

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально–науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра молекулярної генетики та біотехнології**

**Поліморфізм генів статевого фактору деяких
популяцій українських степових бджіл**

**Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

Виконав:
студент 6 курсу, 607 групи
Штефанчук Микола Юрійович
Керівник:
доктор біологічних наук,
професор **Волков Р.А.**

*До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № 5 від 26 листопада 2024 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Волков Р.А.*

Чернівці – 2024

АНОТАЦІЯ

Ген комплементарного визначення статі (*CSD*) має ключову роль у визначенні статі соціальних комах, зокрема таких як бджоли, мурахи та оси та забезпечує розвиток жіночих особин, у випадку наявності різних алелів згаданого гена. Якщо особина має два однакові алелі або лише один алель, вона розвивається в самця. Такий механізм визначення статі корисний для забезпечення генетичного різноманіття популяцій медоносних бджіл, проте існування такого механізму може призвести до серйозних наслідків, зокрема до диплоїдної стерильності самців та інбридингу. У цьому дослідженні було виявлено кілька варіантів гена *CSD* у племінних лініях бджіл підвиду *Apis mellifera macedonica* (українська степова порода), які підлягають селекції в Україні. Дослідження виявило значну кількість алелів гена *CSD*, які відрізняються рідкісними генетичними структурними варіаціями.

Робота проводилася на кафедрі молекулярної генетики та біотехнологій Інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича протягом 2023-2024 років.

Робота викладена на 58 сторінках машинописного тексту, вміщує 16 рисунків та 7 таблиць. Список використаної літератури складається з 50 джерел, із них 50 англійською мовою.

Ключові слова: *Apis mellifera macedonica*, поліморфізм, *CSD*, *HVR*, *PCR*.

ABSTRACT

The complementary sex determination (*CSD*) gene plays a key role in sex determination in social insects, including bees, ants, and wasps. The gene ensures the development of females when they have different alleles of the gene. If an individual has two identical alleles or one allele, it develops into a male. This sex determination mechanism is detrimental to ensuring genetic diversity in small populations, where the detection of such a mechanism can lead to serious consequences, including diploid male sterility and inbreeding. In this study, several variants of the *CSD* gene were identified in breeding lines of bees of the subspecies *Apis mellifera macedonica* (Ukrainian steppe breed), which are subject to selection in Ukraine. The study revealed a significant number of *CSD* gene alleles that differ in rare genetic structural variations.

The work was carried out at the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of the Institute of Biology, Chemistry and Bioresources of the Yuriy Fedkovich Chernivtsi National University during 2023-2024.

The work is laid out on 58 pages of typewritten text, contains 16 figures and 7 tables. The list of used literature consists of 50 sources, 50 of which are in English.

Key words: *Apis mellifera macedonica*, polymorphism, *CSD*, *HVR*, *PCR*.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ

EDTA	– натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти;
fem	– ген феменізатор;
HVR	– мінлива ділянка гена CSD;
п.н.	– пар(и) нуклеотидів;
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція;
PSD	– частина гену CSD що експресує відповідний білковий домен;
P-домен	– багатий проліном домен;
SNP	– однонуклеотидний поліморфізм;
SR	– потенційний фактор сплайсингу;
tra	– ген трансформер;
CSD	– ген детермінатор статі.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Значення гена <i>CSD</i> для популяції медоносних бджіл	9
1.2 Природний добір алелів, що визначають стать медоносної бджоли	Помилка! Закладку не визначено.
1.3 Практичне значення та застосування <i>CSD</i> -гену у бджільництві.....	10
1.4 Ген <i>fet</i> як регулятор статі: молекулярні механізми та еволюційні аспекти.....	14
1.5 Генетична структура гена <i>CSD</i>	16
1.6 Еволюція <i>CSD</i> -гену у медоносних бджіл.....	Помилка! Закладку не визначено.
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	23
2.1 Матеріал для досліджень	23
2.2. Виділення ДНК з тваринної клітини.....	24
2.2. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.....	26
2.3. Ампліфікація ДНК	27
2.5. Кількісна оцінка очищених ПЛР-продуктів	30
2.6. Лігування ПЛР-продукту у вектор.....	31
2.7. Трансформація компетентних клітин <i>E.coli</i> методом електропорації	31
2.8. Скринінг колоній	32
2.9. Виділення плазмідної ДНК.....	33
2.10. Сиквенування	34

2.11. Робота з нуклеотидними послідовностями	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	35
3.1 Поліморфізм довжин <i>CSD</i> генів	35
3.2 Скринінг продуктів ПЛР в плазмідному векторі.....	36
3.3 Поліморфізм <i>CSD</i> генів медоносних бджіл.....	38
3.3.1 Аналіз структури екзонів <i>CSD</i> генів українських бджіл.....	39
3.4 Типування досліджуваних медоносних бджіл за <i>CSD</i> генами.....	46
3.5 Філогенія 3'-ділянки <i>CSD</i> різних медоносних бджіл.....	49
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	52
ДОДАТКИ.....	59
Додаток 1. Техніка безпеки праці	
в лабораторії. Загальні положення	60

ВСТУП

Медоносні бджоли як і багато інших представників ряду перетинчастокрилих (Hymenoptera) мають унікальний механізм визначення статі. Такий механізм регулюється геном *CSD* (Complementary Sex Determiner) та необхідний медоносним бджолам в природніх умовах для утримання відносно високого ступеню гетерозиготності при низькій щільності популяції. При цьому, висока гетерозиготність самих бджіл та колоній цілком забезпечує активну експансію та пристосування до нових умов. Загалом, визначення статі у медоносних бджіл пов'язане з тим що жіночі особини розвиваються із запліднених яйцеклітин, а самі самки – диплоїдні, тоді як самці розвиваються із незапліднених, гаплоїдних яйцеклітин. Тому фертильні трутні можуть мати лише один варіант гена *CSD* і визначатимуться як гемізиготні особини. Це пов'язано з тим, що ген належить до малоповторюваних та у гаплоїдному геномі зустрічається лише один його тип (Johnson, 2023). У випадку розвитку диплоїдних особин, які мають два ідентичні алелі *CSD*, тобто є гомозиготними, утворюються стерильні трутні, яких після нетривалого періоду розвитку, робочі бджоли знищують, оскільки вони призводять до витоку ресурсів і енергії колонії. Однак ці знищені личинки можуть спричиняти зниження життєздатності самої колонії та негативно впливатимуть на її ріст та продуктивність. Таким чином механізм визначення статі із залученням поліалельної системи *CSD* генів у медоносних бджіл покликаний для уникнення інбридингу (Dageri et al., 2023).

Ген *CSD* у медоносної бджоли складається з дев'яти екзонів. Саме екзони 6, 7 і 8 кодують домен що відповідає за димеризацію та утворення функціонально активного білкового продукту. Саме в цій частині *CSD* гена знаходиться гіперваріабельна область (HVR), ця область знаходиться у восьмому екзоні та охоплена двома фланкуючими консервативними ділянками (Shultz, 2023). Сама гіперваріабельна область є мінливою ділянкою за рахунок того, що складається з великої кількості А/Т нуклеотидних повторів, які в

основному кодують змінну кількість залишків аспарагіну (N) і тирозину (Y). Ця область, яка багата на повтори має високий рівень мутацій, що часто призводить до різних перебудов та утворення нових алелів *CSD* генів. Для формування повноцінної бджолоїної популяції необхідний значний поліморфізм генів *CSD*.

Тому **метою** даної роботи є аналіз структури ділянок *CSD* генів у українських популяцій бджіл.

Відповідно до мети були поставлені **завдання**:

1. Провести аналіз літературних джерел, які стосуються дослідження різноманіття *CSD*.
2. Провести пошук та аналіз послідовностей геному, які можливо використовувати для встановлення родини *CSD*.
3. Порівняти варіативні ділянки в різних зразках медоносних бджіл.
4. Виявити високо варіабельні ділянки геному для встановлення їх різноманіття.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Відомо, що стать у медоносних бджіл в першу чергу контролюється геном *CSD*, який володіє значним поліморфізмом (Johnson, 2023). Перетинчастокрилі загалом і медоносні бджоли зокрема, можуть мати як гаплоїдний так і диплоїдний набір хромосом, це означає, що гетерозиготи за геном *CSD* розвиваються в самок, у той час як гомо- або гемізиготи розвиваються в самців (Sommer, 2023; De Iorio et al., 2024).

1.1 Значення гена *CSD* для популяції медоносних бджіл

Визначення статі в бджолиних колоніях має вирішальну роль для підтримки їх стабільності та продуктивності. Ген *CSD* діє за принципом гетерозиготності: коли особина має різні алелі цього гена, вона розвивається як робоча бджола або матка (самка). Якщо ж у зиготі обидва алелі однакові або є лише один алель.

Цей механізм має велике значення для генетичної стабільності популяції медоносних бджіл. Гетерозиготність за геном *CSD* забезпечує достатню кількість робочих бджіл у колонії, що забезпечує всі ключові функції — від збору нектару до захисту гнізда. Відсутність належної генетичної різноманітності призводить врешті до пониження життєздатності та загибелі бджолиної сім'ї під час несприятливого сезону (Seiler, J., & Beye, M. 2024).

Збереження генетичного різноманіття алелів гена *CSD* є визначальним для системи запобігання інбридингу а також для уникнення народження диплоїдних самців. У невеликих популяціях або в умовах тривалої селекції кількість доступних алелів може зменшитися, що збільшує ризик гомозиготності за геном *CSD*. Така ситуація підвищує ймовірність появи неповноцінних самців і як наслідок може привести до загибелі колонії через нестачу робочої сили (Chibani Bahi Amar et al., 2024).

Крім того, генетична різноманітність гена *CSD* сприяє адаптивному потенціалу популяції. В умовах змін навколишнього середовища, таких як зміни клімату або нові хвороби, при наявності різних алелів є ймовірність того,

що певні комбінації генів забезпечують виживання та адаптацію колонії до нових умов. Тому підтримання високого рівня генетичної варіабельності цього гена є важливою стратегією довгострокової стабільності та продуктивності бджолиних популяцій (Suzuki et al., 2023). Поліморфізм *CSD* є критичним для популяційної стабільності. Цей ген має гіперваріабельну ділянку (*HVR*), яка містить численні алельні варіанти, що відрізняються за нуклеотидним складом. Наприклад, у дослідженнях італійських популяцій медоносних бджіл було виявлено 88 різних алелів, що підтверджує високу генетичну різноманітність серед колоній (Zampakas et al., 2024). Еволюційні процеси, такі як балансувальний відбір, сприяють підтримці цього різноманіття, знижуючи ймовірність гомозиготності, яка є летальною для личинок бджіл (Jain & Brockmann 2020).

Таким чином, ген *CSD* є не лише механізмом визначення статі, але й ключовим чинником, що впливає на виживання, стабільність та ефективність популяції медоносних бджіл. Його роль у генетичному різноманітті та селекції особливо важлива для забезпечення здоров'я і продуктивності колоній, які мають критичне значення для агроєкосистеми та біологічного різноманіття (Miyakawa & Miyakawa, 2023).

1.2 Ознаки селекції серед алелів, що визначають стать медоносної бджоли

Механізм визначення статі забезпечується одним локусом у багатьох видів перетинчастокрилих (Amin & Kumova, 2024). Самки походять із запліднених яєць і є гетерозиготними за локусом, що визначає стать, тоді як самці розвиваються із незапліднених яєць. У випадку медоносних бджіл диплоїдні самці виробляють диплоїдні гамети, що призводить до стерильності таких трутнів (Satta et al., 2000).

Нездатність диплоїдних самців відтворювати потомство призводить до утримання великої кількості різних алелів у популяціях через баланс між добором, мутаціями та генетичним дрейфом. За оцінками, кількість алелів у

популяціях медоносної бджоли *Apis mellifera* варіюється від 11 до 19 (Palmer & Oldroyd, 2000).

Динаміка генів, що визначають стать, подібна до динаміки S-локусу рослин. У системі визначення статі є відмінності в утворенні гомозигот і два шляхи. Алелі, що визначають стать, представляють собою чудовий приклад підтримки генетичної різноманітності завдяки природному добору, коли гомозиготи мають нульову репродуктивну придатність (Miyakawa & Miyakawa 2023; Vovo et al. 2021). Використання секвенування нового покоління (NGS) допомагає досліджувати динаміку алелів *CSD* у різних популяціях. Наприклад, у дослідженнях популяцій медоносних бджіл Європи та Північної Америки було виявлено, що поліандрія маток сприяє підтриманню великої кількості алелів *CSD* навіть у комерційно керованих колоніях. Підтримання алельного різноманіття у *CSD* є критичним для збереження популяцій, особливо в умовах змін клімату та зростання захворюваності серед бджіл (Eynard et al., 2024). Сучасні дослідження також підкреслюють необхідність включення знань про *CSD* у програми генетичного відбору, щоб уникнути проблем, пов'язаних із диплоїдними самцями. Окрім загальних біологічних аспектів, поява диплоїдних самців у медоносних бджіл має важливі наслідки для управлінських практик та селекційних програм у бджільництві (Otte et al. 2023).

1.3 Практичне значення та застосування *CSD*-гену у бджільництві

Вивчення різноманітності *CSD*-генів медоносних бджіл має важливе значення для селекційних програм, спрямованих на покращення продуктивності бджолиних колоній та їх виживаності. Оскільки поліморфізм цього гену є ключовим фактором для уникнення інбридингу та утворення диплоїдних самців, сучасні технології молекулярної біології можуть допомогти бджолярам ефективно керувати генетичною різноманітністю бджолиних популяцій (Beye et al. 2003). Однією з основних проблем, з якою стикаються бджолярі, є зниження генетичної різноманітності колоній через інбридинг. Інбридинг збільшує ймовірність того, що потомство буде гомозиготним за

CSD-генами, що призводить до утворення диплоїдних самців. Диплоїдні самці стерильні і не виконують жодної функції в колонії, що знижує її продуктивність і загальну життєздатність (Del Lama et al., 1990). За даними досліджень, в колоніях з низькою генетичною різноманітністю частота диплоїдних самців може досягати 50%, що призводить до втрати до половини нового покоління робочих бджіл (Bovo et al. 2021). Для комерційного бджільництва це означає зниження ефективності продуктивності. Завдяки ідентифікації алелей *CSD*-гену, можна обирати особин з різними алелями для програм племінного розведення, зменшуючи ризик інбридингу та підвищуючи кількість життєздатних колоній (Jain & Brockmann 2020).

Вибір генетично різноманітних королев і трутнів з різними алелями *CSD* допомагає підтримувати стабільну продуктивність колоній. У бджолярстві продуктивність колонії безпосередньо пов'язана з кількістю робочих бджіл, які відповідають за збирання меду, догляд за розплодом та підтримку гнізда. Системи племінного добору, що враховують генетичну різноманітність *CSD*, дозволяють утримувати більш життєздатні і продуктивні колонії (Ruttner 1988).

Застосування молекулярної біології дозволяє заздалегідь визначити комбінації алелів *CSD*-гену і уникнути їх невдалих варіантів при розведенні. Використання знань про *CSD*-ген також може допомогти у виборі найкращих королев для племінної програми. Королеви з унікальними алелями *CSD* вносять різноманітність у генетичний пул популяції, що робить колонії більш стійкими до захворювань та інших екологічних стресів. Бджолярі можуть використовувати генетичні тести для виявлення різних алелей *CSD* у королев, щоб забезпечити їх генетичну сумісність з трутнями, з якими вони будуть спарюватися (Yuger et al., 2023).

Штучне запліднення медоносних бджіл із урахуванням алельного складу *CSD*-гену є важливим інструментом для підтримки генетичної різноманітності та життєздатності колоній (Yuger et al., 2023). Основною метою цієї процедури є уникнення гомозиготності *CSD*-гену, яка призводить до народження нежиттєздатних самців і знижує репродуктивну успішність колонії. Для цього

перед процедурою проводять ретельний генетичний аналіз маток і трутнів за допомогою сучасних молекулярних методів, таких як PCR або секвенування ДНК. Аналіз дозволяє точно визначити алельний склад CSD-гену та підібрати оптимальні пари, щоб забезпечити максимальне генетичне різноманіття потомства. Сперму збирають у кількох генетично різних трутнів, щоб мінімізувати ризик повторення однакових алелів у потомстві. Вона вводиться в репродуктивний тракт матки за допомогою мікрохірургічних інструментів після її короткочасної анестезії. Такий підхід дозволяє контролювати спаровування та уникнути негативних наслідків неконтрольованого запліднення в природних умовах, особливо в популяціях із низьким рівнем генетичного різноманіття. Після штучного запліднення проводиться моніторинг якості потомства, де оцінюється співвідношення статей, життєздатність колонії та її продуктивність. Окрім того, розвиток таких інновацій, як біобанки сперми трутнів із рідкісними алелями та використання CRISPR для створення нових алелів, відкриває перспективи для подальшого удосконалення цієї методики. Це особливо актуально в умовах кліматичних змін, які загрожують стійкості бджолиних популяцій. (Tarpy et al., 2013).

Генетична різноманітність дає змогу популяціям краще адаптуватися до змін у навколишньому середовищі (Eynard et al., 2024). Різні алелі в межах популяції створюють генетичну базу, завдяки якій деякі особини можуть бути більш стійкими до нових стресових факторів, таких як зміни температури, наявність нових патогенів або нестача ресурсів. Коли популяція має низьку генетичну різноманітність, зростає ймовірність інбридингу — схрещування між особинами які є близькими родичами. Це може призводити до накопичення шкідливих рецесивних мутацій, які погіршують здоров'я та виживаність популяції. Збереження генетичної різноманітності є ключовим чинником для стабільної чисельності популяції. Це особливо важливо для бджолиних колоній, де наявність великої кількості різноманітних варіантів гаплотипів гена *csd* знижує ймовірність утворення диплоїдних трутнів (Mohankumar & Rajan, 2023). Генетична різноманітність медоносних бджіл не тільки забезпечує

стійкість самих бджолиних популяцій, але й підтримує стійкість екосистем загалом. Зменшення генетичної різноманітності у бджіл може призвести до зниження їхньої чисельності або навіть до вимирання окремих популяцій, що негативно вплине на рослини, які вони запилюють, а відтак і на харчові ланцюги та агроєкосистеми в цілому (Garnery et al., 1992).

Для бджолярів є розуміння динаміки цих алелів, оскільки утворення диплоїдних самців впливає на продуктивність та ефективність вуликів. Селекційні програми спрямовані на забезпечення максимальної генетичної різноманітності в популяціях, щоб уникнути високої частоти утворення диплоїдних самців. Один із підходів — використання технологій штучного осіменіння, що дозволяє контролювати генетичний матеріал і уникати близькоспорідненого схрещування (Tarpay et al., 2013).

1.4 Ген *fem* як регулятор статі: молекулярні механізми та еволюційні аспекти

Ген *fem* (femenizer) є ключовим у процесі статевої диференціації у медоносних бджіл, а саме забезпечує експресію білків, які необхідні для формування робочих бджіл і маток (Rider et al., 2017). Ген *fem* розташований на третій хромосомі бджоли і складається з кількох екзонів, що кодують білкові послідовності, та інтронів, які не кодують, але відіграють важливу роль у регуляції роботи цих генів. У бджіл та в маток, ген *fem* сплайсується так, що утворюється функціональний білок. Цей білок є необхідним для подальшого розвитку жіночих особин. У трутнів, які є гаплоїдними або гомозиготними за *CSD*, альтернативний сплайсинг порушується, і білок *fem* не виробляється (Eynard et al., 2024).

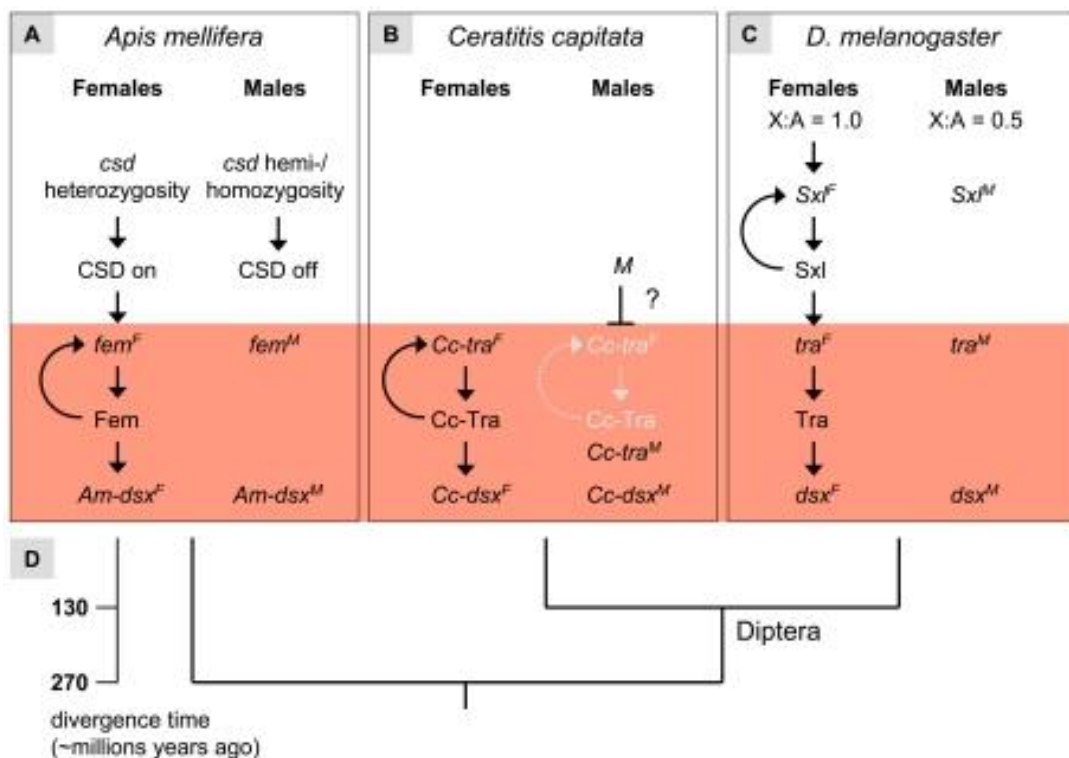


Рисунок 1.4.1 Механізм визначення статі медоносних бджіл по відношенню до інших модельних видів комах (Couton et al., 2023).

Еволюційно *fem*-ген розвинувся як частина складної системи статевої диференціації, яка адаптувалась до соціального способу життя бджіл. Унікальність цієї системи полягає в її гнучкості та ефективності: вона забезпечує точне регулювання співвідношення самок і самців у колонії, що є критично важливим для виживання виду. *Fem*-ген також демонструє високий рівень консервативності серед комах родини *Hymenoptera*, що свідчить про його еволюційну значущість (Cristino et al., 2006).

Білковий продукт гена *fem* здатен розпізнавати та взаємодіяти з геном *tra*. Ген *tra* кодує білок, який працює спільно з білком *fem* для регуляції сплайсингу та розвитку особин по жіночому типу. Важливо те, що без правильної взаємодії з *tra*, навіть у гетерозиготних бджіл, розвиток жіночої статі буде неможливим. Ген *fem* має критичну роль у розвитку медоносних бджіл як соціального виду. Система статевої диференціації з використанням гена *fem* є високоефективною, оскільки вона дозволяє бджолам швидко адаптуватися до змін середовища, зберігаючи генетичну різноманітність у колонії (Jain & Brockmann, 2020).

Дослідження показують, що механізми статевої диференціації, подібні до тих, які ми бачимо у бджіл, також зустрічаються у ос, мурах та інших соціальних комах. Проте, ген *fem* унікальний у своїй здатності тонко регулювати розвиток самок через механізм альтернативного сплайсингу (Cheng et al. 2023).

Еволюційно цей механізм надає значні переваги, оскільки він дозволяє контролювати співвідношення статей у колонії залежно від потреби. Наприклад, за відсутності необхідності у трутнях колонія буде виробляти більше робочих бджіл (Iqbal et al., 2024).

Сьогодні досліджено молекулярні механізми визначення статі у кількох модельних об'єктів класу комах. На основі спорідненості або відмінності між цими шляхами вдалося відобразити еволюцію самих механізмів визначення статі (рис 1.4.1).

Дослідження *fem*-гену є важливим для розуміння еволюції статевої системи у соціальних комах, а також для управління бджолиними популяціями. Подальший аналіз молекулярних механізмів його функціонування, зокрема взаємодії з іншими генами та регуляторними елементами, може допомогти створити нові методи боротьби з проблемами інбридингу та зниженням генетичного різноманіття у бджіл. (Gempe et al., 2006)

1.5 Структура гена *CSD*

Ще в 1994 році двома лабораторіями, які знаходяться в США та в Німеччині були отриманні дані про ген, який визначає стать у медоносних бджіл *A. mellifera* (Suzuki et al., 2023). Ген комплементарного визначення статі (*CSD*) у медоносних бджіл (*Apis mellifera*) має ключове значення для процесу статевої диференціації в колоніях цих соціальних комах (Seiler & Beye 2024). Його унікальна структура та функціональні особливості можуть пояснити, чому у медоносних бджіл настільки важливе генетичне різноманіття цього гена. Відомо, що *CSD* ген має довжину 11734 пар основ та складається з дев'яти екзонів, які розділені на три області і розділені двома великими інтронами. І

саме екзони з 6 по 8 кодують потенційно-специфікуючий домен *CSD-PSD*. Цей домен є мішенню на яку впливає балансуєчий добір. І саме тут спостерігається високий рівень поліморфізму, який в 7 разів вище ніж в інших некодуючих регіонах. Розташовується *CSD* ген поблизу теломерного кінця 8-ї хромосоми (Fouks et al., 2024; Paolillo et al., 2022).

У своєму складі *CSD-PSD* містить гіперваріабельну область (*HVR*), яка збагачена на аргініном, сирином та проліном, які беруть участь у білок-білковій взаємодії. Також гіперваріабельна область (*HVR*) містить велику кількість А / Т повторів, тому ця ділянка є мінливою і кодує в основному тирозин і аспарагін (Mohankumar & Rajan, 2023). Структура гена *CSD* підтримується балансувальним відбором, коли рідкісні алелі отримують перевагу. Це забезпечує низьку ймовірність утворення гомозигот, що є еволюційно вигідним. Алелі в *HVR* змінюються частіше, ніж у інших регіонах геному, що створює широкий спектр алельної різноманітності. Сучасні дослідження свідчать про існування понад 200 алелів *CSD* у глобальних популяціях бджіл, хоча локальні популяції можуть містити лише 11–19 варіантів (Zampakas et al., 2024).

Ген *CSD* розвинувся через дуплікацію з гена-фемінізатора (*FEM*) у роду *Apis*, що включає медоносних бджіл. Гетерозиготність гена *CSD*, потрібна для початку жіночого розвитку шляхом взаємодії з білком трансформером-2, який має саме РНК-зв'язуючий домен. Це позначає жіночий сплайсинговий транскрипт *FEM*, утворюючи білок, який відповідає жіночому специфічному сплайсинговому транскрипту *Am-DSX* (Gemp et al., 2009). Гомозиготний або гемізиготний стан гена *CSD* запускає чоловічий розвиток через укорочений білок *FEM*, що через наявність раннього стоп-кодону в чоловічій мРНК *FEM*. Як результат, трансляція припиняється передчасно, і *Am-DSX* сплайсується по чоловічому типу, утворюючи білок із специфічним для самців карбоксильним кінцем (Hagan et al., 2023).

Наявність алелів *CSD*, які відрізняються за послідовністю *HVR*, але не в послідовностях навколишніх ділянок ДНК, вказує на те, що *HVR* проходить

швидку еволюцію. Процес, який викликає зміну послідовності *HVR*, ймовірно, подібний до процесу, який викликає зміну мікросателітів (Zampakas et al., 2024). Поодинокі та множинні триплетні зміни (TAA і TAT), які часто з'являються як набори мотивів, свідчать про дублювання та/або нерівний кросинговер (Bresnahan et al., 2024).

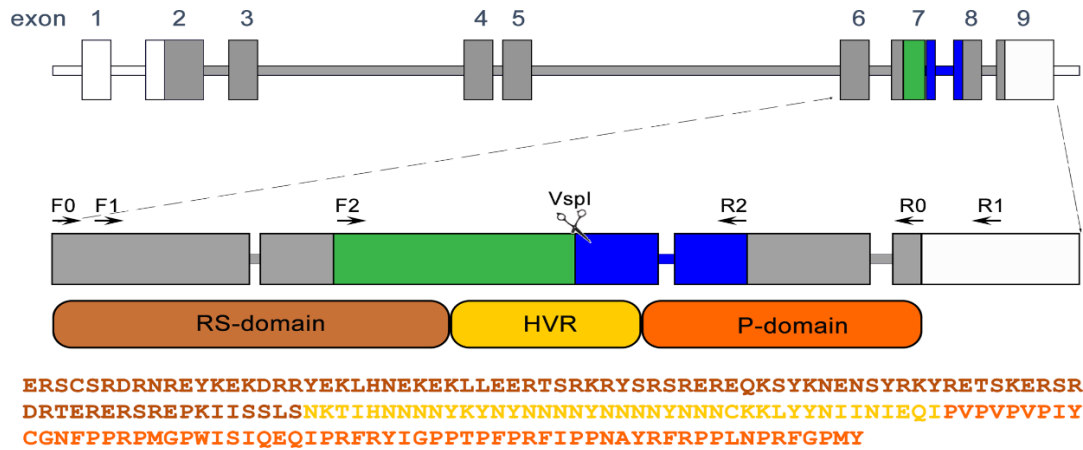


Рисунок 1.5.1 Схематичне зображення локуса *CSD* у медоносної бджоли *Apis mellifera* ілюструє розташування ключових доменів: аргінін/серин-багатий домен (RS-домен), гіперваріабельну область (*HVR*) та пролін-багатий домен (P-домен) (Hagan et al., 2023; Lechner et al., 2014).

Ще можна побачити появу однонуклеотидних поліморфізмів, які призводять до заміни амінокислот. Відомо, що еволюційні процеси, які призводять до великої варіації довжини *CSD* - *HVR*, відбуваються швидко в часі, за рахунок того що гіперваріабельна область (*HVR*), збагачена А / Т повторами і саме в цій ділянці можуть відбуватися процеси рекомбінації під час мейозу, а також можна побачити різні спонтанні мутації (Pinto et al., 2009). За рахунок цього, стає зрозуміло, що гіперваріабельна область (*HVR*) є тією ділянкою, яка може швидко накопичувати зміни в результаті високої частоти мутацій, можуть виникати нові алелі, які підтримують генетичну різноманітність (Zampakas et al., 2024).

Тільки нещодавно, стало відомо, роль мінливості *HVR* , що саме ця ділянка відрізняє алелі *CSD* генів та дозволяє уникнути інбридингу, тим самим підтримує здорову популяцію бджіл (Couton et al., 2023).

Зважаючи на таку високу генетичну різноманітність, кожен алель гена *CSD* має свої унікальні компоненти нуклеотидів, які можуть суттєво відрізнятися між популяціями бджіл з різних географічних регіонів. Ця варіативність є результатом еволюційних процесів, включно з мутаціями, генетичним дрейфом та природним добром. Велика кількість варіантів алелів *CSD* в одній популяції є результатом довготривалого еволюційного добору, спрямованого на забезпечення генетичної різноманітності та уникнення диплоїдних самців (Meixner et al., 2013).

1.6 Еволюція *CSD*-гену у медоносних бджіл

CSD-ген еволюціонував під впливом сильного природного добору, спрямованого на підтримання генетичної різноманітності популяції. Основний еволюційний рушій для такого процесу полягає у потребі уникати диплоїдних самців, які виникають у разі гомозиготності за *CSD*-геном (Büchler et al., 2024). До цих еволюційних процесів, які призвели до виникнення *CSD* гену можна віднести мутації та алельний поліморфізм, який передбачає багаторазові мутації у різних лініях бджіл сприяли виникненню різноманітних варіантів *CSD*-гену та селекцію, яка підтримує високу алельну різноманітність, що підвищує ймовірність появи гетерозиготних особин, що підвищують репродуктивний потенціал колонії (Leigh et al., 2021).

Ген *CSD* медоносних бджіл має еволюційні паралелі з іншими гаплодиплоїдними соціальними комахами, такими як оси та мурахи, хоча механізми можуть суттєво відрізнятися (Büchler et al., 2024). У мурах (*Formicidae*) система визначення статі також базується на гаплодиплоїдії, однак у більшості видів не виявлено аналогічного *CSD*-гену. Визначення статі у мурах часто регулюється комбінацією генетичних та епігенетичних факторів. У деяких видів мурах, статевий диморфізм визначається через множинні локуси, а

не через єдиний ген, як це відбувається у медоносних бджіл. У ос (*Vespidae*) визначення статі також слідує гаплодиплоїдному принципу, але механізми подібні до бджіл лише у деяких аспектах. У деяких видів ос визначення статі регулюється полігенними системами, де на це впливають декілька локусів, що створює більш складний і гнучкий механізм, ніж у бджіл з *CSD* (Mohankumar & Rajan 2023).

Оскільки бджоли є важливими запилювачами багатьох сільськогосподарських культур та дикорослих рослин, зміни у їх популяціях можуть мати серйозні екологічні наслідки. Якщо порушення гену *CSD* призводять до зниження ефективності колонії або зменшення чисельності бджіл, це може знизити рівень запилення рослин, що, в свою чергу, впливає на біорізноманіття та стабільність екосистем (Steinhage et al., 2007). Популяції, які мають низьку генетичну різноманітність через мутації у *CSD*-гена, стають більш вразливими до екологічних стресів, таких як зміни клімату, втрати середовища існування та пестициди. Низька алельна різноманітність зменшує здатність бджіл адаптуватися до нових умов середовища або хвороб, що може призвести до масової смертності і колапсу колоній (Hasselmann et al., 2010).

У популяціях із низькою різноманітністю однакові алелі можуть зустрічатися частіше, що збільшує ризик виникнення диплоїдних самців (Stevanovic et al., 2010). Така ситуація створює тиск на колонію для пошуку механізмів, що дозволяють збільшувати генетичну різноманітність, зокрема через поліандрію (Fridi et al., 2022). Спаровування з багатьма трутнями збільшує ймовірність, що потомство буде гетерозиготним за геном *CSD*, що мінімізує ризик виникнення диплоїдних самців. Мутації, що знижують поліандрію, можуть бути еволюційно несприятливими і призводити до посилення негативних наслідків, пов'язаних із гомозиготністю за *CSD* (Wanget et al., 2023).

Деякі популяції бджіл можуть розвивати еволюційні адаптації до мутацій у *CSD*, наприклад, через збільшення частоти поліандрії або розширення набору алелів, що підтримують життєздатність колоній. Це може включати механізми,

що дозволяють маткам або трутням «вибирати» партнерів із більшою генетичною різноманітністю або «уникати» спаровування з особинами, які мають однакові алелі *CSD*.

У невеликих популяціях або ізольованих колоніях, генетичний дрейф може призводити до втрати деяких алелів *CSD*, що теж збільшує ризик виникнення гомозиготних особин (Warmoes et al., 2012).

Одним із важливих факторів, що впливають на експресію генів у медоносних бджіл є температура. Зміна клімату, зокрема підвищення середніх значень температур, може змінювати функціонування *CSD*-гену як на молекулярному, так і на популяційному рівнях.

Один із механізмів впливу температури пов'язаний із процесом альтернативного сплайсингу. Альтернативний сплайсинг *CSD*-гену формує специфічні білкові ізоформи, які визначають функціональність статеві детермінації. Під впливом температурного стресу може спостерігатися порушення цього процесу, що призводить до змін у співвідношенні статей у колонії. Наприклад, у тепліших регіонах дослідження показали підвищену частоту розвитку трутнів, що може бути наслідком недостатньої експресії гетерозиготного стану *CSD*-гену (Becher et al., 2014).

Крім того, підвищення температури може змінювати частоту певних алелів *CSD*-гену у популяції. Це пояснюється тим, що стрес, спричинений температурними коливаннями, може вибірково впливати на життєздатність особин з різними алелями. Дослідження показали, що в умовах високої температури виживання бджіл із певними алелями знижується, що потенційно зменшує алельний поліморфізм у наступних поколіннях. Це, своєю чергою, може призвести до збільшення випадків гомозиготності та появи нежиттєздатного потомства, погіршуючи загальний стан популяції бджіл (Lechner et al., 2014).

Тривалий вплив високих температур також може зумовити зміщення природного балансу між статями у колонії, що негативно впливає на її продуктивність. Наприклад, надмірна кількість трутнів не лише зменшує

кількість робочих бджіл, але й створює конкуренцію за спаровування, яка може посилювати ризик інбридингу. У результаті колонії стають більш вразливими до зовнішніх загроз, таких як хвороби або хижаки. У світлі цих фактів стає очевидним, що моніторинг впливу температури на *CSD*-ген і підтримка високого алельного різноманіття є необхідними для збереження популяцій медоносних бджіл у контексті зміни клімату (Harpur et al., 2017).

Отже, структура та різноманіття *CSD*-генів у медоносних бджіл є результатом тривалого еволюційного процесу, що підтримується сильним природним добром. Генетична різноманітність, особливо високий рівень алельного поліморфізму, є ключовою для уникнення диплоїдних самців, які знижують репродуктивний потенціал колонії. У порівнянні з іншими гаплодиплоїдними комахами, такими як осі та мурахи, механізми визначення стану у бджіл є унікальними і тісно пов'язані з *CSD*-геном. Низька алельна різноманітність та мутації, що зменшують поліандрію, створюють популяцію бджіл більш вразливими до екологічних стресів і підвищують ризик колапсу колоній. Таким чином, підтримання генетичної різноманітності *CSD*-гену через поліандрію або адаптаційні механізми є фактором для стійкості бджолиних популяцій та стабільності екосистем, в яких вони є запилювачами.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Матеріал для досліджень

Об'єктом дослідження була українська степова бджола (*Apis mellifera macedonica*), яка є одним із найпоширеніших підвидів медоносної бджоли в Україні. Українська степова бджола характеризується високою медопродуктивністю, витривалістю до хвороб та добре адаптована до кліматичних умов регіону.

Зразки медоносних бджіл були зібрані в період активного медозбору (травень-липень) з племінної пасіки, що розташована в Хмельницькій області (Україна) та з пасіки, яка розташовується на горі Афон (Греція). Із кожного регіону було зібрано по 20-25 робочих бджіл із різних вуликів.

Таблиця 2.1.

Використаний для досліджень матеріал

Назва	Підвид (екотип)	Походження
A.M.UKR-KhM-2	<i>A.m. ssp</i>	м. Хмельницьк Україна
A.M.UKR-KhM-34	<i>A.m. ssp</i>	м. Ярмолинці, Україна
A.M.UKR-KhM-21	<i>A.m. ssp</i>	м. Хмельницьк Україна
A.M.UKR-KhM-7	<i>A.m. ssp</i>	м. Дунаївці Україна
A.M.MKD-1	<i>A.m. macedonica</i>	Греція
A.M.MKD-2	<i>A.m. macedonica</i>	Греція
A.M.MKD-3	<i>A.m. macedonica</i>	Греція

Для роботи з ядерним геномом було використано сиквеновані та опубліковані повні геноми *Apis mellifera* із бази даних NCBI (табл. 2.1).

Таблиця 2.2.

Повногеномні послідовності *Apis mellifera*, використані для вивчення
ядерних маркерів

Підвид	Посилання на запис NCBI BioSample	Додаткова інформація
<i>Apis mellifera</i>	SAMN09259743	Amel_HAv3.1, репрезентативний (референсний) геном медоносної бджоли
<i>Apis mellifera ligustica</i>	SAMN19090750	Походження: Китай, Чжедзян Зібраний із послідовностей геному 8 зразків бджіл
<i>Apis mellifera carnica</i> (Carniolan honeybee)	SAMN15487569	Походження: Китай, Цзілінь
<i>Apis mellifera mellifera</i> (German honeybee)	SAMN08947224	Походження: Франція, о. Уессан
<i>Apis mellifera caucasica</i> (Caucasian honeybee)	SAMN15487696	Походження: Китай, Цзілінь

2.2. Виділення ДНК

1. Підготовка реактивів:

Лізисний буфер СТАВ: Для приготування лізисного буфера СТАФ використати 4 г СТАВ (концентрація 20 г/л), 16,4 г NaCl (1,4 М), 3,15 г Трис-НCl (0,1 М), та 1,5 г Na₂EDTA (20 мМ).). Ці компоненти розчинити в 100 мл деіонізованої води, після чого рН довести до 8,0 за допомогою 1М NaOH. Об'єм розчину треба довести до 200 мл, після чого треба буде автоклавувати.

Буфер для осадження СТАВ : Додати 1 г СТАВ (концентрація 5 г/л) і 0,5 г NaCl (0.04М) на 100 мл деіонізованої води. Розчин довести до рН 8,0 за допомогою 1М NaOH і збільшити об'єм до 200 мл перед автоклавуванням.

Розчин NaCl (1,2 М) : 7 г NaCl розчинити в 100 мл деіонізованої води, після чого розчин автоклавувати.

2. Зразки подрібнити та гомогенізувати в суміші, що складалася з 1 мл лізисного буфера з додаванням PVP та 2% β-меркаптоетанолу. Гомогенізацію проводити за допомогою ступки і товкачика.

3. Отриманий гомогенат потрібно перенести у пробірки для мікроцентрифуги типу "епендорф" та інкубувати на водяній бані протягом 60 хв за температури 65°C.

4. Інкубований гомогенат центрифугувати протягом 10 хвилин. Після цього відібрати супернатант перенести в нову пробірку, до якої потрібно додати 500 мкл суміші фенолу з хлороформ-ізоаміловим спиртом у співвідношенні 1:1.

5. Центрифугувати протягом 10 хвилин, відібрати верхню фазу та перенести до чистої пробірки, де міститься 500 мкл хлороформ-ізоамілового спирту.

6. Знову провести центрифугування протягом 5 хвилин, після чого супернатант перенести в новий епендорф, додавши до нього два об'єми буфера для осадження СТАВ. Інкубувати протягом 60 хвилин.

7. Після чергового центрифугування протягом 5 хвилин супернатант був вилитий, а осад розчинений у 350 мкл 1,2 М розчину NaCl.

8. До пробірки додати 350 мкл хлороформу, зразок остаточно перемішати шляхом струшування протягом 30 секунд.

9. Після 10-хвилинного центрифугування верхній шар потрібно видалити, а осад розчинити в 0,6 об'єму ізопропанолового спирту, повторно перемішати зразок.

10. Після чергового 10-хвилинного центрифугування осад обробити 500 мкл 70% етанолу і знову перемішати струшуванням..

11 Видалити залишки етанолу осад і підсушити та розчинити в 100 мкл бідистильованої води.

12 Чистоту і цільність отриманої ДНК перевірити методом електрофорезу на агарозному гелі (концентрація гелю – 1,5%).

2.3 Електрофорез ДНК в агарозному гелі

1. Для початку проведення методи потрібно приготувати 500 мл однократного буфера TBE (TBE), відповідно до якого введіть 0,089 М трисборат, 0,089 М борну кислоту та 0,002 М EDTA.

2. Відміряйте певну кількість агарози, яка необхідна для приготування 30 мл 1,5% гелю, після чого всипте агарозу в колбу, додайте 26 мл дистильованої води та 4 мл 5x TBE.

3. Відкрийте колбу фольгою, щоб уникнути випаровування, та нагрійте розчин до повного кипіння. Після кожного закипання обережно перемішуйте розчин, поки агароза повністю не розчиниться.

4. Розчин охолодити до температури 50–55°C, додайте 15 мкл бромистого етидію для досягнення кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл.

5. Зберіть форму для заливання гелю, влийте туди розчин агарози і швидко вставте гребінки, щоб створити лунки для зразків. Дочекайтеся, поки агароза повністю застигне, утворивши щільний гель.

6. Після застигання гелю перенесіть форму в прилад для електрофорезу і залийте однократним буфером TBE, щоб він покрити гель приблизно на 0,5 см. Обережно витягніть гребінки, залишаючи неушкоджені лунки для внесення зразків.

7. Для кожної проби ДНК змішайте 4 мкл зразка з 4 мкл завантажувального буфера. Завантажувальний буфер забезпечує видимість зразків при нанесенні та містить барвники, які допомагають контролювати вихід електрофорезу.

8. Обережно внесіть шкірну пробку ДНК в лунки гелю, стежачи, щоб лунки залишилися неушкодженими.

9. В одну з лунок додайте ДНК-маркер (наприклад, GeneRuler™ DNA Ladder Mix #0331), який слугуватиме для порівняння розмірів фрагментів ДНК.

10. Розкрийте електрофоретичну камеру кришкою і приєднайте до блоку живлення, перевіривши полярність: катод повинен бути з'єднаний з негативним полюсом, а анод — з позитивним.

11. Проведіть електрофорез при напрузі електричного поля 5 В/см. Слідкуйте за барвником у завантажувальному буфері — коли він пройде близько 2/3 довжини гелю, електрофорез можна завершити.

12. Після завершення електрофорезу обережно перенесіть агарозний гель на чисте скло транс-ілюмінатора. Ультрафіолетове освітлення дозволяє візуалізувати смуги ДНК, які можна задокументувати та зробити фотографію.

13. Після роботи знову промийте камеру для електрофорезу дистильованою водою, щоб видалити залишки буфера та реагентів, і поставте на спеціальний піднос для просушування.

2.4 Ампліфікація ДНК

Отримані під час виділення зразки ДНК були використані для проведення ампліфікації ділянки гена *CSD* за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Склад реакційної суміші розрахувати відповідно до інструкції, зазначених у паспорті полімерази “Hot Fire Pol”, що забезпечує високу специфіку та ефективність при роботі з такими типами зразків. Для збереження активності реагентів та усунути деградацію ДНК усі компоненти суміші готувати в спеціальному охолоджену штативі, який був попередньо охолоджений до низької температури. Загальний об’єм реакційної суміші становить 20 мкл (таблиця 2.3.1).

Таблиця 2.3.1

Схема компонентів реакційної суміші в порядку змішування.

Компоненти	Об’єм (мкл)
H ₂ O бідистильована	15,3
10x ПЛР – PCR-buffer	2
0.75 Mm MgCl ₂	0,4
0.2 Mm dNTP	0,4
Primer 1(25 мкМ)	0,4
Primer 2(25 мкМ)	0,4
Розчин ДНК (50 нг/мкл)	1
ДНК-полімераза Hot Fire Pol	0,1

Для реакції використати дві пари Set1 та Set2, вони є комплементарними до 6-го та 8-го екзонів гена *CSD*. Ці праймери вибрані для цільового посилення окремих ділянок гена, що дозволяє отримати чітке і точне ампліфікаційне покриття (таблиця 2.3.2)

Таблиця 2.3.2

Нуклеотидні послідовності праймерів які були використані у дослідженнях

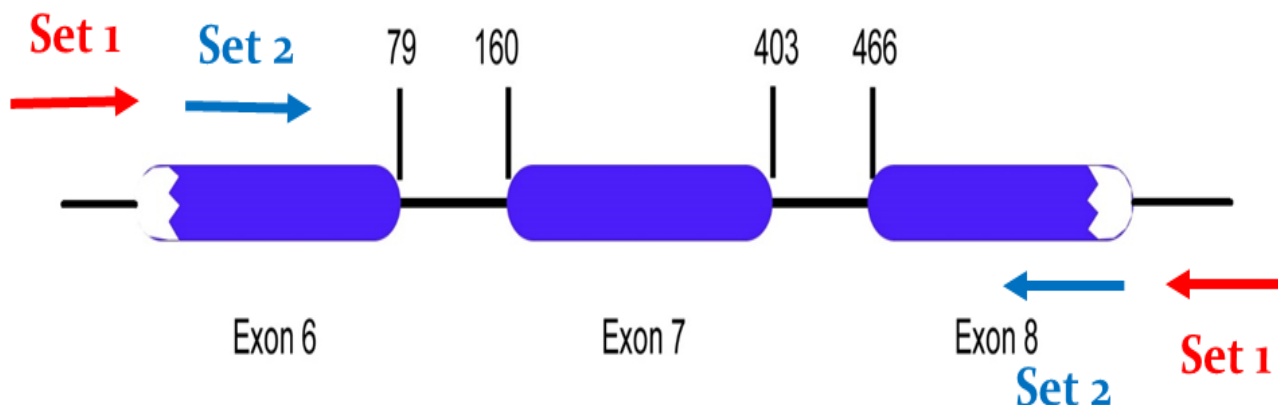
Set1

F1 CSD10984 (CS-84)	5'-AGA CGA TAT GAA AAA TTA CAC AAT GA-3'
R1 CSD8657 (CS-57)	5'-CCT AAA TCT TGG TAT TTG TTC TT-3'

Set2

F2 CSD8110	5'-ACA ATG AAA AAG AAA AAC TTT TAG A-3',
R2 CSD8695	5'-GGA ATG AAT CGT GGA AAT GG-3';

Рисунок 2.3.1 Схематичне зображення 6-го та 8-го екзонів.



Процес ампліфікації проводився на ампліфікаторі PTC-100 (MJResearch, Inc., США), що забезпечує точний контроль температурних циклів. Параметри термоциклера, а саме температура денатурації, відновлення та подовження ланцюга, мають бути оптимізовані для ефективної ампліфікації необхідного фрагмента ДНК (таблиця 2.3.3).

Температурний профіль режиму ампліфікації

№	Температура	Тривалість етапу	Характеристика етапу
1	95°C	4 хв	Гарячий старт ферменту та початкова денатурація ДНК
2	95°C	30 сек	Денатурація ДНК
3	46°C	1 хв	Гібридизація праймера
4	71°C	1 хв 10 сек	Синтез ниток ДНК
5	Повторення 4 рази етап 2-4		
6	95°C	30 сек	Денатурація ДНК
7	51°C	1 хв	Гібридизація праймера
8	72°C	1 хв 10 сек	Синтез ниток ДНК
9	Повторення 30 разів етап 6-8		
10	72°C	7 хв	Завершення ампліфікації

Очистка ПЛР-продуктів

1. До ПЛР-продукту додайте таку кількість суміші хлороформу та ізоамілового спирту у співвідношенні 24:1. Після додавання остаточної суміші перемішайте, щоб забезпечити ефективне відокремлення компонентів. Далі центрифугуйте зразок протягом 5 хвилин, після чого акуратно відберіть верхню (водну) фазу в чисту пробірку. Повторіть цей процес двічі для кращої очистки.

2. Отриману водну фазу перенесіть у чисту пробірку типу "епендорф" і додайте 2 об'єми 96% етанолу. Розчин залишку при температурі -20°C на ніч для ефективного осадження ДНК..

3. Після нічної інкубації центрифугуйте зразок протягом 10 хвилин. Після цього обережно злийте супернатант, щоб не зачепити осад ДНК, який залишився на дні пробірки.

4. Осад підсушити в термоблоці при температурі 37°C, запах спирту не зникне. Це гарантує, що залишки етанолу повністю випаровуються і не включаються на подальший дослід.

5. Осад ДНК розчинити в 11 мкл бідистильованої води, щоб підготувати зразок до подальшого використання.

6. Аналіз очищених ПЛР-продуктів виконайте методом електрофоретичного розділення на 2% агарозному гелі. Це дозволить перевірити цілість та якість очищених ДНК-продуктів.

2.5 Кількісна оцінка очищених ПЛР-продуктів

Концентрацію ДНК в 1 мкл очищеного ПЛР-продукту визначали шляхом порівняння інтенсивності флуоресценції смуги досліджуваних зразків і маркерної ДНК під ультрафіолетовим світлом. Для аналізу використовували систему Gel-Doc з відповідним програмним забезпеченням, що дозволяє вимірювати інтенсивність світу (BioRad, США). Під час обчислення враховували корекційні параметри, такі як довжина ДНК-фрагментів, фонове життя та концентрація ДНК у маркері. Це забезпечує точні дані про концентрацію ДНК у зразках для подальших молекулярних досліджень.

2.6. Лігування ПЛР-продукту у вектор

Лігування проводили за методикою, що використовується для ПЛР-продуктів із «липкими» кінцями (однонитчасті ділянки на кінцях молекули ДНК) з використанням системи клонування CloneJET.

1. Змішати у мікропробірці 1 мкл ПЛР-продукту, 2.5 мкл двократного реакційного буферу, 1.75 мкл бідистильованої води та 0.25 мкл Blunting Enzyme

2. Інкубати отриману суміш при температурі 70°C протягом 5 хвилин, щоб забезпечити утворення тупих кінців на молекулі ДНК.

3. Додати у суміш 0.25 мкл вектору pJET та 0.25 мкл лігази T4

4. Інкубати реакційну суміш при 22°C протягом 1 години, що дозволяє ефективно зв'язувати ПЛР-продукт із вектором.

5. Після інкубації додати 5 мкл бідистильованої води для збільшення об'єму водної фази.

6. Додати 10 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту (співвідношення 24:1), щоб видалити небажані домішки з реакційної суміші.

7. Центрифугувати суміш протягом 10 хвилин, щоб розділити водну і органічну фази.

8. Акуратно відібрати 7-8 мкл верхньої водної фази, яка містить лігований продукт, готовий до подальшого використання.

2.7. Трансформація компетентних клітин *E. coli* методом електропорації

1. Розморозити компетентні клітини *E. coli* на льоду та додати 1-2 мкл лігового ПЛР-продукту.

2. Акуратно перемішати суміш за допомогою піпетки та перенести її у попередньо охолоджену кювету для електропорації. Розмістити кювету у прилад для електропорації *E. coli* Pulser (BioRad, США)

3. Провести електропорацію при напрузі 2.5 квт

4. Після електропорації додати 500 мкл середовища LB до вмісту кювети

5. Інкубувати суміш при температурі 37 °C протягом 45-60 хвилин.

6. Центрифугувати пробу протягом 5 секунд при 10 000 обертів за хвилину.

7. Злити 300 мкл надосадової рідини, ресуспендувати клітини та висіяти їх на чашку Петрі з агаризованим середовищем LB, що містить ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

8. Інкубувати чашки Петрі при температурі 37 °C протягом 8 годин або до появи колоній.

2.8. Скринінг колоній

1. Пронумерувати колонії на вихідній чашці Петрі та підготувати нову чашку з агаризованим середовищем, розділену на секції з відповідною нумерацією для пересадки колоній.

2. Підготувати епендорфи та додати ПЛР-суміщ для проведення ПЛР-реакції. Використати праймери pJET For-Rev для ампліфікації цільового фрагменту.

3. За допомогою стерильного наконечника піпетки або стерильної зубочистки відібрати одну колонію та перенести її на нову чашку Петрі, створивши копію колонії. Той самий наконечник або зубочистку опустіть в епендорф з ПЛР-сумішшю, ретельно перемішати вміст, після чого автоклавувати використаний інструмент.

4. Повторити процедуру для всіх відібраних колоній, використовуючи окремий наконечник або зубочистку для кожної з них..

5. Провести ПЛР-ампліфікацію, після чого виконати електрофорез на агарозному гелі для візуалізації продуктів ампліфікації. Визначте колонії, що містять фрагмент потрібної довжини для подальшого аналізу.

2.9. Виділення плазмідної ДНК

1. Вибрані колонії *E. coli*, що мають вставку потрібної довжини, перенесіть стерильною зубочисткою або наконечником піпетки у пробірку з 5 мл рідкого середовища LB, додавши ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

2. Інкубувати 16 годин при 37 °C на шейкері.

3. Центрифугувати культуру протягом 30 хв при 400g

4. Злити надосадову рідину, залишивши осад бактеріальних клітин, додати 100 мкл буферу S1 (50мМ глюкози, 25мМ трис HCl, 10Мм EDTA, pH 8,0), перенести у мікропробірки

5. Додати 200 мкл буферу S2 (20% SDS, 1 M NaOH)

6. Перемішати, інкубувати 5 хв при кімнатній температурі

7. Додати 150 мкл буферу S3 (3М ацетат калію, 5М оцтова кислота)

8. Перемішати, інкубувати на льоду 5 хв

9. Центрифугувати 10 хв за 11000g

10. Відібрати супернатант в чисту мікропробірку, додати 1 мл 96% етанолу, перемішати, залишити в морозильнику мінімум на 30 хв

11. Центрифугувати 10 хв при 11000g
12. Злити супернатант, підсушити осад протягом 15-20 хв при температурі 37°C
13. Розчинити осад у 100 мкл бідистильованої води
14. Додати рівний об'єм 5М амоній ацетату, центрифугувати 10 хв при 11000g
15. Відібрати супернатант, додати 0.6 об'єму ізопропанолу, центрифугувати 10 хв при 11000g
16. Відібрати супернатант, промити осад 500 мкл 80% етанолу. Центрифугувати 10 хв при 11000g
17. Відібрати супернатант, підсушити осад протягом 15-20 хв при температурі 37°C
18. Розчинити осад у 100 мкл буферу TE
19. Для проведення ПЛР розвести розчин у 100 разів, для проведення електрофорезу – у 10 разів

2.10. Секвенування

Після проведення ПЛР, отримані ПЛР-продукти були очищені від залишків реактивів та побічних продуктів і саме після процедури очистки, ПЛР-продукти були підготовлені до секвенування за Сенжером за протоколом, яка надавала організація, що проводить секвенування.

2.11. Робота з нуклеотидними послідовностями

Ідентифікація отриманих послідовностей здійснювали порівняння з базами GenBank за допомогою онлайн-сервісу NCBI BLAST Зразок вважався ідентифікованим, якщо відсоток збігу з еталонними послідовностями становив близько 96%. Для визначення певних мутацій, поліморфізмів та подальше аналізування з побудуванням філогенетичних дерев послідовностей дослідних зразків було проведено вирівнювання послідовностей за допомогою програми MegAlign з пакету програм Lasergene та DNASTar.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Поліморфізм довжин CSD генів.

Першим етапом проведення роботи було проведення екстракції нативної ДНК з досліджуваних зразків *Apis mellifera*.

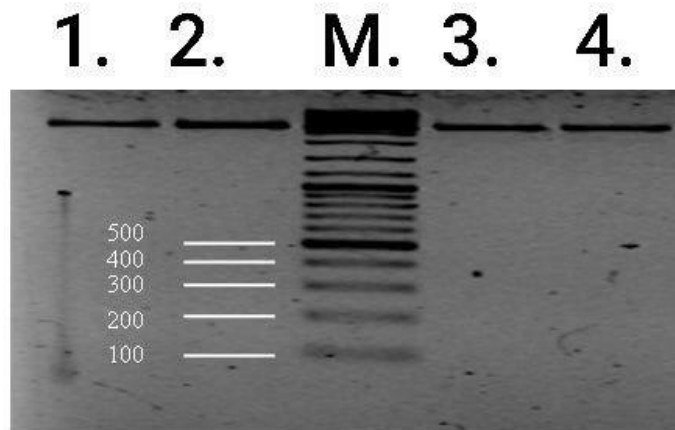


Рисунок 3.1.1. Електрофореграми нативної ДНК *A. mellifera*. Зразки 1. А.М.UKR-KhM-7, 2. А.М.UKR-KhM-21, 3. А.М.UKR-KhM-2, 4. А.М.UKR-KhM-34

На зразках, які були отриманні під час екстракції ДНК, було проведено ампліфікацію за допомогою ПЛР. Для ампліфікації використовували полімеразу “Hot Fire Pol” та дві пари праймерів Set1 та Set2 для успішного проведення ампліфікації. Праймери є комплементарними до 6 та 8 екзонів гену *CSD*.

Результати електрофорезу показали, що ПЛР- продукти, які утворилися під час ампліфікації були переважно однакового розміру.

Часткові результати електрофоретичного розділення ПЛР-ампліфікатів представлені на рисунку 3.1.2.

Отже, отримані ПЛР-продукти практично не відрізнялись за довжинами не демонструючи явного поліморфізму довжин.

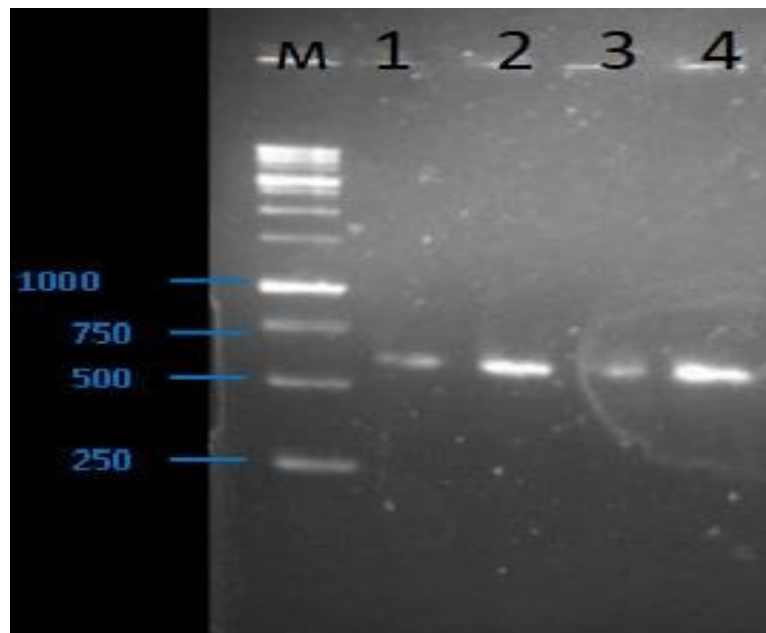


Рисунок 3.1.2. Електрофореграма ПЛР-продуктів: М – маркер 1 kb DNA Ladder. Зразки 1. А.М.UKR-KhM-7, 2. А.М.UKR-KhM-21, 3. А.М.UKR-KhM-2, 4. А.М.UKR-KhM-34

3.2 Клонування ПЛР-продуктів *CSD*-гена в плазмідний вектор та трансформація в клітини *E. coli*

Після успішної ампліфікації *CSD*-гена нами було проведено очистку ПЛР-продуктів від залишків праймерів, dNTPs, буферів та ферментів. Очистка ПЛР-продуктів покращує ефективність лігування. Після очистки ПЛР-продуктів, зразки були введені в плазмідний вектор pJet тим самим була створена рекомбінантна ДНК, яка складалася з вектору та ПЛР-продукту.

Наступним етапом клонування було введення ПЛР-продуктів шляхом електропорації в компетентні клітини *E. coli*. Надалі трансформанти висівались на поживне середовище LB, в яке було попередньо додано ампіцилін. Після висівання чашки Петрі були встановлювались в термостат на 12-16 годин при температурі 37 °C. Через добу, можна було спостерігати колонії бактерій, які вирости на середовищі. Для подальшої роботи нами було обрано 7 колоній. Ці колонії містили рекомбінантні плазміди, і тому були резистентні до антибіотика в середовищі.

Проведений пізніше скринінг плазмід за допомогою ПЛР дозволив отримати ампліфікати, які мали розмір близько 750-и пар нуклеотидів, що відповідало очікуваній довжині рекомбінантної плазмід.

Після скринінгу було отримано 7 клонів, які в подальшому були просеквеновані та проаналізовані. Такі дії дозволили уточнити структурні особливості генів, зокрема, ідентифікувати ділянки з однонуклеотидними поліморфізмами (SNP) і визначити консервативні та варіабельні області в межах генетичного матеріалу. На основі отриманих даних проведено порівняльний аналіз клонів із секвенованими раніше геномами, що зберігаються у відкритих базах даних, таких як GenBank (див. Табл. 2.2). Це дозволило не лише ідентифікувати подібності та відмінності, але й оцінити рівень генетичної різноманітності. Отримані результати також сприяли формуванню гіпотез щодо функціональної ролі виявлених варіацій у розвитку бджіл і регуляції *CSD*-гена.

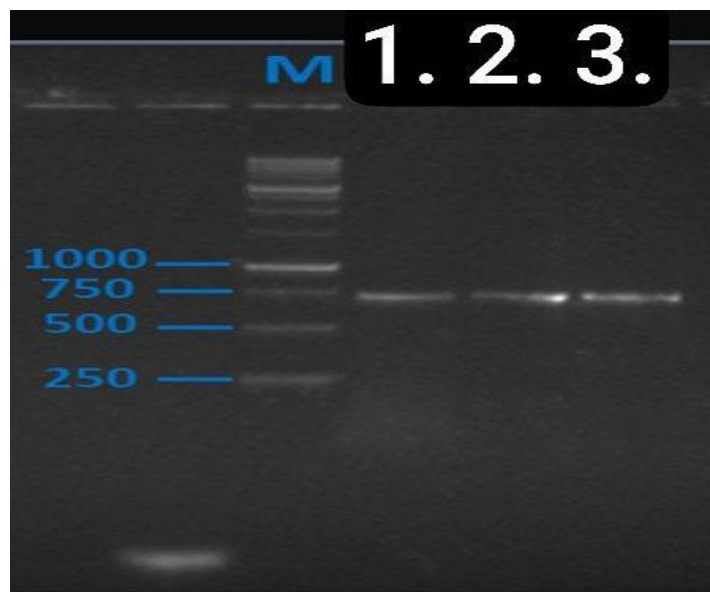


Рисунок. 3.2.3. Результати скринінгу рекомбінантних плазмід отриманих при клонуванні ділянок *CSD* : М – маркер 1 kb DNA Ladder. Зразки 1. А.М.МКД-1, 2. А.М.МКД-2, 3. А.М.МКД-3

3.3 Поліморфізм *CSD* генів медоносних бджіл

Після секвенування, послідовності досліджуваних генів були порівнянні з аналогічними послідовностями інших підвидів медоносних бджіл із бази даних

GenBank: *A.m. mellifera*, *A.m.carnica*, *A.m. anatoliaca* та *A.m. caucasica* (див. табл. 2.2)

Для проведення порівняння та аналізу даних нуклеотидні послідовності вирівнювали, що дозволило встановити ступінь схожості між досліджуваними зразками. Виявлені відмінності між послідовностями були здебільшого пов'язані або з одонуклеотидним поліморфізмом, який спостерігається відносно рівномірно на аналізованих послідовностях. Крім одонуклеотидного поліморфізму спостерігаються і сильніші відмінності між послідовностями, проте всі вони знаходяться у HVR ділянці 7-го екзона (див. Розділ 3.3.1).

На сьогоднішній день немає інформації, що описує специфічні набори ОНП, які могли би бути характерними для різних родин *CSD* медоносних бджіл. Тому подальший етап нашого дослідження полягав в порівнянні послідовностей *CSD*-генів. Для цього ми використовували як анотовані, так і не анотовані геноми, які доступні в базі GenBank та порівнювали з ідентифікованими нами послідовностей *CSD*-генів.

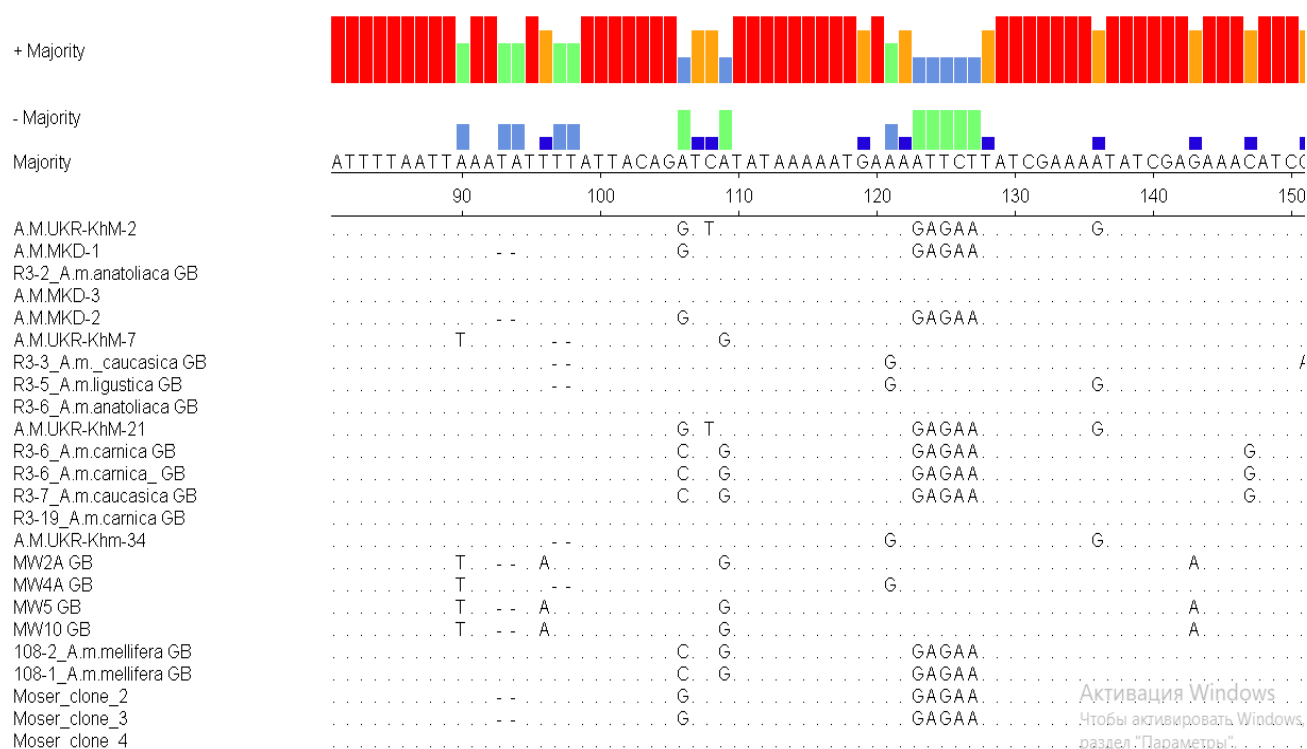


Рисунок 3.3 Одонуклеотидний поліморфізм вирівняної ділянки *CSD* медоносних бджіл. Алгоритм вирівнювання Clustal W.

Аналіз вирівнювання порівнюваних *CSD* (рис. 3.3) показав, що однонуклеотидний поліморфізм дає можливість відрізняти різні типи послідовностей між собою.

3.3.1 Аналіз структури екзонів гена *CSD*

На рисунку 3.3, відображено вирівнювання нуклеотидних послідовностей ділянки *CSD* гена (6 екзон), у кількох представників медоносних бджіл різних підвидів, включаючи *A.m. mellifera*, *A.m. macedonica*, *A.m. anatoliaca*, *A.m. caucasica*, *A.m. ligustica*, та *A.m. carnica*. Загалом було порівняно 6-й, 7-й та 8-й екзон та два інтрони, які розташовуються між ними. Також вирівнювання нуклеотидних послідовностей дає можливість визначити основні типи *CSD* генів на основі виявлених мутацій. У результаті вирівнювання встановлено, що більшість зразків демонструють високий рівень подібності, однак між ними спостерігаються однонуклеотидні поліморфізми. Аналіз показав, що основні мутації представлені транзиціями (переходами між пуринами або між піримідинами), що є типовим для природного добору і адаптаційних процесів. У наших зразках А.М.УКР-KhM-2 і А.М.УКР-KhM-7 зафіксовано транзицію, де у консенсусній послідовності Т замінений на Г. У зразків А.М.МКД-1 і А.М.МКД-3 спостерігається аналогічна транзиція, яка може свідчити про функціональну адаптацію в межах популяції.

Поліморфізм 6-го екзону досліджуваних *CSD*-генів. Представлений аналіз на рисунку 3.3.3 6-го екзону гена *CSD* виявив значну відмінність між різними зразками. Варто звернути увагу на заміну нуклеотиду Г на Т у зразках А.М.УКР-KhM -2 у першій позиції. Також помітні вставки та делеції нуклеотидів у зразках А.М.МКД -3 та А.М.УКР-KhM-7, що можна вказувати на їх регіональну адаптацію. Однонуклеотидні поліморфізми спостерігаються в багатьох позиціях, але найбільш виразні мутації представлені в позиції 30 та 70. Цікаво, що у зразках А.М.УКР-KhM -34 і А.М.УКР-KhM -21 виявлені ідентичні варіанти мутацій, що показали про їх можливе спільне походження. Особливої уваги заслуговує позиція 55, де різна заміна нуклеотиду А на Г лише

в одному зразку. Це можна вказувати за наявності локальної генетичної модифікації.

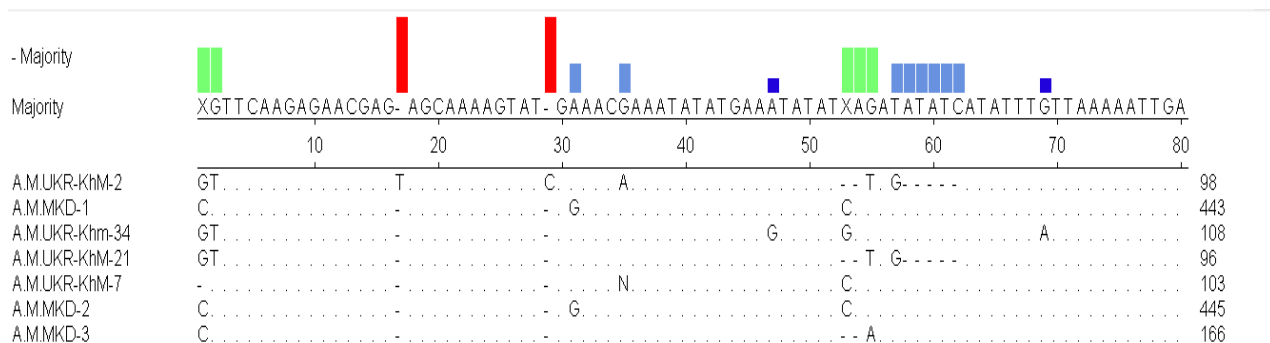


Рисунок 3.3.3 Аналіз вирівнювання 6-го екзону гену CSD у різних зразках *A.m. macedonica*.

На основі послідовностей 6-го екзона було побудоване дендрограму (рис 3.3.4), яка показує еволюційні дистанції між зразками *A.m. macedonica* що отримані з Греції та використані як еталонні зі зразками взятими з племінного господарства де культивують українських степових бджіл. Побудовані на основі аналізу 6-го екзону гена CSD вирівнювання (зразки A.M.UKR-Khm-2, A.M.UKR-Khm-21, A.M.UKR-Khm-34, A.M.UKR-Khm-7) демонструють лише точкову поліморфність окремих нуклеотидів. У межах українських бджіл чітко видно подібну пару — A.M.UKR-Khm-2 та A.M.UKR-Khm-21, бо вони розташовуються в близьких позиціях за результатами дендрограми 6-го екзону. Це може вказувати на мінімальні мутаційні зміни в межах цієї частини гена, що підтверджує стабільність генетичного профілю певної популяції української степової породи. Щодо зразків, які були зібрані з гори Афон, вони також демонструють високу схожість між собою, особливо A.M.MKD-1 та A.M.MKD-2, які формують тісний кластер. Їхня еволюційна дистанція мінімальна, що впливає на низький рівень генетичної дивергенції в цій групі.

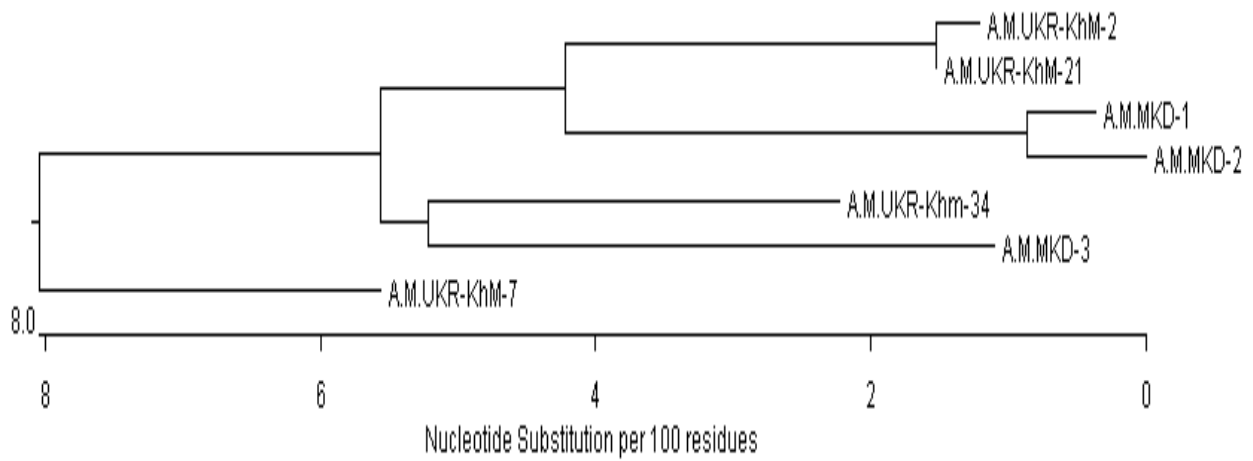


Рисунок 3.3.4 Дендрограма еволюційних дистанцій досліджуваних видів побудована на основі послідовності *CSD* 6-го екзону

Результати аналізу послідовності 6-го екзону підтвердили очікувану між зразками подібність (рис.3.3.5). Найвищий рівень подібності (93,4%) виявлено між зразками A.M.UKR-KhM-2 та A.M.UKR-KhM-34, що показує високу генетичну спорідненість між представниками української степової породи. Схожість на рівні понад 90% також разом з іншими зразками цієї породи, зокрема між A.M.UKR-KhM-2 та A.M.UKR-KhM -21, а також між A.M.UKR-KhM-34 та A.M.UKR-KhM-21. Ці результати підтверджують генетичну цільність та стабільність популяції української степової бджоли.

Натомість зразки, які були зібрані з грецької пасіки демонструють значно нижчий рівень схожості з українськими бджолами. Наприклад, ідентичність між A.M.MKD-1 і A.M.UKR-KhM-2 становить лише 6,8%, а між A.M.MKD-3 та A.M.UKR-KhM-7 – 9,5%. Водночас вони характеризуються високою спорідненістю між собою. таким чином, між зразками A.M.MKD-1 та A.M.MKD-2 подібність становила 93,1%, що демонструє генетичну єдність цієї популяції.

Зразок A.M.UKR-KhM-7 характеризується певною унікальністю, адже рівень його схожості з грецькими зразками є нижчим порівняно з іншими представниками української степової породи. Це можна свідчити про більш виражену дивергенцію або особливі особливості цього генотипу.

Percent Identity							
1	2	3	4	5	6	7	
	93.3	92.2	99.4	90.4	93.1	92.7	1 A.M.UKR-Khm-2
		92.1	93.1	90.8	98.7	90.1	2 A.M.MKD-1
			92.2	91.8	91.7	92.8	3 A.M.UKR-Khm-34
				90.4	92.9	92.5	4 A.M.UKR-Khm-21
					90.6	90.9	5 A.M.UKR-Khm-7
						89.6	6 A.M.MKD-2
							7 A.M.MKD-3

Рисунок 3.3.5 Схожість 6-го екзону *CSD* серед досліджених зразків

A.m.macedonica

Поліморфізм 7-го екзону досліджуваних *CSD*-генів. Аналіз вирівнювання послідовностей 7-го екзону гена *CSD* у досліджуваних послідовностях показав (рис. 3.3.7) значну генетичну варіабельність між зразками. Варто зазначити, що *HVR*-ділянка (гіперваріабельний регіон) знаходиться в межах приблизно від 25-го до 70-го нуклеотиду. У цій області видно найбільшу кількість змін, включаючи однонуклеотидні заміни (SNP), вставки та делеції, які чітко відрізняють зразки. У зразках було виявлено значну кількість SNP, наприклад, у позиції 48 спостерігається заміна Т на С у зразка А.М.МКД-2. У позиції 62 у зразка А.М.МКД-1 зафіксовано заміну А на Т, а у зразка А.М.МКД-3 у тій же позиції на G. У зразку А.М.МКД-2 у позиціях 63–65 спостерігається вставка послідовності "TGACCTG", якої немає в жодному іншому зразку. Також у зразку А.М.УКР-КхМ-7 у межах позицій 58–59 виявлена вставка "TTCA", що може бути специфічною для окремої популяції української степової бджоли. У зразку А.М.МКД-1 виявлено делецію в позиціях 64–65, де відсутня пара нуклеотидів АТ, наявних у інших послідовностях. У А.М.МКД-2 зафіксована інша делеція в позиціях 61–62, що відображає наявність молекулярних змін у цій ділянці.

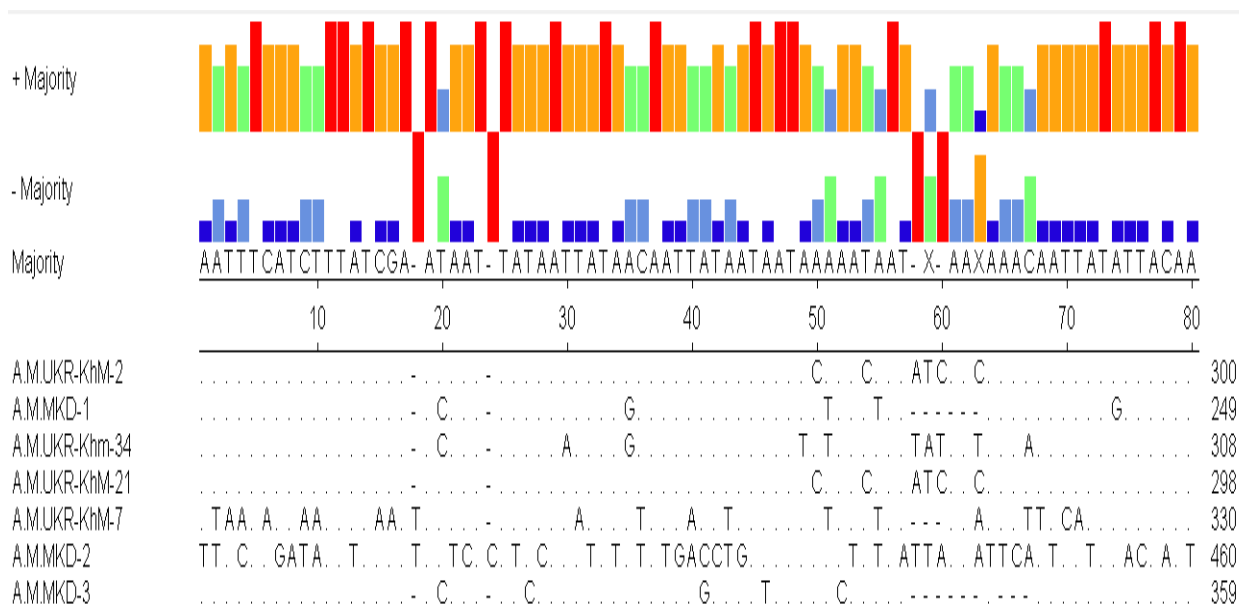


Рисунок 3.3.7 Аналіз вирівнювання фрагменту 7-го екзону гену *CSD* у різних зразках *A.m.macedonica*. Clustal W.

Percent Identity							
1	2	3	4	5	6	7	
	93.4	90.5	100.0	85.7	50.3	92.6	1 A.M.UKR-Khm-2
		94.1	93.4	84.4	48.3	90.1	2 A.M.MKD-1
			90.5	82.6	48.4	92.6	3 A.M.UKR-Khm-34
				85.7	50.3	92.6	4 A.M.UKR-Khm-21
					51.0	81.5	5 A.M.UKR-Khm-7
						48.6	6 A.M.MKD-2
							7 A.M.MKD-3

Рисунок 3.3.8 Схожість 7-го екзону *CSD* серед досліджених представника *A.m.macedonica*

Було проведено порівняльний аналіз рівнів ідентичності між зразками за 7-м екзону (рис.3.3.8). Аналіз підтвердив очікувану низьку подібність, оскільки 7-й екзон містить в собі варіабельну ділянку *HVR*. Найвищу подібність

спостерігається між А.М.UKR-Khm-2, А.М.MKD-1 і А.М.UKR-Khm-34, де значення сягають 93.4–94.1%. Найменша ідентичність спостерігається між А.М.MKD-3 і більшістю зразків (7.8–21.3%), за винятком А.М.MKD-2 (86.7%).

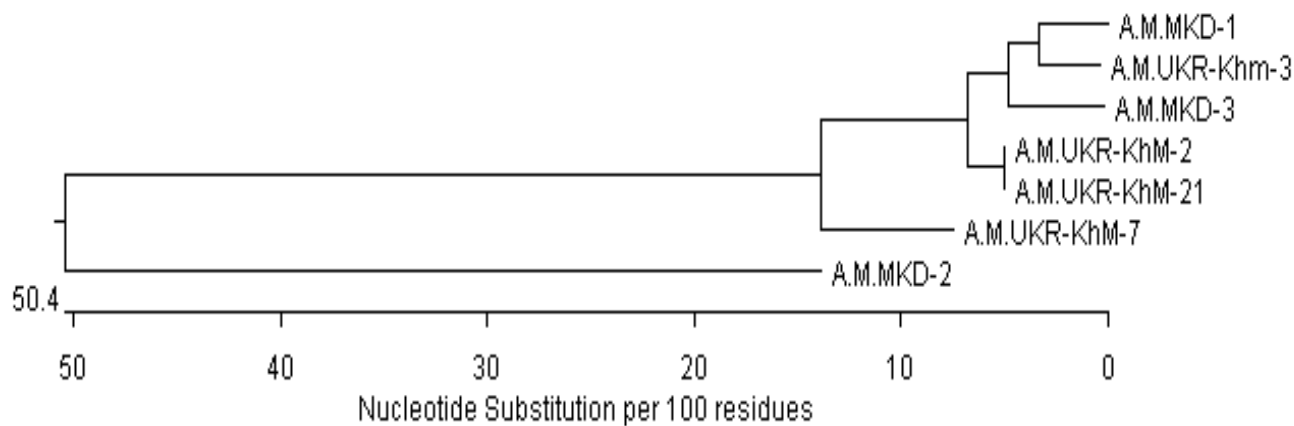


Рисунок 3.3.9 Дендрограма еволюційних дистанцій досліджуваних зразків побудована на основі послідовності *CSD* 7-го екзону

На основі даних про 7-й екзон побудована дендрограма, яка демонструє рівень генетичної спорідненості між досліджуваними зразками." (рис. 3.3.9). Ми спостерігаємо, що зразки групуються в три основні кластери. Перший кластер об'єднує зразки, А.М.UKR-Khm-34 та А.М.MKD-3, які мають високу генетичну подібність один до одного. Другий кластер складається з зразка А.М.UKR-Khm-2, який хоча і має деяку схожість з першою групою, все ж займає окреме місце на дендрограмі. Третій кластер включає зразки А.М.UKR-Khm-7 та А.М.MKD-2, А.М.MKD-1, які демонструють високу спорідненість між собою, але є віддаленими від решти зразків. Зразок А.М.UKR-Khm-21 займає окрему позицію на дендрограмі, що вказує на його значні генетичні відмінності від інших зразків.

Поліморфізм 8-го екзону досліджуваних *CSD*-генів. Нарешті нами було проаналізовано восьмий екзон гена *CSD*, і результати демонструють його високу консервативність (рис.3.3.10). Більшість нуклеотидних позицій зберігають консервативність що свідчить про важливість цього екзона для функціонування гена. Проте, серед консервативних послідовностей були виявлені кілька варіабельних нуклеотидних позицій, серед яких заміни (позиції

28, 50), делеції (позиції 15, 48) та інсерції (позиція 74). Отже, можна зробити висновок, що найбільш придатними для ідентифікації варіантів *CSD* генів слугують саме 6-й та 7-й екзони.

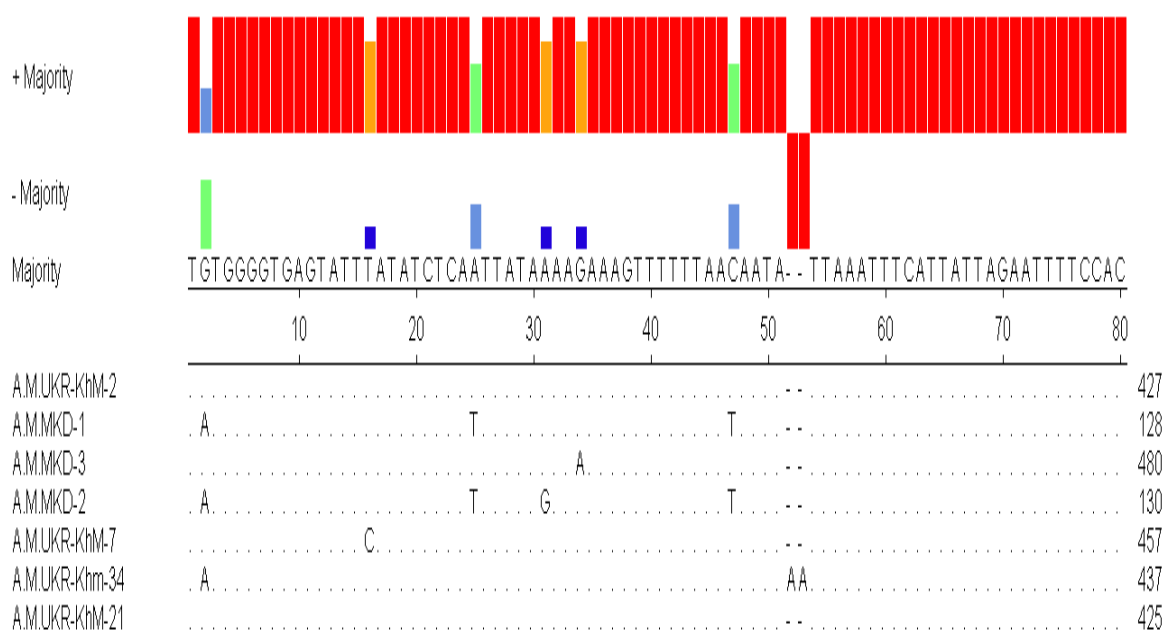


Рисунок 3.3.10 Аналіз вирівнювання 8-го екзону гену *CSD* у різних зразків *A.m.macedonica*. Clustal W

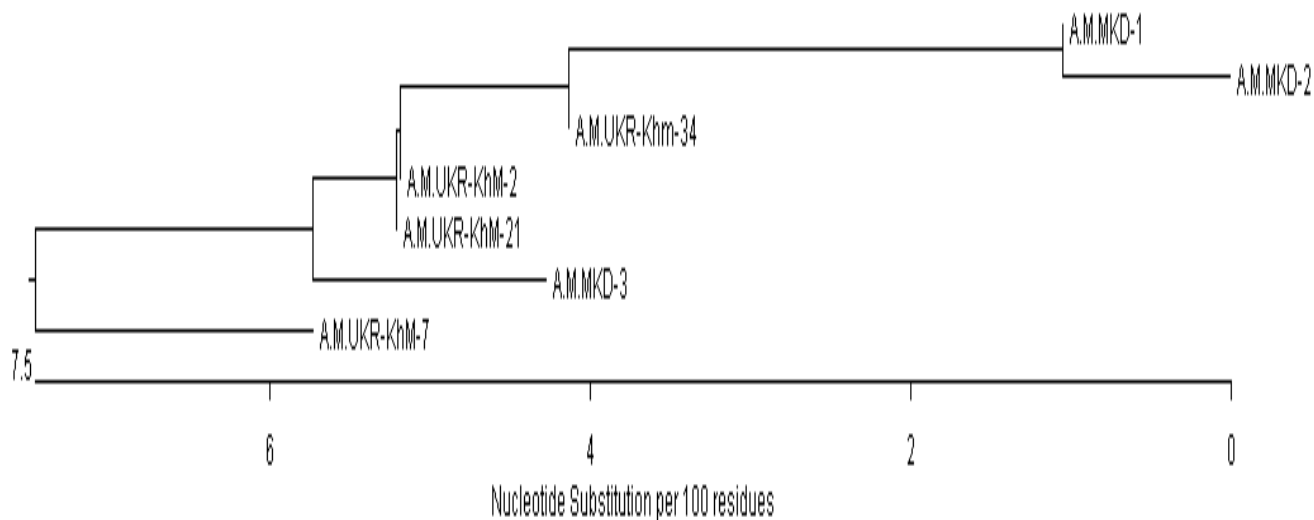


Рисунок 3.3.11 Дендрограма еволюційних дистанцій досліджуваних видів побудована на основі послідовності *CSD* 8-го екзону

Також було побудовано дендрограму (рис.3.3.11), яка свідчить про те, що восьмий екзон гена *CSD* демонструє чіткий поділ на кілька кластерів, що відображає генетичну спорідненість між зразками. Перший кластер утворюють А.М.МКД-1 і А.М.МКД-2, які мають мінімальну генетичну дистанцію, вказуючи на їх високу подібність. Другий кластер складається із зразків А.М.УКР-Кhm-34 і А.М.МКД-3, які мають помірний рівень відмінностей, проте залишаються близькими. Окрему кладу формують А.М.УКР-Кhm-2 та А.М.УКР-Кhm-21, що демонструють високу спорідненість між собою, але є віддаленішими від інших кластерів.

Зразок А.М.УКР-Кhm-7 займає окрему позицію на дендрограмі, що свідчить про значну кількість унікальних нуклеотидних замін та його відокремленість від інших груп.

3.4 Типування досліджуваних медоносних бджіл за *CSD* генами

У цьому розділі досліджено особливості локалізації *CSD*-генів у шостому та восьмому екзонах у зразках медоносних бджіл різного походження. *CSD*-гени є ключовими для визначення статі у медоносних бджіл (*Apis mellifera*), адже їхня варіативність безпосередньо впливає на генетичну різноманітність популяцій. Виявлення та порівняння мутацій у цих генах дозволяє встановити залежність між їх типами та походженням підвидів бджіл. У дослідженні використано порівняльний аналіз послідовностей у шостому та у восьмому екзонах *CSD*-гена (табл. 3.4.1 та табл. 3.4.2) а також дендрограму для встановлення філогенії вказаних ділянок геному. Аналіз показав, що різні зразки демонструють значну варіативність за певними позиціями нуклеотидів. Шостий екзон відзначається варіативністю в локалізації алелів, що свідчить про існування специфічних мутацій у межах різних підвидів.

Восьмий екзон, у свою чергу, показує значно нижчий рівень варіативності, що підтверджує його більш консервативну природу. Кореляція типів *CSD*-генів із підвидовою залежністю пояснюється їхнім еволюційним

значенням. Висока варіативність у цих генах є результатом адаптації до певного середовища та популяційної ізоляції. Це забезпечує генетичну різноманітність, що є ключовою для виживання виду. У підвидах, які формують локальні популяції, такі як *A.m. carnica* та *A.m. ligustica*, спостерігається чітка структурованість у варіативності CSD-генів, що підтверджується результатами нашого аналізу.

Таблиця 3.4.1

Локалізація ОНП у 6-му екзоні CSD

Зразок	A.M.UKR-KhM-2	A.M.MKD-1	A.M.UKR-KhM-34	A.M.UKR-KhM-21	A.M.UKR-KhM-7	A.M.MKD-2	A.M.MKD-3
1	2	3	4	5	6	7	8
G2C	G	C	G	G	-	C	C
-16T	T	-	-	-	-	-	-
-29C	C	-	-	-	-	-	-
A31G	A	G	A	G	A	A	A
G35A	A	G	G	G	G	G	A
A47G	A	A	G	A	A	A	A
A54-	-	A	A	-	A	A	A
T58G	G	T	T	G	T	T	T
T59-	-	T	T	-	T	T	T
A60-	-	A	A	-	A	A	A
T61-	-	T	T	-	T	T	T
C62-	-	C	C	-	C	C	C
G69A	G	G	A	G	G	G	G

*Примітка – кольоровими комірками позначені ОНП

Локалізація ОНП у восьмому екзоні CSD

Зразок	G2A	T17C	A25T	A31G	G34A	G47T	-52A	-53A
A.M.UKR-KhM-2	G	T	A	A	G	G	-	-
A.M.MKD-1	A	T	T	A	A	T	-	-
A.M.MKD-3	G	T	A	A	G	G	-	-
A.M.MKD-2	A	T	T	G	G	T	-	-
A.M.UKR-KhM-7	G	C	A	A	G	G	-	-
A.M.UKR-KhM-34	A	T	A	A	G	G	A	A
A.M.UKR-KhM-21	G	T	A	A	G	G	-	-

*Примітка – кольоровими комірками позначені ОНП

3.5 Філогенія 3'-ділянки CSD різних медоносних бджіл

Після аналізу всіх зразків, обраних для дослідження, нами було побудована філогенія, яка відображає генетичну спорідненість та еволюцію ділянки CSD. Для побудови дендрограми використовували метод "мінімальних дистанцій".

Зразки A.M.UKR-KhM-2 та A.M.UKR-KhM-21 є частиною клади, яка представляє популяцію українських степових бджіл. Варто зазначити, що зразок A.M.MKD-3 походить із Греції проте потрапляє в групу, що включає A.M.MKD-1 та Moser_clone_2. Найцікавіше, що зразок A.M.UKR-KhM-7 показує обмежену спорідненість з іншими представниками українських степових бджіл A.M.UKR-KhM-2, A.M.UKR-KhM-21, A.M.UKR-KhM-34, та відрізняється високим рівнем дивергенції, що може свідчити про унікальні адаптації до локальних умов. Таким чином, порівнявши усі отримані

послідовності з послідовностями з бази даних GenBank, було ідентифіковано щонайменше 5 Українських варіантів *CSD* генів, які групуються у різні родини.

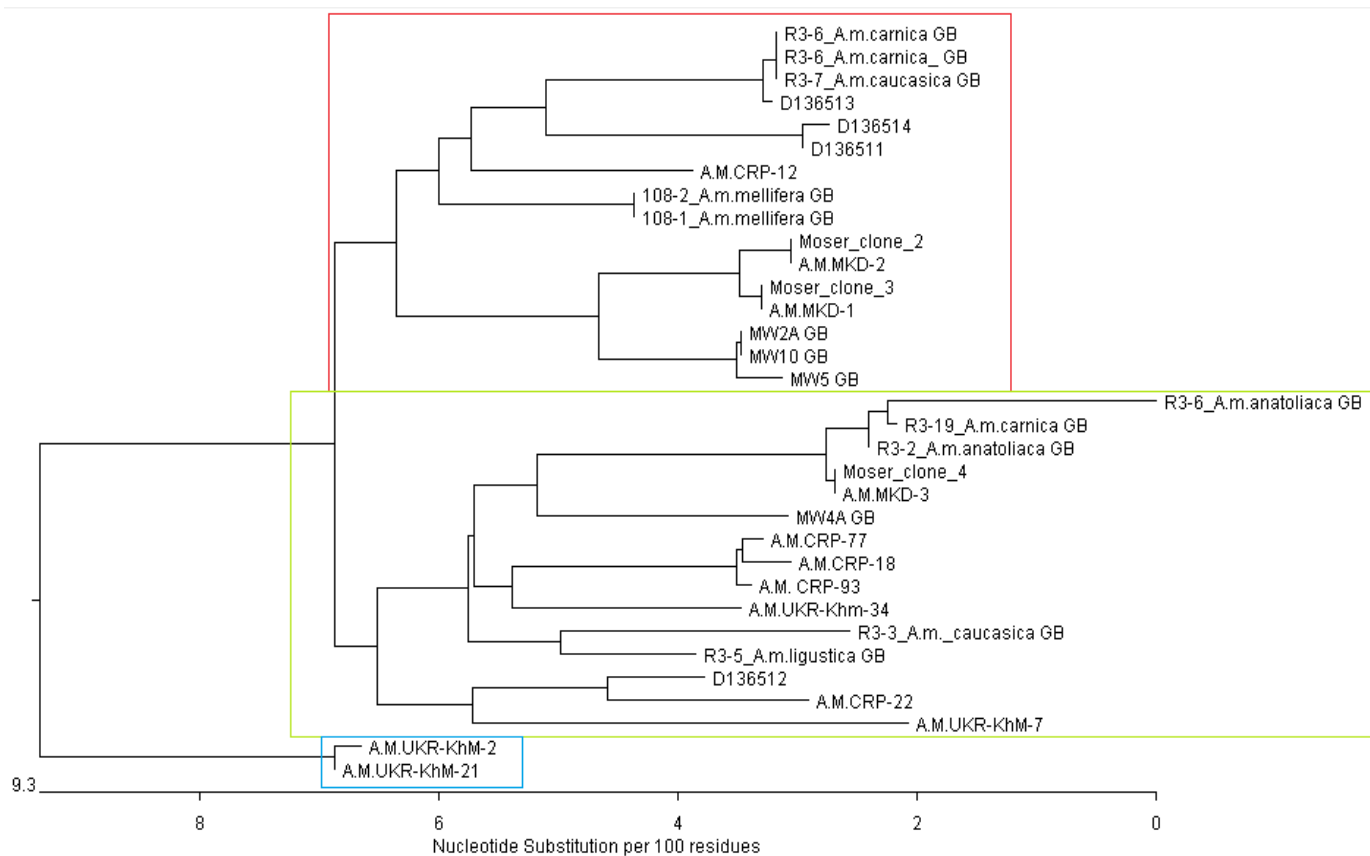


Рисунок. 3.5 Дендрограма еволюційні дистанції між досліджуваними видами, була створена на основі аналізу результативності гена *CSD*.

ВИСНОВКИ

1. Порівняльний аналіз послідовностей *CSD*-генів свідчить, що найбільш мінливими є екзон №7, а менш мінливими - екзони №6 та №8.
2. Шостий та сьомий екзони виявилися особливо інформативними для визначення родинної приналежності генів та аналізу їх еволюції.
3. Серед українських популяцій бджіл було ідентифіковано щонайменше п'ять різних варіантів *CSD* генів.
4. Регіональне походження бджіл не має чіткої залежності з конкретними родинами *CSD* генів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Amin, J., & Kumova, U. (2024). *Apis mellifera* mitochondrial DNA (mtDNA), A Review Paper. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 85, p. 01010). EDP Sciences.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20248501010>
2. Beye, M, Hasselmann, M., Fondrk R., Pag, E., & Omholt S. (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)
3. Becher, M. A., Grimm, V., Thorbek, P., Horn, J., Kennedy, P. J., & Osborne, J. L. (2014). BEEHAVE: A systems model of honeybee colony dynamics and foraging to explore multifactorial causes of colony failure. *Journal of Applied Ecology*, 51(2), 470-482. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12222>
4. Bovo, S., Ribani, A., Utzeri, V. J., Taurisano, V., Schiavo, G., Bolner, M., & Fontanesi, L. (2021). Application of next generation semiconductor-based sequencing for the identification of *Apis mellifera* Complementary Sex Determiner (*csd*) alleles from honey DNA. *Insects*, 12(10), 868-990.
<https://doi.org/10.3390/insects12100868>
5. Bresnahan, S. (2024). Molecular Mechanisms of Phenotypic Variation in Honey Bees (*Apis mellifera*), 1, 34-56.
6. Büchler, R., Andonov, S., Bernstein, R., Bienefeld, K., Costa, C., Du, M., ... & Wilde, J. (2024). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens 2.0. *Journal of Apicultural Research*, 3(1), 1-57.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2295180>
7. Cheng, F.-P., Hu, X.-F., Pan, L.-X., Gong Z.-X., Qin, K.-X., Li Z., & Wang, Z.-L. (2023). Transcriptome changes of *Apis mellifera* female embryos with *fem* gene knockout by CRISPR/Cas9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 229, 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.229>
8. Chibani Bahi Amar, A., Tabet Aoul, N., Fridi, R., Vignal, A., & Canale-Tabet, K. (2024). New COI-COII mtDNA Region Haplotypes in the Endemic Honey Bees

- Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis* (Hymenoptera: Apidae) in Algeria. *Insects*, 15(7), 549-561. <https://doi.org/10.3390/insects15070549>
9. Couton, M., Viard, F., Altermatt, F. (2023). Opportunities and inherent limits of using environmental DNA for population genetics. *Environmental DNA*. 1(2) 16-19. <https://doi.org/10.1002/edn3.448>
 10. Cristino, A. S., Nunes, F. M., Lobo, C. H., Bitondi, M. M., Simoes, Z. L., & Evans, J. D. (2006). Caste development and alternative splicing of the *fem* gene in honeybees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16776-16781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608241103>
 11. Dageri, A., Kadir, M. L., Guz, N., Ogreten, A., & Arshad, M. (2023). The involvement of Antifreeze protein maxi-like and Cold-shock domain-containing protein genes in cold-induced larval diapause and cold-shock treatment of khapra beetle. *Journal of Stored Products Research*, 101, 102-174. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.102074>
 12. 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), 578-652. <https://doi.org/10.3390/genes15060652>
 13. Del Lama, M., Lobo, J., Soares, E., Del Lama, S. (1990). Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*, 21, 271–280. <https://doi.org/10.1051/apido:19900401>
 14. Eynard, S. E., Mondet, F., Basso, B., Bouchez, O. E., Bulach, T., Le Conte, Y., ... & Servin, B. (2024). Sequence-based genome-wide association studies reveal the polygenic architecture of *Varroa destructor* resistance in Western honey bees *Apis mellifera*. *bioRxiv*, 2024-02. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.02.16.580755v3.abstract#:~:text=https%3A%2F%2Fdoi.org%2F10.1101%2F2024.02.16.580755>
 15. Fouks, B., Miller, K. J., Ross, C., Jones, C., & Rueppell, O. (2024). Alternative double strand break repair pathways shape the evolution of high recombination in

- the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*. 1, 44-56.
<https://doi.org/10.1111/imb.12961>
16. Fridi, R., Tabet Aoul, N., Catays, G., Basso, B., Bienefeld, K., Gregorc, A., ... & Canale-Tabet, K. (2022). Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Apis mellifera* subspecies in Algeria and Europe based on complementary sex determiner (CSD) gene. *Apidologie*, 53(1), 4.
 17. Garnery, L., Cornuet, J. M., Solignac, M. (1992). 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>
 18. Gempe, T., Stach, S., Bienefeld, K., & Beye, M. (2009). The sex determination switch fem-CSD utilizes alternative splicing of the fem gene. *Nature Communications*, 3(4), 637-641. <https://doi.org/10.1038/ncomms163>
 19. Hagan, T., Lim, J., Gloag, R. (2023). Drones Do Not Drift between Nests in a Wild Population of *Apis cerana*. *Insects*, 14(4), 323-478.
<https://doi.org/10.3390/insects14040323>
 20. Hasselmann, M., Lechner, S., Schulte, C., & Beye, M. (2010). Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(30), 178-383.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005617107>
 21. Harpur, B. A., Kent, C. F., Molodtsova, D., Lebon, J. M. D., Alqarni, A. S., Owayss, A. A., & Zayed, A. (2017). Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51), 145-169.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1710819114>
 22. Iqbal, J., Manzoor, M., Boruah, T., Wani, S. H., & Wachkoo, A. A. (2024). 3 Sex and Life Caste Determination Cycle of Honey Bees. *Honey Bees, Beekeeping and Bee Products*, 23, 10-19.
 23. Jain, R., & Brockmann, A. (2020). Sex-specific molecular specialization and activity rhythm-dependent gene expression in honey bee antennae. *Journal of Experimental Biology*, 223(12), 217-406. <https://doi.org/10.1242/jeb.217406>

24. Johnson, B. R. (2023). Honey Bee Biology. Princeton University Press.
25. Lechner, S., Ferretti, L., Schöning, C., Kinuthia, W., Willemsen, D., & Hasselmann, M. (2014). Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee *Apis mellifera*. *Molecular biology and evolution*, 31(2), 272-287.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst207>
26. Leigh, D. M., van Rees, C. B., Millette, K. L., Breed, M. F., Schmidt, C., Bertola, L. D., Hand, B. K., Hunter, M. E., Jensen, E. L., Kershaw, F., Liggins, L., Luikart, G., Manel, S., Mergeay, J., Miller, J. M., Segelbacher, G., Hoban, S. and Paz-Vinas, I. (2021). Opportunities and challenges of macrogenetic studies. *Nature reviews. Genetics*, 22(12), 791–807. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00394-0>
27. Meixner M. D, Pinto M. A., Bouga M., Kryger P., Ivanova Evgeniya & Fuchs S. (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-28.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>
28. Miyakawa, M. O., & Miyakawa, H. (2023). Transformer gene regulates feminization under two complementary sex determination loci in the ant, *Vollenhovia emeryi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 156, 103-938.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103938>
29. Mo, E. Y., Utaipanon, P., Bates, T., Davies, J., Grueber, C. E., Lim, J., ... & Chapman, N. C. (2024). Genetic diversity of *Apis mellifera* complementary sex determiner (*csd*) in four Australian breeding populations. *Apidologie*, 55. 3-36.
<https://doi.org/10.1051/apido:19940207>
30. Mohankumar, S., & Rajan, T. S. (2023). Insights into the Genetics and Genomics of *Apis dorsata* Fabricius. Role of Giant Honeybees in Natural and Agricultural Systems, 37-56.
31. Mohankumar, S., & Rajan, T. S. Insights into the Genetics and Genomics of *Apis dorsata* Fabricius and *A. laboriosa* Smith. In Role of Giant Honeybees in Natural and Agricultural Systems (pp. 37-46). CRC Press.

- 32.O'hUigin, C., Satta, Y., Hausmann, A., Dawkins, R. L., & Klein, J. (2000). The implications of intergenic polymorphism for major histocompatibility complex evolution. *Genetics*, 156(2), 867-877.
<https://doi.org/10.1093/genetics/156.2.867>
- 33.Otte, M., et al. (2023). Recognition of polymorphic *CSD* proteins determines sex in the honeybee. *Science Advances*, 9(40), 367-423
- 34.Palmer, K. A., & Oldroyd, B. P. (2000). Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie*, 31(2), 235-248.
<https://doi.org/10.3390/insects15070549>
- 35.Paolillo, G., De Iorio, M. G., Filipe, J. F. S., Riva, F., Stella, A., Gandini, G., ... & Minozzi, G. (2022). Analysis of complementary sex-determiner (*csd*) allele diversity in different honeybee subspecies from Italy based on NGS data. *Genes*, 13(6), 855-991.
- 36.Pinto, M., Johnston, J., Rubink, W., Coulson, R., Patton, J. and Sheppard, W. (2009). Identification of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial DNA: Validation of a Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Annals of the Entomological Society of America*, 96, 679–684.
[https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2003\)096\[0679:IOAHBH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0679:IOAHBH]2.0.CO;2)
- 37.Rider, S. D., Jr, Morgan, M. S. and Arlian, L. G. (2017). Allergen homologs in the *Euroglyphus maynei* draft genome. *PloS-one*, 12(8), 183-535.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183535>
- 38.Ruttner, F. (1988). *Biogeography and taxonomy of Honeybees*. Berlin: Springer Verlag
- 39.Seiler, J., & Beye, M. (2024). Honeybees' novel complementary sex-determining system: function and origin. *Trends in Genetics*. 7, 88-91
- 40.Sheppard W. S., McPheron B. A. (1986). Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. *Apidologie*, 17(1), 21-32.
- 41.Shultz, R. R. (2023). The origins of somatic mutations in honey bee (*Apis mellifera*) drones (Doctoral dissertation, Purdue University Graduate School).

- 42.Sommer, V. (2023). Genetic mechanisms underlying worker caste differentiation in the honeybee (*Doctoral dissertation, Universitäts-und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*)
- 43.Steinlage, V., Schröder, S., Lampe, K.-H. and Cremers, A. (2007). Automated Extraction and Analysis of Morphological Features for Species Identification. *Automated Taxon Identification in Systematics: Theory, Approaches and Applications*, 7, 115–129.
<https://doi.org/10.1201/9781420008074.ch8>
- 44.Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Radakovic, M. and Kovacevic, S. R. (2010). Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Genetika*, 46(5), 685–691. <https://doi.org/10.1134/S1022795410050145>
- 45.Suzuki, Y., Yamada, T., Suzuki, M. G. (2023). In Vitro Comparison of Sex-Specific Splicing Efficiencies of *fem* Pre-mRNA under Monoallelic and Heteroallelic Conditions of *CSD*, a Master Sex-Determining Gene in the Honeybee. *Journal of Developmental Biology*, 11(1), 10-33.
<https://doi.org/10.3390/jdb11010010>
- 46.Wang, Z., Liu, Z., Wu, X., Yan, W., & Zeng, Z. (2012). Polymorphism analysis of *csd* gene in six *Apis mellifera* subspecies. *Molecular Biology Reports*, 39(8), 3067-3071.
- 47.Warmoes, M., Jaspers, J. E., Xu, G., Sampadi, B. K., Pham, T. V., Knol, J. C., Piersma, S. R., Boven, E., Jonkers, J., Rottenberg, S. and Jimenez, C. R. (2013). Proteomics of genetically engineered mouse mammary tumors identifies fatty acid metabolism members as potential predictive markers for cisplatin resistance. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12(5), 1319–1334.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M112.024182>
- 48.Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., Smith, D. R., Suarez, A. V., Weaver, D. and Tsutsui, N. D. (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5799), 642–645.

<https://doi.org/10.1126/science.1132772>

49. Yüger, Ö., Dogan, E., Tonguc, A., & Gunenc, E. (2023). ISSR-Based Population Genetic Structure of Some Turkish Honeybee (*Apis mellifera* L., 1758) Populations. *Turkish Journal of Bioscience and Collections*, 7(2), 83-90.

<https://doi.org/10.26650/tjbc.1326451>

50. Zampakas, K., Alvanou, M. V., Kalapouti, A., Hatjina, F., Tananaki, C., Melfou, K., & Giantsis, I. A. (2024). Genetic Profile of Greek Indigenous Honey Bee Populations, Local Extinctions, Geographical Distinction, and Patterns, by Using mtDNA COI and Nuclear CSD Gene Analysis Markers. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2024(1), 546-616.

<https://doi.org/10.1155/2024/5466016>

ДОДАТКИ

Техніка безпеки праці в лабораторії

Загальні положення

1. Студенти повинні дотримуватись правил техніки безпеки і попереджати випадки порушень цих правил іншими. Забороняється допускати студентів до виконання лабораторних робіт без вивчення даної інструкції та додатків до неї.

2. На початку кожного семестру студенти проходять інструктаж з техніки безпеки. Проведення інструктажу відмічається підписом у лабораторному журналі з техніки безпеки.

3. Лабораторні заняття проводяться у строго встановлені години, визначені розкладом.

Вимоги безпеки перед початком роботи

1. Лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.

2. Перед початком роботи потрібно:

- оглянути та упорядкувати робоче місце;
- перевірити витяжку систему;
- перевірити правильність підключення устаткування до електромережі;
- перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
- переконатися в наявності захисного заземлення приладів.

3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання. Працівник зобов'язаний повідомити керівнику про виявлені пошкодження.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Під час роботи у лабораторії слід дотримуватись таких правил:

- необхідно використовувати захисний одяг;
- двері під час роботи мають бути зачинені;
- при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи й пилу;

- при роботі з леткими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри забороняється:

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;
- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- набирати реактиви у піпетки ротом;
- викидати у раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальничками тощо);
- переносити обладнання без дозволу зав. кафедрою або зав. лабораторією;
- користуватись зіпсованими електроприладами;
- самостійно проводити ремонт розеток, вимикачів, запобіжників;
- користуватись витяжними шафами з розбитим склом або непрацюючою вентиляцією;
- зберігати реактиви у посуді без етикеток.

По закінченні роботи треба мити руки.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи:

1 Робота з шкідливими хімічними речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.

2. Використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні.

3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.

4. У кожній лабораторії мають бути наявні списки небезпечних речовин.

При роботі з хімічними речовинами кожен співробітник зобов'язаний ознайомитися з інформацією стосовно небезпечних особливостей цих речовин, особливо відносно їх токсичності та канцерогенності.

При роботі з горючими та вибухонебезпечними речовинами заборонено запалювати вогонь у лабораторії. Такі речовини не можна піддавати дії прямого сонячного світла. Проводити роботу з вибухонебезпечними речовинами в лабораторії дозволяється лише у витяжній шафі.

Зберігання горючих рідин дозволяється лише в металічних шафах або в мінімальній кількості у витяжній шафі. При переливанні цих рідин необхідно користуватися захисними окулярами або застосовувати для переливання піпетки. Пляшки з горючими речовинами мають бути підписані та транспортуватися лише у захисних ємностях (відрах, металічних боксах тощо).

При роботі з їдкими речовинами необхідно застосовувати захисні окуляри. Розпилювання токсичних канцерогенних, мутагенних, тератогенних речовин у лабораторії заборонено. Усі ці речовини мають зберігатися лише у відповідно підписаних ємностях. Збирання залишків небезпечних речовин та їх утилізація має відбуватися з урахуванням техніки безпеки.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру;

- виходячи останнім, зачинити вікна (кватирки), вимкнути світло, газ, перевірити чи вимкнені всі електроприлади та закриті крани, зачинити приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журнал.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

1. При порушеннях у роботі приладів необхідно проінформувати співробітника, який відповідає за даний прилад. При порушеннях у роботі вентиляційної системи, водопроводу, електрики та газопостачання мають бути проінформовані відповідні підрозділи університету.

2. При випадковому розливанні вибухонебезпечних та горючих рідин місця розливу потрібно засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою та винести в спеціально відведене місце.

3. Співробітники мають уникати дій, які можуть призвести до пожежі. Газові горілки та спиртівки заборонено залишати без нагляду. Паління заборонено на всій території університету.

4. При виникненні пожежі необхідно перекрити струм та газ у лабораторії та організувати гасіння пожежі.

5. У випадку загорання горючої речовини слід погасити всі горілки, прикрити полум'я азбестовим рушником чи засипати його піском, або скористатися вогнегасником з вуглекислим газом. Розчинні у воді вогнебезпечні речовини, такі як етанол, ацетон та інші, можна гасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад, ефір, бензол, бензин), то воду використовувати для гасіння пожежі не можна, оскільки вона не тільки не буде ліквідована, але може навіть збільшитися. У цьому випадку полум'я слід гасити піском та використовувати вогнегасник.

6. Кожен співробітник зобов'язаний знати де знаходяться вогнегасники, ящики з піском та ковдри для гасіння вогню і бути ознайомленим з планом евакуації на випадок пожежі. Маленькі лабораторні пожежі мають бути погашені наявними протипожежними засобами (пісок, ковдри, вогнегасники).

7. При виникненні великої пожежі, яку не вдається загасити з вогнегасника, потрібно організувати евакуацію людей з приміщення, закрити двері в лабораторію і терміново викликати пожежників за тел.101 та повідомити адресу, поверх та номер кімнати. Необхідно також організувати евакуацію персоналу з будівлі. При цьому мають бути вжиті заходи щодо відключення газопостачання до будинку.

Надання першої медичної допомоги

У випадку ураження людини струмом перш за все потрібно вимкнути рубильники та викликати «Швидку допомогу» за номером 103.

При легких термічних опіках шкіру слід промити етанолом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та етанолом необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідиновою емульсією).

При опіках міцними кислотами потрібно промити обпалене місце великою кількістю води протягом 10 хвилин, потім – 3% розчином соди.

При опіках міцними лугами шкіру потрібно промити великою кількістю води, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При отруєнні хімікатами слід терміново викликати лікаря або відправити потерпілого в найближчий лікарський заклад. Дуже важливо визначити, отруєння якою речовиною мало місце. Перша допомога при будь-якому отруєнні полягає в швидкому видаленні отрути з організму, а якщо це не можливо, то у знешкодженні її в організмі. При попаданні отрути в організм через рот необхідно викликати блювання. Проте це не можна робити, якщо потерпілий знаходиться у несвідомому або напівсвідомому стані, а також при різкому порушенні кровообігу (колапс). Найпростіший спосіб викликати блювання – ввести пальці глибоко в рот. Щоб видалити отруту із шлунку, слід дати випити велику кількість (5-8 склянок) теплої (30-35°C) води, а після цього

знову викликати блювання. Таке промивання шлунку слід повторити декілька разів. Якщо отрута відома, шлунок промивають чистою водою, або розчинами речовин, що нейтралізують отруту. При отруєнні лугами промивку проводять 2% оцтовою або лимонною кислотою. При отруєнні ртуттю або свинцем для промивання використовують молоко.

При отруєнні парами постраждалого слід вивести на свіже повітря. При послабленні дихання та нестачі кисню слід застосовувати штучне дихання і викликати лікаря.

При попаданні хімікатів у очі їх необхідно негайно промити великою кількістю води.

При порізах у разі необхідності видалити з рани уламки скла або інших матеріалів, промити рану, краї рани продезінфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах слід накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити того, хто постраждав, у лікарню.