомогою показника SMR (Suppressed Mite Reproduction), який визначає частку кліщів, що не дали життєздатного потомства.

Генотипування проводили із застосуванням панелі 1340 SNP-маркерів, що дозволило побудувати високороздільну генетичну карту та провести інтервальне картування. Результати показали наявність основного QTL на 9-й хромосомі, який пояснював близько 6,1% фенотипової варіації VSH, та додаткового QTL на 1-й хромосомі, що пояснював близько 3,9% варіації.

У межах цих локусів ідентифіковано 63 кандидатні гени, серед яких особливу увагу привернули *NorpA2* (фосфоліпаза C, що бере участь у процесах навчання та пам'яті) та *dop3* (D2-подібний дофаміновий рецептор, який регулює формування відразливої пам'яті у комах). Виявлення цих генів підтвердило, що VSH включає не лише сенсорну перцепцію, але й когнітивні механізми, які забезпечують здатність бджіл розпізнавати заражений розплід.

У північноамериканських вибірках алель G SNP 9-9224292 був асоційований із підвищеним рівнем VSH, що проявлялося у більшій кількості розкритих комірок та вищих показниках SMR. Tsuruda et al. (2012) використовували картування QTL на основі зчеплення у контрольованих схрещуваннях, що відрізняється від популяційного підходу нашого дослідження. Автори не навели точних частот генотипів для SNP 9-9224292 у загальній популяції, проте SNP виявив статистично значущу асоціацію з VSH-фенотипом ($p < 0,05$).

3.1.7.2 Новозеландські популяції (Sainsbury et al., 2022)

У Новій Зеландії SNP 9-9224292 був перевірений як практичний інструмент маркер-асоційованої селекції у комерційних умовах. Дослідження Sainsbury et al. (2022) на новозеландських бджолах *A. m. ligustica* виявило частоти генотипів: 34,1% GG, 43,0% GA, 22,9% AA, що відповідає $p(G) = 0,556$. Маток генотипували за цим маркером і розподілили на групи GG та AA (контрольні), після чого сформували експериментальні колонії у порівнянних умовах пасік. Моніторинг зараження проводили протягом сезону за допомогою стандартизованих методів, що дозволило отримати достовірні дані про рівень варроа-навантаження.

Результати показали, що колонії з матками GG мали на 28,5% нижчий темп зростання популяції кліща порівняно з колоніями AA ($p = 0,027$). Це підтвердило прикладну цінність SNP 9-9224292 як маркера для селекції

бджіл із підвищеним рівнем VSH. Водночас дослідження виявило низку обмежень: навіть у колоніях GG акарицидні обробки залишалися необхідними, оскільки маркер зменшував інтенсивність зараження, але не забезпечував повної резистентності; поліандрія та генотип трутнів впливали на фенотип сім'ї, що знижувало однорідність прояву VSH; популяційний контекст і відмінності у лінкедж-дизеквілібріумі могли змінювати силу асоціації маркера.

Статистичне порівняння частоти алелю G між новозеландською популяцією та українською вибіркою (без контрольної групи):

- Нова Зеландія: $p(G) = 0,556$
- Україна (Групи 1-3): $p(G) = 0,557$ (95% ДІ: 0,48—0,64)

Точний тест Фішера: $p = 0,99$ — відмінності не значущі.

Проте розподіл генотипів істотно відрізняється:

Популяція	% GG	% GA	% AA	Рівновага Х-В
Нова Зеландія	34,1	43	22,9	Так ($p > 0,05$)
Україна (1-3)	20,4	72,4	7,1	Ні ($p < 0,001$)

Новозеландська популяція демонструє значно більшу частку гомозигот GG (34,1% vs 20,4%, $p = 0,038$) та AA (22,9% vs 7,1%, $p = 0,003$), тоді як українська вибірка характеризується вираженим надлишком гетерозигот (72,4% vs 43,0%, $p < 0,001$).

Можливі причини відмінностей:

- **Породна належність.** *A. m. ligustica* (Нова Зеландія) та *A. m. carnica* (Україна) можуть мати різну генетичну архітектуру стійкості до варроа через незалежну еволюційну історію підвидів.
- **Різні селекційні історії.** Новозеландська популяція формувалася в умовах географічної ізоляції з обмеженою кількістю інтродукованих ліній, що може сприяти гомозиготності. Українські популяції зазнавали тривалої селекції з активним схрещуванням ліній.
- **Система розведення.** У Новій Зеландії практикується контрольоване спарювання на ізольованих пасічних пунктах, тоді як у нашому

дослідженні переважало вільне спарювання, яке може підтримувати вищу гетерозиготність.

3.2 Аналіз генетичної структури окремих сімей

3.2.1 Внутрішньосімейна генетична варіація

Аналіз генетичного різноманіття всередині окремих бджолосімей дозволяє оцінити генотипи маток та ступінь поліандрії — множинного спарювання матки з різними трутнями. У бджіл робочі особини є диплоїдними і отримують один алель від матки (яйцеклітина) та один від трутня (сперматозоїд). Трутні є гаплоїдними і розвиваються з незапліднених яйцеклітин, несучи тільки материнський геном.

Таблиця 9. Генетична структура окремих бджолосімей

Сім'я	Група	n	GG	GA	AA	p(G)	Передбачуваний генотип матки	Оцінка трутнів
38	Львів	6	0	6	0	0,5	GA	50% G, 50% A
45	Львів	4	1	3	0	0,63	GA	переважно G (63%)
204	Львів	6	1	5	0	0,58	GA	переважно G (58%)
400	Львів	5	2	3	0	0,7	GA	переважно G (70%)
340	Львів	5	0	5	0	0,5	GA	50% G, 50% A
442	Львів	6	0	6	0	0,5	GA	50% G, 50% A
550	Київ	6	0	5	1	0,42	GA	переважно A (58%)
162	Київ	6	0	6	0	0,5	GA	50% G, 50% A
549	Київ	6	1	4	1	0,5	GA або GG	змішані

345	Київ	6	0	6	0	0,5	GA	50% G, 50% A
978	Київ	6	0	6	0	0,5	GA	50% G, 50% A
3	Грумінг	6	0	3	3	0,25	GA або AA	перева жно A (75%)
71	Грумінг	6	4	2	0	0,83	GA або GG	перева жно G (83%)
25	Грумінг	6	4	2	0	0,83	GA або GG	перева жно G (83%)
66	Грумінг	6	3	3	0	0,75	GA	перева жно G (75%)
75	Грумінг	6	2	3	1	0,58	GA	перева жно G (58%)
35	Грумінг	6	2	3	1	0,58	GA	перева жно G (58%)
58	Контроль	6	0	0	6	0	AA	100% A
119	Контроль	5	0	0	5	0	AA	100% A

Усі шість львівських сімей демонструють однорідну картину: повна відсутність гомозигот AA та переважання або виключна присутність гетерозигот GA. Це вказує на те, що всі матки мають генотип GA, а спарювання відбувалося як з G-трутнями, так і з A-трутнями у різних пропорціях.

Сім'я 38 ($p(G) = 0,50$, 100% GA) свідчить про збалансоване спарювання з трутнями обох генотипів у рівних частках. Сім'ї 45, 204, 400 ($p(G) = 0,63—0,70$) показують переважання G-трутнів у спарюванні, що призвело до появи гомозигот GG серед робочих бджіл.

Київські сім'ї також переважно демонструють генотип матки GA. Виняток становить сім'я 549, де присутність одного гомозигота GG може вказувати на матку з генотипом GG, яка спарювалася переважно з A-трутнями, або на матку GA, яка спарювалася з трутнями обох типів.

Чотири сім'ї (162, 345, 978, 550) показують ідеально збалансоване спарювання ($p(G) \approx 0,50$), що може бути результатом природного популяційного балансу трутнів або свідомої селекційної стратегії.

Група грумінг демонструє найбільшу варіацію генетичної структури між сім'ями. Сім'я 3 ($p(G) = 0,25$) має найнижчу частоту алелю G, що може вказувати на матку AA або GA, яка спарювалася переважно з A-трутнями. Сім'ї 71 та 25 ($p(G) = 0,83$) показують найвищу частоту G-алелю, що може свідчити про маток GG або GA, які спарювалися переважно з G-трутнями.

Обидві контрольні сім'ї (58, 119) демонструють повну гомогенність: усі робочі бджоли мають генотип AA. Це однозначно вказує на маток з генотипом AA, які спарювалися виключно з A-трутнями. Така повна фіксація алелю A корелює з фенотипом підвищеної сприйнятливості до варроатозу.

3.3 Аналіз гетерозиготних сімей

3.3.1 Фенотип GA-сімей

Переважання генотипу GA у досліджуваних популяціях (44—90% залежно від групи) робить аналіз фенотипу гетерозиготних сімей особливо актуальним для практичного застосування результатів у селекції.

Сім'ї з переважанням GA (>50% GA-особин):

З 17 досліджуваних експериментальних сімей (без контрольної групи) 15 (88%) мали більше 50% гетерозигот GA:

- 11 сімей мали 80—100% GA
- 4 сім'ї мали 50—75% GA
- 2 сім'ї контрольної групи мали 0% GA (100% AA)
- 2 сім'ї мали <50% GA (переважання GG)

Можливі моделі домінування:

- Повне домінування G. Якщо алель G повністю домінуючий, GA та GG матимуть однаковий фенотип (однаково низьку заклешованість).
- Неповне домінування (проміжне успадкування). GA матиме заклешованість між GG та AA.
- Рецесивність G. GA матиме фенотип, подібний до AA (висока заклешованість), і тільки GG демонструватиме стійкість.

Для визначення типу домінування необхідні дані про заклешованість усіх трьох генотипних груп. Sainsbury et al. (2022) порівнювали колонії з матками GG та AA, але не надали детального аналізу фенотипу GA-колоній. Вони показали, що GG-матки забезпечують 28,5% зниження заклешованості порівняно з AA. Це залишає питання про тип домінування відкритим, хоча результати скоріше вказують на адитивність або неповне домінування.

У нашому дослідженні відсутність прямих даних про заклещованість не дозволяє остаточно визначити тип домінування. Однак факт того, що селекційні резистентні лінії (львівська та київська) демонструють переважання GA (87,5% та 90,0%), може свідчити про те, що гетерозиготи забезпечують достатній рівень резистентності для підтримання у популяції через селекцію.

3.3.2 Проблема гетерозиготних особин (GA-генотип) для маркер-асоційованої селекції

У контексті маркер-асоційовано добору на резистентність до *Varroa* (зокрема за SNP-маркерами, асоційованими з VSH/гігієнічною поведінкою), висока частка гетерозиготних робочих бджіл із генотипом GA створює системну проблему: колоніальний фенотип стає проміжним, варіабельним і менш передбачуваним, ніж очікується від «резистентних» гомозиготних комбінацій.

Це особливо критично у відкритих системах спарювання медоносних бджіл із поліандрією маток та надзвичайно високою частотою рекомбінації, що швидко розмиває зв'язок окремих маркерів з причинними варіантами ознак.

Коли переважна більшість робочих у колонії є гетерозиготами GA, середній колоніальний фенотип для кількісних поведінкових ознак має тенденцію до адитивності: гетерозиготні робочі проявляють проміжний рівень виявлення й видалення зараженого розплоду (VSH-активність), гігієнічної поведінки та, відповідно, пригнічення репродукції кліща.

У практичному вимірі це означає:

- Зменшення швидкості «самоочищення» розплоду
- Зростання розкиду показників між поколіннями робочих когорт
- Підвищення ймовірності, що колонія не досягне порогу, за яким динаміка

Varroa переходить у контрольований стан без хімічних обробок

За умов поліандрії матка створює суміш патрилій, у кожній з яких частки GG, GA та AA різняться; якщо GA становить більшість, середній ефект по колонії зміщується до проміжного рівня навіть тоді, коли матка або частина трутнів мають «резистентний» алель.

Адитивна архітектура поведінкових ознак у поєднанні з надвисокою рекомбінацією у бджіл зменшує стабільність асоціації «однолокусний маркер → фенотип» між поколіннями та в різних патриліях. Тому навіть за наявності маток, відібраних за бажаним алелем, відкрите спарювання й потік

гамет від різних трутнів призводить до високої частки GA серед робочих, що послаблює очікуваний селекційний ефект на рівні рою.

Додатково, ефекти домінування для окремих локусів можуть варіювати, але для колоніальних поведінкових ознак емпіричні дані узгоджуються з адитивними моделями: гетерозиготи мають середні значення, гомозиготи — крайні, а надлишкова гетерозиготність не гарантує «гетерозиготної переваги» щодо Varroa-контролю. Важливо зауважити, що випадки істинного сверхдомінування в бджіл описані для *csd*-гену (статеве визначення), де гетерозиготність є необхідною для жіночого розвитку, однак це інший біологічний механізм, який не переноситься на VSH.

3.6.5 Обмеження дослідження

Наша вибірка має достатню потужність для виявлення дуже великих ефектів (>40% різниця), але може бути недостатньою для помірних ефектів (15-25%). Однак, невідомі генотипи трутнів, з якими спарювалися матки, створюють невизначеність у інтерпретації генетичної структури сімей. Контрольоване спарювання або штучне осіменіння з відомими трутнями дозволило б точніше оцінити генотипи маток та їхній вплив на фенотип. При розташуванні сімей на пасіках з малою відстанню між вуликами можливий дрейф робочих бджіл між сім'ями, що може спотворити генетичну структуру. Для мінімізації цього ефекту рекомендується використовувати ізольовані пасічні пункти або збільшувати відстань між вуликами. Використання єдиного SNP обмежує можливість всебічної оцінки генетичної основи стійкості до варроа. VSH є полігенною ознакою, контрольованою множиною локусів (Harbo & Harris, 2005, doi:10.1007/s13592-012-0161-9). Для повної оцінки необхідна панель маркерів, що охоплюють різні QTL. Пряма оцінка VSH-поведінки (наприклад, тест з закріпленими личинками) дозволила б точніше оцінити зв'язок між генотипом та поведінковим фенотипом, незалежно від рівня заклещованості, який залежить від багатьох факторів.

Вибірка охоплює тільки три регіони України (Львівська, Київська, Харківська області), що обмежує можливість узагальнення на всі українські популяції *A. m. carnica*.

3.6.6 Теоретична значимість

Наше дослідження демонструє, що QTL, виявлені в одній популяції, можуть мати різну експресію в інших: Новозеландські дані (Sainsbury et al., 2022) показують іншу генетичну структуру (рівновага Харді-Вайнберга, вища частота гомозигот) порівняно з українськими популяціями (відхилення від рівноваги, надлишок гетерозигот). Ефект конкретного SNP може

залежати від інших генів (епістаз), які відрізняються між популяціями (Maskay, 2014). Наше дослідження підкреслює важливість врахування системи спарювання при оцінці генетичних маркерів у соціальних комах: У бджіл з високою поліандрією "генотип колонії" є композитним, що включає генотип матки та розподіл генотипів робочих, визначений генотипами множинних трутнів-батьків. Генетичне різноманіття робочих у межах колонії може само по собі впливати на стійкість через ефекти поділу праці та гетерозису (Oldroyd & Fewell, 2007). Результати підтримують концепцію VSH як полігенної ознаки.

SNP 9-9224292 пояснює тільки частину генетичної варіації у стійкості до варроа. Інші QTL на різних хромосомах також вносять внесок (Tsuruda et al., 2012). VSH контролюється складною мережею генів, що регулюють нюхову чутливість, розпізнавання запахів, прийняття рішень та виконання поведінкових актів (Mondet et al., 2020).

3.6.7 Практична значимість

На основі отриманих результатів можна сформулювати наступні рекомендації:

- I. Використовувати SNP як додатковий інструмент селекції.** Генотипування може доповнювати фенотипічну оцінку, особливо для ранньої селекції маток.
- II. Пріоритизувати GG-маток.** При доступності маток різних генотипів з подібними продуктивними показниками віддавати перевагу GG.
- III. Поступова селекція.** Поступово підвищувати частоту алелю G у популяції через відбір кращих сімей за генотипом та фенотипом.
- IV. Панель маркерів.** Замість одного SNP використовувати набір маркерів, що охоплюють різні компоненти стійкості (VSH, грумінг, підсилення імунітету).

ВИСНОВКИ

У даній роботі проведено комплексне дослідження SNP 9-9224292 як молекулярно-генетичного маркера резистентності до *Varroa destructor* в українських популяціях *Apis mellifera carnica*. Результати підтверджують наявність значної генетичної варіації за цим локусом у досліджуваних групах та виявляють статистично значущі відмінності між контрольною групою (нестійкі до варроа) та експериментальними групами, що підтримує гіпотезу про зв'язок SNP 9-9224292 зі стійкістю до кліща. Отримані дані свідчать про доцільність застосування даного SNP-маркера в маркер-асоційованій селекції резистентності до *Varroa destructor* в українських популяціях *Apis mellifera carnica*. Впровадження SNP-генотипування як ветеринарно-діагностичного інструменту дозволить у перспективі здійснювати популяційний скринінг на наявність алелів резистентності, відслідковувати динаміку їх розповсюдження та формувати науково обґрунтовані рекомендації щодо підвищення природної стійкості бджолиних сімей до варроатозу на рівні регіонів та країни в цілому.

- 1. Встановлено значну генетичну варіацію за SNP 9-9224292 в українських популяціях *A. m. carnica*.** Частота алелю G варіювала від 0 у контрольній групі до 0,639 у групі грумінг, при середньому значенні 0,504 у експериментальних групах. Контрольна група продемонструвала повну фіксацію алелю A ($p(A) = 1,0$), що корелює з її фенотипом підвищеної сприйнятливості до варроатозу та статистично високо значуще відрізняється від усіх експериментальних груп ($p < 0,001$).
- 2. Виявлено виражений надлишок гетерозигот GA у львівській (81,8%) та київській (92,9%) селекційних групах.** Обидві групи демонструють високо значуще відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга ($p < 0,001$, $\chi^2 = 13,66$ та $19,00$ відповідно), що може пояснюватися балансуємим відбором або селекційним тиском на підтримання генетичного різноманіття. На противагу цьому, група грумінг з Харківської області знаходиться у рівновазі Харді-Вайнберга ($p = 0,83$) та характеризується найвищою частотою гомозигот GG (41,7%).
- 3. Статистичне порівняння не виявило значущих відмінностей у частотах алелів між експериментальними групами після корекції на множинні порівняння.** Львівська ($p(G) = 0,530$), київська ($p(G) = 0,500$) та група грумінг ($p(G) = 0,639$) не відрізняються між собою за частотами алелів ($p > 0,0083$ у всіх попарних порівняннях після

поправки Бонферроні). Це вказує на відсутність чіткої асоціації SNP 9-9224292 з грумінг-поведінкою та на можливу слабкість зв'язку маркера з VSH-фенотипом в умовах вільного спарювання та змішаного генетичного походження українських ліній.

4. **Порівняння з новозеландською популяцією *A. m. ligustica* виявило схожі частоти алелю G (0,556 vs 0,557), але принципово різний розподіл генотипів.** Новозеландська популяція характеризується збалансованим розподілом генотипів та відповідністю рівновазі Харді-Вайнберга (34,1% GG, 43,0% GA, 22,9% AA), тоді як українські популяції демонструють виражений надлишок гетерозигот (20,6% GG, 71,1% GA, 8,2% AA, $p < 0,001$). Це свідчить про різні селекційні історії, системи розведення та можливі породоспецифічні особливості генетичної архітектури стійкості до варроа.
5. **Високий рівень гетерозиготності (44-93%) у досліджуваних популяціях створює системну проблему для маркер-асоційованої селекції.** Переважання генотипу GA призводить до проміжного колоніального фенотипу резистентності через адитивність ознаки на рівні колонії. Ці особливості визначають необхідність комплексного підходу, який включає обов'язкове генотипування трутневого матеріалу поряд з відбором маток. Перспективним є формування контрольованих трутневих популяцій з переважанням генотипу GG через інструментальне осіменіння генотипованим трутневим матеріалом від маток-носіїв бажаних алелів.
6. **Апробовано доступну та економічно ефективну методику генотипування SNP 9-9224292 методом ПЛР-ПДРФ, придатну для впровадження в українські селекційні програми.** Використання ендонуклеази рестрикції Hru188I та електрофоретичного розділення на 4% агарозному гелі забезпечує чітку диференціацію генотипів (GG, GA, AA) без потреби у дорогому обладнанні для секвенування або генотипування високої продуктивності. Вартість аналізу одного зразка не перевищує 50-80 грн, що робить методику доступною для комерційних бджолярських господарств та селекційних центрів з базовим молекулярно-біологічним оснащенням. Простота протоколу дозволяє проводити масове генотипування маток і трутнів у селекційний сезон з мінімальними часовими витратами (3-4 години від екстракції ДНК до отримання результату).

7. Результати дослідження обґрунтовують практичні рекомендації щодо комерційного застосування SNP 9-9224292 в українських селекційних програмах. Маркер може використовуватися як допоміжний інструмент у комплексі з фенотипічною оцінкою VSH-поведінки за умов: пріоритизації GG-маток при контрольованому спарюванні з GG-трутнями для максимізації частки GG-робочих бджіл у колонії; інтеграції генотипування у схеми матковивідних пасік для сертифікації племінного матеріалу; розробки багатомаркерних панелей, що охоплюють додаткові QTL резистентності; регулярної ревалідації асоціацій маркера у локальних популяціях з урахуванням високого рівня рекомбінації у геномі бджоли. Для подальшого широкого застосування SNP 9-9224292 в селекції бджіл необхідні майбутні дослідження із контрольованими схрещуваннями, прямою оцінкою поведінкового фенотипу та інтеграцією додаткових SNP-маркерів для всебічної оцінки полігенної природи резистентності до *Varroa destructor*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Arechavaleta-Velasco, M. E., Alcala-Escamilla, K., Robles-Rios, C., Tsuruda, J. M., & Hunt, G. J. (2012). Fine-scale linkage mapping reveals a small set of candidate genes influencing honey bee grooming behavior in response to *Varroa* mites. *PLOS ONE*, 7(11), e47269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047269>
2. Aliano, N.P., Ellis, M.D. Oxalic acid: a prospective tool for reducing *Varroa* mite populations in package bees. *Exp Appl Acarol* **48**, 303–309 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9240-8>
3. Bienefeld, K., Ehrhardt, K. & Reinhardt, F. Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects — A BLUP-Animal Model approach. *Apidologie* **38**, 77–85 (2007). <https://doi.org/10.1051/apido:2006050>
4. Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>
5. Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Molecular Ecology*, 14(7), 1963–1975. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
6. Garnery, L., Cornuet, J. M., & Solignac, M. (1993). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1(3), 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.x>
7. Hartl, D. L., & Clark, A. G. (2007). *Principles of Population Genetics* (4th ed.). Sinauer Associates. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm035>
8. Hedrick, P. W. (2012). What is the evidence for heterozygote advantage selection? *Trends in Ecology & Evolution*, 27(12), 698–704. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.08.012>
9. Kirrane, M. J., de Guzman, L. I., Holloway, B., Frake, A. M., Rinderer, T. E., & Wheeler, M. M. (2015). Phenotypic and genetic analyses of the *Varroa* Sensitive Hygienic trait in Russian honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *PLOS ONE*, 10(4), e0127314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116672>
10. Mondet, F., Alaux, C., Severac, D., Rohmer, M., Mercer, A. R., & Le Conte, Y. (2020). Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: A systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal of Parasitology*, 45(14), 811–870. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>

11. Oldroyd, B. P., & Fewell, J. H. (2007). Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(8), 408-413.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.02.010>
12. Pritchard, J. K., & Przeworski, M. (2001). Linkage disequilibrium in humans: Models and data. *American Journal of Human Genetics*, 69(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1086/321301>
13. Ruttner, F. (1988). *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1>
14. Tarpy, D. R., Caren, J. R., & Delaney, D. A. (2004). Sex determination and the evolution of polyandry in honey bees (*Apis mellifera*). *Evolution*, 58(11), 2397-2400. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00466.x>
15. Tsuruda, J. M., Harris, J. W., Bourgeois, L., Danka, R. G., & Hunt, G. J. (2012). High-resolution linkage analyses to identify genes that influence Varroa Sensitive Hygiene behavior in honey bees. *PLOS ONE*, 7(11), e48276.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048276>
16. Uzunov, A., Büchler, R., Bienefeld, K., & Costa, C. (2014). The basic concept of honey bee breeding programs. *Bee World*, 91(4), 84-87.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.4.10>
17. Arechavaleta-Velasco, M. E., et al. (2025). Genetic effects for individual honeybee grooming behavior in response to Varroa mites and its relationship with the mite infestation levels of honeybee colonies. *Genes*, 16(7), 792.
<https://doi.org/10.3390/genes16070792>
18. Bartlett, L. J., Boots, M., Brosi, B. J., Delaplane, K. S., Dynes, T. L., & de Roode, J. C. (2024). Rapidly growing parasites threaten host populations due to patch-level population dynamics and higher virulence: A case study of Varroa mites and honey bees. *Journal of Insect Science*, 24(3), 17.
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieae049>
19. Behrens, D., Huang, Q., Geßner, C., Rosenkranz, P., Frey, E., Locke, B., Le Conte, Y., & Kraus, F. B. (2011). Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*. *Ecology and Evolution*, 1(4), 451–458. <https://doi.org/10.1002/ece3.54>
20. Bernstein, R., Weinstock, G. M., & Soller, M. (2023). Polygenic adaptation in a changing environment. *Heredity*, 130(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41437-022-00567-w>

21. Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., & Omholt, S. W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114(4), 419–429. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00606-8)
22. Beye, M., Gattermeier, I., Hasselmann, M., Gempe, T., Schioett, M., Baines, J. F., Schlipalius, D., Mougel, F., Emore, C., Rueppell, O., Sirviö, A., Guzmán-Novoa, E., Hunt, G., Solignac, M., & Page, R. E. (2006). Exceptionally high levels of recombination across the honey bee genome. *Genome Research*, 16(11), 1339–1344. <https://doi.org/10.1101/gr.5680406>
23. Bilodeau, L., & Beaman, L. (2022). Differential expression of three dopamine receptors in Varroa-resistant honey bees. *Journal of Insect Science*, 22(1), 9. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieac003>
24. Boecking, O., & Genersch, E. (2008). Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3(2), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s00003-008-0331-y>
25. Boomsma, J. J., & Ratnieks, F. L. W. (1996). Paternity in eusocial Hymenoptera. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 351(1342), 947–975. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0087>
26. Boutin, S., Alburaki, M., Mercier, P. L., Loublier, Y., Leblanc, M., & Derome, N. (2015). Differential gene expression between hygienic and non-hygienic honeybee (*Apis mellifera* L.) hives. *BMC Genomics*, 16(1), 390. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1586-x>
27. Bowen-Walker, P. L., & Gunn, A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3), 207–217. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00905.x>
28. Brascamp, E. W., Wanders, T. H. V., Wientjes, Y. C. J., & Bijma, P. (2016). Prospects of genomic selection for honeybee breeding programs. *Genetics Selection Evolution*, 48(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0258-5>
29. Broeckx, B. J. G., Mommaerts, V., 命令, F., Wenseleers, T., & Smagghe, G. (2019). Honey bee (*Apis mellifera*) predisposition to *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) is predicted by temperature and influenced by swarming. *Scientific Reports*, 9(1), 7794. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44254-8>

30. Brodschneider, R., Arnold, G., Hrassnigg, N., & Crailsheim, K. (2012). Does patriline composition change over a honey bee queen's lifetime? *Insects*, 3(3), 857–869. <https://doi.org/10.3390/insects3030857>
31. Büchler, R. (1994). Varroa tolerance in honey bees—occurrence, characters and breeding. *Bee World*, 75(2), 54–70. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1994.11099201>
32. Büchler, R., Berg, S., & Le Conte, Y. (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie*, 41(3), 393–408. <https://doi.org/10.1051/apido/2010011>
33. Calderone, N. W., & Page, R. E. (1991). Evolutionary genetics of division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *The American Naturalist*, 138(1), 69–92. <https://doi.org/10.1086/285205>
34. Carpenter, M. H., & Harpur, B. A. (2021). Genetic past, present, and future of the honey bee (*Apis mellifera*) in the United States of America. *Apidologie*, 52(1), 63–79. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00836-4>
35. Chen, G., Jin, M., Shi, T., Zheng, H., Wang, Z., Evans, J. D., Chen, Y. P., & Huang, Z. Y. (2021). A new strain of *Varroa destructor* virus 2 (VDV-2) specific to the mite *Varroa destructor* poses a potential threat to honey bees. *Viruses*, 13(4), 679. <https://doi.org/10.3390/v13040679>
36. Chen, X., Hu, Y., & Zheng, H. (2018). Mechanisms of genomic imprinting in mammals and social insects. *Molecular Ecology*, 27(11), 2871–2884. <https://doi.org/10.1111/mec.14696>
37. Conlon, B. H., Aurori, A., Giurgiu, A. I., Kefuss, J., Dezmarean, D. S., Moritz, R. F., & Routtu, J. (2018). A gene for resistance to the *Varroa* mite (*Varroa destructor*) in honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Molecular Ecology*, 27(20), 4080–4086. <https://doi.org/10.1111/mec.14834>
38. Conlon, B. H., Frey, E., Rosenkranz, P., Locke, B., Moritz, R. F., & Routtu, J. (2019). The role of epistatic interactions underpinning resistance to parasitic *Varroa* mites in haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Journal of Evolutionary Biology*, 32(12), 1458–1465. <https://doi.org/10.1111/jeb.13535>
39. Damaio, J. E., Chen, Y. P., Evans, J. D., & Ryabov, E. V. (2023). Replication of honey bee-associated viruses in the honey bee parasite *Varroa destructor*. *Journal of Virology*, 97(12), e01149-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.01149-23>

40. De Iorio, M. G., Biffani, S., Pagnacco, G., Stella, A., Cozzi, M. C. S., Maggi, L. A., & Minozzi, G. (2025). Results of four generations of selection for *Varroa*-sensitive hygienic behavior in honey bees. *Italian Journal of Animal Science*, 24(1), 1959–1967. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2025.2553715>
41. De Iorio, M. G., Lazzari, B., Colli, L., Pagnacco, G., & Minozzi, G. (2024). Variability and number of circulating complementary sex determiner (*csd*) alleles in a breeding population of Italian honeybees under controlled mating. *Genes*, 15(6), 652. <https://doi.org/10.3390/genes15060652>
42. Delaplane, K. S., Hagan, K., Vogel, K., Danka, R. G., & Camazine, S. (2024). Mechanisms for polyandry evolution in a complex social bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 78(2), 39. <https://doi.org/10.1007/s00265-024-03450-x>
43. Delaplane, K. S., van der Steen, J., & Guzman-Novoa, E. (2021). Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.12>
44. DeLory, T., Funderburk, K., Miller, K., Zuluaga, M., Sohr, A., Michael, J. L., Adelman, Z. N., & McAfee, A. (2020). Local variation in recombination rates of the honey bee (*Apis mellifera*) genome among samples from six disparate populations. *Insectes Sociaux*, 67(1), 127–138. <https://doi.org/10.1007/s00040-019-00736-6>
45. de Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
46. Donthu, R., Marcelino, J. A. P., Giordano, R., Ellis, J. D., Chen, Y., & Hawthorne, D. J. (2024). HBeeID: A molecular tool that identifies honey bee subspecies from different geographic populations. *BMC Bioinformatics*, 25(1), 278. <https://doi.org/10.1186/s12859-024-05776-9>
47. Druml, T., Putz, A., Rubinigg, M., Meixner, M. D., Kuchling, S., Hoppe, A., & Bienefeld, K. (2023). Founder gene pool composition and genealogical structure in two populations of Austrian Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*) as derived from pedigree analysis. *Apidologie*, 54(2), 24. <https://doi.org/10.1007/s13592-023-00999-w>
48. Duay, P., de Jong, D., & Engels, W. (2002). Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested

- by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research*, 1(3), 227–232.
49. Duay, P., de Jong, D., & Engels, W. (2003). Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 34(1), 61–65. <https://doi.org/10.1051/apido:2002052>
 50. Dyrbye-Wright, I., Basuino, L., Chantawannakul, P., Lattorff, H. M. G., & Simone-Finstrom, M. (2025). Honey bees bred for *Varroa* sensitive hygiene trait demonstrate resistance to chalkbrood disease. *PLOS ONE*, 20(8), e0329739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0329739>
 51. Eckholm, B. J., Huang, M. H., Anderson, K. E., Mott, B. M., & DeGrandi-Hoffman, G. (2015). Honey bee (*Apis mellifera*) intracolony genetic diversity influences worker nutritional status. *Apidologie*, 46(2), 150–163. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0311-4>
 52. El-Niweiri, M. A. A., & Moritz, R. F. A. (2011). Mating in the rain? Climatic variance for polyandry in the honeybee (*Apis mellifera jemenitica*). *Population Ecology*, 53(2), 421–427. <https://doi.org/10.1007/s10144-011-0271-8>
 53. Erban, T., Sopko, B., Kadlikova, K., Talacko, P., & Harant, K. (2019). *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports*, 9(1), 9400. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45764-1>
 54. Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., & Cornuet, J. M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140(2), 679–695. <https://doi.org/10.1093/genetics/140.2.679>
 55. Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S62–S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
 56. Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics* (4th ed.). Longman.
 57. Foret, S., Kucharski, R., Pellegrini, M., Feng, S., Jacobsen, S. E., Robinson, G. E., & Maleszka, R. (2012). DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4968–4973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202392109>

58. Fries, I., Locke, B., & Eckert, K. D. (2016). Survival of *Varroa destructor*-infested honeybee colonies without treatment. In P. Neumann & J. D. Evans (Eds.), *Bee health and veterinarians* (pp. 35–39). OIE.
59. Gerdt, J., Dewar, R. L., Simone-Finstrom, M., Edwards, T., & Angove, M. (2018). Hygienic behaviour selection via freeze-killed honey bee brood not associated with chalkbrood resistance in eastern Australia. *PLOS ONE*, 13(11), e0203969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203969>
60. Giuffrè, C., Moon, R. D., Hutchison, W. D., Venturelli, E., & Pritchard, D. J. (2019). Does viral load alter behavior of the bee parasite *Varroa destructor*? *PLOS ONE*, 14(6), e0217975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217975>
61. Guarna, M. M., Hoover, S. E., Huxter, E., Higo, H., Moon, K. M., Domanski, D., Bixby, M. E. F., Melathopoulos, A. P., Ibrahim, A., Pernal, S. F., Pettis, J. S., Foster, L. J., & Desaulniers, N. (2015). Peptide biomarkers used for the selective breeding of a complex polygenic trait in honey bees. *Scientific Reports*, 5(1), 15796. <https://doi.org/10.1038/srep15796>
62. Guarna, M. M., Melathopoulos, A. P., Huxter, E., Iovinella, I., Parker, R., Stoyanov, N., Tam, A., Moon, K. M., Chan, Q. W. T., Pelosi, P., White, R., Pernal, S. F., & Foster, L. J. (2017). A search for protein biomarkers links olfactory signal transduction to social immunity. *BMC Genomics*, 18(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3504-1>
63. Guarna, M. M., Hoover, S. E., Andres, J. A., Dukhovich, A., Strand, M. K., Tarpy, D. R., Rueppell, O., & Guzmán-Novoa, E. (2021). Genetic analysis of *Varroa* sensitive hygiene in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Genes*, 12(9), 1317. <https://doi.org/10.3390/genes12091317>
64. Guichard, M., Dietemann, V., Neuditschko, M., & Dainat, B. (2024). Do *Varroa destructor* mite flows between *Apis mellifera* colonies affect colony infestation phenotypes for resistance selection? *Journal of Insect Science*, 24(4), 3. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieae071>
65. Harbo, J. R., & Harris, J. W. (1999). Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(2), 261–265. <https://doi.org/10.1093/jee/92.2.261>
66. Harbo, J. R., & Harris, J. W. (2005). Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *Journal of Apicultural Research*, 44(1), 21–23. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101141>

67. Harpur, B. A., Chapman, N. C., Krimus, L., Maciukiewicz, P., Sandhu, V., Sood, K., Lim, J., Rinderer, T. E., Allsopp, M. H., Zayed, A., & Oldroyd, B. P. (2015). Assessing patterns of admixture and ancestry in Canadian honey bees. *Insectes Sociaux*, 62(4), 479–489. <https://doi.org/10.1007/s00040-015-0427-1>
68. Harpur, B. A., Everest, A. L., Rinderer, T. E., Hunt, G. J., Guzmán-Novoa, E., & Zayed, A. (2022). Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(32), e2106994119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106994119>
69. Hartl, D. L., & Clark, A. G. (2007). *Principles of Population Genetics* (4th ed.). Sinauer Associates.
70. Hoppe, A., Du, M., Bernstein, R., Tiesler, F. K., Kärcher, M., & Bienefeld, K. (2020). Substantial genetic progress in the international *Apis mellifera carnica* population since the implementation of genetic evaluation. *Insects*, 11(11), 768. <https://doi.org/10.3390/insects11110768>
71. Huang, Q., Zhu, Y. Q., Fouks, B., He, X. J., Niu, Q. S., Zheng, H. J., & Zeng, Z. J. (2022). Signatures of positive selection in the genome of *Apis mellifera carnica*: A subspecies of European honeybees. *Life*, 12(10), 1642. <https://doi.org/10.3390/life12101642>
72. Ihle, K. E., Payne, A. N., Elsik, C. G., Hunt, G. J., Remnant, E. J., Chapman, N. C., Rinkevich, F. D., Schmitzová, J., Perry, C. J., Wallberg, A., Webster, M. T., & Hasselmann, M. (2025). Scientific note updating allelic nomenclature standards of the highly diverse complementary sex-determiner locus in honey bees. *Apidologie*, 56(1), 32. <https://doi.org/10.1007/s13592-025-01161-4>
73. Jones, J. C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufalilia, H., Balfour, N. J., Bork, P., Engel, P., Ratnieks, F. L. W., & Hughes, W. O. H. (2018). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution*, 8(1), 441–451. <https://doi.org/10.1002/ece3.3597>
74. Kamler, M., Nesvorna, M., Stara, J., Erban, T., & Hubert, J. (2022). Variability in expression of hygiene-related genes in the honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 111(2), e21943. <https://doi.org/10.1002/arch.21943>
75. Kaskinova, M. D., Gaifullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskryakov, A. V., & Nikolenko, A. G. (2020). Genetic markers for the resistance of honey bee to

- Varroa destructor*. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 24(8), 853–860.
<https://doi.org/10.18699/VJ20.683>
76. Kirrane, M. J., de Guzman, L. I., Holloway, B., Frake, A. M., Rinderer, T. E., & Whelan, P. M. (2015). Phenotypic and genetic analyses of the *Varroa* sensitive hygienic trait in Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *PLOS ONE*, 10(4), e0116672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116672>
 77. Kistler, T., Basso, B., & Phocas, F. (2021). A simulation study of a honeybee breeding scheme accounting for polyandry, direct and maternal effects on colony performance. *Genetics Selection Evolution*, 53(1), 71.
<https://doi.org/10.1186/s12711-021-00665-8>
 78. Kocher, S. D., Richard, F. J., Tarpy, D. R., & Grozinger, C. M. (2015). Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 9(1), 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-232>
 79. Koleoglu, G., Goodwin, P. H., Reyes-Quintana, M., Hamiduzzaman, M. M., & Guzman-Novoa, E. (2017). Effect of *Varroa destructor*, wounding and *Varroa* homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. *PLOS ONE*, 12(1), e0169669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169669>
 80. Koleoglu, G., Goodwin, P. H., Reyes-Quintana, M., Hamiduzzaman, M. M., & Guzman-Novoa, E. (2018). *Varroa destructor* parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. *Parasitology Research*, 117(4), 1175–1183.
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5796-8>
 81. Kovačić, M., Puškadija, Z., Dražić, M. M., Duplančić, A., Prešern, J., & Moosbeckhofer, R. (2020). Effects of selection and local adaptation on resilience and economic suitability in *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, 51(6), 1062–1073. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00783-0>
 82. Kralj, J., & Fuchs, S. (2006). Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37(5), 577–587. <https://doi.org/10.1051/apido:2006040>
 83. Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S., & Tautz, J. (2007). The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(3), 363–370.
<https://doi.org/10.1007/s00359-006-0192-8>

84. Lapidge, K. L., Oldroyd, B. P., & Spivak, M. (2002). Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften*, 89(12), 565–568. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0371-6>
85. Le Conte, Y., de Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J. C., & Bécard, J. M. (2007). Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38(6), 566–572. <https://doi.org/10.1051/apido:2007040>
86. Le Conte, Y., Alaux, C., Martin, J. F., Harbo, J. R., Harris, J. W., Dantec, C., Séverac, D., Cros-Arteil, S., & Navajas, M. (2011). Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): Transcriptome analysis of *Varroa*-hygienic behaviour. *Insect Molecular Biology*, 20(3), 399–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01074.x>
87. Le Conte, Y., Mondet, F., Russo, R. M., & Mercer, A. R. (2020). *Varroa* resistance in honey bees: A complex trait impacted by genotype and environment. *Apidologie*, 51(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00686-x>
88. Lefebvre, R., Broeckx, B. J. G., De Smet, L., Peelman, L., & de Graaf, D. C. (2024). Population-wide modelling reveals prospects of marker-assisted selection for parasitic mite resistance in honey bees. *Scientific Reports*, 14(1), 8472. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58813-9>
89. Leipart, V., Gjuvslund, A. B., Ranke, M., & Amdam, G. V. (2025). AI-enhanced marker-assisted selection concept for the multifunctional honey bee protein Vitellogenin (Vg). *Journal of Economic Entomology*, 118(1), 12–24. <https://doi.org/10.1093/jee/toae281>
90. Leroy, T., Faux, P., Basso, B., Eynard, S. E., Wragg, D., & Vignal, A. (2024). Inferring long-term and short-term determinants of genetic diversity in honey bees: Beekeeping impact and conservation strategies. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae249. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae249>
91. Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., & de Miranda, J. R. (2012). Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 227–235. <https://doi.org/10.1128/AEM.06094-11>
92. Locke, B., Thaduri, S., Stephan, J. G., Low, M., & de Miranda, J. R. (2021). Adapted tolerance to virus infections in four geographically distinct *Varroa*

destructor-resistant honey bee populations. *Scientific Reports*, 11(1), 12359.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91686-2>

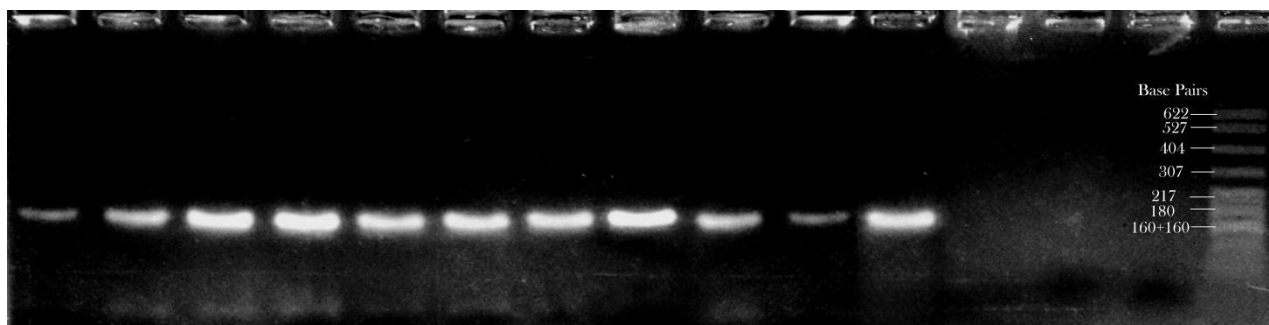
93. Lukic, B., Raguz, N., Kovačić, M., Puškadija, Z., Prešern, J., Tofilski, A., Bučan, A., Zec, M., & Šimon, S. (2024). Genomic diversity and population structure of Carniolan honey bee in its native habitat. *BMC Genomics*, 25(1), 849. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10750-z>
94. Martin, S. J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: A modelling approach. *Journal of Applied Bee Research*, 13(1), 1-10.
95. Arathi, H.S., Burns, I. and Spivak, M. (2000), Ethology of Hygienic Behaviour in the Honey Bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Behavioural repertoire of Hygienic bees. *Ethology*, 106: 365-379. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00556.x>
96. Moshe Nagari, Yafit Brenner, Guy Bloch; Nurse honeybee workers tend capped brood, which does not require feeding, around the clock. *J Exp Biol* 15 November 2017; 220 (22): 4130–4140. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.166884>

ДОДАТКИ

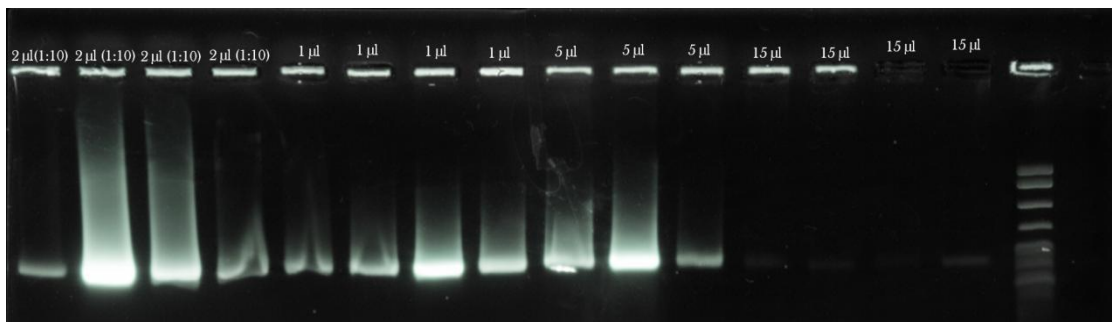
ДОДАТОК А — Характеристика племінного матеріалу



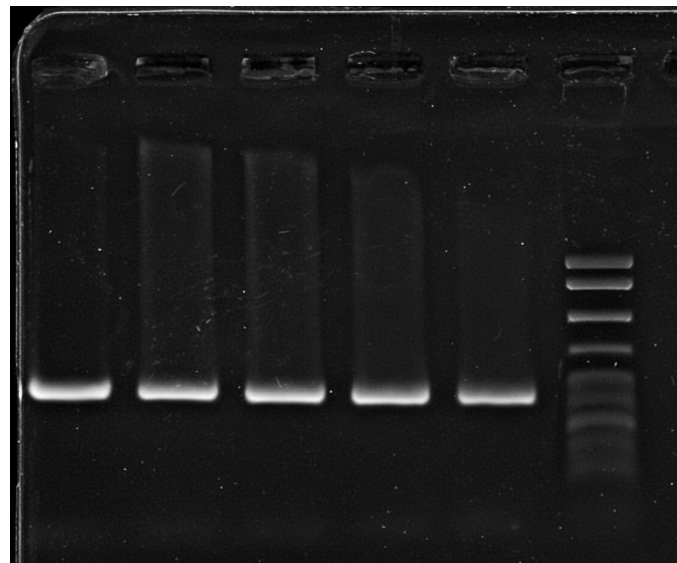
ДОДАТОК Б — Підвищена заклецованість контрольних сімей (№ 58, 119)



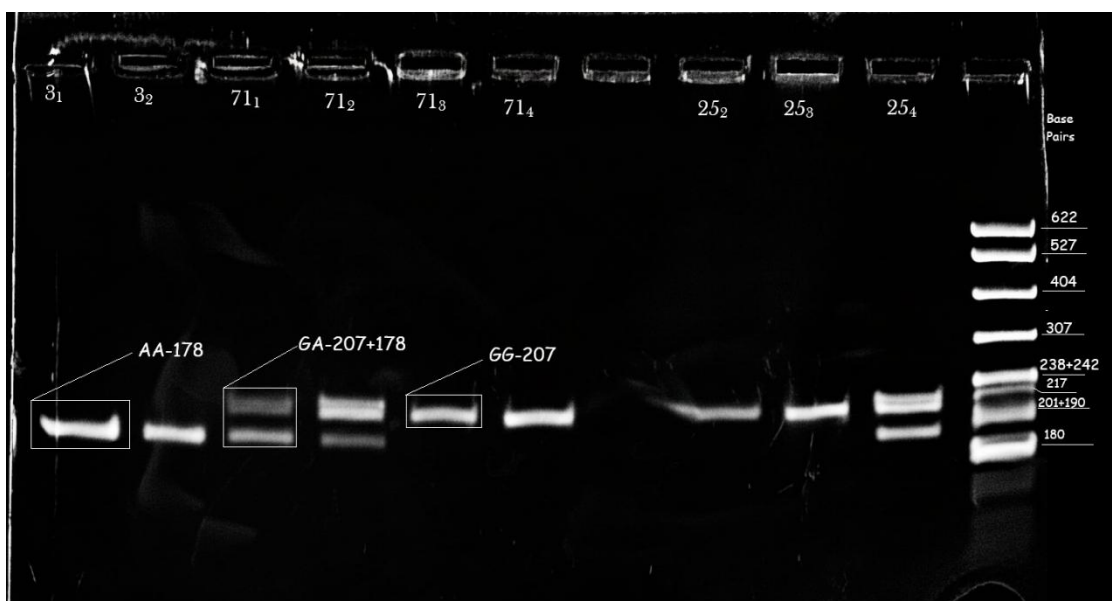
ДОДАТОК В — Оптимізація концентрації ДНК у ПЛР



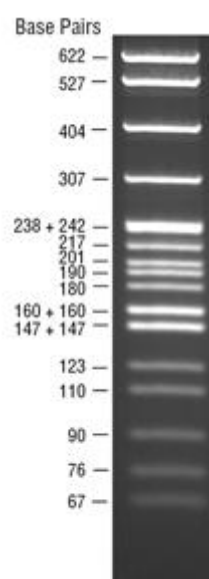
ДОДАТОК Г — Успішна ампліфікація зразків



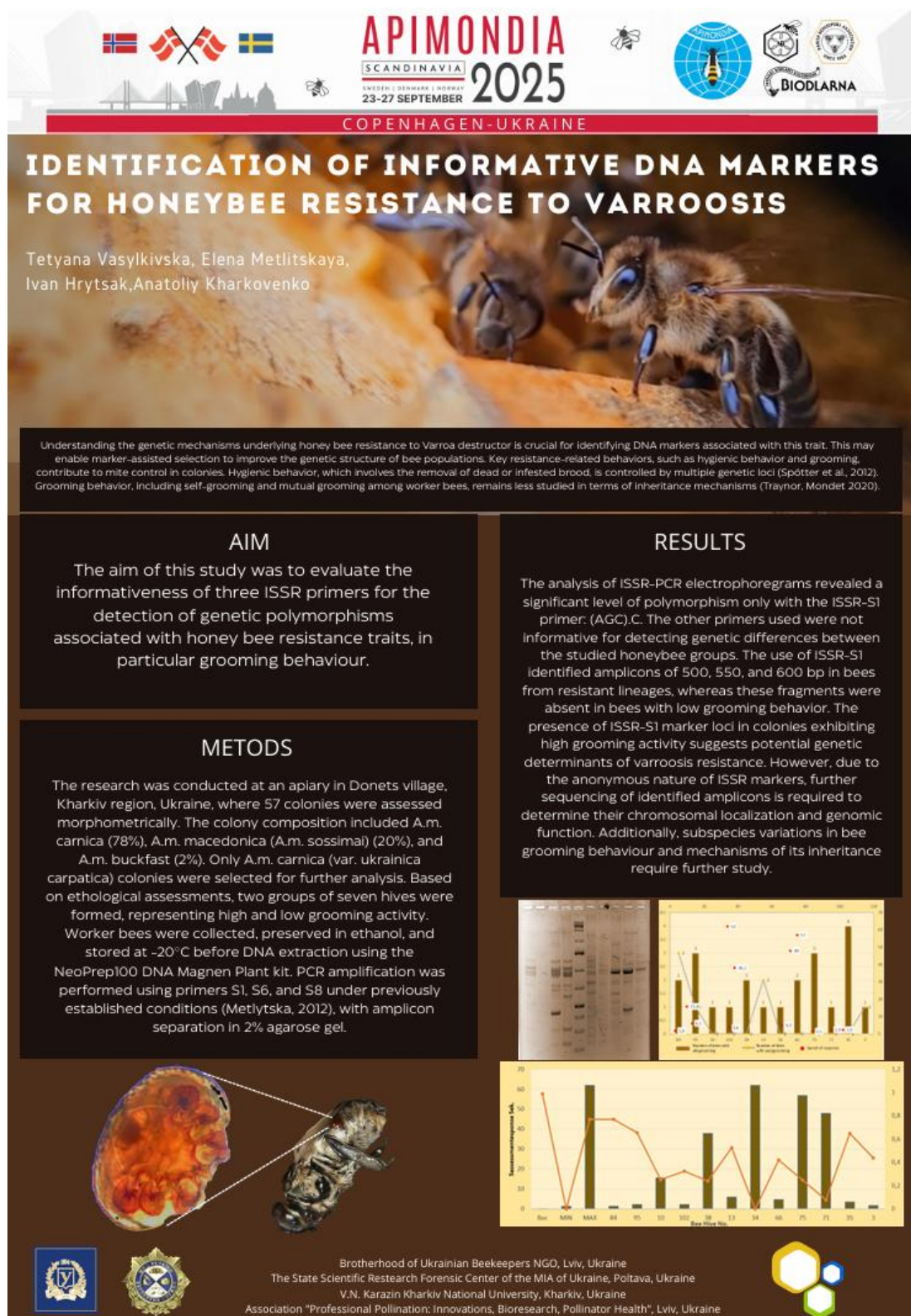
ДОДАТОК Д — Візуалізація алелів SNP 9-9224292



ДОДАТОК Е — Маркер молекулярної маси pBR322



ДОДАТОК Є— Постер за попередним дослідженням (ISSR, мтДНК).
Apimondia 2025



ДОДАТОК Ж — Фото обладнання

