

## Обзоры, проблемы

УДК 638.1:57.02

doi: 10.15389/agrobiology.2025.6.941rus

ЭТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ (*Apis mellifera*) К КЛЕЩУ *Varroa destructor*\* (обзор)М.С. ФОРНАРА<sup>✉</sup>, И.А. ЛЕЩЕНКО, И.С. КУВИКА

Медоносная пчела (*Apis mellifera*) — ключевой опылитель и важный модельный объект для изучения социального поведения, иммунитета и адаптации (N. Gallai с соавт., 2009; S.A.M. Khalifa с соавт., 2021). Популяции пчел по всему миру адаптируются к различным условиям, патогенам и паразитам, таким как клещ *Varroa destructor* (D. Goulson с соавт., 2015; D. Frizzera с соавт., 2023). Понимание генетических основ этих адаптивных признаков остается приоритетной задачей пчеловодческой науки. Цель настоящего обзора — систематизировать современные научные подходы к изучению генетических и поведенческих механизмов устойчивости медоносной пчелы к паразитическому клещу *Varroa destructor* и оценить перспективы их применения в селекционных программах, включая традиционные методы отбора и инновационные геномные технологии. Заражение *V. destructor* негативно влияет на пчеловодство, сокращая продолжительность жизни пчел (D. Anpocia с соавт., 2015; В. Нап с соавт., 2024). Также клещи служат переносчиками вирусных заболеваний (М.Е. Oz с соавт., 2025; K.S. Траунор с соавт., 2020). Пчелы, проявляющие гигиеническое поведение (*varroa-sensitive hygiene*, VSH), способны детектировать, распечатывать и удалять зараженный расплод (F. Mondet с соавт., 2020; R.M. Russo с соавт., 2024). Исследования углубили понимание нейробиологических основ VSH, выявив роль олеиновой кислоты и обонятельных рецепторов у сенсоров (A. McAfee с соавт., 2018), а также скоординированность действий исполнителей (K.M. Wagoner с соавт., 2020; K.A. Khan с соавт., 2021). Традиционные методы оценки гигиенического поведения имеют ограничения, что стимулирует разработку стандартизированных подходов (О.А. Модин, 2012). Низкая частота гигиенического поведения подкрепляет актуальность селекции. Природные устойчивые популяции пчел, например на острове Готланд (S. Thaduri с соавт., 2018), во Франции (Y. Le Conte с соавт., 2007), Норвегии (M.A.Y. Oddie с соавт., 2017) представляют ценный генетический ресурс. Груминг — еще один фактор устойчивости, при котором пчелы удаляют клещей со своего или чужого тела (D.J. Pritchard с соавт., 2016). Африканизированные пчелы служат примером высокой активности груминга (C. Invernizzi с соавт., 2015). Генетические исследования выявляют факторы восприимчивости пчел к возбудителям. Устойчивость к варроатозу связана с различиями в физиологии и поведении (Y. Zhang с соавт., 2010), при этом геномные ресурсы проекта «Геном медоносной пчелы» (G.E. Robinson с соавт., 2006) активно используются. Изучение QTL (D. Behrens с соавт., 2011) и SNP (A. Spötter с соавт., 2016) выявило генетические маркеры, ассоциированные с гигиеническим поведением, включая гены, связанные с обонянием, нервной системой (*Neurexin-1*, октапаминовые рецепторы), иммунным ответом (гименоптаецин) и метаболизмом экдизона (*Mblk-1*) (R. Parker с соавт., 2012; J.D. Evans с соавт., 2019). Масштабные исследования (M. Šotek с соавт., 2025) и целенаправленная селекция на подавление репродукции клеща (M.G. De Lorio с соавт., 2025) демонстрируют успешность улучшения популяций. Активные чистильщики показывают специфический паттерн экспрессии генов, включая *Neurexin-1*, поли-U-связывающий фактор *kd 68* и цитохром P450 (M.M. Hamiduzzaman с соавт., 2017), при этом *Neurexin-1* предложен как молекулярный биомаркер (D. Kabakci с соавт., 2025). Система геномного редактирования CRISPR-Cas9 (Y. Ishino с соавт., 1987; F.J. Mojica с соавт., 1993) позволяет целенаправленно модифицировать гены (X.F. Hu с соавт., 2019), исследовать развитие каст (A. Roth с соавт., 2019) и создавать устойчивых к пестицидам пчел (E. Inak с соавт., 2024), а также редактировать геномы симбионтов (P.J. Larivière с соавт., 2024; Q. Huang с соавт., 2023). Однако применение CRISPR сопряжено с техническими, этическими и регуляторными трудностями. В будущем CRISPR будет служить инструментом валидации генов-кандидатов для традиционной селекции. Достижение успеха в выведении пчелиных семей, устойчивых к варроатозу, требует интеграции традиционных методов селекции с передовыми геномными технологиями. Это включает изучение гигиенического поведения и груминга, идентификацию генетических маркеров и использование молекулярных биомаркеров. Необходим сбалансированный подход, который не только повышает устойчивость к *Varroa*, но и сохраняет хозяйственные характеристики пчел. Внедрение интегрированных стратегий, международное сотрудничество и стандартизация методов критически важны для создания устойчивых популяций медоносных пчел в долгосрочной перспективе.

Ключевые слова: медоносная пчела, клещ, *Varroa destructor*, гигиеническое поведение, груминг, генетические маркеры.

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 25-16-00176.

Медоносная пчела (*Apis mellifera*) — не только ключевой опылитель в глобальных экосистемах и сельском хозяйстве (1-3), но и важнейший модельный объект для изучения социального поведения, иммунитета и адаптации (4). Популяции пчел по всему миру вынуждены приспосабливаться к разнообразным климатическим условиям, новым патогенам, паразитам (например, таким как клещ *Varroa destructor*) и антропогенным факторам (5-7). Понимание генетических основ этих адаптивных признаков — одна из главных задач современной пчеловодческой науки и практики.

Одним из приоритетных направлений остается поиск генетических маркеров устойчивости к самому опасному паразиту пчел — клещу *Varroa destructor* (8-11). Исследования в этой области сфокусированы на двух основных поведенческих механизмах. Первый — это гигиеническое поведение, второй — поведение по уходу (груминг) (12-15).

Цель настоящего обзора — систематизировать современные научные подходы к изучению генетических и поведенческих механизмов устойчивости медоносной пчелы (*Apis mellifera*) к паразитическому клещу *Varroa destructor* и оценить перспективы их применения в селекционных программах, включая традиционные методы отбора и инновационные геномные технологии.

В настоящее время заражение пчелиных семей *V. destructor* оказывает негативное влияние на пчеловодство по всему миру. Внутри запечатанных ячеек с расплодом материнские особи клещей и их потомство прокалывают наружные покровы хозяина и используют в качестве источника пищи жировое тело развивающейся куколки (16, 17). Это ослабляет куколку и сокращает продолжительность жизни выходящей из нее взрослой особи (18). Такие имаго оказываются в меньшей степени способны к добыче корма и поддержке пчелиной семьи (19). Уменьшение продолжительности жизни отдельной особи трансформируется в негативные последствия для приспособленности всей пчелиной семьи, причем размер осенней популяции *Varroa* выступает в качестве существенного прогностического фактора зимней смертности пчел (20). В то же время, несмотря на то, что начальная скорость гибели пчелиных семей может быть очень высока, в популяциях *A. mellifera*, не обрабатываемых против *Varroa*, возможно достаточно быстрое формирование устойчивости к последним (21, 22). Кроме того, эти клещи выступают в качестве векторов распространения многих бактериальных, грибковых и вирусных инфекционных заболеваний пчел, включая вирус острого пчелиного паралича (acute bee paralysis virus, ABPV) (23, 24), вирус деформированного крыла (deformed wing virus, DWV) (25-28) и вирус медленного пчелиного паралича (slow bee paralysis virus, SBPV) (29, 30).

Особи *A. mellifera*, проявляющие признаки гигиенического поведения, обладают способностью детектировать, распечатывать и удалять зараженный расплод из улья до того, как болезнетворный организм достигнет инфекционной стадии (14, 15, 31, 32). Исследования последних лет значительно углубили понимание нейробиологических основ гигиенического поведения, чувствительного к *Varroa* (varroa-sensitive hygiene, VSH), подтвердив модель разделения труда между так называемыми сенсорами и исполнителями.

Процесс инициируется ограниченной группой рабочих пчел (сенсоров), обладающих повышенной чувствительностью обонятельной системы. А. McAfee с соавт. (33) не только подтвердили роль олеиновой кислоты как ключевого триггера, но и идентифицировали специфические обонятельные рецепторы (olfactory receptors, ORs) в антеннах пчел, избирательно настроенные на обнаружение этого «запаха смерти». Показано, что у пчел VSH-

линий экспрессия таких рецепторов статистически значимо выше, что обеспечивает их пороговую чувствительность к летучим сигналам от зараженного расплода, исходящим через восковую крышечку (34).

После того как сенсор идентифицирует и начинает вскрывать ячейку, к работе подключаются исполнители. К.М. Wagonec с соавт. (35) показали, что этот процесс высокоскоординирован. Исполнители реагируют не столько на первоначальный запах, сколько на вибрационные или тактильные сигналы, испускаемые сенсором в процессе вскрытия, а также на усилившийся обонятельный стимул из частично вскрытой ячейки. То есть весь процесс гигиенического поведения в целом по большей части зависит от тех рабочих пчел, которые первыми детектируют зараженный паразитами расплод и иницируют его распечатывание (10, 36-38). Это позволяет другим особям (вероятно, менее чувствительным) более явно распознать стимулы от пораженного расплода через частично вскрытую крышечку и завершить его гигиеническое удаление.

Для исследования гигиенического поведения пчел часто используют полевой метод, который состоит в регистрации времени, необходимого пчелиной семье на то, чтобы обнаружить, распечатать и удалить расплод с участка сот размером 5 на 6 см, содержащего около 100 личинок и куколок на сторону. Опытный фрагмент предварительно вырезают с рамки с расплодом, выдерживают в течение 1 сут при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и затем помещают в улей с исследуемой семьей (39).

Известно, что на выраженность гигиенического поведения влияют условия окружающей среды. Например, поступающий нектар увеличивает скорость удаления погибшего и больного расплода (40, 41). Другой фактор, вносящий вклад в вариацию результатов исследования, может быть связан с источником замороженного расплода: пчелы могут быстрее удалять расплод с чужим запахом по сравнению с замороженным расплодом, полученным из их же улья (42).

Таким образом, инициация гигиенического поведения зависит как от чувствительности обоняния индивидуальной пчелы, так и от профиля запаха и интенсивности стимула, которым служит аномально развивающийся расплод (43). При этом известно, что заражение *Varroa* представляет собой менее интенсивный стимул для активизации гигиенического поведения по сравнению с другими заболеваниями расплода.

Следует отметить, что этот метод имеет ряд недостатков: низкая стандартизация (результаты сильно зависят от источника расплода — чужой удаляется быстрее своего); силы семьи и сезонных условий (наличие медосбора); субъективность оценки (визуальное определение очищенной ячейки персоналом может варьировать) и трудоемкость (метод требует много времени и ручного труда, что затрудняет масштабные исследования). Эти факторы приводят к значительной вариабельности результатов и снижают воспроизводимость теста.

Альтернативный метод оценки гигиенического поведения, предложенный Л.С. Кривцовой (44), основан на регистрации способности пчелиной семьи удалять инородные объекты из гнездового пространства. В качестве тестового материала используют стандартизированный образец бумаги, который размещают на дне улья. Количественная оценка гигиенической активности осуществляется посредством измерения разницы массы бумажного образца до и после нахождения в улье в течение установленного временного интервала. Метод тоже имеет ряд недостатков (сила семьи, конструкция улья и др.) и не подходит для массовой оценки.

О.А. Модин (45) для оценки гигиенического поведения предложил использовать стандартизированные тест-объекты из акварельной бумаги, размещаемые в центральной части гнезда. Метод позиционируется как усовершенствованный подход к описанию гигиенического поведения, позволяющий минимизировать субъективность оценки и обеспечить сопоставимость результатов между различными исследованиями. Используя этот метод на пчелах карпатской и приокского типа среднерусской пород, А.З. Брандорф с соавт. (46) установили высокую гигиеническую активность последних (78,4 %), в то время как у карпатских показатель составлял 69,1 %.

В.И. Комлацкий и соавт. (47) провели сравнительный анализ гигиенического поведения двух пород медоносных пчел (карника и карпатская). При тестировании по методике «удаление замороженного расплода» пчелы породы карника показали способность по вскрытию запечатанного расплода выше на 4 %, а по удалению из сотовых ячеек погибших куколок — больше на 9,1 % по сравнению с пчелами породы карпатская.

В то же время частота встречаемости гигиенического поведения среди пчелиных семей относительно низка и составляет около 10 % (48, 49). Поэтому особый интерес представляет селекция пчел, благоприятствующая этому признаку. Одним из наиболее известных примеров естественной устойчивости служит популяция медоносных пчел, состоящая из 150 семей, на острове Готланд (Швеция), где в 1999 году были зарегистрированы колонии, приобретшие резистентность к *V. destructor* и выживавшие без соответствующего лечения (50).

Также стоит отметить природные популяции медоносных пчел во Франции (51) и Норвегии (52), демонстрирующие устойчивость к *V. destructor*. В частности, норвежская популяция существовала в условиях постоянного заражения клещом более 19 лет, что служит ярким доказательством долгосрочной адаптации (52).

Всестороннее изучение подобных популяций чрезвычайно важно для понимания генетических, эволюционных и эпидемиологических механизмов развития устойчивости к *Varroa* (53, 31). Однако эти природные популяции пчел не используются в коммерческом пчеловодстве, поскольку имеют существенные недостатки — низкую медовую продуктивность и постоянное роение.

В этом отношении популяции дальневосточных пчел, сосуществовавшие с *V. destructor* в течение длительного времени, представляют большой интерес для селекции: они обладают высокой выраженностью гигиенического поведения и даже частично передают этот признак при скрещивании с другими породами (54).

Другим фактором, обеспечивающим устойчивость пчелиных семей к варроатозу, служит груминг: пчелы повреждают и удаляют клещей с собственного тела (аутогруминг) или с тел других пчел (аллогруминг) (55). Такое поведение в значительной степени способствует устойчивости колонии к клещам за счет увеличения смертности паразитов и регулирования роста их популяции (56-58). Эффективность груминга зависит не только от самого факта снятия клеща, но и от способности пчелы его повредить. Пчелы используют свои ноги, а именно специальные щеточки и гребешки, чтобы схватить и раздавить клеща. Поврежденный клещ погибает или теряет способность к размножению, что критически важно для сдерживания популяции *V. destructor*. Такое поведение — наследуемый признак, и его активность сильно варьирует между породами и популяциями пчел.

Примечательно, что африканизированные пчелы — один из лучших примеров естественной, долгосрочной толерантности к клещам *Varroa* в

колониях (56, 59-61). В процессе естественного отбора в Новом Свете, куда клещ *Varroa* был интродуцирован, африканизированные пчелы развили исключительно высокую активность груминга по сравнению со своими европейскими собратьями. Эта поведенческая адаптация служит ключевым компонентом их выживаемости и позволяет их колониям существовать без обработок акарицидами, демонстрируя модель успешного сосуществования с паразитом.

Работы по выявлению генетических факторов, обуславливающих различную восприимчивость медоносных пчел к возбудителям, представляют собой относительно новое направление (62-65).

Первые исследования экспрессии генов позволили предположить, что в основе устойчивости к варроатозу лежат скорее различия в физиологии и поведении, нежели особенности иммунного ответа (66). Кроме того, степень устойчивости хозяина к паразитическому клещу может быть охарактеризована различными особенностями метаболизма и передачи нервных импульсов (67). В настоящее время функциональная геномика предоставляет мощные инструменты изучения взаимоотношений «хозяин-паразит» у медоносных пчел. Геномные ресурсы, созданные в процессе реализации проекта «Геном медоносной пчелы» (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) (68) и новые технологии анализа экспрессии генов — это интегрированный и обширный источник для молекулярных исследований взаимодействия медоносной пчелы и клещей *Varroa* (69).

Первоначально изучение QTL (quantitative trait locus), ассоциированных с устойчивостью к варроозу, проводилось с использованием микросателлитов (70) и ПДРФ-анализа (71). Были выявлены соответственно шесть (3 значимых и 3 предположительных) и семь возможных QTL, относящихся к гигиеническому поведению. Однако сравнение полученных результатов практически невозможно из-за использования двумя исследовательскими группами разных карт сцепления.

При изучении популяций медоносной пчелы с острова Готланд, выживших после поражения *V. destructor*, было проведено QTL-картирование этого признака. Пораженные и непораженные паразитами трутни были исследованы отдельно, и в их геномах проведен скрининг потенциальных QTL с использованием 216 микросателлитных маркеров (72). Было выделено три предполагаемых целевых участка на 4-й, 7-й и 9-й хромосомах, но ярко выраженный эпистаз между тремя этими локусами существенно затрудняет их использование в селекционных программах.

J.M. Tsuruda с соавт. (62) идентифицировали 1536 SNP, секвенируя ДНК медоносных пчел, и использовали эти данные для создания SNP-чипа низкой плотности. С его помощью был проведен поиск QTL, оказывающих влияние на гигиеническое поведение пчел против *V. destructor*. Важнейший из них обнаружен на 9-й хромосоме. В то же время с использованием гибридационного чипа (44 тыс. SNP) ассоциаций на этой хромосоме не обнаружили (73).

При поиске SNP, ассоциированных с гигиеническим поведением у *A. mellifera carnica*, было выявлено 6 однонуклеотидных полиморфизмов, показавших значительную полногеномную ассоциацию с DUVB (обнаружение и распечатывание расплода, зараженного *Varroa*, detection and uncapping of *Varroa*-parasitized brood). Четыре из них пространственно ассоциированы с 4 генами-кандидатами (гены рецептора аденозина, циклин-зависимого активатора киназы-5, рецептора октапамина бета-2R и одорант-связывающим белком 1) (73). Октапаминовые рецепторы насекомых играют несколько функциональных ролей, которые у млекопитающих обычно

связаны с аденоэргическими рецепторами. Эти функции включают модуляцию входных сигналов органов чувств, а также участие в реализации процессов памяти и обучения (74).

Исследование транскрипционного ответа на паразитических клещей, проведенное при сравнении линий *A. mellifera*, устойчивых и чувствительных к *V. destructor*, позволило идентифицировать комплекс из 148 генов со значительно различающимися паттернами экспрессии (66). Экспрессия 32 из них варьировала в зависимости от присутствия *Varroa*, 116 — в зависимости от генотипа, и экспрессия двух генов находилась в зависимости одновременно от двух этих факторов. Пчелы, устойчивые к паразитам, характеризовались преимущественно разницей в экспрессии генов, регулирующих развитие и чувствительность нейронов, а также обоняние. Различия в обонянии и чувствительности к стимулам служат (по крайней мере частично) параметрами, вносящими вклад к устойчивости пчел к *V. destructor* (33, 34).

С использованием полногеномного ассоциативного анализа высокой плотности в популяциях медоносных пчел, устойчивых к *V. destructor*, был идентифицирован экдизон-индуцируемый ген *Mblk-1*, который играет центральную роль в механизме подавления репродукции клеща (suppressed mite reproduction, SMR). Экдизон инициирует одновременно и метаморфоз у насекомых, и размножение у *Varroa*. Клещи не могут самостоятельно синтезировать этот гормон, но получают его вместе с пищей (гемолимфой личинок) (75, 76). С использованием количественного ПЦР-анализа удалось выявить взаимосвязь экспрессии генов экдизон-зависимых генов устойчивости к паразиту с его размножением и рационом клещей (77).

В связи с тем, что паразиты используют компоненты личинок пчел для запуска своего репродуктивного цикла, мутации в цикле биосинтеза экдизона у организма-хозяина могут стать ключевым инструментом селекции и разведения медоносных пчел, устойчивых к варроатозу. Результаты, полученные на мухах *Drosophila*, позволяют предположить, что ген *Mblk-1* активно экспрессируется в жировом теле, которое, как было недавно показано, служит основным источником пищи для клещей *Varroa* (78). Число пчелиных семей и индивидуумов, несущих эти SNP, безусловно, ограничено, а для некоторых QTL несущие их особи вообще единичны, но большинство маток в действительности могут быть гетерозиготны по изучаемым аллелям, что позволит проводить селекционную работу на повышение устойчивости отечественных популяций пчел к *V. destructor*.

М. Šotek с соавт. (79) в масштабном исследовании, проведенном в 77 административных районах Чешской Республики, предприняли попытку оценить генетический потенциал резистентности местных популяций пчел. С помощью разработанной панели для генотипирования методом SNaPshot авторы проанализировали разнообразие 13 SNP-маркеров: маркеры гигиенического поведения (6), подавления репродукции клещей (SMR) (5), общего иммунного ответа (1) и резистентности к аскосферозу (1). Несмотря на успешное естественное распространение аллелей SMR, критически низкая частота благоприятных аллелей VSH и устойчивости к аскосферозу создает угрозу массовой гибели семей при снижении эффективности химических обработок.

Четырехлетнее исследование M.G. De Lorio с соавт. (80) демонстрирует успешность целенаправленной селекции на усиление VSH через отбор по признаку SMR. Матку осеменяли спермой одного трутня, чтобы контролировать материнский и отцовский генетический вклад. Наблюдалось устойчивое увеличение средних показателей SMR (22,1 % в 2021 году, 41,0 % в

2024 году). Эти результаты подтверждают потенциал целевых программ разведения для усиления экспрессии VSH в популяциях медоносных пчел.

В работе, проведенной с целью изучения ассоциаций между груминговой активностью и экспрессией некоторых генов иммунной и нервной систем, системы детоксификации, а также генов, участвующих в развитии и поддержании здоровья, установлено, что активные чистильщики (intense groomers, IG) были более эффективны, поскольку им требовалось существенно меньше времени для начала процесса груминга и меньшее число попыток для успешного удаления клещей со своего тела по сравнению с ленивыми чистильщиками (light groomers, LG).

Также показано, что относительная представленность мРНК неурексина-1 была выше в группе активных чистильщиков (IG) по сравнению с остальными группами: ленивыми чистильщиками (LG); пчелами, не проявляющими груминговой активности (NG), и пчелами без клещей (контроль). Количество мРНК поли-U-связывающего фактора *kd 68* и цитохрома P450 было значительно выше в группе IG по сравнению с контрольными пчелами. Содержание мРНК гименоптацина оказалось существенно выше в группе IG по сравнению с NG, но не отличалось от такового у контрольной группы. Представленность транскрипта вителлогенина не менялась в зависимости от типа груминговой активности. Однако количество мРНК гена *blue cheese* было значительно снижено у пчел группы IG по сравнению с соответствующим показателем в группах LG и NG, но не отличалось от показателя в контрольной группе. Эффективное удаление клещей активными чистильщиками коррелировало с отличным от других групп паттерном экспрессии генов (81). Полученные результаты позволяют предположить, что груминговая активность может быть связана с паттерном экспрессии жизненно важных генов у пчел.

M. Guichard с соавт. (9) предложили метод количественной ПЦР для оценки экспрессии гена *Neurexin-1* в качестве молекулярного биомаркера сенсорной чувствительности, потенциально позволяющего частично заменить или дополнить трудоемкие поведенческие тесты.

D. Kabakci с соавт. (82) при изучении генетических основ устойчивости медоносных пчел (экотип Muğla, *Apis mellifera anatoliaca*) к клещу *V. destructor* выявили значительное повышение экспрессии трех ключевых генов: гименоптацина (*hym*) — в 2,90, неурексина-1 (*AmNrx1*) — в 2,95 и *CYP9Q3* — в 3,26 раза в результате селекционной программы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ). Полученные результаты демонстрируют, что целенаправленная селекция на устойчивость к *Varroa* приводит к молекулярным изменениям, связанным с защитным поведением (автогруминг и аллогруминг). Указанные гены могут служить эффективными молекулярными маркерами для преселекции пчел с повышенной резистентностью к клещу *Varroa* в селекционных программах.

Современная селекция медоносных пчел на устойчивость к *V. destructor* представляет собой динамичную область, где традиционные методы фенотипического отбора все активнее дополняются и вытесняются высокопроизводительными геномными технологиями.

Наиболее радикальным и перспективным инструментом служит система геномного редактирования CRISPR-Cas9, применение которой достигло значительного прогресса за короткий период. В 1987 году Y. Ishino с соавт. (83) обнаружили в ДНК бактерии *Escherichia coli* короткие палиндромные повторы (CRISPR). В начале 1990-х F.J. Mojica с соавт. (84) продолжили эти исследования, выявив CRISPR последовательности у архей, в частности у *Haloferrax mediterranei*. В 2002 году исследователи из Голландии

идентифицировали группу генов, которая была названа CAS (CRISPR-ассоциированные гены) (85). В отличие от традиционной селекции, которая комбинирует существующие аллели, CRISPR позволяет целенаправленно и точно модифицировать конкретные гены, ассоциированные с тем или иным признаком.

Исследование CRISPR/Cas9 на медоносных пчелах впервые провели Н. Kohno с соавт. (86) в 2016 году. Эта группа ученых разработала базовый протокол редактирования генома медоносных пчел для анализа функций генов. В качестве мишени был выбран ген основного белка маточного молочка 1 (*mrjp1*), поскольку он экспрессируется преимущественно у взрослых особей, и ожидается, что его мутация не повлияет на нормальное развитие. Результаты свидетельствовали о том, что ген *mrjp1* не был эссенциальным (незаменимым) для нормального развития трутней, по крайней мере, до стадии куколки.

В 2018 году этой же группой был нокаутирован ген *mKast*, который преимущественно экспрессируется в клетках Кеньона (Kenyon cells, KCs) среднего типа (mKCs) мозга медоносной пчелы. Исследователи сообщили, что ген *mKast* не относится к необходимым для нормального развития и полового созревания. Несмотря на то, что нокаут *mKast* не привел к очевидным фенотипическим изменениям, эта работа имела важное значение, поскольку показала, что, как и в случае с *mrjp1*, не все гены являются эссенциальными для базового выживания и развития в лабораторных условиях. Возможно, функция *mKast* проявилась бы в более сложных поведенческих задачах или в определенных условиях окружающей среды (87). В 2019 году Х.Ф. Ну с соавт. (88) улучшили протокол, разработанный Т. Kubo с соавторами в 2016 году. Ключевым изменением стала микроинъекция непосредственно в область формирования зиготы в течение 2 ч после откладки яйца. Точный временной интервал и место инъекции оказались критическими для достижения высокой эффективности редактирования. Такой подход позволил добиться одностадийного получения биаллельных нокаут-мутантов, что значительно снижало мозаицизм (наличие как отредактированных, так и неотредактированных клеток в одном организме) и упрощало процесс получения гомозиготных мутантов.

CRISPR-Cas9 позволяет исследовать гены, которые контролируют развитие различных каст (маток, рабочих пчел, трутней) в зависимости от факторов окружающей среды (например, питания). Это помогает понять молекулярные механизмы, лежащие в основе полифенизма (89). Несмотря на отсутствие прямых CRISPR-исследований, направленных на создание устойчивости пчел к *V. destructor* посредством изменения их генома, эта технология находит применение в создании пчел, устойчивых к пестицидам, за счет изменения генов, отвечающих за детоксикацию или целевые участки для инсектицидов (90).

CRISPR-подобные системы или методы, основанные на гомологичной рекомбинации, активно применяются для редактирования геномов бактерий-симбионтов из кишечника пчел, что позволяет изучать взаимодействия хозяин—микроб и создавать модифицированные бактерии для борьбы с патогенами или улучшения здоровья пчел (91, 92).

Однако, несмотря на значительные успехи, применение CRISPR у медоносных пчел сопряжено с определенными трудностями: сложность доставки конструкций в яйцо, особенности уникальной структуры семьи, в которой признак должен стабильно проявляться у рабочих особей, а также серьезные этические и регуляторные барьеры, ограничивающие использование генетически модифицированных организмов (ГМО) в окружающей

среде.

В обозримом будущем эта технология будет служить, прежде всего, мощнейшим инструментом функциональной валидации генов-кандидатов *in vivo*: редактируя конкретный ген у лабораторной пчелы, можно с высочайшей точностью установить его причинно-следственную связь с проявлением VSH или груминга, что укажет на наиболее перспективные мишени для традиционной селекции.

Итак, достижение успеха в выведении пчелиных семей, устойчивых к варроатозу, требует интеграции традиционных методов селекции с передовыми геномными технологиями. Ключевые направления включают глубокое изучение гигиенического поведения и груминга у пчел на нейробиологическом и молекулярном уровнях, а также идентификацию и валидацию генетических маркеров (SNP, QTL), ассоциированных с этими признаками. Использование молекулярных биомаркеров (например, экспрессируемого гена *Neurexin-1*) может дополнить трудоемкие поведенческие тесты. Генетические исследования выявили ряд генов-кандидатов, связанных с обонянием, нервной системой, иммунитетом и метаболизмом, подчеркивая полигенную природу устойчивости. Природные популяции, адаптировавшиеся к *Varroa*, представляют собой ценный генетический ресурс для селекционных программ. Технология CRISPR-Cas9 служит мощным инструментом для функциональной валидации генов *in vivo*, однако ее прямое применение в коммерческой селекции пчел ограничено техническими, этическими и регуляторными барьерами. В обозримом будущем CRISPR будет преимущественно использоваться для идентификации наиболее перспективных мишеней традиционной селекции. Для успешной реализации селекционных программ необходим сбалансированный подход, который не только обеспечит повышение устойчивости к *Varroa*, но и сохранит важные хозяйственные характеристики пчел. Внедрение интегрированных стратегий, сочетающих геномную селекцию и фенотипический отбор, а также международное сотрудничество и стандартизация методов критически важны для создания устойчивых популяций медоносных пчел в долгосрочной перспективе.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр  
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,  
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,  
e-mail: margaretfornara@gmail.com ✉, hellobrat5@gmail.com,  
kuvika2000@mail.ru

Поступила в редакцию  
24 сентября 2025 года  
Принята к публикации  
16 октября 2025 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2025, V. 60, № 6, pp. 941-954

## ETHOLOGICAL AND GENETIC BASIS OF RESISTANCE OF HONEY BEE (*Apis mellifera*) TO *Varroa destructor* MITES (review)

M.S. Fornara<sup>✉</sup>, I.A. Leshchenko, I.S. Kuvika

Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail margaretfornara@gmail.com (✉ corresponding author), hellobrat5@gmail.com, kuvika2000@mail.ru

ORCID:

Fornara M.S. orcid.org/0000-0002-8844-177X

Kuvika I.S. orcid.org/0009-0000-6658-0114

Leshchenko I.A. orcid.org/0009-0002-5821-2682

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation, project No. 25-16-00176

Final revision received September 24, 2025

doi: 10.15389/agrobiology.2025.6.941eng

Accepted October 16, 2025

### Abstract

The honey bee (*Apis mellifera*) is a key pollinator and an important model organism for

studying social behavior, immunity, and adaptation (N. Gallai et al., 2009; S.A.M. Khalifa et al., 2021). Bee populations worldwide are adapting to various conditions, pathogens, and parasites, such as the mite *Varroa destructor* (D. Goulson et al., 2015; D. Frizzera et al., 2023). Understanding the genetic basis of these adaptive traits remains a priority task in apicultural science. The aim of this review is to systematize modern scientific approaches to studying the genetic and behavioral mechanisms of honey bee resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* and to evaluate the prospects of their application in breeding programs, including traditional selection methods and innovative genomic technologies. Infestation by *V. destructor* negatively impacts beekeeping by reducing the lifespan of bees (D. Annoscia et al., 2015; B. Han et al., 2024). Mites also serve as vectors for viral diseases (M.E. Oz et al., 2025; K.S. Traynor et al., 2020). Bees exhibiting hygienic behavior (Varroa-Sensitive Hygiene, VSH) are capable of detecting, uncapping, and removing infested brood (F. Mondet et al., 2020; R.M. Russo et al., 2024). Research has deepened the understanding of the neurobiological basis of VSH, revealing the role of oleic acid and olfactory receptors in sensors (A. McAfee et al., 2018), as well as the coordination of actions by performers (K.M. Wagoner et al., 2020; K.A. Khan et al., 2021). Traditional methods for evaluating hygienic behavior have limitations, which stimulates the development of standardized approaches (O.A. Modin, 2012). The low frequency of hygienic behavior underscores the relevance of selective breeding. Naturally resistant bee populations, for example on Gotland Island (S. Thaduri et al., 2018), in France (Y. Le Conte et al., 2007), and Norway (M.A.Y. Oddie et al., 2017), are valuable genetic resources. Grooming is another resistance factor, in which bees remove mites from their own or another's body (D.J. Pritchard et al., 2016). Africanized bees serve as an example of high grooming activity (C. Invernizzi et al., 2015). Genetic studies reveal factors of bee susceptibility to pathogens. Resistance to varroosis is associated with differences in physiology and behavior (Y. Zhang et al., 2010), while genomic resources from the "Honey Bee Genome Project" (G.E. Robinson et al., 2006) are actively used. The study of QTL (D. Behrens et al., 2011) and SNP (A. Spotter et al., 2016) has identified genetic markers associated with hygienic behavior, including genes related to olfaction, the nervous system (*Neurexin-1*, octopamine receptors), immune response (hymenoptaecin), and ecdysone metabolism (*Mblk-1*) (R. Parker et al., 2012; J.D. Evans et al., 2019). Large-scale studies (M. Sotek et al., 2025) and targeted selection for suppressed mite reproduction (M.G. De Lorio et al., 2025) demonstrate the success of population improvement. Active groomers show a specific gene expression pattern, including *Neurexin-1*, poly-U-binding factor, *kd 68*, and cytochrome P450 (M.M. Hamiduzzaman et al., 2017), with *Neurexin-1* proposed as a molecular biomarker (D. Kabakcı et al., 2025). The CRISPR-Cas9 genome editing system (Y. Ishino et al., 1987; F.J. Mojica et al., 1993) provides targeted gene modifications (X.F. Hu et al., 2019), allows for investigation of caste development (A. Roth et al., 2019), creation of pesticide-resistant bees (E. Inak et al., 2024) and editing the genomes of symbionts (P.J. Lariviere et al., 2024; Q. Huang et al., 2023). However, the application of CRISPR is associated with technical, ethical, and regulatory challenges. In the future, CRISPR will serve as a tool for validating candidate genes for traditional breeding. Achieving success in breeding bee colonies resistant to varroosis requires integrating traditional breeding methods with advanced genomic technologies. This includes studying hygienic behavior and grooming, identifying genetic markers, and using molecular biomarkers. A balanced approach is necessary, which not only increases resistance to *Varroa* but also preserves the economic traits of bees. The implementation of integrated strategies, international cooperation, and standardization of methods are critically important for creating resistant honey bee populations in the long term.

Keywords: honey bee, *Varroa destructor* mite, hygienic behavior, grooming, genetic markers.

## REFERENCES

- Gallai N., Salles J.M., Settele J., Vaissière B.E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 2009, 68(3): 810-821 (doi: 10.1016/j.ecolecon.2008.06.014).
- Klein S., Cabiroi A., Devaud J.M., Barron A.B., Lihoreau M. Why bees are so vulnerable to environmental stressors. *Trends in Ecology & Evolution*, 2017, 32(4): 268-278 (doi: 10.1016/j.tree.2016.12.009).
- Khalifa S.A.M., Elshafey E.H., Shetaia A.A., El-Wahed A.A., Algethami A.F., Musharraf S.G., AlAjmi M.F., Zhao C., Masry S.H.D., Abdel-Daim M.M., Halabi M.F., Kai G., Al Naggari Y., Bishr M., Diab M.A.M., El-Seedi H.R. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 2021, 12(8): 688 (doi: 10.3390/insects12080688).
- Robinson G.E., Grozinger C.M., Whitfield C.W. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(4): 257-270 (doi: 10.1038/nrg1575).
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103(Suppl.): 96-119 (doi: 10.1016/j.jip.2009.07.016).
- Goulson D., Nicholls E., Botias C., Rotheray E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 2015, 347(6229): 1255957 (doi: 10.1126/science.1255957).
- Frizzera D., Zanni V., D'Agaro M., Boaro G., Andreuzza L., Del Fabbro S., Annoscia D.,

- Nazzi F. Varroa destructor exacerbates the negative effect of cold contributing to honey bee mortality. *Journal of Insect Physiology*, 2023, 151: 104571 (doi: 10.1016/j.jinsphys.2023.104571).
8. Sainsbury J., Nemeth T.E., Baldo M., Jochym M., Felman C., Goodwin M., Lumsden M., Pattemore D., Jeanplong F. Marker assisted selection for *Varroa destructor* resistance in New Zealand honey bees. *PLoS ONE*, 2022, 17(9): e0273289 (doi: 10.1371/journal.pone.0273289).
  9. Guichard M., Droz B., Brascamp E.W., von Virag A., Neuditschko M., Dainat B. Exploring two honey bee traits for improving resistance against *Varroa destructor*: development and genetic evaluation. *Insects*, 2021, 12(3): 216 (doi: 10.3390/insects12030216).
  10. Eynard S. E., Mondet F., Basso B., Bouchez O., Le Conte Y., Dainat B., Decourtye A., Genestout L., Guichard M., Guillaume F., Labarthe E., Locke B., Mahla R., de Miranda J., Neuditschko M., Phocas F., Canale-Tabet K., Vignal A., Servin B. Sequence-based multi ancestry association study reveals the polygenic architecture of *Varroa destructor* resistance in the honeybee *Apis mellifera*. *Molecular Ecology*, 2025 34(3): e17637 (doi: 10.1111/mec.17637).
  11. Sepehri B., Alijani S., Javanmard A., Johnmohammadi H., Hasanpur K. Molecular screening of varroa-resistant trait of honey bee colonies based on NorpA2 candidate gene polymorphism: a genetic case-control study. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2023, 13(1): 177.
  12. Harbo J.R., Harris J.W. Responses to varroa by honey bees with different levels of *Varroa* sensitive hygiene. *Journal of Apicultural Research*, 2009, 48(3): 156-161 (doi: 10.3896/IBRA.1.48.3.02).
  13. Ibrahim A., Spivak M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie*, 2006, 37(1): 31-40 (doi: 10.1051/apido:2005052).
  14. Jeyapriya G., Sumathi E., Saminathan V.R., Renukadevi P., Sasikala R., Priya S.S., Kowsika S., Pradeep S. Parasitic mites of honey bees (*Apis* spp.): a detailed review of varroa destructor in parasitism, pathogen transmission and its management. *Acta Parasitologica*, 2025, 70(5): 184 (doi: 10.1007/s11686-025-01124-w).
  15. Spivak M., Danka R.G. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie*, 2021, 52(1): 1-16 (doi: 10.1007/s13592-020-00784-z).
  16. Ramsey S.D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery J.D., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero J.M., Ellis J.D., Hawthorne D., van Engelsdorp D. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(5): 1792-1801 (doi: 10.1073/pnas.1818371116).
  17. Han B., Wu J., Wei Q., Liu F., Cui L., Rueppell O., Xu S. Life-history stage determines the diet of ectoparasitic mites on their honey bee hosts. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 725 (doi: 10.1038/s41467-024-44915-x).
  18. Schneider P., Drescher W. The influence of *Varroa jacobsoni* on weight, development of weight and hypopharyngeal glands, and longevity of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 1987, 18(1): 101-110 (doi: 10.1051/apido:19870108).
  19. Annoscia D., Del Piccolo F., Covre F., Nazzi F. Mite infestation during development alters the in-hive behavior of adult honeybees. *Apidologie*, 2015, 46(3): 306-314 (doi: 10.1007/s13592-014-0323-0).
  20. van Dooremalen C., Gerritsen L., Cornelissen B., van der Steen J.J.M., van Langevelde F., Blacquière T. Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e36285 (doi: 10.1371/journal.pone.0036285).
  21. Kefuss J., Vanpoucke J., Bolt M., Kefuss C. Selection for resistance to *Varroa destructor* under commercial beekeeping conditions. *Journal of Apicultural Research*, 2015, 54(5): 563-576 (doi: 10.1080/00218839.2016.1160709).
  22. Locke B. Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie*, 2016, 47(3): 467-482 (doi: 10.1007/s13592-015-0412-8).
  23. Nordstrum S., Fries I., Aarhus A., Hansen H., Korpela S. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infection. *Apidologie*, 1999, 30(6): 475-484 (doi: 10.1051/apido:19990602).
  24. Oz M.E., Avci O., Dogan M. Factors influencing the prevalence of acute bee paralysis virus in *Apis mellifera* and insights into its phylogenetic relationships. *Virus Genes*, 2025, 61(2): 220-229 (doi: 10.1007/s11262-025-02135-5).
  25. Martin S.J., Highfield A.C., Brettell L., Vilavobos E.M., Budge G.E., Powell M., Nikaido S., Schroeder D.C. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 2012, 336(6086): 1304-1306 (doi: 10.1126/science.1220941).
  26. Ryabov E.V., Wood G.R., Fannon J.M., Moore J.D., Bull J.C., Chandler D., Mead A., Burroughs N., Evans D.J. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in Vitro*, transmission. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(6): e1004230 (doi: 10.1371/journal.ppat.1004230).
  27. Martin S.J., Brettell L.E. Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Annual Review of Virology*, 2019, 6(1): 49-69 (doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015700).
  28. Piou V., Schurr F., Dubois E., Vétillard A. Transmission of deformed wing virus between *Varroa destructor* foundresses, mite offspring and infested honey bees. *Parasites Vectors*, 2022, 15: 333

- (doi: 10.1186/s13071-022-05463-9).
29. Shafiey H., Gogol-Durring A., McMahon D.P., Doublet V., Disayathanoowat T., Paxton R.J. A new variant of slow bee paralysis virus revealed by transcriptome analysis. *Journal of Apicultural Research*, 2025, 64(1): 56-59 (doi: 10.1080/00218839.2024.2425912).
  30. Traynor K.S., Mondet F., de Miranda J.R., Techer M., Kowallik V., Oddie M.A.Y., Chantawannakul P., McAfee A. *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in parasitology*, 2020, 36(7): 592-606 (doi: 10.1016/j.pt.2020.04.004).
  31. Mondet F., Beaurepaire A., McAfee A., Locke B., Alaux C., Blanchard S., Danka B., Le Conte Y. Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology*, 2020, 50(6-7): 433-447 (doi: 10.1016/j.ijpara.2020.03.005).
  32. Russo R.M., Pietronave H., Conte C.A., Liendo M.C., Basilio A., Lanzavecchia S.B., Scannapieco A.C. Stimulus-specific gene expression profiles associated with grooming behavior and *Varroa destructor* resistance in honey bees. *Frontiers in Bee Science*, 2024, 2: 1441317 (doi: 10.3389/frbee.2024.1441317).
  33. McAfee A., Chapman A., Iovinella I., Gallagher-Kurtzke Y., Collins T.F., Higo H., Madilao L.L., Pelosi P., Foster L.J. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Scientific Reports*, 2018, 8: 5719 (doi: 10.1038/s41598-018-24054-2).
  34. Guarna M.M., Melathopoulos A.P., Huxter E., Iovinella I., Parker R., Stoynov N., Tam A., Moon K.-M., Chan Q.W.T., Pelosi P., White R., Pernal S.F., Foster L.J. A search for protein biomarkers links olfactory signal transduction to social immunity. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 63 (doi: 10.1186/s12864-014-1193-6).
  35. Wagoner K.M., Millar J.G., Schal C., Rueppell O. Cuticular pheromones stimulate hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera*). *Sci Rep.*, 2020, 10: 7132 (doi: 10.1038/s41598-020-64144-8).
  36. Boecking O. Sealing up and non-removal of diseased and *Varroa jacobsoni* infested drone brood cells is part of the hygienic behaviour in *Apis cerana*. *Journal of Apicultural Research*, 1999, 38(3-4): 159-168 (doi: 10.1080/00218839.1999.11101006).
  37. Moretto G., Guerra Jr. J.C., Bittencourt C.V. Uncapping activity of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) towards worker brood cells infested with the mite *Varroa destructor* Anderson & Treuman (Mesostigmata: Varroidae). *Neotropical Entomology*, 2006, 35(3): 299-301 (doi: 10.1590/S1519-566X2006000300002).
  38. Khan K.A., Ghramh H.A. An investigation of the efficacy of hygienic behavior of various honey bee (*Apis mellifera*) races toward *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) mite infestation. *Journal of King Saud University-Science*, 2021, 33(3): 101393 (doi: 10.1016/j.jksus.2021.101393).
  39. Taber S. Determining resistance to brood diseases. *American Bee Journal*, 1982, 122: 422-425.
  40. Thompson V.C. Behaviour genetics of nest cleaning honeybees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research*, 1964, 3: 25-30 (doi: 10.1080/00218839.1964.11100078).
  41. Momot J.P., Rjthenbuhler W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *Journal of Apicultural Research*, 1971, 10: 11-21 (doi: 10.1080/00218839.1971.11099665).
  42. Breed M.D., Garry M.F., Pearce A.N., Hibbard B.E., Bjostad L.B., Pasge R.E. Jr. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, 1995, 50(2): 489-496 (doi: 10.1006/anbe.1995.0263).
  43. Gramocho K.P., Spivak M. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2003, 54: 472-479 (doi: 10.1007/s00265-003-0643-y).
  44. Krivtsova L.S. V sbornike: *Problemi entomologii i arakhnologii* [In: Problems of entomology and arachnology]. Tyumen', 2001: 138-140 (in Russ.).
  45. Modin O.A. *Sposob otsenki gigienicheskogo povedeniya pchel*. A.s. 2534586 C2 (RF) MPK A 01 K55/00. *Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie Vserossiyskiy nauchno-issledovatel'skiy institut Veterinarnoy entomologii i arakhnologii Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennikh nauk (RF)*. № 2012153081/13. *Zayavl. 07.12.2012. Opubl. 27.11.2014* [A method for assessing the hygienic behavior of bees. A.s. 2534586 C2 (RF) IPC A 01 K55/00. State scientific institution All-Russian Research Institute of Veterinary Entomology and Arachnology of the Russian Academy of Agricultural Sciences (RF). No. 2012153081/13. Application 07.12.2012. Publ. 11/27/2014] (in Russ.).
  46. Brandorf A.Z., Shestakova A.I., Svishchuk D.V., Lar'kina E.O. In: *General question of world science*. Brussels, 2021: 123-128 (doi: 10.18411/gq-31-03-2021-27) (in Russ.).
  47. Komlatskiy V.I., Strel'bitskaya O.V., Leshchenko V.A. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Pchelovodstvo i apiterapiya: sovremennye podkhodi i razvitiye»* [Proc. Int. Conf. «Beekeeping and apitherapy: modern approaches and development»]. Ribnoe, 2021: 88-93 (doi: 10.51759/fncp\_bee\_2021\_17) (in Russ.).
  48. Spivak M., Gilliam M. Facultative expression of hygienic behavior of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*, 1993, 32: 147-157 (doi: 10.1080/00218839.1993.11101300).

49. Oldroyd B.P. Evaluation of Australian commercial honey bees for hygienic behavior, a critical character for tolerance to chalkbrood. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 1996, 36(5): 625-629 (doi: 10.1071/EA9960625).
50. Thaduri S., Locke B., Granberg F., de Miranda J.R. Temporal changes in the viromes of Swedish *Varroa*-resistant and *Varroa*-susceptible honeybee populations. *PLoS ONE*, 2018, 13(12): e0206938 (doi: 10.1371/journal.pone.0206938).
51. Le Conte Y., De Vaublanc G., Crauser D., Jeanne F., Rousselle J.-C., Bécard J.-M. Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*, 2007, 38(6): 566-572 (doi: 10.1051/apido:2007040).
52. Oddie M.A.Y., Dahle B., Neumann P. Norwegian honey bees surviving *Varroa destructor* mite infestations by means of natural selection. *Peer J.*, 2017, 5: e3956 (doi: 10.7717/peerj.3956).
53. Moritz R.F.A., de Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Neumann P., Paxton R.J. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, 2010, 41: 227-242 (doi: 10.1051/apido/2010010).
54. Bourgeois A.L., Rinderer T.E. Genetic characterization of Russian honey bee stock selected for improved resistance to *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, 2009, 102(3): 1233-1238 (doi: 10.1603/029.102.0349).
55. Peng Y.-S., Fang Y., Xu S., Ge L., Nasr M.E., The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1987, 49(1): 54-60 (doi: 10.1016/0022-2011(87)90125-X).
56. Pritchard D.J. Grooming by honey bees as a component of *Varroa* resistant behavior. *Journal of Apicultural Research*, 2016, 55: 38-48 (doi: 10.1080/00218839.2016.1196016).
57. Dadoun N., Nait-Mouloud M., Mohammedi A., Sadeddine Zennouche O. Differences in grooming behavior between susceptible and resistant honey bee colonies after 13 years of natural selection. *Apidologie*, 2020, 51: 793-801 (doi: 10.1007/s13592-020-00761-6).
58. Russo R.M., Liendo M.C., Landi L., Pietronave H., Merke J., Fain H., Muntaabski I., Palacio M.A., Rodriguez G.A., Lanzavecchia S.B., Scannapieco A.C. Grooming behavior in naturally *Varroa*-resistant *Apis mellifera* colonies from north-central Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2020, 8: 590281 (doi: 10.3389/fevo.2020.590281).
59. Guzman-Novoa E., Emsen B., Unger P., Espinosa-Montaco L.G., Petukhova T. Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(3): 314-320 (doi: 10.1016/j.jip.2012.03.020).
60. Invernizzi C., Zefferino I., Santos E., Sánchez L., Mendoza Y. Multilevel assessment of grooming behavior against *Varroa destructor* in Italian and Africanized honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 2015, 54: 321-327 (doi: 10.1080/00218839.2016.1159055).
61. Nganso B.T., Fombong A.T., Yusuf A.A., Pirk C.W., Stuhl C., Torto B. Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees—new damage categories in *Varroa destructor*. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0179329 (doi: 10.1371/journal.pone.0179329).
62. Tsuruda J.M., Harris J.W., Bourgeois L., Danka R.G., Hunt G.J. High-resolution linkage analyses to identify genes that influence *Varroa* sensitive hygiene behavior in honey bees. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e48276 (doi: 10.1371/journal.pone.0048276).
63. Holloway B., Sylvester H.A., Bourgeois L., Rinderer T.E. Association of single nucleotide polymorphisms to resistance to chalkbrood in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 2012, 51: 154-163 (doi: 10.3896/IBRA.1.51.2.02).
64. Holloway B., Tarver M.R., Rinderer T.E. Fine mapping identifies significantly associating markers for resistance to the honey bee brood fungal disease, Chalkbrood. *Journal of Apicultural Research*, 2013, 52(3): 134-140 (doi: 10.3896/IBRA.1.52.3.04).
65. Bourgeois A.L., Rinderer T.E., de Guzman L.I., Holloway B. Molecular genetic analysis of *Varroa destructor* mites in brood, fallen injured mites, and worker bee longevity in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 2015, 54(4): 328-334 (doi: 10.1080/00218839.2016.1160635).
66. Navajas M., Migeon A., Alaux C., Martin-Magniette M., Robinson G., Evans J., Cros-Arteil S., Crauser D., Le Conte Y. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, 2008, 9: 301 (doi: 10.1186/1471-2164-9-301).
67. Zhang Y., Liu X., Zhang W., Han R. Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56(9): 1207-1218 (doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.019).
68. The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443: 931-949 (doi: 10.1038/nature05260).
69. Robinson G.E., Evans J.D., Maleszka R., Robertson H.M., Weaver D.B., Worley K., Gibbs R.A., Weinstock G.M. Sweetness and light: illuminating the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 535-539 (doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00698.x).
70. Oxley P.R., Spivak M., Oldroyd B.P. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 2010, 19(7): 1452-1461 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04569.x).
71. Lapidge K.I., Oldroyd B.P., Spivak M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften*, 2002, 89: 565-568 (doi: 10.1007/s00114-002-0371-6).

72. Behrens D., Huang Q., Geßner C., Rosenkranz P., Frey E., Locke B., Moritz R.F.A., Kraus F.B. Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*. *Ecology and Evolution*, 2011, 1(4): 451-458 (doi: 10.1002/ece3.17).
73. Spötter A., Gupta P., Mayer M., Reisch N., Bienfeld K. Genome-wide association study of a *Varroa*-specific defense behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Heredity*, 2016, 107(3): 220-227 (doi: 10.1093/jhered/esw005).
74. Maqueira B., Chatwin H., Evans P.D. Identification and characterization of a novel family of *Drosophila*  $\beta$ -adrenergic-like octopamine G-protein coupled. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 94(2): 547-560 (doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03251.x).
75. Parker R., Guarna M.M., Melathopoulos A.P., Moon K.-M., White R., Huxter E., Pernal S. F., Foster L.J. Correlation of proteome-wide changes with social immunity behaviors provides insight into resistance to the parasitic mite, *Varroa destructor*, in the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Biol.*, 2012, 13: R81 (doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r81).
76. Riddiford L.M. Hormones and *Drosophila* development. In: *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993, 2: 899-939.
77. Conlon B.H., Aurori A., Giurgiu A.I., Kefuss J., Dezmirean D.S., Moritz R.F.A., Routtu J. A gene for resistance to the *Varroa* mite (Acari) in honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Molecular Ecology*, 2019, 28(12): 2958-2966 (doi: 10.1111/mec.15080).
78. Evans J.D. Selection for barriers between honey bees and a devastating parasite. *Molecular Ecology*, 2019, 28(12): 2955-2957 (doi: 10.1111/mec.15142).
79. Šotek M., Pridal A., Urban T., Knoll A. Genetic diversity in candidate single-nucleotide polymorphisms associated with resistance in honeybees in the Czech Republic using the novel SNaPshot genotyping panel. *Genes*, 2025, 16(3): 301 (doi: 10.3390/genes16030301).
80. De Iorio M.G., Biffani S., Pagnacco G., Stella A., Cozzi M.C.S., Maggi L.A., Minozzi G. Results of four generations of selection for *Varroa* Sensitive hygienic behavior in honey bees. *Italian Journal of Animal Science*, 2025, 24(1): 1959-1967 (doi: 10.1080/1828051X.2025.2553715).
81. Hamiduzzaman M. Md., Emsen B., Hunt G.J., Subhashree Subramanyam S., Williams C.E., Jennifer M., Tsuruda J.M., Guzman-Novoa E. Differential gene expression associated with honey bee grooming behavior in response to *Varroa* mites. *Behavior Genetics*, 2017, 47(3): 335-344 (doi: 10.1007/s10519-017-9834-6).
82. Kabakçı D., Karataş Ü., Tunca R.I., Çankaya M., Karabağ K., Akdeniz G., Kuzucu M. Unveiling genetic defense mechanisms: expression analysis of *hym*, *AmNrx1*, and *CYP9Q3* genes in *Varroa*-resistant anatolian honey bees. *Veterinary Research Communications*, 2025, 49: 17 (doi: 10.1007/s11259-024-10587-7).
83. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433 (doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987).
84. Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterraneae* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites. *Molecular Microbiology*, 1993, 9(3): 613-621 (doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x).
85. Jansen R., van Embden J.D., Gastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575 (doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x).
86. Kohno H., Suenami S., Takeuchi H., Sasaki T., Kubo T. Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. *Zoological Science*, 2016, 33(5): 505-512 (doi: 10.2108/zs160043).
87. Kohno H., Kubo T. *mKast* is dispensable for normal development and sexual maturation of the male European honeybee. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 11877 (doi: 10.1038/s41598-018-30380-2).
88. Hu X.F., Zhang B., Liao C.H., Zeng Z.J. High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2019, 9(5): 1759-1766 (doi: 10.1534/g3.119.400130).
89. Roth A., Vleurinck C., Netschitailo O., Bauer V., Otte M., Kaftanoglu O., Page R.E., Beye M. A genetic switch for worker nutrition-mediated traits in honeybees. *PLoS Biol.*, 2019, 17(3): e3000171 (doi: 10.1371/journal.pbio.3000171).
90. İnak E., De Rouck S., Koç-İnak N., Erdem E., Rüstemoğlu M., Dermauw W., Van Leeuwen, T. Identification and CRISPR-Cas9 validation of a novel  $\beta$ -adrenergic-like octopamine receptor mutation associated with amitraz resistance in *Varroa destructor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2024, 204: 106080 (doi: 10.1016/j.pestbp.2024.106080).
91. Larivière P.J., Ashraf A.Z., Navarro-Escalante L., Leonard S.P., Miller L.G., Moran N.A., Barrick J.E. One-step genome engineering in bee gut bacterial symbionts. *mBio*, 2024, 15(9): e01392-24 (doi: 10.1128/mbio.01392-24).
92. Huang Q., Larivière P.J., Powell J.E., Moran N.A. Engineered gut symbiont inhibits microsporidian parasite and improves honey bee survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2023, 120(25): e2220922120 (doi: 10.1073/pnas.2220922120).