

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

Навчально–науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

**ПОЛІМОРФІЗМ ДЕЯКИХ ПОПУЛЯЦІЙ УКРАЇНСЬКИХ БДЖІЛ НА
ОСНОВІ ISSR–МАРКЕРІВ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконав:

студент 6 курсу, 607 групи

Сосній Богдан Андрійович

Керівник:

доктор біологічних наук,

професор **Волков Р.А.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № 5 від 26 листопада 2024 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Волков Р.А.

Чернівці – 2024

Анотація

На сьогодні, важливе місце у вивченні біологічних об'єктів займає використання молекулярних маркерів. Їх використання сприяє розумінню впливу антропогенних і природних факторів на генетичне різноманіття бджіл. Зокрема, для медоносних бджіл часто необхідне використання ядерних маркерів. Такі дослідження є важливими для збереження генетичного різноманіття та добору високопродуктивних і стійких до паразитів форм у сільськогосподарській селекції. Тому, в даній роботі досліджено генетичну структуру та різноманітність українських популяцій медоносних бджіл за допомогою ISSR–маркерів. Результати показали високу генетичну різноманітність та значний поліморфізм локусів у популяції медоносних бджіл України.

Ключові слова: *ISSR–маркери, Apis mellifera L., українські бджоли, поліморфізм ISSR–маркерів.*

Annotation

Today, an important place in the study of biological objects is occupied by the use of molecular markers. Their use contributes to the understanding of the influence of anthropogenic and natural factors on the genetic diversity of bees. In particular, for honey bees the use of nuclear markers is often necessary. Such studies are important for the preservation of genetic diversity and the selection of highly productive and parasite-resistant forms in agricultural breeding. Therefore, the genetic structure and diversity of Ukrainian honey bee populations were investigated in this work by using ISSR markers. The results showed high genetic diversity and significant polymorphism of loci in the honey bee populations.

Keywords: *ISSR markers, Apis mellifera L., Ukrainian bees, polymorphism of ISSR markers.*

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

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	5
1.1. Молекулярні маркери.....	5
1.2. STR– і VNTR–маркери.....	7
1.3. SNP–маркери.....	8
1.4. SSR–маркери.....	10
1.5. ISSR–маркери.....	12
1.6. Роль ISSR–маркерів в молекулярних дослідженнях.....	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	16
2.1. Виділення ДНК з клітин тварин.....	18
2.2. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.....	20
2.3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	21
2.4. Статистичний аналіз отриманих даних.....	22
2.4.1. Алгоритм використання програми «TotalLab TL 120».....	23
2.4.2. Алгоритм використання програми «DARwin 6».....	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1. Оптимізація умов та вибір ISSR–маркера.....	26
3.2. Поліморфізм ISSR–маркерів у бджоли медоносної.....	31
3.2.1. Поліморфізм ISSR–маркерів у бджоли медоносної за допомогою ампліфікації праймера Bee 4.....	31
3.2.2. Поліморфізм ISSR–маркерів у бджоли медоносної за допомогою ампліфікації праймера Bee 1.....	35
3.2.2.1. Географічна мінливість <i>A. mellifera</i> на основі праймера Bee 1.....	41
3.2.3. Порівняння філогенії бджоли медоносної на основі ПЛР-профілів за допомогою праймерів Bee 1 та Bee 4.....	45
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51
ДОДАТКИ.....	57

ВСТУП

Сьогодні генетика є важливою галуззю науки, яка дозволяє ідентифікувати та зрозуміти складні процеси в популяціях комах. Одним з важливих аспектів генетичної структури популяції є генетичне різноманіття, яке визначається наявністю та розподілом генетичних маркерів у популяції. Українські медоносні бджоли є одними з найменш досліджених в світі, тому існує необхідність досліджувати їх генетичне різноманіття.

Метою даного дослідження є вивчення генетичної структури та різноманіття української популяції медоносної бджоли на основі ISSR–маркерів. Результати цього та деяких інших досліджень (Ceksteryte et al., 2012; Paplauskienė et al., 2006) свідчать про те, що ISSR є ефективним методом оцінки генетичного різноманіття медоносних бджіл. Результати подібних досліджень допомагають зберегти генетичне різноманіття українських медоносних бджіл та можуть сформувати уявлення про їх генетичну структуру (Adeleke et al, 2020).

Вивчення генетичного різноманіття популяцій медоносних бджіл є важливим кроком для збереження та підтримки біорізноманіття даних комах. Крім того, дослідження поліморфізму ядерного геному можуть використовуватись для покращення якості продуктів бджільництва в різних регіонах України. Це також стане важливим кроком до розуміння впливу антропогенних та природних факторів на генетичне різноманіття бджіл.

Тому метою нашого дослідження було вивчити поліморфізм українських медоносних бджіл на основі ISSR–маркерів та визначити генетичну структуру популяції. Результати даної дипломної роботи будуть корисними для збереження біорізноманіття, добору найбільш продуктивних та стійких до паразитів видів для розведення в аграрному секторі, а також для розуміння впливу антропогенних та природних факторів на генетичне різноманіття бджіл.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Молекулярні маркери

Мікросателітні маркери (SSR–маркери) – це короткі послідовності ДНК, які повторюються від 5 до 50 разів. Ці мотиви зазвичай складаються з 1–6 нуклеотидів і можуть бути присутніми в генах, негенних ділянках ДНК або міжгенних ділянках.

Кількість мікросателітних повторів варіює у різних організмів і є хорошим показником генетичного різноманіття. Це робить їх корисним інструментом для популяційно–генетичних досліджень, таких як визначення родоводів, вивчення міграції та часового розподілу генетичних змін (Kumar et al., 2019).

Для визначення мікросателітних маркерів у зразку ДНК використовується полімерзана ланцюгова реакція (ПЛР), що є одним із ключових методів сучасної молекулярної біології. Вона дозволяє ампліфікувати мікросателітні послідовності, використовуючи спеціально розроблені праймери, що розпізнають унікальні ділянки геному. Мікросателітні послідовності являють собою ділянки ДНК, які складаються з повторюваних нуклеотидних мотивів і характеризуються високою варіабельністю.

У процесі ПЛР синтезуються фрагменти ДНК, відомі як амплікони, які відповідають мікросателітним ділянкам. Після ампліфікації ці фрагменти піддаються розділенню за довжиною методом електрофорезу в агарозних або поліакриламідних гелях. Цей етап дозволяє визначити точну довжину ампліконів шляхом порівняння з молекулярними маркерами. Такий підхід забезпечує високу точність і чутливість аналізу, що робить його незамінним у вивченні генетичної різноманітності (Adeleke et al, 2020).

Мікросателітні маркери можна використовувати для визначення генетичної дистанції як між різними особами так і популяціями, встановлення спорідненості та вивчення структури популяцій (Seksteryte et al., 2012). Вони вважаються одними з найбільш ефективних інструментів молекулярної генетики через їх високий рівень поліморфізму, що дозволяє виявляти навіть незначні відмінності між генотипами. Їх

застосування охоплює численні аспекти біологічних досліджень. Зокрема, вони є незамінними для збереження видів, оскільки дозволяють оцінити рівень генетичної різноманітності в популяціях і визначити ступінь загрози вимирання. Такі дослідження важливі для розробки стратегій охорони біорізноманіття та управління генетичними ресурсами.

Дослідження на основі мікросателітних маркерів дають змогу встановити ступінь генетичної спорідненості між організмами, аналізувати еволюційні процеси та генетичний дрейф. Завдяки цьому метод стає ключовим у селекції нових сортів рослин і порід тварин, дозволяючи оптимізувати вибір генетичних ліній для схрещування.

Мікросателітні маркери класифікуються на наступні типи відповідно до їхньої структури та властивостей (Miah et al., 2013):

1. STR (Short Tandem Repeat) або VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Ці маркери складаються з коротких повторюваних послідовностей довжиною 10–100 нуклеотидів. Висока варіабельність робить їх ідеальними для генетичних ідентифікацій і досліджень популяційної динаміки.

2. SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Маркери, що базуються на однонуклеотидних варіаціях у геномі. Вони менш поліморфні, але забезпечують надзвичайно високу точність, особливо у великих геномах.

3. SSR (Simple Sequence Repeats). Найпоширеніші мікросателітні маркери, що складаються з повторюваних послідовностей довжиною від однієї до шести основ. Їх використовують для створення генетичних карт і вивчення геномної організації.

4. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Маркери, які розташовані між двома SSR–послідовностями. Вони характеризуються більшою випадковістю і меншою консервативністю, що робить їх корисними для дослідження нестандартних геномних структур.

Ці маркери дозволяють проводити комплексні дослідження, спрямовані на вивчення міграційних процесів у популяціях, аналіз генетичних адаптацій до різних екологічних умов і розробку методів селекції. Наприклад, ISSR–маркери

використовують для оцінки генетичного поліморфізму в умовах екологічного стресу, що дозволяє досліджувати механізми адаптації видів.

Отже, мікросателітні маркери є основою багатьох напрямів сучасної генетики. Вони відкривають широкі можливості для аналізу генетичних процесів, управління генофондами і розробки нових стратегій збереження біорізноманіття, відіграючи важливу роль у вирішенні екологічних, еволюційних і селекційних задач.

1.2. STR– і VNTR–маркери

STR– і VNTR–маркери часто розглядають разом через їхню дуже схожу структуру і функції. Основна відмінність між ними полягає в довжині повторів: STR містять короткі послідовності повторів від двох до семи нуклеотидів, тоді як VNTR містять повтори від дев'яти до декількох сотень нуклеотидів (Arvas, 2023).

Дані маркери дуже стійкі до геномних змін і можуть передаватися з покоління в покоління. Вони також є поліморфними, з різними варіаціями у кожної особини, що робить їх корисними для вивчення генетичного різноманіття популяції та ідентифікації представників того чи іншого виду.

Ці поліморфні ділянки використовуються в багатьох галузях, включаючи медичну генетику, судову медицину та еволюційну біологію. У медичній генетиці вони використовуються для діагностики генетичних захворювань, таких як гемофілія та муковісцидоз. У судовій медицині STR і VNTR маркери використовуються для підтвердження ідентичності ДНК, залишеної на місці злочину (Jian et al., 2021). В еволюційній біології їх використовують для вивчення генетичного різноманіття різних видів і популяцій та реконструкції їхньої еволюційної історії.

Одним із найбільш розповсюджених і ефективних методів виявлення мікросателітних маркерів, таких як STR (Short Tandem Repeat) і VNTR (Variable Number Tandem Repeat), є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Ця технологія базується на ампліфікації цільових послідовностей ДНК за допомогою специфічних праймерів, що дозволяє отримувати численні копії певних фрагментів для подальшого аналізу.

STR–маркери представляють собою короткі повторювані послідовності ДНК (зазвичай 2–6 нуклеотидів), які організовані у вигляді тандемних повторів. Ці послідовності можуть зустрічатися від 5 до 50 разів у конкретних геномних локусах. Варіабельність довжини таких повторів між різними індивідами робить STR–маркери надзвичайно корисними для ідентифікації генотипів та аналізу генетичної різноманітності популяцій.

Для виявлення STR–маркерів використовуються методи ПЛР та гель–електрофорезу. В рамках ПЛР пара праймерів розміщується по обидва боки STR–ділянки, що дозволяє ампліфікувати цей сегмент ДНК. Після ампліфікації отримані фрагменти розділяють за довжиною методом електрофорезу, що дозволяє точно визначити кількість повторів у кожному локусі.

Основною перевагою STR–маркерів є їхня висока відтворюваність і чутливість, що дозволяє проводити точний аналіз генетичної варіабельності та встановлювати зв'язки між генотипами. Їх застосовують у багатьох галузях, включаючи судово–медичну експертизу, діагностику спадкових захворювань, а також у вивченні популяційної генетики.

STR–маркери активно використовуються для аналізу схильності до різних спадкових захворювань, таких як рак, цукровий діабет, хвороба Альцгеймера тощо. Вони дозволяють виявляти генетичні поліморфізми, які можуть бути маркерами підвищеного ризику розвитку певних патологій.

Вони також можуть використовуватися в судовій медицині для встановлення батьківства та ідентифікації особи (Dumache et al., 2019). Однак STR–маркери мають певні недоліки, такі як висока вартість і складність стандартизації протоколів аналізу.

1.3. SNP–маркери

SNP–маркери (Single Nucleotide Polymorphism) – це однонуклеотидний поліморфізм який є однонуклеотидною зміною в ланцюжку ДНК, що може призвести до виникнення алелів з різними експресивними характеристиками. Це

найпоширеніший тип молекулярних маркерів, що використовується в генетичному аналізі. Такі поліморфні ділянки утворюються в результаті одонуклеотидних змін і є найпоширенішими генетичними варіантами у людини та інших організмів. SNP–маркери не залежать від довжини послідовності ДНК і тому можуть бути легко ідентифіковані шляхом послідовного порівняння ланцюжків ДНК (Lee, 2019).

Одонуклеотидний поліморфізм використовується в багатьох генетичних дослідженнях, включаючи асоціативні, філогенетичні та еволюційні дослідження. Вони також можуть бути використані для вивчення взаємозв'язку між генотипом і фенотипом та для пошуку генів, відповідальних за певні ознаки організму.

Однією з унікальних особливостей SNP–маркерів є те, що можна точно визначити місцезнаходження генетичної варіації. Тому SNP–маркери корисні для пошуку асоціацій між генотипом і фенотипом, а також для пошуку генетичних взаємозв'язків, відповідальних за певні характеристики організму (Ballard et al., 2020).

Дані поліморфні ділянки є найпоширенішими молекулярними маркерами для вивчення генетичного різноманіття. SNP маркери ідентифікують варіабельність на рівні одного нуклеотиду (наприклад, А, Т, G або С), що є результатом точкових мутацій у геномі. Хоча SNP менш поліморфні, ніж STR, вони мають низку переваг:

1. Широка поширеність у геномі: Вони можуть відображати генетичну різноманітність, оскільки існують великі відмінності в одонуклеотидному поліморфізмі між окремими особами.

2. Точність аналізу: Варіанти SNP відносно рідкісні, тому взаємозв'язки між різними популяціями можуть бути визначені з досить високим ступенем точності.

3. Застосування у медицині: SNP часто асоційовані з генами, які впливають на розвиток захворювань, або з фенотиповими ознаками, що дозволяє використовувати їх для прогнозування ризиків захворювань або аналізу відповіді на терапію.

SNP–маркери дозволяють проводити глибокі дослідження генетичної структури популяцій, еволюційної історії, а також визначати генетичну різноманітність та спорідненість між різними групами організмів. Тому ці поліморфізми в основному

використовуються для вивчення генетичних відмінностей між окремими особами та популяціями, зокрема схильності до генетичних захворювань, популяційної генетики та філогенетичних зв'язків між організмами.

Відомо, що SNP–маркери можуть бути присутні в різних частинах геному, включаючи екзони, інтрони і некодуючі ділянки; такі поліморфні ділянки часто зустрічаються в генах, пов'язаних із захворюваннями і фенотипними ознаками, і тому можуть бути використані для визначення ризику захворювання.

Варто також зазначити, що SNP–маркери можна використовувати для генетичного картування та асоціативного аналізу з метою ідентифікації генів, які впливають на певні характеристики, тож вони є корисними інструментами в генетиці, геноміці та медицині (Jian et al., 2021).

Наприклад, ці маркери можна використовувати для виявлення асоціацій з певними фенотипними ознаками, вивчення мутацій, дослідження еволюційних зв'язків і генофондів у різних популяціях, а також для розробки прогностичних моделей в медицині та інших галузях. Завдяки їх високій точності, можливостям автоматизованої обробки і простоті використання, SNP–маркери відіграють важливу роль у геномній та персоналізованій медицині.

1.4. SSR–маркери

SSR–маркери (Simple Sequence Repeats) – це короткі повторювані послідовності ДНК, що зазвичай складаються з одного–шести нуклеотидів. Ці повтори розташовані в міжгенних і кодуючих ділянках геному, а їх частота і розмір можуть варіювати між генами і популяціями (Lee, 2019).

Дані нуклеотидні послідовності використовуються в генетичних дослідженнях для аналізу поліморфізму між окремими особами, популяціями та видами, а також для встановлення родинних і генетичних зв'язків. Їх високий поліморфізм (мінливість) і здатність горизонтально переноситись роблять їх корисним інструментом для визначення рівнів генетичного різноманіття.

Ці послідовності можна ампліфікувати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і вимірювати за допомогою методів розділення ДНК, таких як гель–електрофорез або капілярний електрофорез. Розмір ампліфікованих фрагментів можна виміряти і використовувати для порівняння між окремими особами або популяціями.

SSR–маркери є одними з найпоширеніших маркерів, що використовуються в генетичних дослідженнях різних організмів, включаючи людей, тварин і рослин (Swetha & Sran, 2022). Вони також можуть бути використані для вивчення екологічних та еволюційних процесів.

SSR (Simple Sequence Repeats) є одними з найбільш поширених молекулярних маркерів. Вони складаються з коротких повторюваних послідовностей ДНК (2–6 нуклеотидів), таких як (AC) n , (AG) n або (AAG) n , де "n" вказує кількість повторів. Кількість таких повторів варіюється між індивідами, що робить SSR незамінними для генетичної ідентифікації.

Ампліфікація SSR–маркерів за допомогою ПЛР дозволяє аналізувати генетичну структуру популяцій, виявляти рівень різноманітності, а також досліджувати еволюційні процеси. SSR–маркери мають низьку вартість аналізу і високу ефективність, що сприяє їх широкому використанню у сільськогосподарській генетиці, селекції рослин і тварин.

Дані поліморфні ділянки широко використовуються для аналізу генетичної структури популяцій і вивчення їх еволюційної історії; вони також можуть бути використані для визначення рівня генетичного різноманіття в популяції, розміру і швидкості поширення генетичних варіацій, а також для визначення походження і шляхів міграції різних груп організмів.

Крім того, різні методи аналізу SSR–маркерів можуть бути використані для визначення довжини алелів і визначення генетичної різноманітності між різними популяціями. Одним з таких методів є аналіз генетичної структури за допомогою

F–статистики, яка надає інформацію про ступінь генетичної диференціації між різними популяціями (Zheng et al., 2019).

Для аналізу F–статистики необхідна інформація про кількість алелів у кожному локусі в кожній дослідній популяції. На основі цієї інформації можна розрахувати різні F–статистики, такі як FST, FIS і FIT, де FST показує, наскільки популяції відрізняються одна від одної, FIT вказує на загальний рівень генетичної різноманітності у всіх популяціях, а FIS показує, наскільки генетично різноманітні особини в кожній популяції.

Таким чином, аналіз SSR–маркерів надає важливу інформацію про генетичне різноманіття та структуру популяцій. Ця інформація може бути використана для вивчення еволюційних процесів, дослідження різних аспектів популяційної біології, встановлення походження та історії різних популяцій, а також для збереження та управління різноманіттям.

1.5. ISSR–маркери

ISSR–маркери (Inter Simple Sequence Repeats) – це молекулярні маркери, які використовуються для визначення генетичної різноманітності між організмами, такими як рослини, тварини та мікроорганізми. ISSR–маркери були розроблені на основі міжгенних ділянок геному, що містять послідовності, які повторюються.

Дані послідовності створюються за допомогою спеціальних праймерів, які розташовуються поруч з повторюваними послідовностями в міжпросторових ділянках геному. Праймери містять короткі послідовності повторюваних основ, специфічні для певних ділянок геному (Undal & Ahir, 2023).

Оскільки ці повтори можуть ампліфікувати велику кількість геномних фрагментів, вони надають багату інформацію про генетичну структуру популяції і є дуже потужним інструментом для аналізу генетичного різноманіття. ISSR–маркери також є високополіморфними і можуть виявляти невеликі відмінності в послідовності геному між окремими особами.

Порівняно з іншими молекулярними маркерами, ISSR–маркери є більш універсальними, оскільки їх можна використовувати в усіх організмах.

Дані маркери засновані на міжгенних послідовностях, які містять більше 1000 основ між двома повторюваними послідовностями. Ці послідовності можуть містити кілька сайтів рестрикції одночасно, що дозволяє проводити ISSR ПЛП з використанням різних праймерів, що містять повтори сусідніх послідовностей (Borborah et al., 2020).

Дані повторювані послідовності дозволяють отримати велику кількість поліморфних локусів з високою генетичною варіабельністю та ефективно вивчати генетичну структуру популяції. Їх використання у дослідженні генетичної мінливості рослин і тварин дозволяє не тільки оцінити рівень генетичного різноманіття, але й знайти механізми, які формують це різноманіття в популяції.

Основна перевага ISSR–маркерів полягає в тому, що вони не потребують знання послідовності для розробки праймерів, що скорочує час і вартість розробки праймерів. Крім того, вони можуть досліджувати ширший спектр геномних ділянок, забезпечуючи більш повну картину генетичного різноманіття (Abdalla et al., 2020).

У бджіл ISSR–маркери, або міжпросторові повторювальні послідовності, є важливим інструментом для дослідження генетичної структури популяцій і оцінки їхньої генетичної різноманітності. Ці маркери дозволяють ідентифікувати ступінь спорідненості між різними генотипами, аналізувати родинні зв'язки між окремими особинами і визначати генетичні особливості різних популяцій. Завдяки ISSR–маркерам дослідники можуть досліджувати механізми розвитку й еволюції медоносних бджіл, їхню здатність адаптуватися до змін навколишнього середовища і взаємодію з антропогенними факторами, такими як сільське господарство чи міське середовище.

ISSR–маркери відіграють важливу роль у генетичному моніторингу бджолиних популяцій. Їх використання дає можливість визначати генетичну ідентичність ліній бджіл і створювати ефективні селекційні програми, спрямовані на поліпшення продуктивності, стійкості до хвороб і адаптивних характеристик. Це дозволяє не лише

вдосконалювати якість селекції, а й забезпечувати збереження унікальних генетичних ресурсів, що є особливо важливим у сучасних умовах скорочення біорізноманіття. Застосування ISSR–маркерів дозволяє також оцінювати стан здоров'я бджолиних популяцій, виявляти рівень генетичної стабільності та досліджувати міграційні шляхи окремих груп, що має вагоме значення для розвитку стратегій охорони видів.

1.6. Роль ISSR–маркерів в молекулярних дослідженнях

Метод ISSR ґрунтується на ампліфікації ділянок ДНК між простими повторювальними мотивами за допомогою специфічних праймерів. Ці праймери, які складаються з коротких послідовностей, зв'язуються з консервативними ділянками геному і ініціюють полімеразну ланцюгову реакцію, що дозволяє отримувати специфічні фрагменти ДНК. Отримані фрагменти аналізуються за допомогою гелевого електрофорезу, що дозволяє виявляти поліморфізм і визначати генетичні відмінності між особинами. Метод є високоінформативним і доступним, що робить його ідеальним для досліджень у галузі генетики популяцій.

ISSR–маркери широко застосовуються у різних наукових і практичних сферах. Їх використання у дослідженнях медоносних бджіл сприяє кращому розумінню популяційної генетики і дає змогу вдосконалювати методи управління генетичними ресурсами. Важливою є також їхня роль у селекційних програмах, які зосереджуються на створенні високопродуктивних і стійких до патогенів ліній. Крім того, ISSR–маркери сприяють збереженню генетичного різноманіття, що є критично важливим для сталого розвитку бджільництва в умовах кліматичних змін і екологічних викликів.

Метод ISSR дозволяє аналізувати поліморфізм у ділянках геному, що містять міжгенні повтори, таким чином виявляючи різноманітність генетичних послідовностей між організмами. Це дозволяє визначати генетичну структуру популяцій, оцінювати рівень генетичного різноманіття, встановлювати зв'язки між різними видами та вивчати еволюційні відносини (Undal & Ahir, 2023).

З практичної точки зору, методи ISSR можуть бути використані для проведення генетичних досліджень, важливих для збереження біорізноманіття, програм селекції рослин і тварин, вивчення структури популяцій та ідентифікації генетичних маркерів для селекції та ідентифікації сортів. Система ISSR–маркерів базується на аналізі міжгенних послідовностей ДНК, що містять короткі послідовності повторів. Вони використовуються для виявлення поліморфізму в цих ділянках і надають інформацію про генетичні відмінності між організмами. Їх використання сприяє розвитку генетичних досліджень у медицині, екології та сільському господарстві, що дозволяє підвищити ефективність селекційних програм і забезпечити стале використання генетичних ресурсів.

В Україні ISSR–маркери є перспективним інструментом для дослідження місцевих популяцій медоносних бджіл, таких як українська степова бджола. Використання цього методу дозволяє проводити глибокий аналіз генетичної структури, створювати генетичний банк даних, що сприяє оптимізації селекційних програм і розробці стратегій збереження популяцій. Цей підхід є особливо важливим у контексті інтеграції генетичних досліджень у практику сучасного бджільництва, що забезпечує його сталий розвиток. Таким чином, ISSR–маркери виступають як універсальний інструмент для генетичного аналізу, збереження біорізноманіття і підтримки екологічного балансу.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідні матеріали, представлені у вигляді зразків бджіл, зібрані на території України і охоплюють різні географічні зони, кліматичні умови та екосистеми. Для проведення даного дослідження ми вибрали ділянки, характерні для різних ландшафтних зон України. На Рис. 2.1 представлена мапа, що показує області, в яких відбувався збір зразків бджіл.



Рисунок 2.1. Контуром обведено області України, з яких отриманий матеріал.

У цьому дослідженні використовували два типи зразків ДНК: еталонні та дослідні. Еталонні зразки включали Сап 11, Мсд 6, Ліг 1, 1 Зк та Мосер 1 і використовувались для порівняння та стандартизації результатів. Дослідні зразки та області, де вони були зібрані, представлені у Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Дослідні зразки бджіл

Область	Зразки
Волинська	14 VІ, 21 VІ, 22 VІ, 28 VІ, 30 VІ, 31 VІ
Дніпропетровська	1 Dn, 3 Dn, 5 Dn, 10 Dn, 16 Dn, 17 Dn, 18 Dn, 22 Dn, 43 Dn
Запорізька	1 Zp, 3 Zp, 4 Zp, 7 Zp, 8 Zp
Івано–Франківська	2 IF, 4 IF, 7 IF, 8 IF, 14 IF
Київська	1 Kv, 9 Kv, 11 Kv, 13 Kv, 14 Kv, 15 Kv, 16 Kv, 33 Kv, 34 Kv
Кіровоградська	1 Kg, 2 Kg, 3 Kg, 4 Kg, 5 Kg
Львівська	1 Lv, 3 Lv, 11 Lv, 12 Lv, 14 Lv, 15 Lv
Миколаївська	23 Mk, 24 Mk, 25 Mk
Полтавська	3 Pl, 4 Pl, 5 Pl, 8 Pl, 12 Pl
Хмельницька	6 Khm, 23 Khm, 24 Khm, 25 Khm, 31 Khm, 39 Khm, 40 Khm, 54 Khm, 55 Khm, 59 Khm, 81 Khm, 82 Khm
Черкаська	3 Chk, 5 Chk, 8 Chk, 9 Chk, 26 Chk

Зібрані зразки бджіл є важливими дослідними матеріалами для розуміння генетичної структури популяцій та їх здатності адаптуватися до різних екологічних та кліматичних факторів. Такий підхід дозволяє оцінити рівень генетичного різноманіття в конкретному регіоні, а також загальні демографічні тенденції в контексті змін навколишнього середовища. Зокрема, дослідження поліморфізму зразків бджіл з різних регіонів України дають можливості:

1. Вивчити вплив факторів навколишнього середовища на генетичну структуру популяції. Аналіз генетичного матеріалу дозволяє виявити, як різні фактори навколишнього середовища, такі як клімат, рельєф, ґрунтовий покрив і доступність кормових ресурсів, впливають на генетичну структуру популяцій. Наприклад, зразки з регіонів з контрастними кліматичними умовами (наприклад, степових зон) потенційно дозволяють відстежувати різні стратегії адаптації популяцій.

2. Виявити регіональні особливості генетичного складу бджіл. Завдяки збору матеріалів з різних географічних регіонів України стає можливим виявити унікальні генотипи, характерні для окремих регіонів. Такі дослідження важливі для розуміння історії формування популяцій, міграційних процесів та впливу екологічної ізоляції на генетичне різноманіття.

3. Виявити групи, які потребують захисту або репродуктивного втручання. Аналіз генетичних даних дозволяє виявити популяції з низьким генетичним різноманіттям або проявляють ознаки інбридингу. Таким популяціям необхідно розробити спеціальні заходи, спрямовані на підтримку генетичного потенціалу або посилення селекційної роботи, щоб уникнути генетичної деградації.

Колекція експериментальних зразків, зібраних з різних регіонів України, формує міцну основу для ретельних досліджень у галузі генетики, екології та селекції. Їх використання дозволяє робити обґрунтовані висновки про стан популяцій бджіл і сприяє розробці ефективних стратегій збереження біорізноманіття в умовах сучасних екологічних викликів.

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 M).
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.
14. Наявність та якість виділеного матеріалу перевіряли за допомогою методу електрофоретичного розділення в 1,5% агарозному гелі, після попереднього проведення полімеразної ланцюгової реакції (Таб. 2.3.2., 2.3.3.).

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 ЕДТА.
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 5 мкл зразка ДНК з 2 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 електрофоретичного розділення гель обережно переносили на чисте скло транслюмінатора і спостерігали та фотографували ДНК в ультрафіолетовому світлі.

2.3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для ампліфікації використовували ISSR-праймери, представлені у зведеній таблиці 2.3.1.

Таблиця 2.3.1

Використані праймери

Назва праймера	Послідовність	Довжина, н.п.
Be 1	(TCC)5GT	500–1300
Be 2	(AC)8YT	600–1550
Be 3	(AC)8G	400–750
Be 4	(AC)8T	450–1200

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
Активация 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

На ранніх етапах дослідження використовувався протокол ПЛР, представлений у таблиці 2.3.2, який забезпечує основні умови для ампліфікації ДНК. Цей протокол був

розроблений для роботи зі зразками поширених типів, що дозволило отримати результати на першому етапі дослідження генетичного матеріалу. Однак особливості наших дослідних зразків вимагали адаптації протоколу. На наступних етапах експерименту він був оптимізований відповідно до наших вимог для досягнення максимальної чутливості та специфічності ампліфікації ДНК. Остаточний протокол ПЛР представлений в таблиці 2.3.3.

Таблиця 2.3.3

Протокол OV TAQBE

Етап	Температура, °C	Час
Активация полімерази	95	3 хвилини
Денатурація ДНК	95	30 секунд
Гібридизація праймерів	51	1 хвилина
Елонгація	68	30 секунд
Повернення до кроку 2	–	40 разів
Фінальна елонгація	72	7 хвилин
Охолодження	12	5 хвилин

Для візуалізації продуктів ПЛР було використано 1.5% агарозні гелі, які забезпечують оптимальне розділення фрагментів ДНК у діапазоні довжин від 100 до 2000 пар нуклеотидів. Після завершення електрофорезу гель переносили транс-ілюмінатор, де результати реєстрували в ультрафіолетовому світлі. Продукти ампліфікації спостерігалися як окремі смуги, і їх розташування порівнювали з маркерними смугами ДНК.

2.4. Статистичний аналіз отриманих даних

Статистичний аналіз даних є важливим етапом наукових досліджень, оскільки він забезпечує об'єктивну інтерпретацію отриманих результатів. Це дозволяє виявити

закономірності, перевірити гіпотези і оцінити рівень варіабельності і надійності отриманих даних. У цьому розділі представлені методи та підходи, що використовуються для обробки та аналізу експериментальних даних.

Застосовані статистичні моделі дозволили оцінити взаємозв'язок між досліджуваними параметрами і важливість виявлених відмінностей всередині різних популяцій бджіл. Основна увага була приділена використанню сучасних програмних засобів і підходів, що забезпечують точність і репрезентативність аналізу.

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 даних, в тому числі даних ISSR–маркерів, використовується додаток DARwin 6 (Perrier et al., 2003). Нижче наведено загальний робочий алгоритм для аналізу генетичних даних ISSR–маркерів для генетичних досліджень бджіл в програмі «DARwin 6»:

1. Відкрити додаток «DARwin 6» 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.

Інші функції та методи аналізу можуть бути використані в залежності від конкретного дослідницького завдання або потреб (Perrier et al., 2003).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На початковому етапі наших досліджень ми виділяли ДНК з тіла медоносних бджіл отриманих з різних областей України. Надалі ця ДНК перевірялась на нативність за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (розділи 2.1, 2.2) (рис. 3.1.).

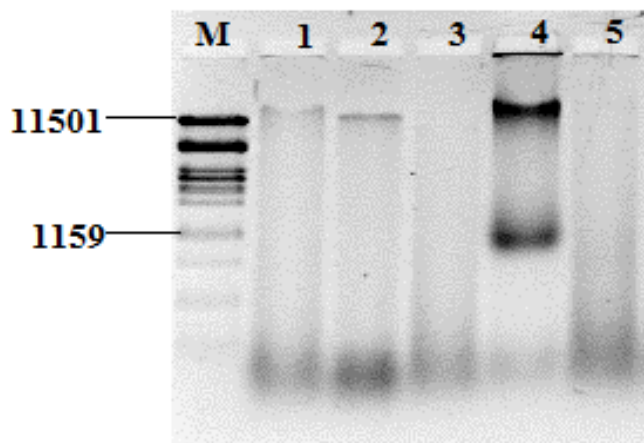


Рисунок 3.1 Приклади електрофоретичного розділення нативної ДНК: **М** – маркер Gene Ruller, №1 – 33 Kv, №2 – 34 Kv, №3 – 35 Kv, №4 – 22 Dn, №5 – 23 Dn.

Після екстракції ДНК зразки були піддані ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів, що комплементарні до крайніх ділянок мікросателітних областей.

У нашому дослідженні було використано чотири праймери, для визначення оптимальних умов (табл. 2.3.1) при роботі з підвидами медоносних бджіл, що мешкають в Україні. Кожен праймер має унікальну нуклеотидну послідовність, яка відповідає певним ділянкам геному бджіл.

3.1. Оптимізація умов та вибір ISSR–маркера

На початкових етапах роботи з новими праймерами нами проводилась оптимізація умов ПЛР. Температура гібридизації праймера підібралась для отримання чітких результатів ампліфікації ISSR ділянок з подальшим їх співставленням з

аналогічними дослідженнями інших авторів (Borborah et al., 2020; Ceksteryte et al., 2012; Paplauskienė et al., 2006). Температуру гібридизації праймерів при ампліфікації змінювали в межах від 45°C до 52°C, з метою пошуку оптимальної. Правильний вибір умов проведення ПЛР забезпечує найвищу ефективність ампліфікації та дозволяє сформувати яскраві, чіткі смуги на електрофореграмах. Для досліджень, в якості контрольного зразка використовувалась ДНК *A.m. carnica* (Moser 1).

Кожен праймер використовувався окремо для ампліфікації зразків ДНК.

Ампліфіковану ДНК піддавали електрофорезу в агарозному гелі. Під час електрофорезу ампліфікована ДНК розподілялась за розміром. В результаті на електрофореграмі в кожному треку можна спостерігати набори смуг, кожна з яких відповідає амплікону певної довжини.

Отримані електрофоретичні профілі були візуалізовані та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення «TotalLab TL 120» (Nonlinear Dynamics Ltd (2008). Для порівняння профілів між зразками та визначення статистично значущих відмінностей між групами бджіл використовували програмне забезпечення «DARwin 6».

Попередня ампліфікація передбачає ампліфікацію зразка ДНК з почерговим використанням кожного праймера окремо.

На рисунку 3.1.1. показано результати пробної ампліфікації, отримані з використанням праймера Вее 2. Під час ампліфікації було отримано набори електрофоретичних смуг. Найбільша кількість варіантів ампліфікатів виявлена лише при температурі 45 °C, а саме – 5 (табл. 3.1.1). При інших температурах кількість ПЛР – продуктів менша. Найкращі результати ампліфікації були отримані при 45°C, де на електрофореграмах чітко видно ампліфікати з довжинами 850, 1100, 1300 і 1400 п.н. Однак результати ампліфікації з праймером Вее 2 були менш задовільними, ніж з праймером Вее 1.

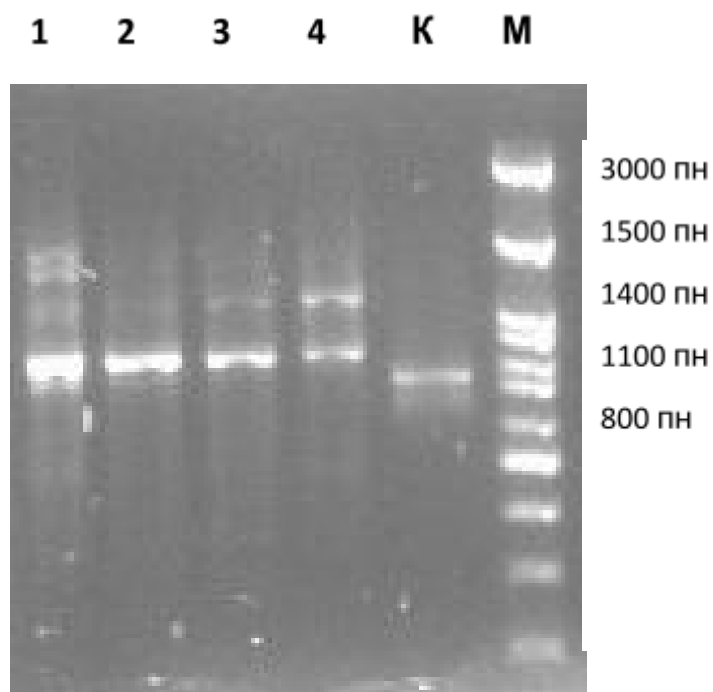


Рисунок 3.1.1. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Bee 2. К – контроль, М – маркер.

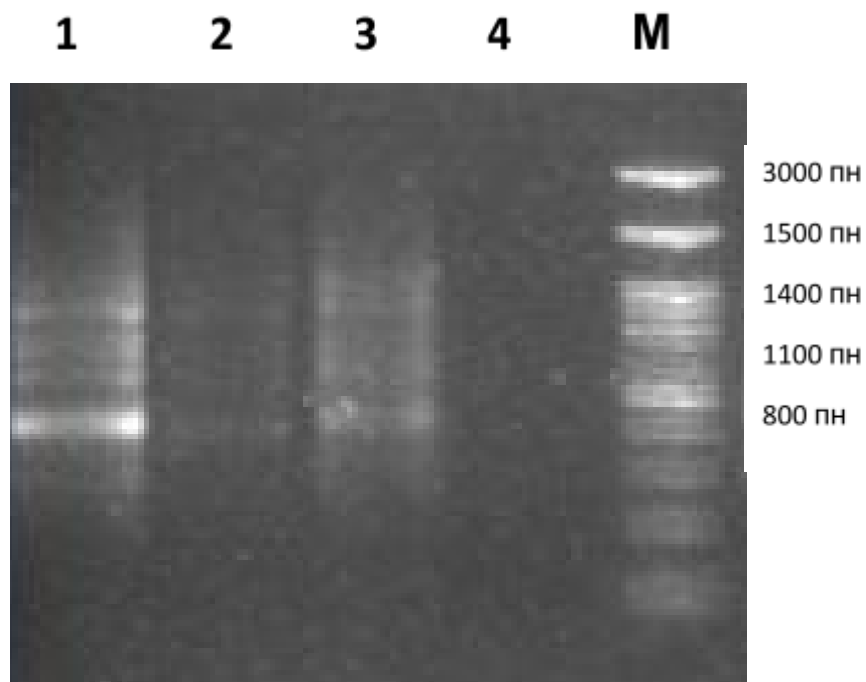


Рисунок 3.1.2. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Bee 3. М – маркер.

Використання праймера Вее 3 (рис. 3.1.2) призводило до найгірших результатів, оскільки праймер проявляв диференційну чутливість до зразків ДНК та вибірково ампліфікував їх. Проблема була настільки серйозною, що варіант використання праймера Вее 3 був відкинутий на ранній стадії дослідження. Отже, цей праймер не надалі не використовувався у дослідженнях.

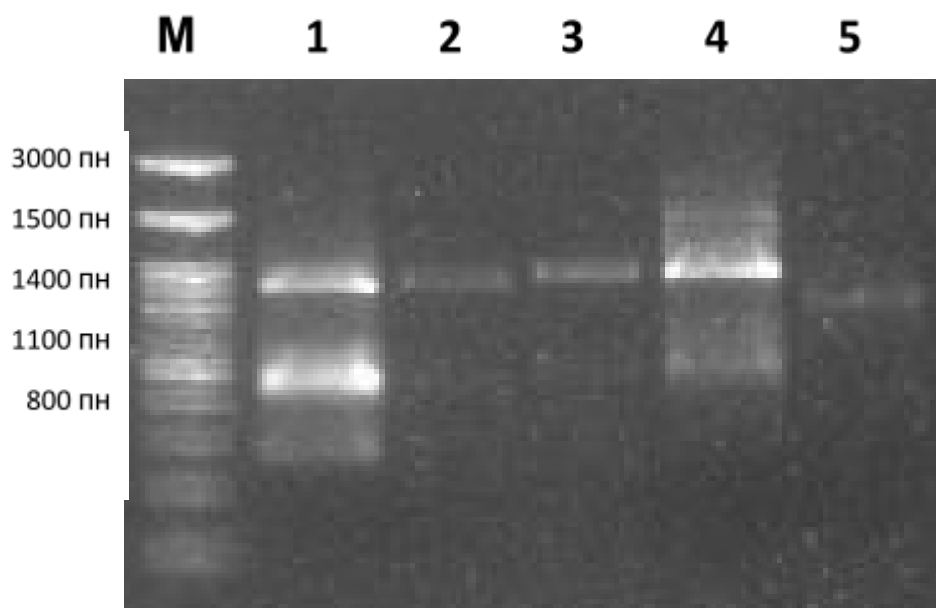


Рисунок 3.1.3. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Вее 4. М – маркер. Еталонні зразки.

На рисунку 3.1.3. показано результати використання праймера Вее 4, які у подальшому виявилися одними з кращих серед усіх дослідних праймерів.

В результаті проведених ПЛР було визначено, які праймери призвели до формування найбільшої кількості ампліфікатів. Надалі були відібрані праймери, які показали найкращі результати в цих категоріях. Це дозволило визначити праймери, придатні для подальших досліджень поліморфізму у геномах бджіл.

Таблиця 3.1.1

Порівняння результатів ампліфікації різних праймерних послідовностей для зразка *A.m.carnica* (Moser)

Праймер	Температура гібридизації праймера, °C	Кількість смуг
Bee 1 (TCC)5GT	45	1
	46.5	—
	47	—
	50.5	3
	51	5
Bee 2 (AC)8YT	45	4
	46.5	1
	47	2
	50.5	2
	51	1
Bee 3 (AC)8G	45	4
	48	2
	50	3
	51	—
Bee 4 (AC)8T	45	3
	46.5	1
	47	1
	50.5	3
	51	—

Таким чином, найкращі показники ампліфікації були отримані при використанні праймера Bee 1 (див. розділ 3.2.2) та Bee 4 (див. розділ 3.2.1). Ці праймери характеризується високою варіабельністю, що дозволило отримати більш різноманітні та інформативні набори ампліфікованих продуктів.

3.2. Поліморфізм ISSR–маркерів у бджоли медоносної

Поліморфізм ISSR–маркерів є ключовим показником генетичної варіативності популяцій, і його аналіз дозволяє отримати цінну інформацію про рівень генетичного різноманіття та структуру геному досліджуваних організмів. У даному розділі розглядається поліморфізм ISSR–маркерів, ампліфікованих за допомогою специфічних праймерів Bee 1 та Bee 4, які широко використовуються для дослідження генетичної диференціації та спорідненості у бджіл (Paplauskienė et al., 2006; Ceksteryte et al., 2012). Особливий інтерес становить їхня здатність виявляти унікальні генетичні варіації, що робить ці праймери важливим інструментом у селекції та збереженні біорізноманіття медоносних бджіл.

Для ефективного проведення подальших досліджень необхідно було визначити які з доступних праймерних послідовностей дозволяють спостерігати відмінності між еталонними зразками ДНК медоносних бджіл. Тому для кожного праймера було проведено пробну ампліфікацію, щоб оцінити його можливості. Надалі, нами послідовно проводилась ПЛР для медоносних бджіл з різних регіонів України. Набори отриманих продуктів ампліфікації різних довжин дозволяють виявити міру приналежності аналізованих зразків до еталонних.

3.2.1. Поліморфізм ISSR–маркерів у бджоли медоносної за допомогою ампліфікації праймера Bee 4

За допомогою електрофоретичного розділення ампліфікатів еталонних зразків ми спробували надалі використовувати їх як стандарт, для подальшої диференціації бджіл невідомого походження до тих чи інших груп.

Порівнянням дослідних зразків з еталонними, можна визначити, чи містить аналізований зразок специфічні фрагменти ДНК, які наявні в еталонному зразку.

Результати електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів еталонних зразків є важливою основою для інтерпретації та порівняння результатів з дослідними зразками.

Вони дозволяють визначити, чи є в зразках спільні або унікальні фрагменти, і зробити висновки про генетичну схожість або відмінність між зразками.

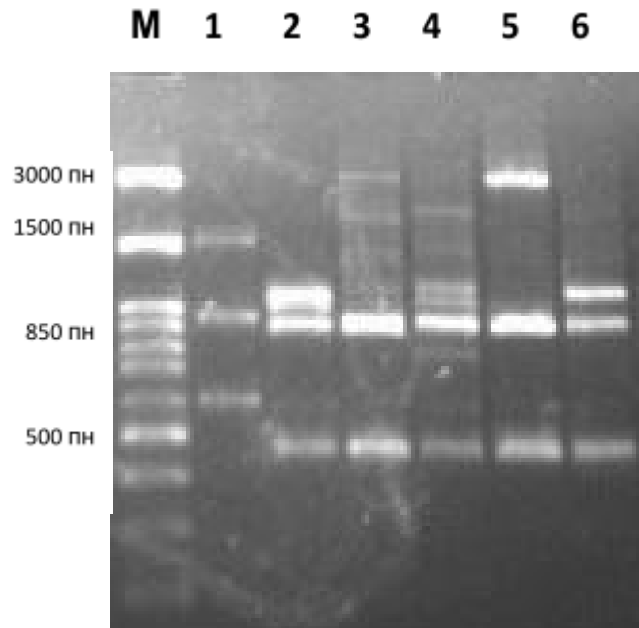


Рисунок 3.2.1.1. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробної ампліфікації з використанням праймера Bee 4.

Зразки: М – маркер, 1– Cau 1, 2– Cau 11, 3 – 1 Zk, 4 – 14 Zk, 5 – Lig 1, 6 – Mcd 6.

Порівнюючи ампліфікати отримані за допомогою праймера Bee 4 спостерігаються смуги довжиною 1100 п.н. які присутні в усіх зразках, тому їх можна назвати неpolіморфними. Смуга довжиною 3000 п.н. наявна лише у підвидів *A.m.carnica* (Karpatka) і *A.m.ligustica* (зразки 1 Zk і Lig 1 відповідно). Серед досліджуваних нами зразків найспецифічніші набори ампліфікатів характерні підвиду *A.m.caucasica* (Cau 1). Для нього притаманна відсутність смуги довжиною 500 п.н., але наявна довжиною 800 п.н. (Рис. 3.2.1.1.).

Для наочності електрофоретичні профілі було зведено в таблицю, де зеленим кольором позначено смуги відповідних довжин, а самі довжини та зразки позначені синім кольором (Таб. 3.2.1.3).

Таблиця 3.2.1.1

Порівняння ISSR профілів *Apis mellifera* різних областей за Вее 4

	1500	1250	1100	1000	900	850	800	750	650	500	CO
CAUC 11	–	+	+	–	–	+	–	–	+	+	
MCD 6	–	+	+	–	+	+	–	–	–	+	
Lig 1	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	
1 Zk	+	–	+	–	–	+	–	–	–	+	
Moser 1	–	+	+	+	–	–	–	–	–	+	
9 Kv	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	CRN
11 Kv	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	CAUC
13 Kv	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	MCD
14 Kv	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	CAUC
15 Kv	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–	MCD
16 Kv	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–	MCD
33 Kv	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–	MCD (morphometr)
34 Kv	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	MCD (morphometr)
21 VI	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	CAUC
22 VI	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	CRN
31 VI	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	CRN
23 Mk	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	CAUC
1 Kg	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	CRN
2 Kg	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	CRN
2 IF	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	CRN
4 IF	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	CRN

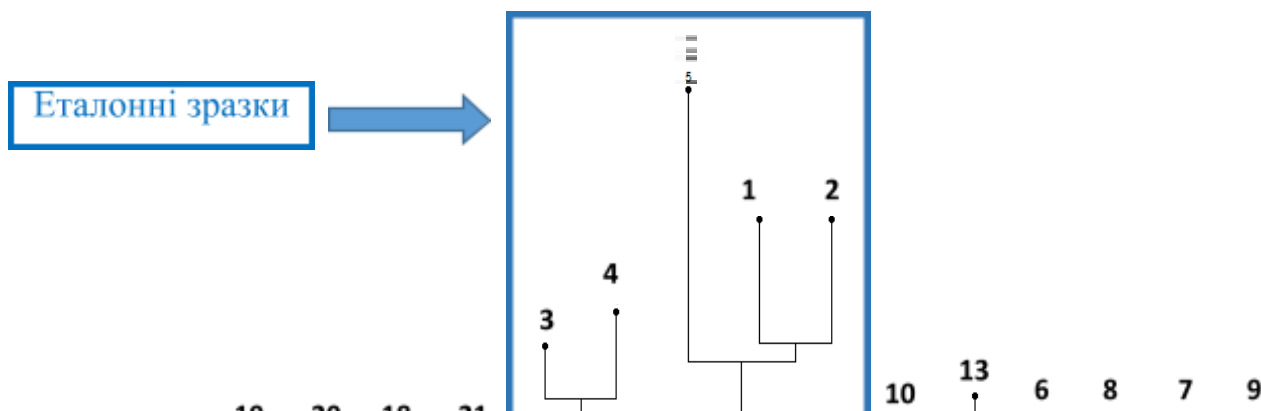


Рисунок 3.2.1.2. Філогенетичне дерево дослідних підвидів *Apis mellifera* за праймером Bce 4.

Варто зазначити, що у багатьох зразків після аналізу електрофореграми було знайдено специфічні профілі, внаслідок чого виникли складнощі з аналізом отриманих даних та проведенням подальшого дослідження. Також, на рисунку 3.2.1.2. видно, що усі еталонні зразки виявилися між собою ближчими, ніж з іншими дослідними зразками, внаслідок чого відокремились в «ізолювану» гілку. Можливо така картина пов'язана з тим що еталонні зразки хоч і відбирались із територій та пасік де не відбувалось свідомого завезення бджіл невідомого походження, проте не виключені випадкові давні події гібридизації. Крім того, *A. m. macedonica*, *A. m. lygustica*, *A. m. carnica* належать до однієї, наймолодшої еволюційної лінії (лінія С) бджіл. Їх порівняння із бджолами де відбувалось привнесення геномів *A. m. caucasica* (лінія О) та *A.m. mellifera* (лінія М), що належать до віддалених еволюційних ліній створює такий результат (Закон України «Про бджільництво»; Гайдар & Поліщук, 1993). З цих причин було прийнято рішення продовжити дослідження, використовуючи ще один праймер, а саме Bce 1.

3.2.2. Поліморфізм ISSR–маркерів у бджоли медоносної за допомогою ампліфікації праймера Bce 1

Результати електрофорезу еталонних зразків, використаних в цьому дослідженні, показані на рисунку 3.2.2.1, для порівняння з дослідними зразками, електрофореграми та опис результатів яких представлені нижче (рис. 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.2.3, 3.2.2.1.1, 3.2.2.1.2, 3.2.3.1).

А) 1 2 3 4 5 М

Б) М 1 2 3 4 5 6 7

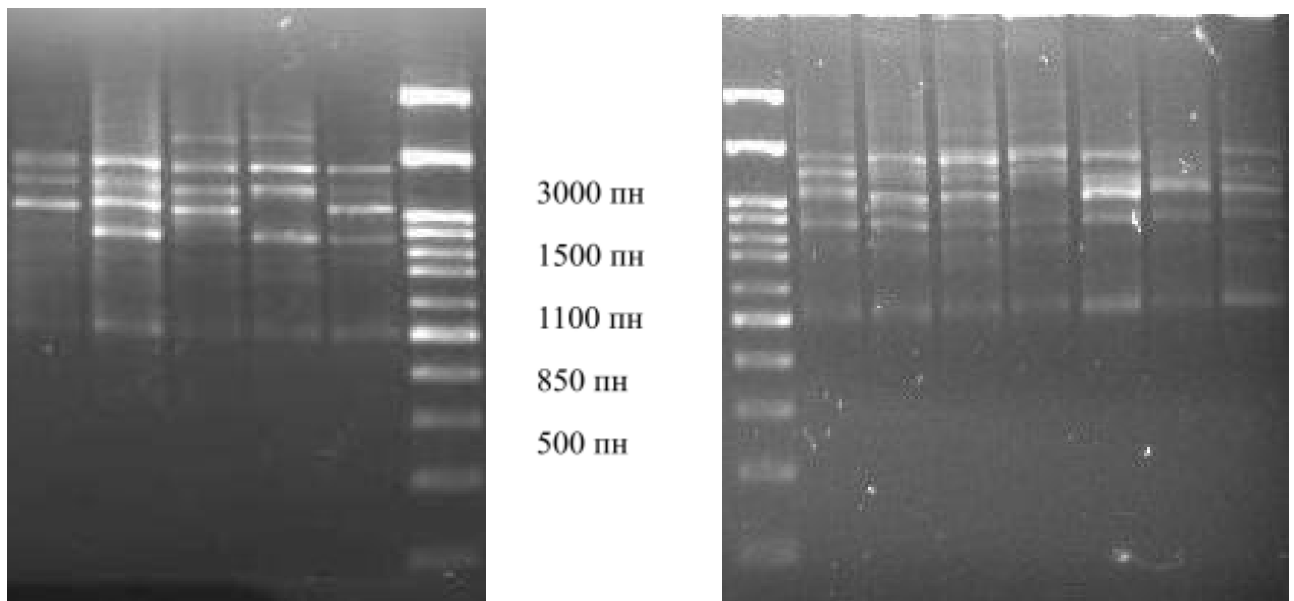


Рисунок 3.2.2.1. Поліморфізм продуктів ампліфікації, утворений за допомогою ISSR–праймера Bee 1, М – маркер, А) Еталонні зразки: Cauc 11, Mcd 6, Lig 1, 1 Zk, Moser 1; Б) Зразки: М – маркер, 1 – 10 Dn, 2 – 22 Dn, 3 – 43 Dn, 4 – 13 Kv, 5 – 16 Kv, 6 – 33 Kv, 7 – 34 Kv.

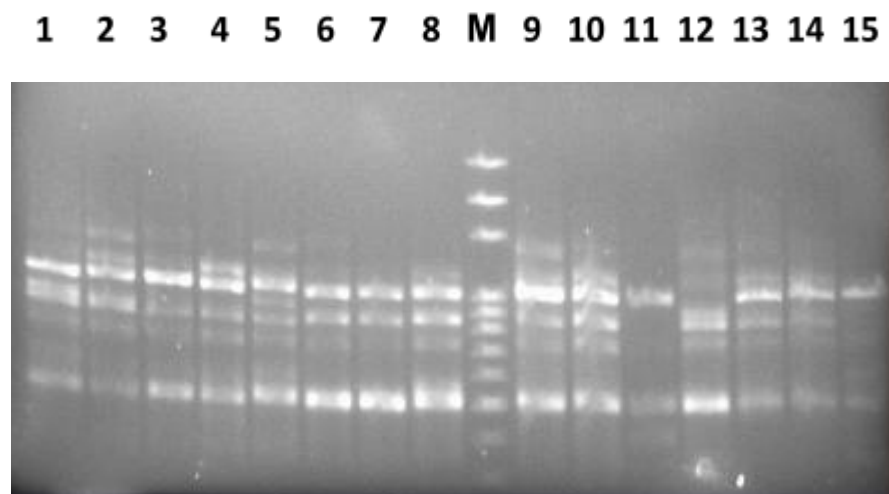


Рисунок 3.2.2.2. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Bee 1.

Зразки: 1 – 1 Lv, 2 – 3 Lv, 3 – 11 Lv, 4 – 12 Lv, 5 – 14 Lv, 6 – 15 Lv, 7 – 7 Vl, 8 – 14 Vl, М – Маркер, 9 – 28 Vl, 10 – 30 Vl, 11 – 24 Khm, 12 – 25 Khm, 13 – 39 Khm, 14 – 40 Khm, 15 – 55 Khm.

1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14

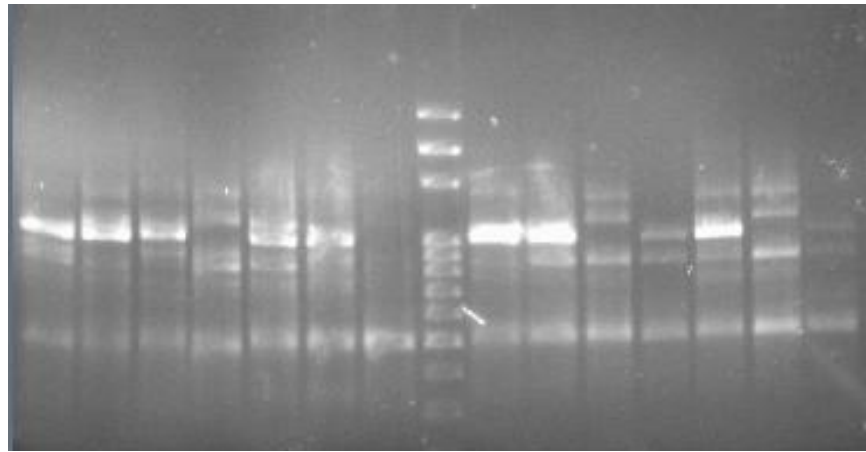


Рисунок 3.2.2.3. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Bee 1.

Зразки: 1 – 3 Chk, 2 – 5 Chk, 3 – 8 Chk, 4 – 9 Chk, 5 – 26 Chk, 6 – 3 Pl,
7 – 5 Pl, M – Маркер, 8 – 8 Pl, 9 – 12 Pl, 10 – 1 Zp, 11 – 3 Zp,
12 – 4 Zp, 13 – 7 Zp, 14 – 8 Zp.

Для узагальнення та аналізу отриманих результатів нами було створено зведені таблиці для еталонних та дослідних зразків (див. додаток Б), з подальшим порівнянням даних за праймером Bee 1:

1. CAUC 11. Зразок містить унікальні поліморфні смуги на 850 п.н. та 950 п.н., які притаманні, окрім нього, ще для 1 Zk і Moser 1, відповідно.

2. MCD 6. Цей зразок має характерні смуги на 800 п.н і 900 п.н., що є специфічними для цього зразка, і не зустрічається у інших еталонних. Окрім цього, спостерігається відсутність смуги довжиною у 1700 п.н., яка є характерною для решти еталонних зразків.

3. Lig 1. У даного зразка не спостерігається унікальних поліморфізмів, що може свідчити про гібридизацію даного зразка, або ж, навпаки, його надмірну генетичну стабільність порівняно з іншими еталонними зразками з вибірки.

4. 1 Zk. Відсутність смуг на 700 п.н. і 1100 п.н., а також наявність смуг довжиною у 600 п.н. і 850 п.н. є характерними рисами цього зразка, що відрізняє його від інших еталонів. Інші довжини смуг є типовими для еталонних зразків, що свідчить про загальну стабільність профілю цього зразка.

5. Moser 1. Цей зразок демонструє відсутність двох смуг на 700 п.н. і 1100 п.н., а також наявність смуги довжиною у 950 п.н., тож ці смуги можна вважати поліморфними, і у класифікації дослідних зразків орієнтуватися саме на них.

Аналізуючи отримані результати, можна стверджувати, що наявність смуг ампліфікатів довжиною 800 п.н. і 900 п.н. і відсутність смуги довжиною 1700 п.н. характерна лише для підвиду *A.m. macedonica*.

Для підвиду *A.m. caucasica* характерні смуги довжиною 750 п.н., 850 п.н. і 950 п.н.

Також варто зазначити, що *A.m. carnica* (альпійський екотип) і *A.m. carnica* (карпатський екотип) хоч і відносяться до одного підвиду, проте мають деякі відмінності. Зокрема, для зразка Lig 1 характерна наявність смуг довжиною 750 п.н. і 1100 п.н. у той час, як для зразка 1 Zk характерна наявність смуг довжиною 700 п.н. і 850 п.н., але відсутня смуга довжиною 1100 п.н.

Таблиця 3.2.2.1

Порівняння результатів ампліфікації у різних підвидів медоносних бджіл із застосуванням праймера Bee 1

Праймер	Підвиди <i>Apis mellifera</i>	Кількість смуг	Кількість поліморфних смуг
Bee 1 (TCC)5G T	<i>A.m. carnica</i> (альп.)	6	1
	<i>A.m. carnica</i> (карп.)	6	2
	<i>A.m. macedonica</i>	7	3
	<i>A.m. caucasica</i>	8	3

Отримані результати щодо дослідних зразків було розділено на групи за областями, з яких було отримано зразки, і проведено характеристику кожної дослідної групи, після чого результати електрофоретичного розділення було перенесено у зведену таблицю для кращого розуміння та наочності (див. додаток Б):

1. Mk. Зразки групи Mk характеризуються певною стабільністю, але з окремими варіаціями, що надають цій групі генетичну унікальність. Основною особливістю цих зразків є відсутність смуг на 600 п.н. та 900 п.н. Окрім того, відсутність смуги на 700 п.н. і 800 п.н. у зразка Mk 23 вказує на генетичну варіативність у межах цього зразка. Також, зразок Mk 24 демонструє стабільний генетичний профіль, у якому всі довжини зберігаються без значних змін. Наявність смуги на 850 п.н. є основною ознакою, яка відрізняє його від інших зразків цієї групи.

2. Pl. У зразках цієї групи відсутність смуг на 1100 п.н. і 850 п.н. є визначальною ознакою. У цілому ж, дана група зразків є досить варіабельною відносно інших. Окремо варто зазначити зразок Pl 3, який досить сильно відрізняється від усіх зразків даної групи, що може свідчити про його гібридизацію.

3. Lv. Ця група демонструє відсутність смуги на 850 п.н. (окрім зразка Lv14), що є типовим для представників цієї групи. Окрім того, зразки Lv 11, Lv 12 і Lv 14 характеризуються відсутністю смуг довжиною 600 п.н., 1100 п.н. і 950 п.н. відповідно. За цими ознаками їх можливо розрізнити між собою в даній вибірці.

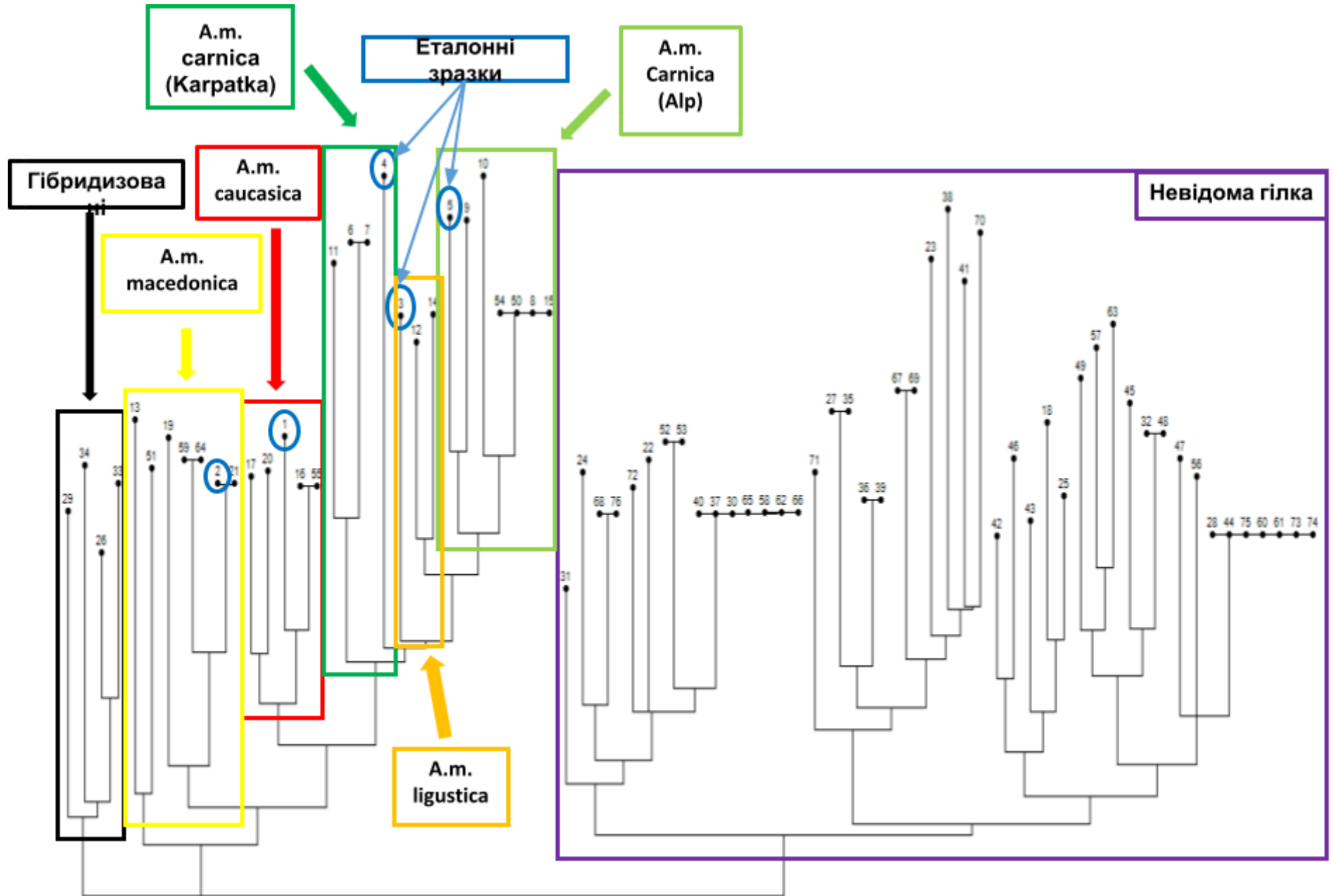
4. Vl. Зразки цієї групи мають відсутність смуг на 600 п.н. та 800 п.н. (за виключенням зразка Vl 7), як спільну ознаку. Також, спільною ознакою можна вважати смугу довжиною 950 п.н., оскільки вона є притаманною для кожного зразка даної вибірки.

5. If. Зразки цієї групи мають досить високу варіабельність між собою, проте спільною для них є наявність смуги довжиною 800 п.н. Також варто зазначити, що зразок If 4 має характерну від інших ознаку – відсутність смуги 850 п.н.

6. Kg. Для цієї групи характерною ознакою є відсутність смуги на 850 п.н. (окрім зразка 1 Kg), а також наявність смуг довжиною 800 п.н., 950 п.н. і 1100 п.н., які в даному випадку є поліморфними.

На основі отриманих результатів було побудовано філогенетичне дерево (рис. 3.2.2.4), згідно якого складалася узагальнююча таблиця (таб. 3.2.2.2). Обґрунтування дендрограми наведено нижче.

Рисунок 3.2.2.4. Філогенетичне дерево дослідних підвидів *Apis mellifera* за праймером Bee 1.



Згідно результатів, отриманих внаслідок побудови філогенетичного дерева видно, що частина дослідних зразків розділилися на кілька чітких груп, відповідно до еталонних зразків, окрім невеликої вибірки, яку виявилось складно ідентифікувати. Також, частина дослідних підвидів утворила окрему велику гілку, в яку не потрапив жоден еталонний зразок (дана тенденція спостерігатиметься і у подальших дендрограмах). Задля зручності сприйняття інформації, усі отримані результати було оформлено у вигляді узагальнюючих таблиць, з розподілом зразків у відповідні дендрограми групи.

Таблиця 3.2.2.2

Класифікація дослідних зразків за підвидовою приналежністю (Бee 1)

Підвид	Зразки
<i>A.m. carnica (Alp)</i>	Moser 1 , 11 Kv, 13 Kv, 14 Kv, 23 Mk, 21 Vl, 31 Vl;
<i>A.m. carnica (Karpatka)</i>	Zk 1 , 1 Kv, 9 Kv, 15 Kv;
<i>A.m. caucasica</i>	Cauc 11 , 24 Mk, 25 Mk, 5 Dn, 6 Khm;
<i>A.m. ligustica</i>	Lig 1 , 16 Kv, 34 Kv;
<i>A.m. macedonica</i>	Mcd 6 , 33 Kv, 3 Dn, 10 Dn, 22 Vl, 31 Khm, 59 Khm;
Гібридизовані зразки	43 Dn, 8 Chk, 4 Pl, 5 Pl;
Невідома гілка	14 Vl, 28 Vl, 30 Vl, 1 Dn, 16 Dn, 17 Dn, 18 Dn, 22 Dn, 1 Zp, 3 Zp, 4 Zp, 7 Zp, 8 Zp, 2 IF, 4 IF, 7 IF, 8 IF, 14 IF, 1 Kg, 2 Kg, 3 Kg, 4 Kg, 5 Kg, 1 Lv, 3 Lv, 11 Lv, 12 Lv, 14 Lv, 15 Lv, 3 Pl, 8 Pl, 12 Pl, 23 Khm, 24 Khm, 25 Khm, 39 Khm, 40 Khm, 54 Khm, 55 Khm, 81 Khm, 82 Khm, 3 Chk, 5 Chk, 9 Chk, 26 Chk.

3.2.2.1. Географічна мінливість *A. mellifera* на основі праймера Bce 1

Також варто дослідити варіативність підвидів бджоли медоносною залежно від регіону. Для цього було обрано зразки з кількох областей України, і проведено порівняльну характеристику їх електрофоретичних профілів.

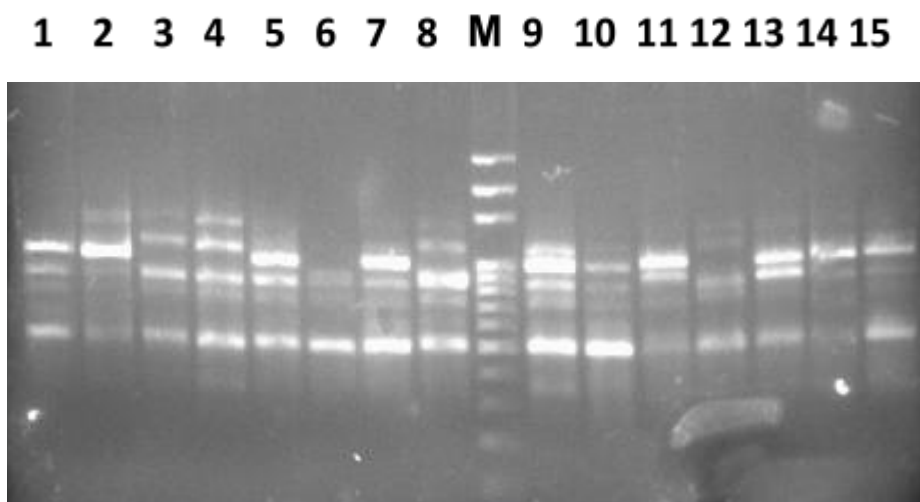


Рисунок 3.2.2.1.1. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Bee 1.

Зразки: 1 – 1 Dn, 2 – 3 Dn, 3 – 5 Dn, 4 – 10 Dn, 5 – 16 Dn, 6 – 17 Dn, 7 – 18 Dn, 8 – 22 Dn, М – Маркер, 9 – 43 Dn, 10 – 4 Pl, 11 – 24 Mk, 12 – 25 Mk, 13 – 6 Khm, 14 – 31 Khm, 15 – 59 Khm.

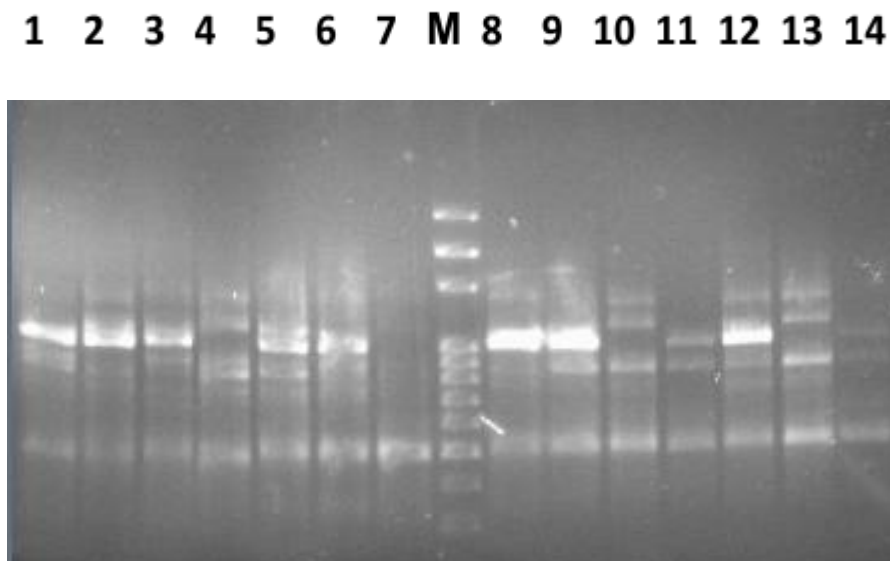


Рисунок 3.2.2.1.2. Приклади електрофоретичного розділення продуктів пробного ампліфікування з використанням праймера Bee 1.

Зразки: 1 – 3 Chk, 2 – 5 Chk, 3 – 8 Chk, 4 – 9 Chk, 5 – 26 Chk, 6 – 3 Pl, 7 – 5 Pl, М – Маркер, 8 – 8 Pl, 9 – 12 Pl, 10 – 1 Zp, 11 – 3 Zp, 12 – 4 Zp, 13 – 7 Zp, 14 – 8 Zp.

Отримані результати було описано, після чого оформлено у зведену таблицю із зазначенням відповідних дослідних груп (див. додаток В). Також, на основі отриманих даних було створено дендрограму (рис. 3.2.2.1.3) і перенесено отримані результати у зведену таблицю із зазначенням відповідних зразків (таб. 3.2.2.1.1):

1. Kv. Зразки цієї групи демонструють певну генетичну картину, яка включає відсутність смуг довжиною 700 п.н., 800 п.н., 850 п.н. і 900 п.н. в усіх представників, що може бути відрізняючою рисою. Окрім того, зразок Kv 13 характеризується відсутністю смуги 1100 п.н., що відрізняє його від усієї групи. Зразок Kv 14, у свою чергу, не має смуги 500 п.н., що є характерною рисою лише для даного зразка серед усіх груп.

2. Chk. Для усіх зразків характерна наявність смуги 1100 п.н., що є основною генетичною особливістю цієї групи. Щодо особливостей – у зразка Chk 3 відсутня смуга 700 п.н., у Chk 5 – 850 п.н., у Chk 8 – 850 п.н., а у зразка Chk 9 немає смуги довжиною 900 п.н. Це особливості, за якими можна розрізняти дані зразки між собою.

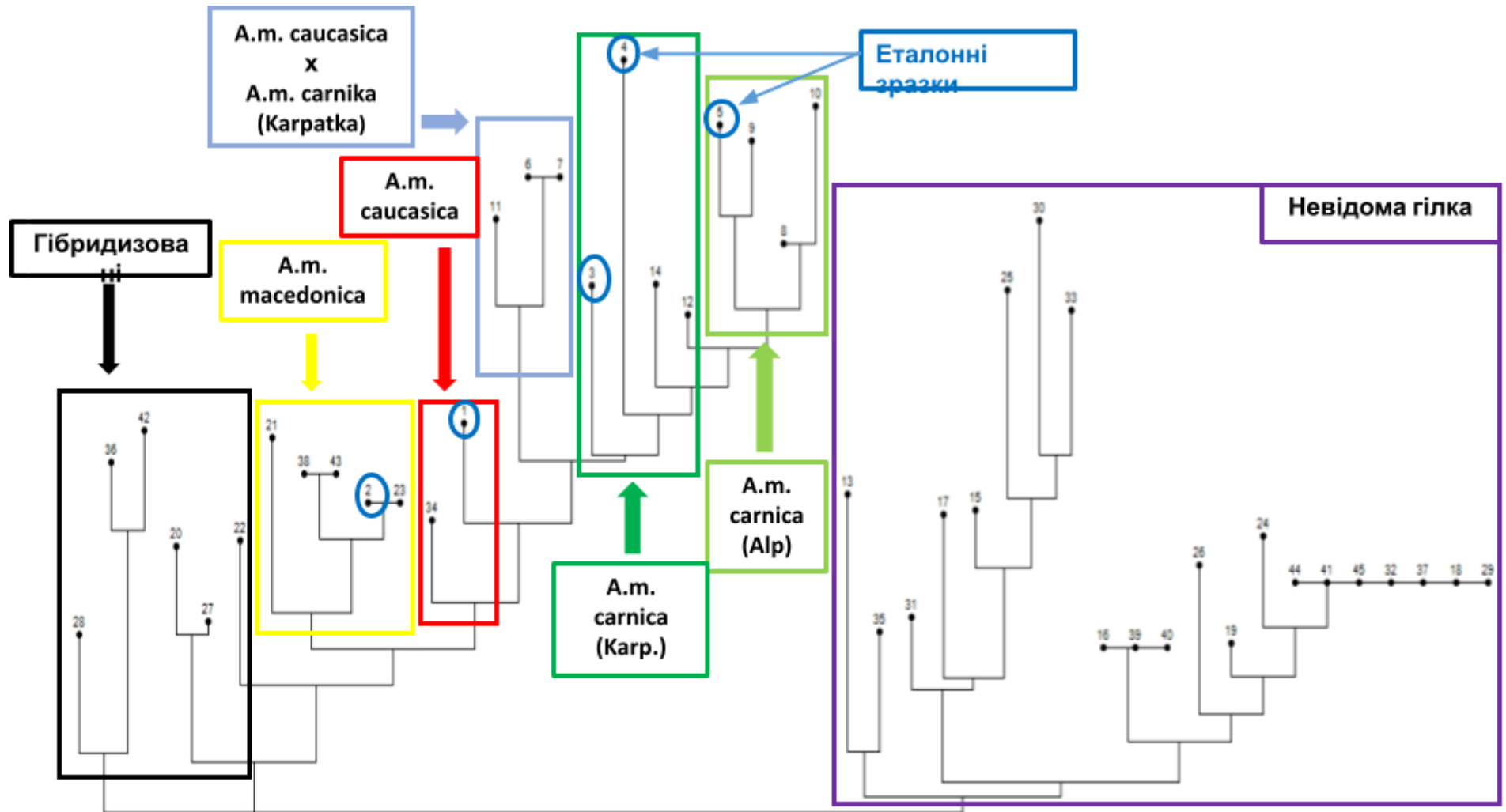
3. Dn. Генетичні профілі зразків цієї групи є дуже варіабельними, хоча всі вони мають наявність смуг 1100 п.н. (окрім зразка Dn 17) і 800 п.н. (окрім зразка Dn 43), як спільну характеристику. Також варто зазначити, що зразкам Dn 16 і Dn 43 притаманна смуга 850 п.н., а зразку Dn 5 – смуга 1700 п.н., які можна вважати поліморфними.

4. Zp. Дана дослідна група характеризується наявністю смуги 850 п.н., що є характерною ознакою для всіх її представників, тож не може вважатися поліморфною. Окрім того, для усіх зразків, окрім Zp 3, характерна смуга 800 п.н., що відрізняє цей зразок від інших. Також варто зазначити про відсутність смуг довжиною 1350 п.н., 1500 п.н. і 1700 п.н. у всіх зразків даної групи, що також є їхньою характерною рисою.

5. Khm. Відсутність смуг на довжині 600 п.н. і 700 п.н. є загальною ознакою цієї групи. Щоправда, виключенням слугають зразки Khm 55 і Khm 23, відповідно, у яких вищезазначені смуги все ж наявні. Окрім того, для таких зразків, як Khm 6, Khm 31 і

Khm 59 наявні смуги довжиною 1350 п.н., 1500 п.н. і 1700 п.н., що може бути характерною рисою конкретно цих зразків.

Рисунок 3.2.2.1.3. Філогенетичне дерево деяких дослідних підвидів *Apis mellifera* за праймером Bee 1 у відповідних областях (Kv, Chk, Dn, Zp, Khm).



Класифікація деяких дослідних зразків за підвидовою приналежністю (Bee 1)

Підвид	Зразки
<i>A.m. carnica (Alp)</i>	Moser 1 , 11 Kv, 13 Kv, 14 Kv;
<i>A.m. carnica (Karpatka)</i>	1 Zk, Lig 1 , 16 Kv, 34 Kv;
<i>A.m. caucasica</i>	Сauc 11 , 6 Khm;
<i>A.m. macedonica</i>	Med 6 , 3 Dn, 10 Dn, 31 Khm, 59 Khm;
<i>A.m. caucasica</i> x <i>A.m. carnica (Karpatka)</i>	1 Kv, 9 Kv, 15 Kv;
Гібридизовані зразки	1 Dn, 5 Dn, 22 Dn, 43 Dn, 24 Khm, 55 Khm;
Невідома гілка	33 Kv, 3 Chk, 5 Chk, 8 Chk, 9 Chk, 26 Chk, 16 Dn, 17 Dn, 18 Dn, 1 Zp, 3 Zp, 4 Zp, 7 Zp, 8 Zp, 23 Khm, 25 Khm, 39 Khm, 40 Khm, 54 Khm, 81 Khm, 82 Khm

3.2.3. Порівняння філогенії бджоли медоносної на основі**ПЛР-профілів за допомогою праймерів Bee 1 та Bee 4**

На рисунках 3.2.2.2, 3.2.2.3, 3.2.2.1.1, 3.2.2.1.2, 3.2.3.1, 3.2.3.2. показані електрофореграми з продуктами ампліфікації, де спостерігаються смуги різної довжини. Електрофоретичні профілі зразків, отриманих з праймерами Bee 1 та Bee 4, дуже різноманітні та інформативні, що підкреслює їх важливість для подальших досліджень ядерного геному бджіл.

Смуга (Рис. 3.2.3.1) довжиною 1500 п.н. є характерною для усіх зразків на даному електрофоретичному розділенні, тому її можна назвати неполіморфною.

Смуги (Рис. 3.2.3.2) довжиною 1100 та 500 п.н. є характерними для усіх зразків, тому їх можна назвати неполіморфними. Проте нами виявлені ампліфікати зі специфічними довжинами які властиві окремим підвидам або такі що з'являються у досліджуваних зразків і на сьогодні не описані.

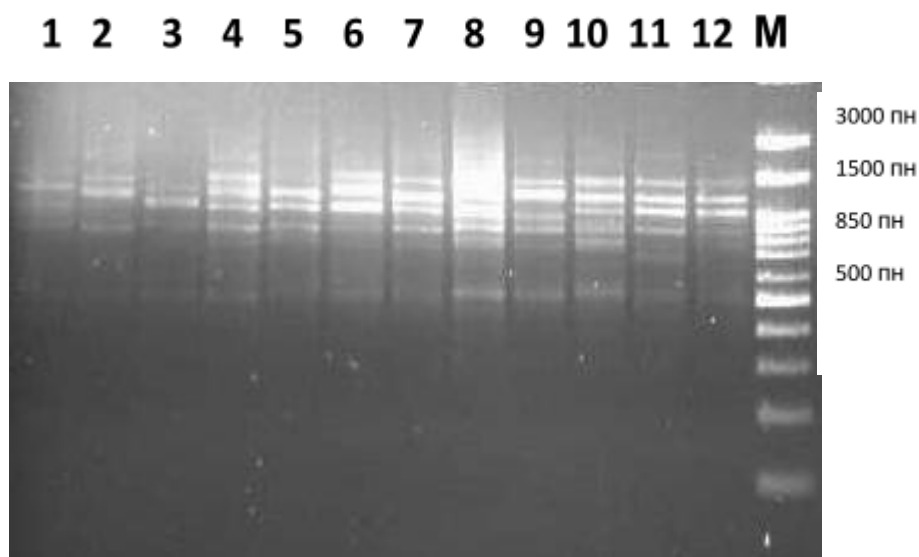


Рисунок 3.2.3.1. Поліморфізм продуктів ампліфікації, утворений за допомогою ISSR–праймера Bee 1.

Зразки: 1 – 4 Pl , 2 – Moser 1, 3 – 1 Kv, 4 – 11 Kv, 5 – 14 Kv, 6 – 15 Kv, 7 – 21 Vl, 8 – 22 Vl, 9 – 31 Vl, 10 – 6 Khm, 11 – 31 Khm, 12 – 59 Khm, M – маркер.

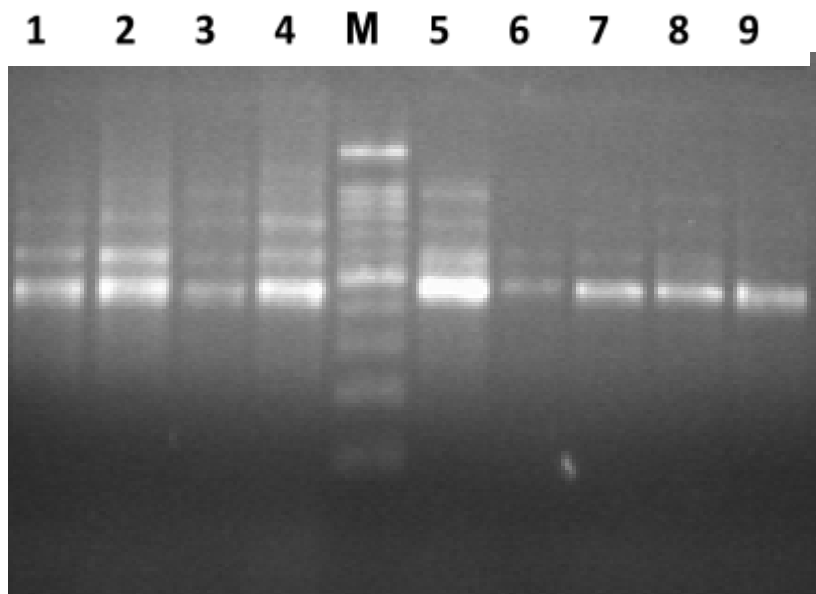
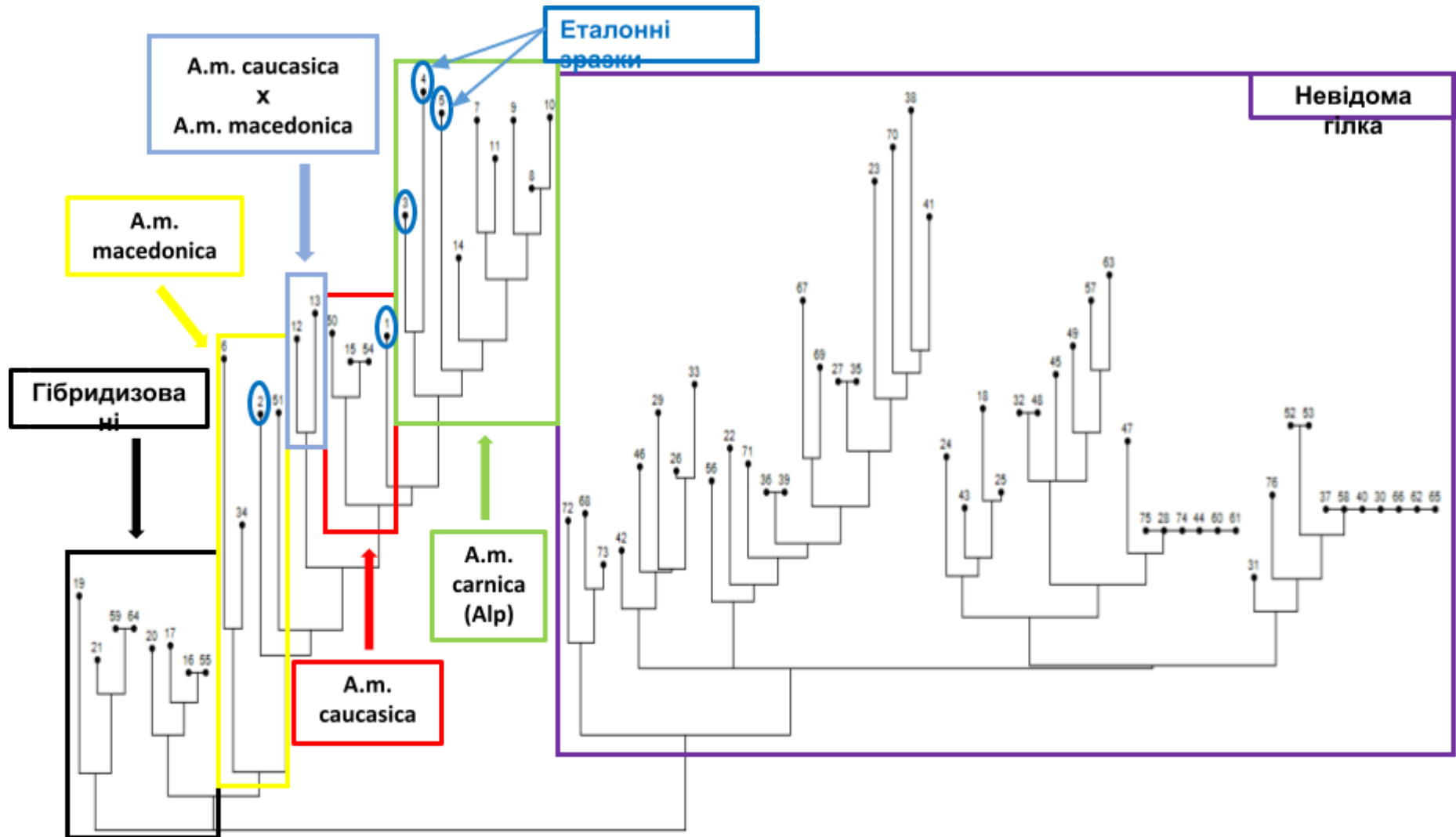


Рисунок 3.2.3.2. Поліморфізм продуктів ампліфікації, утворений за допомогою ISSR–праймера Bee 4.

Зразки: 1 – 9 Kv, 2 – 11 Kv, 3 – 13 Kv, 4 – 14 Kv, M – маркер,

5 – 15 Kv, 6 – 16 Kv, 7 – 33 Kv, 8– 34 Kv, 9 – 21 Vl.

Рисунок 3.2.3.3. Філогенетичне дерево дослідних підвидів *Apis mellifera* за праймерами Bee 1 та Bee 4.



У більшості випадків серед досліджуваних бджіл спостерігаються гібридні форми (таб.3.2.3.1). При порівнянні із аналізом за мтДНК маркерами спостерігається часткова відповідність до них. Така ситуація може пояснюватись подіями гібридизації у минулому. Так наприклад, у XX столітті окупаційною владою було завезено на територію України значну кількість бджіл з Кавказу (*A.m. caucasica*), що, внаслідок безконтрольної гібридизації, негативно вплинуло на розвиток та життєздатність багатьох колоній через відмінності клімату України та кавказьких гір. Свідченням цього є зразки 16 Kv, 33 Kv, 31 Vl, а також гілка невизначених та гібридизованих зразків (Таб. 3.2.3.1).

Таблиця 3.2.3.1

Класифікація дослідних зразків за підвидовою приналежністю (Всє 1 та Всє 4)

Підвид	Зразки
<i>A.m. carnica</i> (Alp)	Lig 1, 1 Zk, Moser 1, 9 Kv, 11 Kv, 13 Kv, 14 Kv, 15 Kv, 34 Kv;
<i>A.m. caucasica</i>	Cauc 11, 23 Mk, 21 Vl, 31 Vl;
<i>A.m. macedonica</i>	Mcd 6, 1 Kv, 5 Pl, 22 Vl;
<i>A.m. caucasica</i> x <i>A.m. macedonica</i>	16 Kv, 33 Kv;
Гібридизовані зразки	24 Mk, 25 Mk, 3 Dn, 5 Dn, 10 Dn, 6 Khm, 31 Khm, 59 Khm;
Невідома гілка	14 Vl, 28 Vl, 30 Vl, 1 Dn, 16 Dn, 17 Dn, 18 Dn, 22 Dn, 43 Dn, 1 Zp, 3 Zp, 4 Zp, 7 Zp, 8 Zp, 2 IF, 4 IF, 7 IF, 8 IF, 14 IF, 1 Kg, 2 Kg, 3 Kg, 4 Kg, 5 Kg, 1 Lv, 3 Lv, 11 Lv, 12 Lv, 14 Lv, 15 Lv, 3 Pl, 4 Pl, 8 Pl, 12 Pl, 23 Khm, 24 Khm, 25 Khm, 39 Khm, 40 Khm, 54 Khm, 55 Khm, 81 Khm, 82 Khm, 3 Chk, 5 Chk, 8 Chk, 9 Chk, 26 Chk.

Крім того, результати електрофорезу порівнювали з попередніми результатами аналізу мітохондріальної ДНК (мтДНК), зокрема гена цитохромоксидази (CO) (Череватов & Рошка, 2020; Cherevatov, Melnik, & Volkov, 2020; Cherevatov, Panchuk,

Kerek, & Volkov, 2019). Це дозволило отримати додаткову інформацію про генетичну різноманітність та спорідненість між досліджуваними зразками.

Порівняння виявило чіткі відмінності в ампліфікаційних наборах (кількості та довжині смуг) між еталонними зразками. Це свідчить про наявність генетичної мінливості та можливості ідентифікації їх у популяції бджіл. Зокрема, бджоли, проаналізовані на пасіках, показали різний ступінь гібридизації між згаданими підвидами. Це вказує на потенціал неконтрольованої гібридизації, яка може загрожувати виживаності та призвести до занепаду колоній з наступним виродженням тих чи інших підвидів бджіл.

Порівняння отриманих в ході дослідження результатів з аналізом за мтДНК маркерами показує, що за ядерною ДНК бджоли 9 Kv, 11 Kv, 13 Kv, 14 Kv, 15 Kv, 34 Kv, 23 Mk, 21 Vl і 31 Vl належать до підвиду *A.m. carnica*, що може пояснюватись активною інтродукцією цього підвиду до сьогодні і на рівнинній території України. Бджоли 24 Mk, 25 Mk, 5 Dn, 6 Khm належать до підвиду *A.m. caucasica*, що взагалі пов'язано із нещодавнім активним епізодичним завезенням цього підвиду на територію України. Зразки 1 Kv, 5 Pl, 22 Vl, 33 Kv, 3 Dn, 10 Dn, 31 Khm і 59 Khm належать до підвиду *A.m. macedonica*. Окрім того, зразки 16 Kv і 34 Kv належать до підвиду *A.m. ligustica*, що може бути зумовлене власною ініціативою бджолярів щодо навмисної гібридизації бджіл у комерційних цілях.

Присутність на одній відносно обмеженій території різних підвидів медоносних бджіл раніше чи пізніше спонукає до виникнення подій гібридизації між цими підвидами. Тому деякі зразки були значно гібридизовані, наприклад 3 Dn, 43 Dn, 8 Chk, 4 Pl, що склало певну проблему при визначенні їх генетичної підвидової приналежності.

ВИСНОВКИ

1. Серед усіх досліджуваних праймерів (Bee 1, Bee 2, Bee 3, Bee 4) найкращі результати показав праймер Bee 1. Профілі ISSR, згенеровані за допомогою праймера Bee 1, виявили часткову відповідність уявленням про філогенез досліджуваних популяцій медоносних бджіл. Зокрема, цей метод надав змогу виявити відмінності, що дозволяють зрозуміти еволюційні зв'язки між різними популяціями.

2. Профілювання медоносних бджіл з пасік України за допомогою праймера Bee 4 продемонструвало відсутність чіткої відповідності жодному з еталонних зразків і вказало на значну гібридизацію цих популяцій.

3. Результати показали, що багато популяцій бджіл, досліджених у рамках цього дослідження, мають складний генетичний профіль, який поєднує ознаки кількох різних ліній та підвидів.

4. Деякі зразки суттєво відрізняються від еталонів, що ускладнює їх підвидову класифікацію та потребує подальших досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гайдар, В. А., & Поліщук, В. П. (1993). *Пасіка*. Київ.
2. Закон України «Про бджільництво»: від 22 лютого 2000 р. № 1492-III. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1492-14>
3. Череватов, О., & Рошка, Н. (2020). Поліморфізм ділянки СОІІ медоносних бджіл західних регіонів України. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(2), 174–179. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.174>
4. Abdalla, M. F., Saleh, H. A., & Khater, M. A. (2020). Detection of genetic variations in *orobanche crenata* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00390-0>
5. Abdulla, B. S., Rashed, R. J., Hamasalih, R. M., Ahmed, S. H., & Majid, A. O. (2023). Molecular diversity and phylogenetic analysis of some Iraqi Honey bee population inferred from mitochondrial DNA gene segments (COI and 16S rDNA). *Applied Ecology & Environmental Research*, 21(1), 229–242. https://aloki.hu/pdf/2101_229242.pdf
6. Adeleke, M. T., Adekunle, O. N., Owagboriaye, F. O., Odeseye, A. O., Oyedele, K. S., Adebawale, A. A.,... & Lawal, O. A. (2020). Genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera adansonii*) In Ijebu Environs Revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *African Journal of Science and Nature*, 10, 77–87. <https://doi.org/10.46881/ajsn.v10i0.180>
7. Ahmed, D. S., & Ayoub, Z. N. (2023). Molecular identification with morphometric and anatomic characterization of Honey Bee (*Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica* and *Apis mellifera meda*) in northern Iraq. *Ann. For. Res*, 66(1), 2895–2908.
8. Al–Ameri, D. T., & Alhasan, A. S. (2020). Study of the genetic diversity of Iraqi honeybee (*Apis mellifera L.*) populations utilizing the mt–DNA COI region. *Int. J. Agricult. Stat. Sci*, 16, 1775–1778.
9. 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. <https://doi.org/10.51458/BSTD.2021.8>

10. Arvas, Y. E., Marakli, S., Kaya, Y., & Kalendar, R. (2023). The power of retrotransposons in high-throughput genotyping and sequencing. *Frontiers in plant science*, 14. 1–14. doi:10.3389/fpls.2023.1174339.
11. Ballard, D., Winkler–Galicki, J., & Wesolý, J. (2020). Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. *International Journal of Legal Medicine*, 134(4), 1291–1303. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02294-0>
12. Borborah, K., Saikia, D., Rehman, M., Islam, M. A., Mahanta, S., Chutia, J.,... & Tanti, B. (2020). Comparative analysis of genetic diversity in some non-commercial cultivars of Musa L. from Assam, India, using morphometric and ISSR markers. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup2), 1814–1828. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1772178>
13. Ceksteryte, V., Paplauskiene, V., Tamasauskiene, D., Pasakinskiene, I., & Mazeikiene, I. (2012). Genetic characterization of Lithuanian honeybee lines based on ISSR polymorphism. Institute of Agriculture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. Faculty of Natural Sciences, Vilnius University. Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. DOI: 10.1007/s13592-012-0140-2.
14. Cherevatov, O. V., Melnik, E. O., & Volkov, R. A. (2020). Поліморфізм гена COI у медоносних бджіл з різних регіонів України. *Visnik ukrains' kogo tovaristva genetikov i selekcioneriv*, 18(1–2), 22–28. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.18.1-2.1351>
15. Cherevatov, O. V., Panchuk, I. I., Kerek, S. S., & Volkov, R. A. (2019). Molecular diversity of the CoI–CoII spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the carpathian bee. *Cytology and Genetics*, 53, 276–281.
16. Costa, R. B., de Moraes, P. M., Skowronski, L., de Oliveira, C. E., Nogueira, M. L., dos Santos Yui, R. M.,... & Fava, W. S. (2020). Genetic diversity and population structure of Croton urucurana Baill.(Euphorbiaceae) in Central Brazil by ISSR markers. *Brazilian Journal of Botany*, 43(4), 831–838. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00657-w>
17. Dumache, R., Puiu, M., Parvanescu, R., Rogobete, A. F., & Enache, A. (2019). Advantages of Chromosome X–STRs Markers in Solving a Father–Daughter Paternity Case

with one Mismatch on SE33 Locus. *Clinical laboratory*, 65(9), 1661–1667. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.190207.

18. Endris, M., & Abate, M. (2023). Molecular Characterization of Livestock Breeds in Ethiopia: A Review. *Global Journal of Animal Scientific Research*, 11(1), 146–167. <http://www.gjasr.com/index.php/GJASR/article/view/157>

19. Gaber, A., Hassan, M. M., Boland, C., Alsuhaibany, A., Babbington, J., Pereira, J.,... & Shobrak, M. (2020). Molecular identification of *Todiramphus chloris* subspecies on the Arabian Peninsula using three mitochondrial barcoding genes and ISSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.014>

20. Honrado, M., Lopes, A. R., Pinto, M. A., & Amaral, J. S. (2022). A novel real-time PCR coupled with high resolution melting analysis as a simple and fast tool for the entomological authentication of honey by targeting *Apis mellifera* mitochondrial DNA. *Food Research International*, 161, 17–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111761>

21. Ismail, M. Y., Leonard, T., Tarimo, J. F., & Kayombo, C. J. (2021). Beekeeping Potential, Richness, and Distribution of Plant Species Foraged by Stinging Honey Bee (*Apis mellifera* L.) in West Kilimanjaro Tanzania Forest Service Agency (TFS) Plantation. *International Journal of Advanced Research*, 3(1), 33–54. <https://doi.org/10.37284/ijar.3.1.301>

22. Jian, H., Wang, L., Lv, M., Tan, Y., Zhang, R., Qu, S.,... & Liang, W. (2021). A novel SNP–STR system based on a capillary electrophoresis platform. *Frontiers in Genetics*, 12, 636–821. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.636821>

23. Khoshraftar, M., Nazemi–Rafie, J., & Ghobari, H. (2021). Evaluation of the efficacy of mitochondrial ATP 6 and 8, Cyt b and 16S rDNA genes for differentiation of Iranian honeybees (*Apis mellifera meda*) from commercial subspecies of *Apis mellifera* L. and comparison with geometric morphometric method. *Journal of Asia–Pacific Entomology*, 24(1), 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.11.003>

24. Kumar, M., Acharya, A. P., Kumar, S., Thakuria, J., Basumatary, G., & Chaturvedi, C. S. (2019). A review on microsatellite markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Journal of Experimental Zoology India*, 22(2).
25. Lee, J. (2019). Development and evolution of molecular markers and genetic maps in *Capsicum* species. *The Capsicum Genome*, 85–103. DOI: 10.1007/978-3-319-97217-6_5
26. Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam, K. N., & Latif, M. A. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22499–22528. <https://doi.org/10.3390/ijms141122499>
27. Modaber, M., Nazemi Rafie, J., & Rajabi–Maham, H. (2019). Population genetic structure of native Iranian population of *Apis mellifera meda* based on intergenic region and COX2 gene of mtDNA. *Insectes Sociaux*, 66, 413–424. <https://doi.org/10.1007/s00040-019-00701-3>
28. Mondini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19–35. doi.org/10.3390/d1010019
29. Morammazi, S., & Mirhosseini, M. A. (2021). Expression of hSP90 gene and its relationship with ambient temperature and foraging rate in *Apis mellifera meda*. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(4), 181–204.
30. Nonlinear Dynamics Ltd (2008). 1D Analysis Tutorial.
31. Paplauskienė, V., Čeksterytė, V., Pašakinskienė, I., Tamašauskienė, D., & Račys, J. (2006). The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. *Biologija*, 3, 16–20.
32. Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F. (2003). Data analysis methods. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. *Montpellier*. 43 – 76.
33. Rahimi, A., Kahrizi, D., Mirmoayedi, A., Zarei, L., & Jamali, S. (2023). Genetic Characterizations of the Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda* Skorikov 1929) Populations

Using the Microsatellite DNA Markers. *Biochemical Genetics*, 1–25.
<https://doi.org/10.1007/s10528-023-10368-y>

34. Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zaraei, L., & Jamali, S. (2019). Phylogenetic relationship study of Iranian subspecies honeybee with other honeybee subspecies using morphological and molecular markers. *Animal Sciences Journal*, 32(123), 323–334.

35. Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zarei, L., & Jamali, S. (2022). Molecular genetic diversity and population structure of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) populations: implications for breeding and conservation. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129(6), 1331–1342. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00657-w>

36. Salehi, S., & Nazemi–Rafie, J. (2020). Discrimination of Iranian honeybee populations (*Apis mellifera meda*) from commercial subspecies of *Apis mellifera* L. using morphometric and genetic methods. *Journal of Asia–Pacific Entomology*, 23(2), 591–598.
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.04.009>

37. Solatani, H., Nazemi–Rafie, J., & Harighi, B. (2021). Differentiation of Iranian Honeybees (*Apis mellifera meda*) from Commercial Honeybee Subspecies using ND1 and ND5 Genes. *Research on Animal Production*, 12(31), 157–168.

38. Swetha, V. A., & Sran, R. S. (2022). A review on relishing the difference between SSR markers & RAPD markers in bread wheat (*Triticum aestivum* sp.). *The Pharma Innovation Journal*, 11(5): 481–483

39. Undal, V. S., & Ahir, M. R. (2023). The Methods of Molecular Markers In Genome Analysis: A Brief Biotechnological Approach. *Weser Books*, 149 –173.

40. Valizadeh, P., Guzman–Novoa, E., & Goodwin, P. H. (2022). High genetic variability of *Nosema ceranae* populations in *Apis mellifera* from East Asia compared to central Asia and the Americas. *Biological Invasions*, 24(10), 3133–3145.
<https://doi.org/10.1007/s10530-022-02835-1>

41. Veisi, H., Nazemi–Rafie, J., Azizi, A., & Rajabi–Maham, H. (2020). Genetic characteristics of the Iranian honey bee, *Apis mellifera meda*, based on mitochondrial genes

of ND4, ND4L and ND6 and their internal transcribed spacers. *Insectes Sociaux*, 67, 439–448. <https://doi.org/10.1007/s00040-020-00769-2>

42. Vidotti, M. S., Lyra, D. H., Morosini, J. S., Granato, Í. S. C., Quecine, M. C., Azevedo, J. L. D., & Fritsche-Neto, R. (2019). Additive and heterozygous (dis) advantage GWAS models reveal candidate genes involved in the genotypic variation of maize hybrids to *Azospirillum brasilense*. *PloS one*, 14(9), 1–21.

43. Zheng, X., Cheng, T., Yang, L., Xu, J., Tang, J., Xie, K.,... & Hu, Z. (2019). Genetic diversity and DNA fingerprints of three important aquatic vegetables by EST-SSR markers. *Scientific reports*, 9(1), 14074. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50569-3>

ДОДАТОК А

Правила охорони праці

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 витяжну 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:

1. Необхідно використовувати захисний одяг (лабораторний бавовняний халат, при необхідності гумові рукавички та окуляри; при роботі з дрібно дисперсними речовинами потрібно носити респіраторні маски);

2. Двері під час роботи мають бути зачинені;

3. При роботі з вибуховими та легко займистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи і пилу;

4. При роботі з летючими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри забороняється:

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;

- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- викидати в раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальниками 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 слід мити руки.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи:

1. Робота з шкідливими 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 повинні бути списки небезпечних речовин.

Вимоги безпеки після закінчення роботи.

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру;

– виходячи останнім, зачинити вікна (квартирки), вимкнути світло, газ, перевірити чи вимкненні всі електроприлади та закриті крани, зачинити приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журналі.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

До аварійних ситуацій відносяться:

- розгерметизація технологічних трубопроводів, тари та обладнання з викидом продукту, його пари та пилу у виробниче та зовнішнє середовище;
- загоряння технологічних трубопроводів, обладнання, продукту;
- відключення електропостачання, яке живить засоби колективного захисту, обривання і коротке замикання електрокомунікацій, електрообладнання.

У разі розливу легкозаймистих та горючих рідин необхідно погасити газові пальники, вимкнути електроживлення загальним рубильником, розлитий продукт засипати піском, пісок зібрати і усунути у безпечне місце.

У випадку займання легкозаймистих та горючих рідин необхідно:

- негайно приступити до її гасіння, застосовуючи відповідні для даного випадку засоби гасіння (пісок, порошкові та інші вогнегасники);
- негайно вимкнути вентиляцію, пальники і нагрівальні прилади;
- винести з приміщення посудини з вогнєнебезпечними речовинами.

При виникненні іскріння (спалахування) струмоведучих частин електрообладнання, лаборант зобов'язаний його негайно знеструмити, повідомити про це електрику, завідувачому лабораторією.

У разі виявлення пожежі (ознак горіння) необхідно:

- припинити роботу; – знеструмити електрообладнання;
- негайно повідомити про це телефоном пожежну охорону. При цьому необхідно назвати адресу об'єкта, вказати кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку на пожежі, наявність людей, а також повідомити своє прізвище;
- вжити (за можливістю) заходів до евакуації людей, гасіння (локалізації) пожежі та збереження матеріальних цінностей;

- повідомити про пожежу наукового керівника або працівників кафедри;
- у разі необхідності викликати інші аварійно–рятувальні служби (медичну, газорятувальну тощо);
- у випадку оголошення евакуації швидко й організовано покинути приміщення лабораторії та навчального корпусу.

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.

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

При **опіках 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 лікувальний заклад.

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 продезинфікувати 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.

ДОДАТОК Б

Порівняння ISSR профілів *Apis mellifera* різних областей за Вее 1

	1700	1500	1350	1100	950	900	850	800	700	600	500	CO
CAUC 11	+	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	
MCD 6	–	+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	
Lig 1	+	+	+	+	–	–	–	–	+	–	+	
1 Zk	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+	+	
Moser 1	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+	
1 Kv	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
9 Kv	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
11 Kv	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	CAUC
13 Kv	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+	MCD
14 Kv	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	CAUC
15 Kv	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	MCD
16 Kv	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	MCD
33 Kv	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	+	MCD (morphometr)
34 Kv	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	MCD (morphometr)
23 Mk	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	CAUC
24 Mk	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	Mellifera
25 Mk	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	+	CAUC
1 Dn	–	+	–	+	–	+	–	+	+	+	+	MCD (morphometr)
3 Dn	–	–	+	+	–	+	–	+	–	–	+	MCD
5 Dn	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	+	CRN (MCD morph)
10 Dn	–	+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	CRN (MCD morph)
16 Dn	–	–	–	+	+	–	+	+	–	–	+	CAUC
17 Dn	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
18 Dn	–	–	–	+	+	–	–	+	+	+	+	CRN 2 (Karpatka)
22 Dn	–	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	MCD (morphometr)
43 Dn	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	MCD (morphometr)
3 Chk	–	–	–	+	–	+	+	+	–	–	+	MCD

	1700	1500	1350	1100	950	900	850	800	700	600	500	CO
5 Chk	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	MCD
8 Chk	–	–	–	+	–	+	+	–	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
9 Chk	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD
26 Chk	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	MCD
3 Pl	–	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	CAUC
4 Pl	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	+	CAUC
5 Pl	–	–	+	+	–	–	+	–	+	–	+	CAUC
8 Pl	–	–	–	+	–	+	+	+	–	–	+	MCD
12 Pl	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	MCD
1 Zp	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
3 Zp	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
4 Zp	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	MCD
7 Zp	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	CAUC
8 Zp	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+	+	CRN 2 (Karpatka)
1 Lv	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	CRN 1 (Alp)
3 Lv	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+	CRN 2 (Karpatka)
11 Lv	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
12 Lv	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	CRN 2 (Karpatka)
14 Lv	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	CAUC
15 Lv	–	–	–	+	–	+	–	+	+	–	+	MCD
7 VI	–	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
14 VI	–	–	–	–	+	+	+	–	+	–	+	CAUC
21 VI	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	CAUC
22 VI	–	+	–	+	+	+	–	–	–	–	+	CRN 1 (Alp)
28 VI	–	–	–	+	+	–	+	–	+	–	+	???
30 VI	–	–	–	+	+	–	+	–	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
31 VI	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
6 Khm	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	CAUC
23 Khm	–	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	MCD

	1700	1500	1350	1100	950	900	850	800	700	600	500	CO
24 Khm	–	–	–	–	+	+	–	–	+	–	+	MCD
25 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	CAUC
31 Khm	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	CAUC
39 Khm	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	MCD
40 Khm	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	MCD
54 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD
55 Khm	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	+	???
59 Khm	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	MCD
81 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD
82 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD
2 IF	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
4 IF	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
7 IF	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+	MCD
8 IF	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	+	MCD
14 IF	–	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	???
1 Kg	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	CRN 2 (Karpatka)
2 Kg	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
3 Kg	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
4 Kg	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
5 Kg	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	MCD

Додаток В

**Порівняння ISSR профілів деяких дослідних підвидів *Apis mellifera* за праймером
Всє 1 у відповідних областях (Kv, Chk, Dn, Zp, Khm)**

	1700	1500	1350	1100	950	900	850	800	700	600	500	CO
CAUC 11	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	
MCD 6	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	
Lig 1	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—	+	
1 Zk	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	
Moser 1	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	
1 Kv	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	CRN 2 (Karpatka)
9 Kv	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	CRN 2 (Karpatka)
11 Kv	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	CAUC
13 Kv	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	MCD
14 Kv	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	CAUC
15 Kv	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	MCD
16 Kv	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	MCD
33 Kv	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	MCD (morphometr)
34 Kv	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	MCD (morphometr)
3 Chk	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—	+	MCD
5 Chk	—	—	—	+	+	+	—	+	+	—	+	MCD
8 Chk	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—	+	CRN 2 (Karpatka)
9 Chk	—	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+	MCD
26 Chk	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	MCD
1 Dn	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+	+	MCD (morphometr)
3 Dn	—	—	+	+	—	+	—	+	—	—	+	MCD
5 Dn	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	CRN (MCD morph)
10 Dn	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	CRN (MCD morph)
16 Dn	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	+	CAUC
17 Dn	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	+	CRN 2 (Karpatka)
18 Dn	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	CRN 2 (Karpatka)

	1700	1500	1350	1100	950	900	850	800	700	600	500	CO
22 Dn	–	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	MCD (morphometr)
43 Dn	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	MCD (morphometr)
1 Zp	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	CRN 2 (Karpatka)
3 Zp	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	CRN 2 (Karpatka)
4 Zp	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	MCD
7 Zp	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	CAUC
8 Zp	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+	+	CRN 2 (Karpatka)
6 Khm	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	CAUC
23 Khm	–	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	MCD
24 Khm	–	–	–	–	+	+	–	–	+	–	+	MCD
25 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	CAUC
31 Khm	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	CAUC
39 Khm	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	MCD
40 Khm	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	MCD
54 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD
55 Khm	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	+	???
59 Khm	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	MCD
81 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD
82 Khm	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+	MCD