

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

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**ОЦІНКА РІВНЯ ГІБРИДИЗАЦІЇ МЕДОНОСНИХ БДЖІЛ НА ОСНОВІ ISSR
МАРКЕРІВ ЗАХІДНОЇ УКРАЇНИ**

Виконала:

студентка 4 курсу, групи 407
спеціальність 162 Біотехнологія та
біоінженерії

Явдосюк Анна Валентинівна

Керівник:

Кандидат біологічних наук,
асистент **Череватов О.В.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № ____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедри. _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці – 2025

Анотація

Бджоли, як життєво важливі запилювачі, мають величезне значення не тільки для екосистем, але й для світового сільського господарства та біорізноманіття. Їх генетична різноманітність та пристосованість частково формуються під впливом природної та штучної гібридизації. У цій роботі досліджується генетична структура популяцій бджіл за допомогою молекулярних методів, з особливим акцентом на маркерах Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Маркери ISSR, відомі своєю високою відтворюваністю та здатністю виявляти поліморфізм, є ефективним підходом до ідентифікації гібридних особин. Попередньо вилучені зразки ДНК були проаналізовані за допомогою ПЛР з праймерами BE1–BE8 і візуалізовані за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Ключові слова: Issr- маркери, гібридизація, поліморфізм, *Apis mellifera*.

Abstract

Bees, as vital pollinators, are of immense importance not only for ecosystems but also for global agriculture and biodiversity. Their genetic diversity and adaptability are partly shaped by natural and artificial hybridization. This study investigates the genetic structure of bee populations using molecular methods, with a particular focus on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. ISSR markers, known for their high reproducibility and ability to detect polymorphism, are an effective approach for identifying hybrid individuals. Previously extracted DNA samples were analyzed by PCR with primers BE1–BE8 and visualized by agarose gel electrophoresis

Keywords: Issr markers, hybridization, polymorphism, *Apis mellifera*.

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

Явдосюк Анна

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
 РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	5
1.1. Гібридизація бджіл	5
1.2. Молекулярні маркери.....	6
1.3. SSR-маркери	8
1.4. SNP-маркери	10
1.5. ISSR-маркери	12
1.6. Методи дослідження з використанням ISSR-маркерів.....	13
 РОЗДІЛ2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	15
2.1. Виділення ДНК з клітин тварин.....	16
2.2. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.....	17
2.3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	18
2.4. Статистичний аналіз отриманих даних.....	19
2.4.1. Алгоритм використання програми «TotalLab TL 120».....	19
2.4.2. Алгоритм використання програми «DARwin 6».....	20
2.4.3 Програмне забезпечення та пакети для статистичної обробки ISSR-даних.....	21
 РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	24
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
ДОДАТКИ.....	40

Вступ

Медоносні бджоли (*Apis mellifera*) є одними з найважливіших запилювачів у природних та сільськогосподарських екосистемах. Їхня роль у підтримці біорізноманіття та виробництві сільськогосподарських культур робить дослідження їхніх популяцій особливо важливим. Однак ідентифікація різних популяцій або підвидів медоносних бджіл є досить складним завданням, оскільки ці комахи відрізняються переважно поведінковими характеристиками та екологічними адаптаціями, а не чіткими морфологічними або анатомічними ознаками. У цьому контексті молекулярні маркери стали потужним інструментом для генетичної ідентифікації та характеристики популяцій медоносних бджіл.

Серед різних типів молекулярних маркерів маркери ISSR широко визнані за їх ефективність, відтворюваність та здатність виявляти поліморфізми в некодуючих ділянках геному. Ці маркери виявилися особливо корисними для вивчення генетичного різноманіття, структури популяцій та рівнів гібридизації популяцій медоносних бджіл, надаючи цінну інформацію, недоступну за допомогою традиційного морфологічного аналізу.

Метою даного дослідження є вивчення генетичного різноманіття медоносних бджіл у південно-західних регіонах України за допомогою ISSR-маркерів. Цей регіон представляє особливий інтерес завдяки своєму екологічному та сільськогосподарському значенню, а також потенційній присутності генетично відмінних популяцій бджіл.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

1. Провести генетичний аналіз зразків медоносних бджіл на основі ISSR-маркерів.
2. Провести порівняльний аналіз генетичної структури популяцій медоносних бджіл з різних регіонів України.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гібридизація бджіл: поняття, причини, наслідки

Гібридизація медоносних бджіл (*Apis mellifera*) є важливим біологічним процесом, що полягає у схрещуванні особин різних підвидів або популяцій, внаслідок чого формуються нові генотипи з рекомбінованими спадковими ознаками. Така міжпопуляційна або міжпідвидова взаємодія має суттєвий вплив на генетичну структуру бджолосімей, їх адаптивні властивості, продуктивність, поведінкові особливості, а також стійкість до захворювань (Büchler et al., 2019).

Природна гібридизація виникає унаслідок вільного спаровування маток із трутнями з різних бджолиних колоній, що утримуються на одній території, або у місцях із високою щільністю пасік. Такий процес особливо інтенсивний у регіонах, де відбувається одночасне утримання аборигенних та інтродукованих підвидів або селекційних ліній медоносної бджоли. Як наслідок, відбувається поступове проникнення чужорідного генетичного матеріалу до генофонду місцевих популяцій, що з часом може призвести до ерозії характерних адаптивних ознак аборигенних форм. Для українського контексту це особливо актуально у випадку з українською степовою бджолою (*Apis mellifera sossimai*), яка внаслідок неконтрольованої гібридизації з карпатською, кавказькою та іншими породами, зазнає втрати генетичної ідентичності (Chahbar et al., 2023).

Штучна гібридизація є цілеспрямованим процесом, що реалізується в умовах контрольованого розведення з метою отримання бджіл із заданими господарсько цінними ознаками. Найпоширенішим методом такого типу гібридизації є штучне осіменіння, яке забезпечує точний добір батьківських особин і дозволяє прогнозовано передавати бажаної фенотипові характеристики нащадкам. Водночас, надмірне використання гібридизації без належного моніторингу супроводжується ризиками втрати алельного різноманіття, зниженням адаптивного потенціалу та генетичної стабільності популяцій (Hasnat et al., 2022; De la Rúa et al., 2019).

Існує два основних методи штучної гібридизації бджіл:

- **Інструментальне запліднення:** Цей метод полягає в штучному заплідненні матки спермою від вибраного трутня. Сперму трутня збирають і вводять у матку за допомогою спеціального інструменту (Laidlaw et al., 2015)
- **Контрольоване парування:** Цей метод полягає в створенні умов, які сприяють схрещуванню бджіл з бажаними характеристиками. Це може включати ізоляцію колоній, використання штучних гнізд або випуск трутнів з бажаними генами (Weaver, 1993).

Отже, гібридизація у медоносних бджіл є невід'ємним елементом еволюційної динаміки, здатним як підвищувати генетичне різноманіття, так і поставити під загрозу цілісність місцевих генофондів. Тому застосування молекулярних маркерів, зокрема ISSR- набуває вагомого значення, вони дають змогу виявити рівні гібридизації та структури популяції, таким чином сприяють розробці ефективних стратегій збереження селекційного розведення бджіл.

1.2. Молекулярні маркери

Мікросателітні маркери, також відомі як прості повтори послідовності (Simple Sequence Repeats, SSR) або короткі тандемні повтори (Short Tandem Repeats, STR), є типом ДНК-маркерів, які широко використовуються в дослідженнях генетики бджіл. Ці маркери складаються з коротких тандемних повторів 1-6 нуклеотидів, які розкидані по геному бджіл.

Молекулярно-генетичні маркери є незамінними інструментами в дослідженні популяцій медоносних бджіл (*Apis mellifera*), оскільки дають уявлення про генетичний склад, різноманітність та структуру популяцій бджіл. Серед найбільш використовуваних маркерів у дослідженнях є мікросателіти (SSR) та маркери міжсателітних послідовностей (ISSR). Ці молекулярні інструменти мають різні, але взаємодоповнюючі переваги з точки зору роздільної здатності, вартості та вимог до геномної інформації. Їх застосування є особливо важливим у контексті моніторингу

гібридизації, де інтрогресія з немісцевих ліній може поставити під загрозу генетичну цілісність місцевих підвидів медоносних бджіл (Nagy et al., 2019).

Мікросателіти складаються з повторюваних одиниць довжиною 1-6 нуклеотидів, таких як (CA)_n, (AT)_n або (GATA)_n, де 'n' позначає кількість повторюваних одиниць. Ці послідовності розподілені по всьому геному, як у кодуючих, так і в некодуючих ділянках. Високий рівень мутацій мікросателітів, головним чином через ковзання реплікації, призводить до варіацій у кількості повторюваних одиниць серед індивідів, що призводить до високих рівнів поліморфізму (Harpur et al., 2019).

Мікросателітні маркери мають численні переваги, що робить їх особливо цінними в молекулярно-генетичному аналізі. По-перше, їх високий рівень поліморфізму забезпечує роздільну здатність при розрізненні особин та оцінці генетичної мінливості всередині та між популяціями (Wallberg et al., 2022). По-друге, мікросателіти демонструють кодомінантне успадкування, що дозволяє виявляти обидва алелі в певному локусі у диплоїдних організмів, що є надзвичайно важливим для точної оцінки гетерозиготності та частоти алелей (Kraus et al., 2020). По-третє, мікросателіти поширені та рівномірно розподілені по геному, що полегшує їх застосування в геномних дослідженнях, аналізі зв'язків та селекції за допомогою маркерів (Quezada-Euan et al., 2020). Крім того, оскільки більшість локусів мікросателітів розташовані в некодуючих ділянках геному, вони загалом вважаються селективно нейтральними, що мінімізує вплив природного відбору на генетичну мінливість і робить їх ідеальними маркерами для визначення структури популяції та демографічної історії (Guarna et al., 2019).

Незважаючи на ці переваги, мікросателітні маркери також мають певні обмеження. Одним з таких обмежень є наявність нульових алелей — неампліфікованих алелей, що виникають в результаті мутацій у місцях зв'язування праймерів. Ці алелі можуть призвести до помилок генотипування та неточної оцінки частоти алелей і гетерозиготності (Wallberg et al., 2022). Іншим недоліком є

гомоплазія, при якій алелі однакового розміру виникають незалежно в окремих еволюційних подіях, що може призвести до недооцінки генетичної диференціації та спорідненості (Kraus et al., 2020). Механізми мутацій, що лежать в основі мікросателітів, хоча і вважаються загалом заснованими на реплікаційному зсуві, можуть призводити до складної мутаційної динаміки, що ускладнює інтерпретацію варіацій мікросателітів (Harpur et al., 2019). Крім того, розробка та оптимізація мікросателітних маркерів вимагають значних технічних зусиль, включаючи розробку локус-специфічних праймерів та валідацію на різних особинах або популяціях (Quezada-Euan et al., 2020).

1.2.1 SSR-маркери

SSR-маркери, також відомі як мікросателітні маркери, являють собою короткі тандемні повтори (2-6 нуклеотидів) в ДНК, які розташовуються як у міжгенних, так і в кодуючих ділянках геному. Їхня частота та розмір можуть варіюватися між різними генами та популяціями, роблячи їх цінними інструментами для дослідження генетичного різноманіття (Lee, 2019).

Важливою характеристикою SSR-маркерів є їх поліморфізм, тобто варіативність кількості повторів між особинами та популяціями. Цей поліморфізм робить їх цінними інструментами для генетичних досліджень, адже дозволяє: Ідентифікувати та розрізняти особин у популяції, вивчати генетичну структуру популяцій, а також досліджувати еволюційні стосунки між видами та оцінювати рівень генетичного різноманіття. Їх висока мінливість і здатність передаватися між різними видами роблять SSR-маркери цінними інструментами для оцінки рівнів генетичної різноманітності.

Маркери SSR, також відомі як прості повтори послідовності або мікросателіти, складаються з коротких повторюваних послідовностей ДНК. Ці послідовності складаються з тандемних повторів основного мотиву, як правило, довжиною 2-6 нуклеотидів, наприклад А, С, G або Т. Наприклад, загальний мотив SSR може бути «AG», повторюваним кілька разів поспіль у послідовності ДНК.

Повторюваний характер SSR-маркерів виникає через прослизання під час реплікації ДНК, де фермент ДНК-полімераза може прослизати та збиватися під час реплікації, що призводить до розширення або скорочення повторюваних одиниць. Це явище призводить до мінливості кількості повторюваних одиниць між індивідуумами, що робить маркери SSR дуже поліморфними (Ellegren, 2020).

Маркери SSR розсіяні по всьому геному організмів, включаючи рослини, тварин і мікроорганізми. Їх можна знайти як у кодуючих, так і в некодуючих областях геному.

Маркери SSR характеризуються короткими послідовностями ДНК (зазвичай довжиною 2-6 пар основ), які повторюються в тандемі. Загальні мотиви включають динуклеотидні повтори (наприклад, CA/GT), тринуклеотидні повтори (наприклад, CAG/GTC), тетрануклеотидні повтори (наприклад, GATA/CTAT) і пента- та гексануклеотидні повтори. Кількість повторюваних одиниць може значно відрізнятися серед різних особин виду, що сприяє їх поліморфізму (Jian Zhang, 2023)

Повторювана послідовність у маркері SSR фланкована унікальними послідовностями ДНК з обох боків. Ці фланкуючі області є вирішальними, оскільки вони забезпечують необхідні сайти для конструювання праймерів, які використовуються в ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Праймери зв'язуються з цими фланкуючими ділянками, щоб посилити область SSR для подальшого аналізу (Jieru Xu et al., 2024)

Мінливість кількості повторюваних одиниць у різних індивідуумів робить маркери SSR дуже поліморфними. Цей поліморфізм є основною причиною, чому маркери SSR корисні для розрізнення різних генотипів, оцінки генетичного різноманіття та картографування генетичних ознак. По суті, маркери SSR складаються з основної послідовності повторюваних нуклеотидів, фланкованих унікальними послідовностями, які дозволяють ампліфікувати та аналізувати повторювану область.

Ця структура дозволяє широко використовувати їх у генетичних дослідженнях і селекційних програмах завдяки високому рівню варіабельності та простоті аналізу.

1.2.2 SNP-маркери

Однонуклеотидні поліморфізми (SNP) є найпоширенішою формою генетичної мінливості, що спостерігається в геномах еукаріотів, включаючи геном медової бджоли (*Apis mellifera*). SNP представляє собою зміну однієї пари нуклеотидів у послідовності ДНК, як правило, заміну одного нуклеотиду (А, Т, С або G) на інший. Ці варіації можуть виникати як у кодуючих, так і в некодуючих ділянках геному і можуть мати або не мати фенотипних ефектів залежно від їх геномного контексту та функціональної значущості (Kumar et al., 2021). Завдяки високій частоті та поширенню по всьому геному SNP слугують високоінформативними молекулярними маркерами для генетичних та геномних досліджень.

SNP можна класифікувати на синонімічні (мовчазні) та несинонімічні типи залежно від того, чи змінюють вони кодовану амінокислоту в генному продукті. Несинонімічні SNP можуть призводити до місенс- або нонсенс-мутацій, що потенційно змінюють функцію білка та призводять до фенотипних відмінностей або схильності до захворювань (Patel et al., 2022). Крім того, SNP в регуляторних ділянках можуть впливати на рівні експресії генів, а в інтронних ділянках — на сплайсинг або стабільність РНК. Ці особливості підкреслюють біологічне значення SNP в еволюції, розвитку та фізіологічній адаптації. Однією з ключових переваг SNP-маркерів є їх кодомінантне успадкування, що дозволяє дослідникам розрізняти гомозиготні та гетерозиготні генотипи. Це полегшує точне генетичне картування та дозволяє проводити надійну оцінку алельних варіацій всередині популяцій та між ними (Singh et al., 2019). SNP також характеризуються низькими рівнями мутацій, що робить їх стабільними та надійними протягом поколінь для використання в еволюційних та популяційно-генетичних дослідженнях.

Маркери SNP широко застосовуються в геномних асоціативних дослідженнях (GWAS), де вони допомагають ідентифікувати гени, пов'язані з конкретними ознаками, такими як стійкість до хвороб, поведінкові ознаки та адаптація до навколишнього середовища. Вони виявилися особливо корисними для таких організмів, як медоносні бджоли, де морфологічна диференціація між підвидами обмежена, а поведінкові ознаки важко піддаються кількісній оцінці. Поширеність SNP по всьому геномі дозволяє проводити високоточний аналіз структури популяції, домішок та генного потоку, що робить їх потужним інструментом у програмах збереження та селекції (Wang et al., 2020).

Однією з істотних переваг SNP над іншими типами маркерів є їх придатність для генотипування з високою пропускнуою здатністю. Такі технології, як SNP-масиви, мас-спектрометрія та платформи секвенування нового покоління (NGS), дозволяють швидко аналізувати тисячі локусів у багатьох зразках з високою точністю та відтворюваністю (Zhao & Li, 2020). Ця масштабованість робить SNP-маркери ідеальними для широкомасштабних досліджень у геноміці, медицині та аграрних науках.

Однак SNP-маркери також мають деякі обмеження. Оскільки вони зазвичай є біалельними, кожен SNP надає менше інформації на локус, ніж мультиалельні маркери, такі як мікросателіти. Отже, для досягнення порівнянного рівня генетичної роздільної здатності може знадобитися більша кількість SNP. Крім того, виявлення SNP та розробка тестів можуть бути ресурсомісткими, вимагаючи доступу до еталонного геному та складних біоінформаційних інструментів. Іншим фактором, який слід врахувати, є упередженість визначення, коли SNP, ідентифіковані в одній популяції, можуть не бути поліморфними або інформативними в іншій, що може спотворити оцінки генетичного різноманіття (Kumar et al., 2021).

1.2.3 ISSR-маркери

ISSR-маркери (Inter Simple Sequence Repeats) - це молекулярні маркери, які використовуються для аналізу генетичної різноманітності та вивчення еволюційних процесів у різних організмів, включаючи рослини, тварини та мікроорганізми. Вони були розроблені на основі міжгенних ділянок геному, які містять повторювані послідовності. Ці повторювані послідовності формуються за допомогою спеціальних праймерів, які розташовуються поруч з повторами в міжгенних ділянках геному (Undal & Ahir, 2023).

ISSR-маркери є високополіморфними, тобто вони дозволяють виявляти невеликі відмінності в генетичній структурі між окремими особинами. Це робить їх потужним інструментом для аналізу генетичного різноманіття та вивчення факторів, які впливають на генетичну структуру популяцій, таких як екологічні та географічні чинники (Borborah et al., 2020).

ISSR-маркери (Inter-Simple Sequence Repeat) ампліфікуються за допомогою двох праймерів, комплементарних простим тандемним повторам (SSR). Один праймер комплементарний 3'-кінцю SSR, а інший - ділянці ДНК, розташованій на відстані 100-2000 нуклеотидів від 5'-кінця SSR. Ця відстань визначається довжиною праймера та температурою ампліфікації.

В результаті ампліфікації утворюються поліморфні фрагменти ДНК, розмір яких залежить від числа повторів SSR в даній ділянці геному та відстані між SSR та праймерами (Volleth and Herrmann, 2021).

Однією з переваг ISSR-маркерів є їх універсальність, оскільки їх можна використовувати у всіх організмів. Крім того, вони дозволяють аналізувати широкий спектр геномних ділянок, що забезпечує більш повну картину генетичного різноманіття (Abdalla et al., 2020).

Використання ISSR-маркерів у дослідженнях генетичної різноманітності дозволяє не лише оцінити рівень генетичного різноманіття, але й вивчити механізми, які формують цю різноманітність в популяціях. Вони можуть бути також використані для встановлення родинних зв'язків між окремими особинами та дослідження еволюційних процесів (Abdalla et al., 2020).

У дослідженнях генетичної структури популяцій бджіл ISSR-маркери використовуються для вивчення механізмів розвитку та еволюції цих комах, їх адаптації до змін навколишнього середовища та взаємодії з людиною. Вони також дозволяють встановлювати генетичну ідентичність різних ліній бджіл та розробляти ефективні методи селекції та збереження генетичних ресурсів бджіл (Abdalla et al., 2020).

Таким чином, ISSR-маркери представляють собою важливий інструмент для вивчення генетичної різноманітності та еволюційних процесів в різних організмах, включаючи бджіл, та можуть бути використані для встановлення родинних зв'язків, дослідження екологічних та географічних факторів, що впливають на генетичну структуру популяцій.

1.3 Методи дослідження з використанням ISSR-маркерів

При дослідженні бджіл розуміння генетичного різноманіття та структури популяції має важливе значення для стратегій збереження та управління. Метод Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) став цінним інструментом для генетичного аналізу завдяки своїй економічній ефективності та здатності генерувати поліморфні маркери без попередньої геномної інформації.

ISSR-метод - це метод молекулярної маркерної діагностики, заснований на ампліфікації повторюваних послідовностей ДНК з використанням довільних послідовностей з одним або декількома короткими повторами.

Метод ISSR широко використовувався в різних організмах завдяки його здатності виявляти високі рівні поліморфізму за допомогою відносно простої та економічно ефективної процедури» (Wang et al., 2021). ISSR використовує ПЛР-ампліфікацію областей між мікросателітними повторами, створюючи унікальні шаблони смуг, які служать генетичними маркерами. Ця методологія вимагає мінімального введення ДНК і може бути застосована до немодельних організмів, таких як бджоли, з обмеженими геномними ресурсами.

Використання маркерів ISSR включає кілька ключових етапів:

1.Вибір праймера: Праймери для ISSR-маркерів зазвичай складаються з 16-25 нуклеотидів і містять ядро мікросателітної послідовності (наприклад, (CA)_n, (AG)_n). Праймер може бути повністю комплементарним до мікросателітної послідовності або містити один або кілька додаткових нуклеотидів на 3'- або 5'-кінцях.

2. Підготовка ДНК: Геномну ДНК екстрагують з тканин організму, який досліджується. Цей крок включає лізис клітин, видалення білків та очищення ДНК

3. ПЛР-ампліфікація : у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) праймери ISSR ампліфікують сегменти ДНК між двома ділянками SSR. Варіабельність довжини цих ампліфікованих фрагментів є результатом різних відстаней між SSR у геномі. Цей процес генерує кілька фрагментів різного розміру.

ПЛР проходить три основні етапи:

- **Денатурація (94-95°C):** Двospіральна ДНК розплавляється на дві одинарні нитки.
- **Гібридизація праймерів (45-60°C):** Праймери зв'язуються з комплементарними послідовностями ДНК.
- **Елонгація (72°C):** Taq-полімераза синтезує нові ланцюги ДНК, починаючи від праймерів.

Ці етапи повторюються в 25-35 циклах для досягнення необхідної кількості ампліфікованого продукту (Zietkiewicz et al., 1994).

4.Електрофорез у гелі: продукти ампліфікації потім розділяють за допомогою електрофорезу в гелі, який сортує фрагменти за розміром. Це створює візерунок смуг, який можна візуалізувати та проаналізувати.

5. Аналіз результатів: Після електрофорезу зразки, розділені гелем, оцінюють шляхом візуального огляду або за допомогою автоматизованих засобів виявлення, таких як лазерні сканери або флуоресцентні аналізатори. Результати порівнюються між зразками, щоб встановити генетичні відмінності та різноманітність.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У нашому дослідженні вивчалась гібридизація популяцій медоносних бджіл з південно-західного регіону України. Цей регіон характеризується різноманітними умовами навколишнього середовища, що може сприяти генному потоку та ненавмисній гібридизації між різними підвидами. Для оцінки генетичної структури популяцій бджіл було використано дев'ять ISSR-праймерів (BE1–BE9). Кожен праймер містить унікальну нуклеотидну послідовність, яка зв'язується з конкретними ділянками мікросателітів у геномі. Аналізуючи набори смуг, отримані за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, було можливо оцінити інформативність кожного праймера та вибрати найбільш придатні для подальшого аналізу гібридизації.

Матеріал для досліджень був зібраний з кількох областей України а саме: Хмельницької, Івано-Франківської та Чернівецької області.



Рисунок 2.1. Кольором виділено області України, з яких було отримано матеріал для досліджень.

2.1 Виділення ДНК з клітин тварин

1. Спочатку готували розчин, необхідний для виділення ДНК тварин:

- Буфер для лізису STAB, що містить 4 г STAB (20 г/л), 16,4 г NaCl (1,4 М), 3,15 г трис-HCl (0,1 М) і 1,5 г Na₂EDTA (20 мМ). Далі додавали 100 мл деіонізованої води і доводили рН розчину до позначки 8,0 за допомогою 1 М NaOH. Потім об'єм доводили до 200 мл та стерилізували в автоклаві.

- Готували буфер для осадження STAB, що містить 1 г STAB (5 г/л) і 0,5 г NaCl (0,04 М). Додавали 100 мл деіонізованої води і доводили рН розчину до 8,0 за допомогою 1 М NaOH; об'єм збільшували до 200 мл і автоклавували.

- 7,0 г NaCl 1,2 М розчиняли у 100 мл деіонізованої води та автоклавували.

2. Гомогенізували матеріал в 1 мл буфера для лізису + PVP + 2% β-меркаптоетанолу за допомогою ступки та товкачика.

3. Гомогенат переносили в мікроцентрифужну пробірку (Ependorf) та інкубували на водяній бані при 65°C протягом 60 хв.

4. Після інкубації надосадову рідину центрифугували протягом 10 хв, після чого верхню фазу видаляли і переносили в чистий епендорф, після чого додавали 500 мкл фенол: хлороформ - ізоаміловий спирт (1:1).

5. Центрифугували протягом 10 хв, видалили верхню фазу, потім перенесли в чистий епендорф з 500 мкл хлороформ-ізоамілового спирту.

6. Після центрифугування протягом 5 хв видалили верхню фазу, перенесли в чистий епендорф і додали 2 об'єми буфера STAB для осадження. Проводили інкубацію протягом 60 хв.

7. Після інкубації центрифугували протягом 5 хв, зцідили надосадову рідину і розчинили осад у 350 мкл NaCl (1,2 М).

8. Додавали 350 мкл хлороформу і перемішували струшуванням протягом 30 секунд.

9. Після 10-хвилинного центрифугування зціджували надосадову рідину і розчиняли осад в 0,6 об'єму ізопропанолу струшуванням.

10. Після 10 хвилин центрифугування знову зливали надосадову рідину.

11. Додали 500 мкл 70% розчину етанолу і перемішували струшуванням.

12. Центрифугували протягом 10 хв і зціджували надосадову рідину.

13. Осад підсушували, а ДНК розчиняли у 100 мкл дистильованої води.

Наявність та якість виділеного матеріалу перевіряли за допомогою методу електрофоретичного розділення в 1,5% агарозному гелі.

2.2. Електрофорез ДНК в агарозному гелі

1. Спочатку приготували 500 мл буфера для електрофорезу 1x TBE, що містить 0,089 М трисборату, 0,089 М борної кислоти та 0,002 М EDTA.

2. Насипали в колбу об'єм агарози, необхідний для приготування 30 мл 1,5% гелю, додали 26 мл дистильованої води і 4 мл 5xTBE.

3. Накривали колбу фольгою, нагрівали до кипіння і обережно перемішували до повного розчинення агарози.

4. Охолоджували розчин до 50-55°C і додавали 15 мкл бромистого етидію до кінцевої концентрації барвника 0,5 мкг/мл (бромистий етидій є сильним мутагеном, тому при роботі з розчинами або гелями, що містять бромистий етидій, слід надягати захисні рукавички).

5. Збирали форму для гелю, заливали розчин агарози і швидко вкладали в паз гребінець.

6. Після того, як агароза застигла, переносили форму в електрофоретичну ванну і заповнювали її 1x TBE буфером так, щоб буфер покривав 0,4-0,5 см гелю. Потім гребінець обережно видаляли, не пошкоджуючи лунки.

7. Змішували 3 мкл зразка ДНК з 1 мкл фарби для нанесення.

8. Обережно наносили зразок ДНК у лунку під буфером, не пошкоджуючи гель.

9. Наносили ДНК-маркер у вільну лунку.

10. Закривали камеру для електрофорезу кришкою і підключали її до джерела живлення, під'єднавши катод до негативного, а анод до позитивного полюсів.

11. Електрофорез проводили при напруженості поля 5 В/см. Хід електрофорезу контролювали за відстанню, яку пройшов барвник. Електрофорез зупиняли, коли барвник проходив 2/3 відстані.

12. Після завершення електрофорезу гель обережно переносили на чисте скло транслюмінатора і спостерігали та фотографували ДНК в ультрафіолетовому світлі.

2.3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для ампліфікації використовували праймери, комплементарні до міжгенного спейсера COI-COII.

Таблиця 2.3.1.

Використані праймери.

Назва праймера	Послідовність	Довжини ампліфікатів, н.п.
Be 1	(TCC)5GT	500-1300
Be 3	(AC)8G	400-750
Be 4	(AC)8T	450-1200
Be 5	(AG)8C	400–1100
Be 6	(GT)8C	500–1300
Be 7	(CA)8A	380–1000
Be 8	(GA)8T	420–1150

Реакційні суміші розраховували відповідно до специфікацій використаних полімераз. Всі маніпуляції з приготування сумішей проводили на льоду; ПЛР проводили на приладі RTS-100 (MJResearch, Inc., США) згідно протоколу CAPABE1:

Таблиця 2.3.2.

Протокол CAPABE1.

Етап	Температура, °C	Час
------	-----------------	-----

Активація полімерази	95	3 хвилини
Денатурація ДНК	95	30 секунд
Гібридизація праймерів	45-52	1 хвилина
Елонгація	72	35 секунд
Повернення до кроку 2	-	40 разів
Фінальна елонгація	72	6 хвилин
Охолодження	12	5 хвилин

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР проводили на 1.5% агарозних гелях.

2.4. Статистичний аналіз отриманих даних

2.4.1. Алгоритм використання програми «TotalLab TL 120»

Аналіз отриманих результатів було проведено за допомогою пакету програм «TotalLab TL 120» і програми «DARwin 6».

Програмне забезпечення «TotalLab TL 120» може використовуватись для аналізу даних, отриманих за допомогою електрофорезу ISSR-маркерів. Алгоритм роботи з програмою «TotalLab TL 120»:

1. Відкрити «TotalLab TL 120» на комп'ютері та створити новий проект.
2. Імпортувати зображення електрофорезу. Для цього потрібно обрати опцію «Імпорт зображень» і вибрати відповідний збережений файл зображення.
3. Попередньо обробити зображення для поліпшення якості і видалення шуму. «TotalLab TL 120» має ряд інструментів для обробки зображень, включно з підвищенням контрастності, фільтрацією і видаленням фону. Вибрати відповідний інструмент і підготувати зображення для подальшого аналізу.
4. Встановити параметри для визначення смуг підсилення на зображенні; використовувати інструменти «TotalLab TL 120» для позначення смуг і вимірювання їх довжини та інтенсивності.
5. Виконати автоматичне визначення смуг на всьому зображенні або вибрати ручне визначення смуг за допомогою програмного інструменту.

6. Перевірити правильність визначення смуг і за необхідності відкоригувати результати.

7. Проаналізувати отримані дані ISSR-маркерів за допомогою різних статистичних методів, які надає «TotalLab TL 120». Провести порівняльний аналіз профілів між суб'єктами дослідження, розрахувати генетичну схожість, побудувати філогенетичні дерева та виконати інші статистичні розрахунки, залежно від завдання дослідження.

8. Створити відповідні графіки, діаграми та таблиці для візуалізації та представлення результатів.

9. Зберегти результати аналізу у відповідному форматі (наприклад, Excel, PDF) для подальшої обробки та використання.

Це загальний алгоритм використання програмного забезпечення «TotalLab TL 120» для аналізу даних ISSR-маркерів в генетичних дослідженнях бджіл. Інші функції та методи аналізу можуть бути використані в залежності від конкретного дослідницького питання та потреб (Nonlinear Dynamics Ltd, 2008).

2.4.2. Алгоритм використання програми «DARwin 6»

Для аналізу та візуалізації генетичних даних, в тому числі даних ISSR-маркерів, використовується програма DARwin 6. Нижче наведено детальний алгоритм роботи з цією програмою:

1. Відкрити «DARwin 6» на комп'ютері та створити новий проект.

2. Імпортувати генетичні дані аналізу ISSR-маркерів медоносних бджіл. Для цього потрібно вибрати опцію "Імпортувати дані" і завантажити відповідний файл даних, що містить інформацію про ампліфікацію.

3. Переглянути та перевірити імпортовані дані, щоб переконатися, що дослідні зразки правильно відображені.

4. Розрахувати генетичну схожість між зразками, використовуючи відповідний алгоритм аналізу в «DARwin 6». Залежно від завдання дослідження, для розрахунку генетичної подібності можна використовувати різні методи, такі як коефіцієнт Жаккара, коефіцієнт Соренсена-Дайса тощо.

5. Створити філогенетичні дерева і дендрограми для візуалізації генетичних відстаней між зразками. «DARwin 6» містить інструменти для побудови дерев і налаштування їх зовнішнього вигляду.

6. Використати вбудовані інструменти «DARwin 6» для створення діаграм, що показують генетичні відстані та класифікацію зразків. Наприклад, можна створити кругову діаграму, що показує розподіл генетичних груп серед бджіл.

7. Виконати статистичний аналіз за допомогою «DARwin 6» для визначення статистично значущих відмінностей між групами зразків, використовуючи відповідні статистичні тести, такі як ANOVA або кластерний аналіз.

8. Зберегти результати аналізу, включно з графіками, діаграмами і таблицями, у зручному форматі, який можна використовувати для подальшого аналізу, презентації або публікації.

Це загальний робочий алгоритм для аналізу генетичних даних ISSR-маркерів з генетичних досліджень бджіл в програмі «DARwin 6». Інші функції та методи аналізу можуть бути використані в залежності від конкретного дослідницького завдання або потреб (Perrier et al., 2003).

2.4.3. Програмне забезпечення та пакети для статистичної обробки даних ISSR

Для обробки результатів типування ISSR та аналізу генетичної мінливості було використано ряд сучасних програмних засобів, що дозволяють виконати повний цикл статистичного та популяційно-генетичного аналізу. Більшість розрахунків було виконано в середовищі **R** за допомогою спеціальних тематичних пакетів. Додатковий аналіз було проведено за допомогою програмного забезпечення **GenAlEx** та **Arlequin**.

1. Аналіз у середовищі R

Середовище R (версія XX.XX) слугувало основною платформою для виконання статистичного та популяційно-генетичного аналізу даних ISSR. Для вирішення

ключових завдань молекулярно-генетичної статистики було застосовано кілька спеціалізованих пакетів:

Adegenet Цей пакет використовувався для:

- аналізу головних компонент (PCA),
- аналізу головних координат (PCoA),
- оцінки гетерозиготності,
- кластеризації зразків на основі генетичних профілів.

• **Poppr** Застосовувався для:

- аналізу молекулярної варіації (AMOVA),
- розрахунку індексів різноманітності (Шеннона,).

• **Pegas** Використовувався для:

- розрахунку генетичних відстаней між зразками,
- побудови дендрограм для візуалізації генетичних зв'язків.

• **hierfstat** Використовується для обчислення F-статистики, зокрема індексу **F_{ST}**, який вказує на генетичну диференціацію між популяціями.

2. GenAlEx (Генетичний аналіз в Excel)

Для доповнення аналізу, виконаного в R, було використано надбудову **GenAlEx** (версія XX) для Microsoft Excel. Цей інструмент дозволив інтерактивну обробку матриць ISSR та спростив створення графічних результатів. GenAlEx використовувався для:

- Розрахунку основних параметрів генетичної різноманітності (наприклад, кількості алелей, спостережуваної та очікуваної гетерозиготності),
- Виконання AMOVA з ієрархічними рівнями,
- Проведення PCA,

- Оцінки генетичних відстаней,
- Розрахунку індексів фіксації, включаючи F_{ST} .

Його зручний інтерфейс дозволив ефективно створювати таблиці та рисунки для включення в дисертацію.

3. Програмне забезпечення Arlequin

Для поглибленого генетичного аналізу популяцій та валідації результатів R та GenAlEx було використано програмне забезпечення **Arlequin** (версія XX). Його функціональність у цьому дослідженні включала:

- Виконання ієрархічного AMOVA для оцінки генетичної мінливості всередині та між популяціями,
- Розрахунок індексів фіксації (наприклад, F_{ST}) для оцінки диференціації популяцій,
- Побудова матриць парних генетичних відстаней та виведення структури популяцій.

Комбіноване використання цих інструментів забезпечило надійну статистичну обробку та достовірну інтерпретацію даних ISSR.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Гібридизація, що визначається як схрещування генетично різних особин або популяцій, є важливим еволюційним механізмом, який сприяє генетичній мінливості та може впливати на пристосованість, адаптивність і фенотипний прояв. Для розуміння масштабів і природи гібридизації необхідний аналіз на молекулярному рівні, здатний виявити генетичні поліморфізми з високою чутливістю. ISSR маркери (Inter Simple Sequence Repeat) добре підходять для цієї мети, оскільки вони ампліфікують ділянки геному, оточені мікросателітними послідовностями.

Завдяки високій відтворюваності та здатності виявляти міжвидові та внутрішньовидові варіації, маркери ISSR широко застосовуються в популяційній генетиці та дослідженнях ідентифікації гібридів.

3.1. Оптимізація умов та вибір ISSR-маркера

Для забезпечення надійності та відтворюваності ISSR-аналізу було необхідно оптимізувати умови ПЛР перед проведенням скринінгу генетичного різноманіття серед зразків медоносних бджіл. Одним із ключових параметрів, що впливають на успішність ампліфікації, є температура, яка визначає специфічність зв'язування праймера з ДНК-матрицею. У нашому дослідженні було проведено градієнтну ПЛР для визначення оптимальної температури гібридизації праймеру для ампліфікації конкретних ISSR праймерів, перевіривши діапазон температур від 45 °C до 55 °C.

Процес ампліфікації ПЛР відбувається за стандартним протоколом термоцикування. Спочатку зразки ДНК денатурують при високій температурі для розділення дволанцюгової ДНК на одноланцюгові. Далі відбувається етап гібридизації, під час якого праймери ISSR приєднуються до комплементарних ділянок, що фланкують мікросателіти. На етапі подовження, каталізованому ДНК-полімеразою, синтезуються нові ланцюги ДНК, починаючи з праймерів. Кожен цикл призводить до експоненціальної ампліфікації цільових ділянок, в результаті чого утворюється кілька копій різних фрагментів ДНК, що відповідають поліморфним локусам у геномі. Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли електрофорезом на

агарозному гелі. Отримані електрофореграми показують чіткі профілі смуг, кожна з яких представляє амплікон певної довжини.

Під час фази оптимізації було протестовано дев'ять праймерів ISSR (BE1 до BE9). Ці праймери відрізняються нуклеотидними послідовностями і націлені на конкретні ділянки геному, що дозволяє виявляти генетичні варіації, які можуть свідчити про гібридизацію.

Патерни смуг були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення **DARwin 6** для побудови матриць подібності та проведення кластерного аналізу на основі спільних локусів. Крім того, програмне забезпечення **TotalLab TL120** було використано для порівняння електрофоретичних профілів окремих зразків та виявлення статистично значущих відмінностей між ними. Ці відмінності є важливими для виявлення гібридних особин та оцінки генетичної структури популяцій бджіл з південно-західному регіону України.

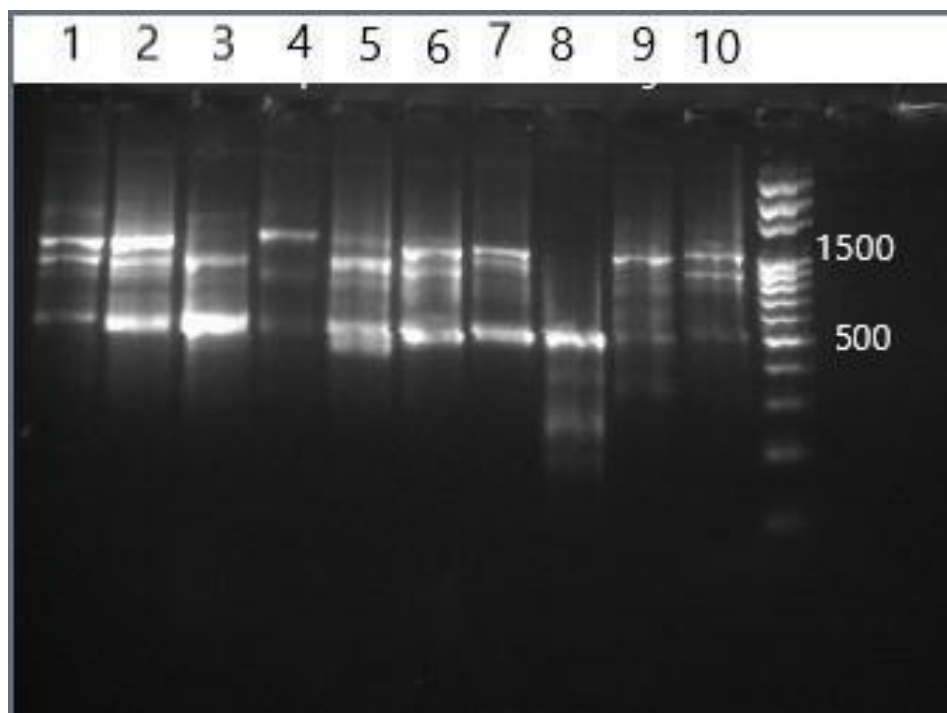


Рисунок 3.1.1. Електрофоретичне розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням ISSR-праймера BE1.

Праймер BE-1 успішно ампліфікував кілька локусів у кожному зразку, утворивши чіткі смуги різної інтенсивності та розміру. Розподіл смуг по зразках відображав високий рівень поліморфізму. Більшість особин мали кілька чітких

фрагментів, деякі з яких були присутні майже у всіх зразках, а інші спостерігалися лише у окремих особин. Ця мінливість вказує на генетичну диференціацію в межах аналізованої популяції, що, ймовірно, пов'язано з відмінностями підвидів та процесами гібридизації. Серед ампліфікованих фрагментів деякі виявилися висококонсервативними. Зокрема, фрагмент приблизно 900 п.н. з'являвся послідовно і помітно в більшості зразків, особливо в тих, що, як передбачалося, належали до *Apis mellifera macedonica*, що свідчить про те, що він може представляти консервативну ділянку геному в межах цього підвиду. Інший стабільний фрагмент, приблизно 500 п.н., також спостерігався в більшості зразків, що, можливо, відображає повторюваний елемент, спільний для різних генетичних фонів.

Водночас інші фрагменти демонстрували чітку мінливість. Наприклад, локуси поблизу 1300 п.н. або 800 п.н. були виявлені в деяких особин, але повністю відсутні в інших, що вказує на вищу геномну мінливість у цих регіонах. Наявність або відсутність конкретних фрагментів серед особин може слугувати показником генетичної віддаленості та підтверджувати висновки про гібридизацію та склад ліній. Складність смугових патернів варіювалася між зразками. Деякі особини мали багаті профілі з множинними ампліфікованими локусами, тоді як інші мали менше фрагментів, що може свідчити про відмінності в організації геному, алельному складі або гібридному походженні.

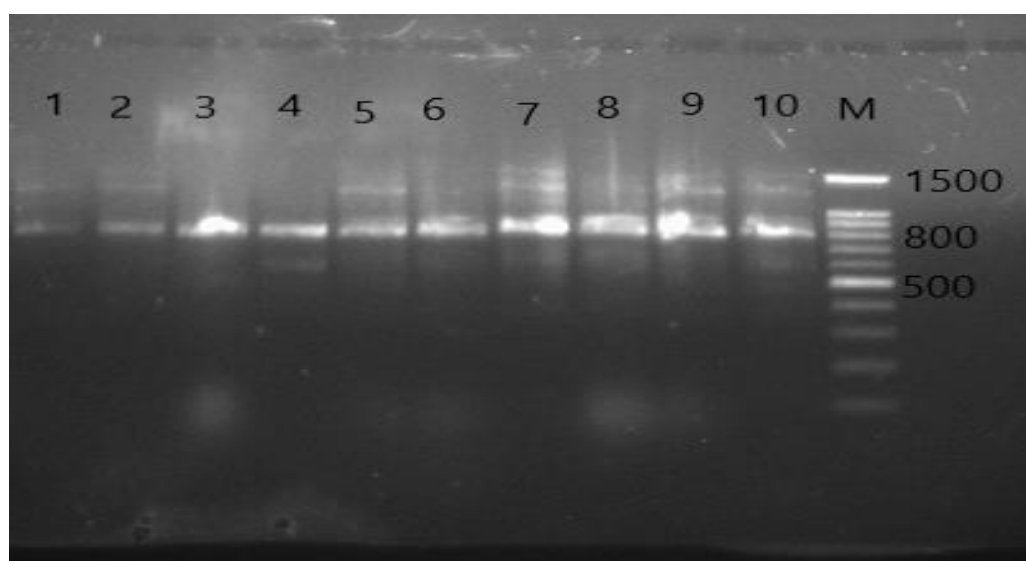


Рисунок 3.1.2. Електрофоретичне розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням ISSR-праймера BE3.

Серед спостережуваних фрагментів найбільш консервативними були смуги 1000 п.н і 700 п.н, які зустрічались найчастіше. Така висока частота свідчить про генетичну стабільність і високу схожість цих ділянок ДНК у різних особин медоносних бджіл. Ці локуси, ймовірно піддаються сильному селективному тиску, який зберігає цілісність їх послідовності, мінімізуючи генетичну мінливість. Крім того, ці ділянки можуть бути менш схильні до мутацій або структурних змін завдяки ефективним механізмам репарації ДНК, що сприяє їх стабільності. На відміну від цього, інші фрагменти наприклад 1500 н.п та 600 н.п показали значний поліморфізм, будучи присутніми лише в частині зразків.

Загалом, поєднання консервативних і поліморфних фрагментів, виявлених за допомогою праймера Ве-3, демонструє його корисність у виявленні як стабільних, так і мінливих ділянок геному медової бджоли.

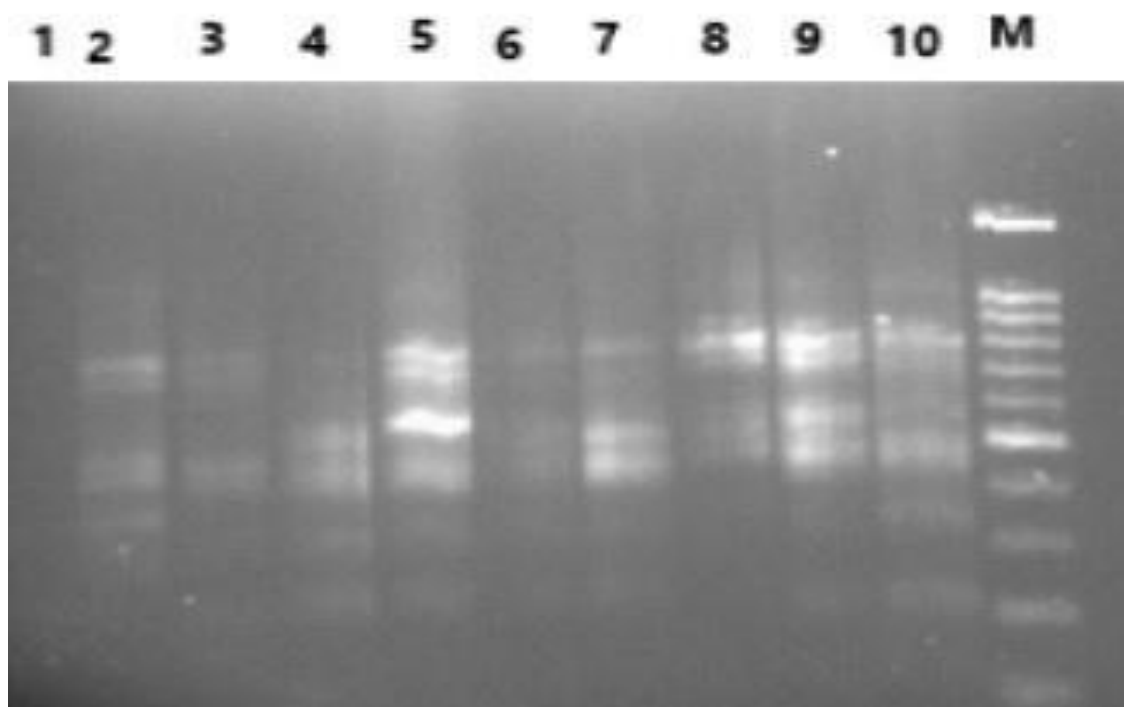


Рисунок 3.1.3. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікування з використанням ISSR-праймера BE4.

Застосування праймера Ве-4 в нашому дослідженні дозволило успішно отримати помітні продукти ампліфікації у всіх аналізованих зразках. Фрагмент 800 п.н був поліморфним і присутнім у всіх десяти зразках. Ця послідовна присутність

свідчить про те, що геномні ділянки, на які націлений праймер для отримання амплікону, є висококонсервативними, що потенційно вказує, що вони менш схильні до генетичних змін. Фрагмент розміром 700 п.н був виявлений у дев'яти зразків, відсутній лише у зразку № 5, тоді як фрагмент розміром 900 п.н був присутній у восьми зразків. Висока поширеність цих ампліконів, особливо фрагмента розміром 800 п.н підкреслює їх потенціальну стабільність.

І навпаки, праймер Be-4 також висвітлив унікальні генетичні особливості в наборі зразків. Наприклад, фрагмент 1500 п.н виявився характерним маркером, ампліфікуючим виключно в зразках № 50 і № 51. Його відсутність у всіх інших зразках сильно вказує на унікальні генетичні локуси або варіації послідовності, характерні для цих двох особин, що робить це відкриття особливо цінними для відрізнення цих зразків від решти досліджуваної популяції.

Фрагмент розміром 600 п.н продемонстрував чіткий поліморфізм, він був помітно відсутній у зразках № 5, №14 та №54, тоді як був присутній у решти зразків. Такі поліморфізми присутності чи відсутності свідчать про генетичні відмінності, які можуть виникати в результаті делеції або поліморфізми одного нуклеотиду в місцях зв'язування праймерів або в самій ампліфікованій ділянці. Крім того, фрагмент 500 п.н. був майже повсюдним, але чітко відсутній у зразку № 14. Ці випадки диференціальної ампліфікації підкреслюють генетичну гетерогенність у досліджуваній колекції. Відсутність певного амплікону в конкретних зразках, наприклад смуги 600 п.н. у зразках № 5 і № 54 (та № 14), вказує на алельні відмінності, які можна використовувати для генетичної характеристики та оцінки різноманітності.

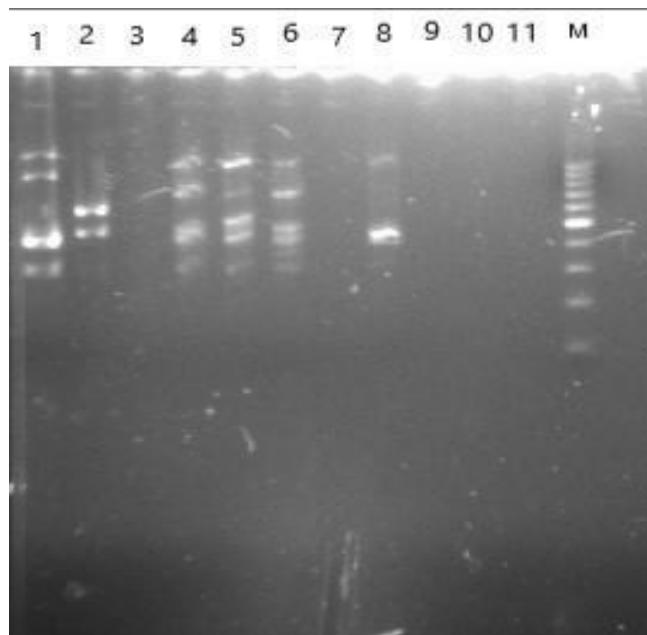


Рисунок 3.1.4. Електрофоретичне розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням ISSR-праймера BE5.

При використанні праймера Be-5 деякі зразки показали повну відсутність ампліфікованих смуг. Це може свідчити про значну генетичну дивергенцію в цих зразках, що потенційно включає мутації або делеції в місцях зв'язування праймера.

Фрагмент 1000 п.н є одним із напоширеніших смуг цей фрагмент з'явився у всіх зразках, крім одного, що вказує на те, що він може відповідати відносно стабільному локусу, який послідовно ампліфікується. Фрагмент 600 п.н був виявлений у 4 з 11 зразків таке вибіркоче виявлення може свідчити про те, що цей фрагмент є специфічним для осіб з інших підгруп або з більшою генетичною віддаленістю. Фрагмент 500 п.н був найменш поширеним у зразках 1 і 2. Його обмеження цими двома зразками, які мали також кілька інших смуг може вказувати на спільне походження або більш тісний генетичний зв'язок між ними, можливо свідчить про схожість на рівні колоній

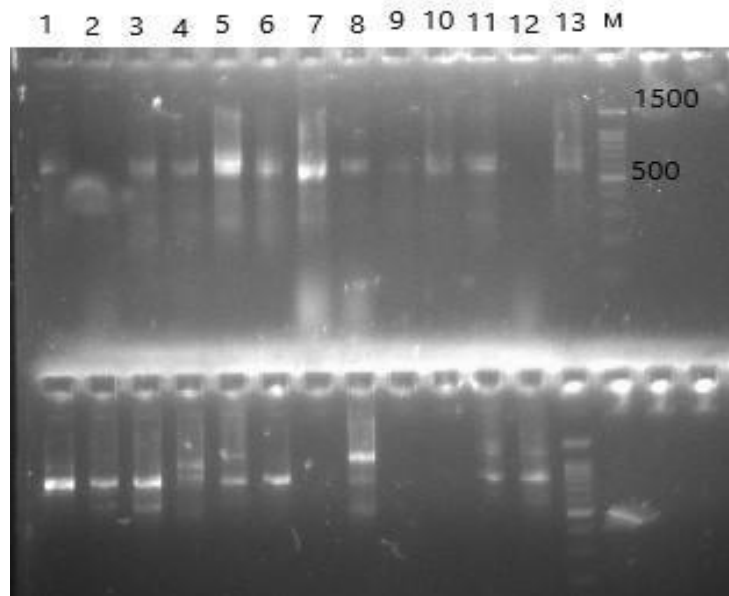


Рисунок 3.1.5. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікування з використанням ISSR-праймера BE6 та BE7 .

У випадку праймера BE6 ампліфікація спостерігалася в більшості з 13 проаналізованих зразків, причому кілька виразних смуг постійно з'являлися близько 1000 п.н. і 700 п.н. Однак зразки 2 і 12 не показали видимих продуктів ампліфікації. Відсутність смуг у цих осіб, ймовірно, пов'язана з відсутністю комплементарних мікросателітних ділянок, що фланкують послідовності, які відповідають праймеру. Оскільки праймери ISSR призначені для аннелювання до специфічних повторюваних мотивів, відсутність ампліфікації свідчить про те, що ці мотиви або відсутні, або значно реорганізовані в цих геномах. Відсутність цільових ділянок заважає праймеру зв'язуватися та ініціювати полімеразну ланцюгову реакцію. Також можливо, що структурні геномні варіації, такі як вставки, делеції або рекомбінації в міжмікросателітних ділянках, призвели до відсутності ампліфікованих локусів у тестованому діапазоні розмірів.

Для праймера BE7 успішна ампліфікація була досягнута в більшості з 13 зразків, з видимими поліморфними смугами в декількох локусах. Проте, зразки 7, 9 та 10 не показали жодних виявляємих ампліконів. Це, ймовірно, знову відображає генетичну дивергенцію у місцях зв'язування праймера або відсутність відповідних повторюваних ділянок, на які націлений цей праймер. Такі варіації є типовими для

ISSR-аналізу і відображають природну високу мінливість ділянок між простими повторними послідовностями в геномах.

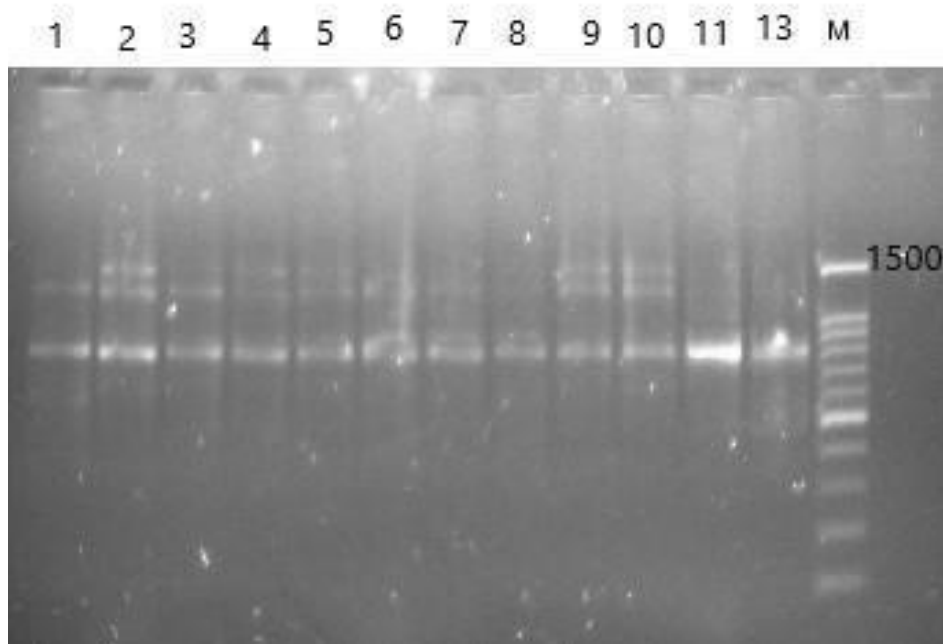


Рисунок 3.1.6. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікування з використанням ISSR-праймера BE8.

Виразна смуга 1000 п.н. була стабільно присутня у всіх проаналізованих зразках, що вказує на збережений локус, ампліфікований цим праймером. Крім того, було виявлено кілька поліморфних смуг при 600 п.н. і 500 п.н., які варіювалися за присутністю між окремими особинами, що свідчить про мінливість ампліфікованих локусів.

Примітно, що зразки 5, 6, 7 і 13 мали сильні смуги близько 1500 п.н., що вказує на ампліфікацію довших фрагментів ДНК, які були відсутні або слабкі в інших зразках. Це свідчить про потенційні відмінності в регіонах, що фланкують мікросателіти, або в ефективності зв'язування праймера в певних генотипах. Смуги при 700 п.н. і 900 п.н. також були виявлені в підгрупі зразків, що ще більше сприяло спостережуваному поліморфізму.

Велика кількість смуг у зразку 13, що охоплюють весь діапазон від 500 п.н. до 1500 п.н., вказує або на більш гетерозиготну геномну структуру, або на потенційно

змішану матричну ДНК і може слугувати орієнтиром для порівняння з іншими особинами.

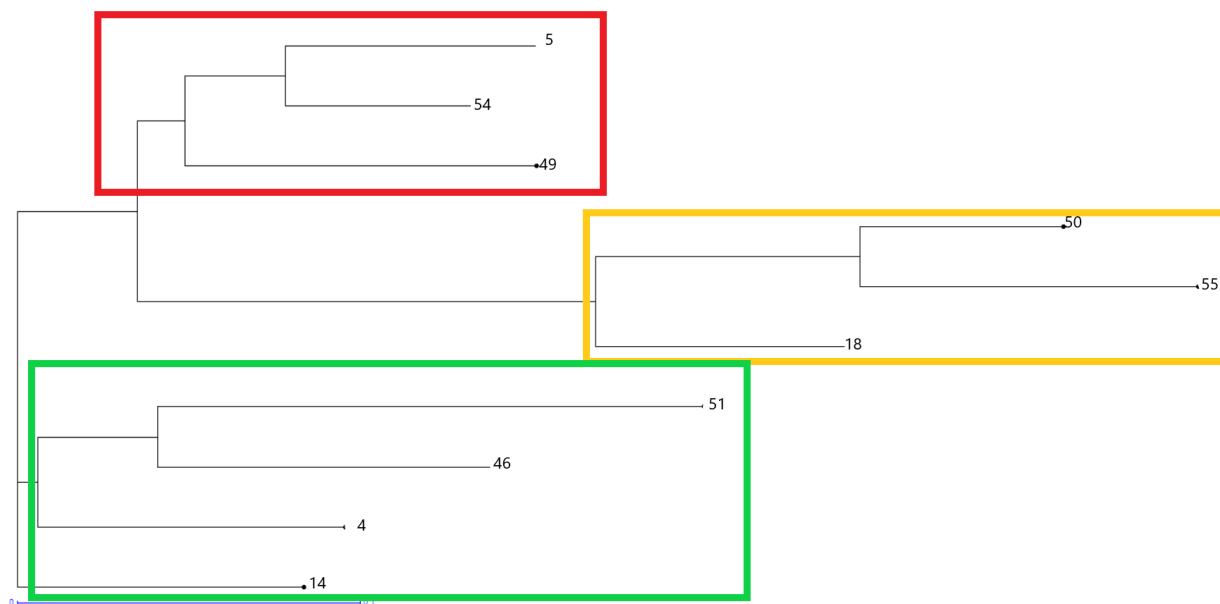


Рисунок 3.1.7. Філогенія аналізованих медоносних бджіл що заснована на одночасному використанні праймерів Be1 - Be9. Метод оптимізації дендрограми Neighbor joining.

Філогенетичний аналіз досліджених зразків, заснований на даних генетичної подібності, ймовірно отриманих за допомогою ISSR-маркерів, представлений у вигляді дендрограми (рис. 3.1.7.). Отримане дерево показує еволюційні відносини між зразками і демонструє чіткий поділ на три основні клади, що вказує на певну генетичну структуру всередині аналізованої групи. Перша клада складається із зразків 5, 64 та 49, причому зразки 5 та 54 утворюють тісний підкластер, що свідчить про високий ступінь генетичної схожості та, можливо, спільне географічне або генетичне походження, тоді як зразок 49 дещо відхиляється, хоча все одно належить до цієї групи. Друга клада включає зразки 50, 55 і 18. Усередині цього кластера зразки 50 і 55 тісно пов'язані, утворюючи майже ідентичну пару, тоді як зразок 18 демонструє більш помірний рівень дивергенції, що вказує на часткову спорідненість. Ця група відгалужується від основної структури дерева в положенні, що вказує на проміжну дивергенцію порівняно з іншими кладами. Третя клада охоплює зразки 4, 14, 46 і 51 і розташована в основі дендрограми, що означає найдавнішу дивергенцію

порівняно з іншими групами. Усередині цієї клади зразки 4 і 46 генетично схожі і утворюють окремий підкластер, тоді як зразок 51 демонструє помірний рівень відокремлення. Примітно, що зразок 14 має найдовшу гілку серед інших зразків представлених на дендрограмі, що вказує на те, що це генетично найвіддаленіший зразок у наборі даних, що може відображати окремий еволюційний лінійний ряд або ізоляцію від решти популяції.

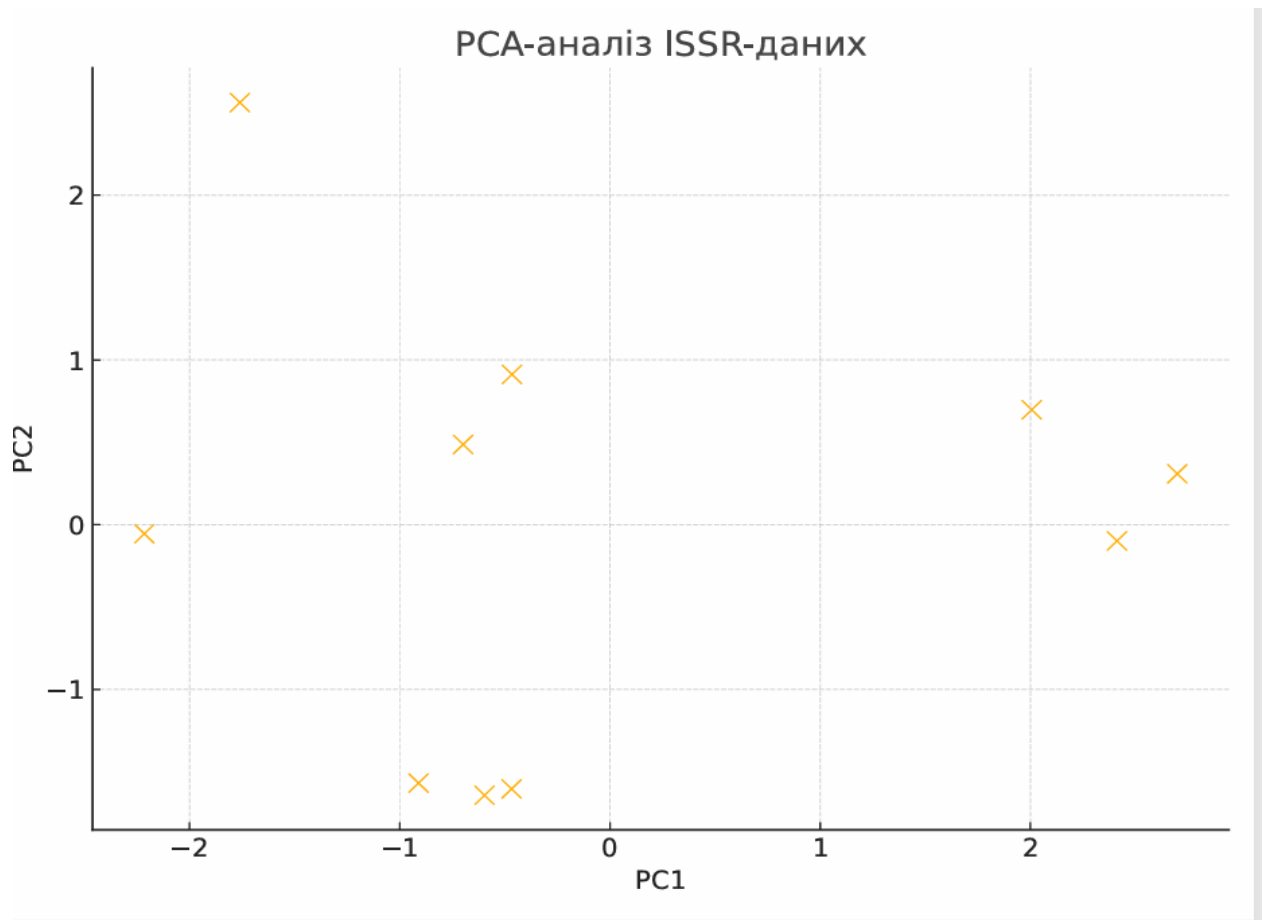


Рисунок 3.1.8. Просторове групування зразків за допомогою аналізу головних компонент (PCA).

Для візуалізації генетичних взаємозв'язків між окремими зразками на основі профілів ISSR-маркерів було проведено аналіз головних компонент (PCA). Графік PCA (див. рисунок 3.1.8.) чітко демонструє розподіл особин за першими двома головними компонентами (PC1 і PC2), що вказує на помірний ступінь генетичної мінливості в досліджуваній групі. Перші дві головні компоненти становили значну

частину загальної дисперсії (точні значення наведено у результатах PCA), що відображає основні виміри генетичної диференціації. Зразки були розсіяні, а не щільно скупчені, що свідчить про внутрішню генетичну гетерогенність та відсутність чітких підгруп.

Цей розподіл підтверджує результати, отримані за розрахунками гетерозиготності та індексу Шеннона, які вказують на помірну до високої генетичну різноманітність. Спостережувана варіація може бути результатом природної рекомбінації, генного потоку або селекції в межах популяції.

Таким чином, PCA підтверджує висновок про те, що популяція має генетично різноманітну структуру, без яскраво вираженої кластерної структури, що вказує на високий рівень інбридингу або ізоляції субпопуляцій.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз ISSR-маркерів із використанням окремих праймерів для одних і тих самих зразків бджіл продемонстрував загальну тенденцію до формування двох великих та однієї меншої клад.
2. Найбільш інформативною та стабільною виявилася топологія, побудована на основі об'єднаних даних усіх праймерів для тих самих зразків, що дозволило отримати узагальнену та об'єктивну картину генетичної структури досліджуваних популяцій
3. Аналіз PCA підтверджує, що досліджувана популяція демонструє помірну генетичну різноманітність та внутрішню гетерогенність, без чіткого кластеризації або ізоляції субпопуляцій. Це свідчить про генетично різноманітну та взаємопов'язану групу, на яку, ймовірно, впливають генний потік, рекомбінація та природний добір.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ahmad, K. M. S. (2018). Genetic characterisation of honey bees (*Apis mellifera*) populations from Kurdistan Region of Iraq via ISSR markers. *Annual Research & Review in Biology*, 28(5), 1–9.
2. Arslan, O. C. (2020). A preliminary study for the application of ISSR markers to discriminate honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Bee Studies*, 12(2), 43–47.
3. Büchler, R., Costa, C., Hatjina, F., Andonov, S., Meixner, M. D., Le Conte, Y., Uzunov, A., & Wilde, J. (2019). The importance of controlled mating in honeybee breeding. *Genetics Selection Evolution*, 51, 73.
4. Chahbar, M., Sifi, M. A., Ghanem, H., & Bouguedoura, N. (2023). Genetic diversity and population structure of the Saharan honey bee *Apis mellifera sahariensis*: Introgression assessment and implications for conservation. *Apidologie*, 54, Article 31.
5. De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., & Serrano, J. (2019). The conservation of native honey bees is crucial. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(9), 789–798.
6. Eimanifar, A., Pieplow, J. T., Asem, A., & Ellis, J. D. (2020). Genetic diversity and population structure of two subspecies of western honey bees (*Apis mellifera* L.) in the Republic of South Africa as revealed by microsatellite genotyping. *PeerJ*, 8, e8280.
7. Guarna, M. M., Hoover, S. E. R., Huxter, E., Higo, H. A., Moon, K.-M., Domanski, D., et al. (2019). Peptide biomarkers used for the selective breeding of a complex polygenic trait in honey bees. *Scientific Reports*, 9, 18748.
8. Guarna, M. M., et al. (2019). Genomic selection in the honey bee: Demonstrated benefit for trait improvement. *Journal of Insect Science*, 19(1), 1–13.
9. Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., ... & Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 591–611.

10. Hasnat, M. A., Haque, M. M., & Alam, M. J. (2022). Instrumental insemination: A nontraditional technique to produce superior quality honey bee (*Apis mellifera*) queens. *Journal of King Saud University - Science*, 34(5), 102077.
11. Harpur, B. A., Guarna, M. M., Huxter, E., Higo, H., Moon, K. M., Hoover, S. E. R., ... & Zayed, A. (2021). Integrative genomics reveals mechanisms regulating honey bee worker behavior and lifespan. *Nature Communications*, 12, 1–13.
12. Harpur, B. A., Minaei, S., Kent, C. F., & Zayed, A. (2019). Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology*, 28(4), 858–870.
13. Ilyasov, R. A., Poskryakov, A. V., Nikolenko, A. G., & Petukhov, A. V. (2017). Modern methods of assessing the taxonomic affiliation of honeybee colonies. *Ecological Genetics*, 15(1), 3–14. https://journals.eco-vector.com/ecolgenet/article/view/6518/en_US
14. Jian, Z. (2023). Characterization of SSR markers and their applications in honey bee genetics. *Molecular Genetics and Genomics*, 298(2), 395–406.
15. Kraus, F. B., Franck, P., & Vandame, R. (2020). Asymmetric introgression and admixture in Africanized honeybees. *Molecular Ecology*, 29(2), 237–249.
16. Kraus, F. B., Koeniger, N., Tingek, S., & Moritz, R. F. A. (2020). Genetic structure of the cavity nesting honey bee *Apis cerana* in northern Borneo. *Heredity*, 125(3), 135–142.
17. Kumar, A., Singh, R., & Patel, M. (2021). Single nucleotide polymorphisms: Applications in genetics and genomics. *Genetics Research*, 103, e12.
18. Lee, M. L. (2019). Genetic diversity analysis of honey bee populations using SSR markers. *Journal of Apicultural Science*, 63(2), 173–182.
19. Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Hegedűs, G., & Taller, J. (2019). ISSR and microsatellite markers: Tools for genetic diversity analysis and plant breeding. *Biomolecules*, 9(10), 502.
20. Patel, D., Sharma, A., & Gupta, P. (2022). The role of SNPs in disease susceptibility: Recent advances and perspectives. *Frontiers in Genetics*, 13, 837245.

21. Quezada-Euán, J. J. G., May-Itzá, W. D., & Medina, L. M. (2020). Hybridization of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) with European honey bees in tropical America. *Apidologie*, 51(3), 354–369.
22. Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L., & Jamali, S. (2016). Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera* meda Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. *Cellular and Molecular Biology*, 62(4), 53–58. <https://cellmolbiol.org/index.php/CMB/article/view/840>
23. Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629.
24. Singh, P., Rao, J., & Mehta, S. (2019). SNP markers in genetic diversity and association studies: A review. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5213–5226.
25. Wallberg, A., Bunikis, I., Pettersson, O. V., & Webster, M. T. (2022). Extreme recombination frequencies shape genome variation and evolution in the honeybee. *PLOS Genetics*, 18(1), e1010002.
26. Wang, L., Zhao, X., & Li, J. (2020). Genome-wide SNP discovery and genotyping for functional studies. *Frontiers in Plant Science*, 11, 575983.
27. Zhao, H., & Li, X. (2020). Advances in SNP genotyping technologies and their applications. *Biotechnology Advances*, 44, 107622.

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;

- користуватись 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.

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ
студентської наукової конференції
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
БІОЛОГІЇ, ХІМІЇ ТА БІОРЕСУРСІВ

12-15 травня 2025 року



Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2025

100. <i>Ельвіра Цюпа</i> . Фазові рівноваги в системі CsPbBr_3 – CsPbBr_2Cl	202
101. <i>Єлизавета Цюпа</i> . Фазові рівноваги в системі CsPbBr_3 – CsPbBr_2I	204
102. <i>Ангеліна Чев'юк</i> . Вміст ліпопротеїнів високої густини в сироватці крові щурів за умов введення різних доз диетилфталату	206
103. <i>Анна Черказьянова</i> . Ідентифікація хлоропластних гаплотипів інвазійних рослин роду <i>Reynoutria</i> на основі ділянок <i>matK</i> та <i>rpl32-trnL (UAG)</i>	208
104. <i>Олександр Чернописький</i> . Динаміка вирощування ріпаку в Україні	210
105. <i>Руслан Швага</i> . Придатність алювіально-дернового ґрунту для вирощування арахісу	212
106. <i>Юлія Шелегон</i> . Чужорідні рослини на газонах парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва місцевого значення «Парк-сквер» (м. Чернівці, вул. Кирила Стеценка, 3)	214
107. <i>Рувім Шелгачов</i> . Фауна повисюхових мух (Diptera: Syrphidae) плодів садів Чернівецької області за результатами першого моніторингового року в рамках проєкту HORIZON Europe RestPoll	216
108. <i>Катерина Шишкіна</i> . Використання ядерних та хлоропластних маркерів для дослідження генетичного поліморфізму та міжвидової гібридизації у <i>Impatiens parviflora</i> на території України	218
109. <i>Владислав Шурина</i> . ISSR-профілювання бджіл Північної України	220
110. <i>Анна Явдосюк</i> . Поліморфізм медоносних бджіл Чернівецької області на основі ISSR-профілів	222

Явдосюк Анна

Науковий керівник – асист. Череватов О.В.

Поліморфізм медоносних бджіл Чернівецької області на основі ISSR-профілів

Гібридизація – ключовий механізм еволюції, що впливає на адаптацію видів, видоутворення та генетичний обмін між популяціями [1]. Здатність виявляти й аналізувати події гібридизації має важливе значення для розуміння структури популяцій та еволюційних тенденцій. Молекулярні маркери, зокрема ISSR-маркери, широко використовуються для оцінки генетичного різноманіття та ідентифікації гібридних особин з високою точністю [1]. ISSR-маркери особливо корисні завдяки своїй здатності виявляти поліморфізми в кількох локусах без необхідності попередньої геномної інформації. Вони підсилюють міжмікросателітні ділянки, генеруючи унікальні патерни смуг, що дозволяють диференціювати близькоспоріднені генотипи [2]. Висока відтворюваність і специфічність ISSR-маркерів роблять їх цінним інструментом у дослідженнях гібридизації та генетичної мінливості. Тому метою роботи було дослідити різноманіття медоносних бджіл південно-західного регіону України за допомогою Issr-маркерів.

У нашому дослідженні використовувався праймер B2 з метою оцінки його оптимальності для роботи з підвидами медоносних бджіл на південно-західному регіоні. На початковому етапі проводили виділення ДНК із тіла бджіл, після чого її нативність перевіряли методом електрофорезу в агарозному гелі. Далі екстрагована ДНК піддавалася ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів, комплементарних до крайніх ділянок мікросателітних областей. Оптимальна температура для гібридизації праймера B2 становила 45 °C. Результати електрофоретичного розділення ампліфікатів оцифровували та аналізували за допомогою програмного забезпечення TotalLab і DarVin.

Для порівняння нами обрано зразки, що мешкають у відносно контрастних екологічних умовах. З цією метою обрано Сторожинецький район, який характеризується гірською місцевістю, та Кельменецький район, що належить до лісостепової зони.

Проаналізувавши результати та побудувавши дендрограму (рис. 1), яка відображає філогенетичні зв'язки між досліджуваними зразками, стало очевидно, що зразки на філогенетичному дереві розподілилися на три групи.

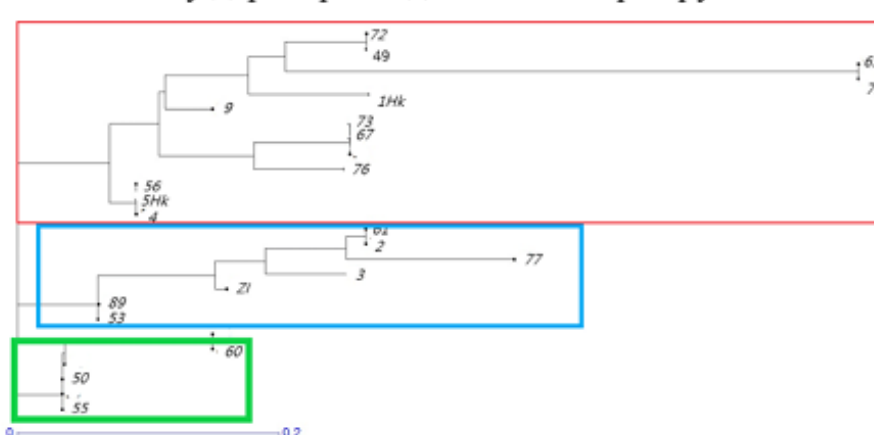


Рис. 1. Філогенетичне дерево на основі поліморфізму довжин продуктів ПЛР

Отже, клада А об'єднує більшість зразків і сформована переважно зі зразків Сторожинецького району. До клади В увійшли зразки з Кельменецького району Чернівецької області. Третя, найменша, клада С містить три зразки, які, ймовірно, були завезені пасічниками та демонструють відносну віддаленість від інших зразків.

Література

1. Metlytska, O. I., Kopylov, K. V., & Berezovsky, A. V. (2016). Modern molecular-genetic approach to increase efficiency of selection process in animal breeding of Ukraine. *Animal Breeding and Genetics*, 51, 193-200.
2. Hryhorchuk, D. I., Rabokon, A. M., Postovoitova, A. S., Pirko, N. M., Pirko Ya, V., & Blume Ya, B. (2020). Evaluation of genetic diversity of honey bee in Ukraine analyzed by the SSR-markers. *Factors Experimental Evol. Organisms*, 26, 56-60.