

ПОЛІМОРФІЗМ ДІЛЯНКИ *COII* МЕДОНОСНИХ БДЖІЛ ЗАХІДНИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

О. В. ЧЕРЕВАТОВ, Н. М. РОШКА

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012,
e-mail: o.cherevatov@chnu.edu.ua

Внаслідок активного втручання людини у природні генетично-популяційні процеси, виживаність та ареали розповсюдження медоносних бджіл зазнали негативного впливу. Збереження генофонду добре адаптованих до локальних природних умов місцевих бджіл *Apis mellifera* є актуальною проблемою, яка не може бути вирішена без використання молекулярних методів для моніторингу генетичного складу місцевих популяцій. Такого роду дослідження потребують використання найсучасніших підходів, які базуються на застосуванні молекулярних маркерів. У молекулярній таксономії комах для ідентифікації близькосторіднених форм широко використовуються мітохондріальні гени цитохром оксидази. Особливість мтДНК полягає в тому, що вона успадковується лише по материнській лінії, а присутні у її складі молекулярні маркери не роз'єднуються внаслідок рекомбінації. Ген *CoII*, який кодує другу субодиницю цитохром оксидази, широко використовується для визначення підвидової належності бджоли медоносної. Тому, для оцінки розповсюдження в Україні різних підвидів/порід *Apis mellifera* було проведено розшифрування (сиквенування) та порівняння 5'-ділянки гена *CoII* для бджіл з різних географічних регіонів. Виявлено мутації гену *CoII*, які дозволяють розрізняти поширені в Україні породи бджоли медоносної – Карпатської та Української степової. Встановлено, що розповсюдження згаданих порід не завжди відповідає офіційному районуванню. Розповсюджена в Україні практика перевезення генетичного матеріалу *Apis mellifera* з різних регіонів призводить до неконтрольованої гібридизації та становить загрозу для збереження аборигенних порід медоносної бджоли.

Ключові слова: біорізноманіття, молекулярна еволюція та філогенія, мітохондріальна ДНК, цитохром оксидаза, *Apis mellifera*

Вступ. Медоносна бджола (*Apis mellifera* L.) належить до відносно поліморфних видів з великою кількістю підвидів, поширених в Європі, Азії та Африці. Коректна ідентифікація цих підвидів має важливе значення для стабільного бджільництва і збереження біорізноманіття медоносної бджоли, оскільки штучне переміщення підвидів/порід між різними регіонами веде до втрати чистоти аборигенного генофонду в результаті гібридизації (Carreck, Neumann, 2010). Внаслідок активного втручання людини у природні генетично-популяційні процеси, виживаність та ареали розповсюдження медоносних бджіл зазнали негативного впливу (Van der Zee et al., 2009; Brodschneider 2016; Федоряк та ін., 2018). Морфометричні дослідження українських бджіл показали, що сьогодні на території Західної України внаслідок неконтрольованої гібридизації зони розповсюдження чистопородних бджіл майже відсутні (Череватов та ін., 2014; Череватов та ін., 2016). Морфологічні ознаки у гібридизованих колоній сильно варіюють, що суттєво знижує достовірність і навіть унеможливує визначення породної приналежності з використанням традиційного морфометричного аналізу. Тому для компенсації такого впливу актуальним в наш час є збереження та відтворення місцевих генетичних

ліній бджіл. З'ясування генетичного складу місцевих популяцій *A. mellifera* не може бути вирішено із використанням лише морфометричних методів та потребує залучення найсучасніших підходів (Meixner et al., 2013; Achou et al., 2015; Pentek-Zakar et al., 2015; Метлицька 2010). Особливо важливим видається застосування таких методів для ідентифікації генетичного матеріалу найпоширеніших в Україні Карпатської та Української степової порід (Ruttner, 1988a; Метлицька та ін., 2010; Метлицька та ін., 2015; Григорків, 2017; Cherevatov et al., 2019; Григорчук та ін., 2020).

Такого роду дослідження потребують використання молекулярних маркерів, які базуються на порівнянні особливостей структури ДНК. У молекулярній систематиці та філогенії перетинчастокрилих широко застосовується мітохондріальна ДНК (мтДНК). Тому, ключову роль у дослідженні філогенезу бджіл відіграють мітохондріальні гени які відображають походження материнської лінії впродовж поколінь, даючи можливість визначення походження підвидів (Garnery et al., 1992; Rortais et al., 2011). Вирішення згаданої проблеми за допомогою методів розшифрування ділянок мітохондріального геному є новим і раніше в Україні не застосовувалося. Тому метою роботи було сикве-

нувати цільові ділянки геному для «еталонних» зразків підвидів *A. mellifera*, походження яких добре відомо та порівняти їх із зразками отриманими із кількох областей України.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження були робочі бджоли підвиду *A. m. carnica* карпатського еко типу та австрійського еко типу, які було отримано з колекцій ННЦ «Інституту бджільництва ім. П.І. Прокоповича» та громадської організації «Об'єднання матководів України» (ГО

ОМУ). Зразки підвиду *A. m. macedonica* був отриманий з напівізольованої автохтонної пасіки у Греції (г. Афон). Крім того, було вільно відловлено або взято бджіл із пасік Чернівецької (Selyatin, Ust-Putyla), Львівської (Peremyslyany) та Хмельницької (Khmelnyskyi, Yarmolyntsi) областей України (табл. 1). Комах консервували в 90 % етанолі і використовували для виділення сумарної ДНК (Rogers, Bendich, 1985; Rowley et al., 2007; Панчук, Волков, 2007).

Таблиця 1.

Походження досліджених зразків *Apis mellifera*

Table 1.

The origin of the studied samples of *Apis mellifera*

№	Назва зразка	Походження зразка
1.	Selyatin	с. Селятин, Чернівецька обл., Україна
2.	Ust-Putyla	с. Усть-Путило, Чернівецька обл., Україна
3.	Peremyslyany	м. Перемишляни, Львівська обл., Україна
4.	Khmelnyskyi	м. Хмельницький, Україна
5.	Yarmolyntsi	сmt., Ярмолинці, Хмельницька обл., Україна
6.	Troiseck 1075	АСА, Австрія
7.	Vuchkivska	с. Вучкове, Закарпатська обл., Україна
8.	Greece	автохтонна пасіка, г. Афон, Греція
9.	Mellifera-GB	Реєстраційний номер у базі даних GenBank KJ396183

Примітка. АСА – Austrian Carnica Association.

Для ПЛР ампліфікації ділянки *ColI* використовували пару праймерів prRV1509 та prRV1510 (табл. 2), які комплементарні до 3'-ділянки гену *ColI* та 5'-ділянки *ColII* мітохондріального геному *A. m. ligustica* (реєстраційний номер у базі даних

Genbank L06178 (Crozier, Crozier, 1993). Місце гібридизації праймерів було обрано так, щоб досягти ампліфікації ділянки гену *ColII*, який кодує другу субодиницю цитохром оксидази.

Таблиця 2.

Праймерні послідовності для ампліфікації ділянки *COII*

Table 2.

Sequences of primers used for amplification of the *COII* region

prRV1509	5' – GATTTTGATTACTTCCTCCCTCAT – 3'
prRV1510	5' – GAATTTCAACAGTAATAAGAATCTGGA – 3'

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 30 мкл містила такі компоненти: 1 нг ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (FirePol, Solis Biodyne, Естонія), 2,5 мМ MgCl₂, суміш dNTP – 0,2 мМ кожного, 1× буфер для ПЛР та 0,2 мМ кожного з двох праймерів. ПЛР проводилася з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) 94°C, 4 хв.; (2) чотири цикли 94°C, 45 с; 47°C, 1 хв.; 72°C, 1 хв. 10 с; (3) 30 циклів 94°C, 45 с; 51°C, 1 хв.; 72°C, 1 хв. 10 с; (4) 72°C, 7 хв.; припинення реакції – 4°C; загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофоретичного аналізу у 2% агарозному гелі та сиквенували на фірмі «Eurofins Scientific» (Люксембург).

Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Вирівнювання здійснювали методом Clustal W (Thompson et al., 1994; Rizzo, Rouchka, 2007), а пошук гомологічних послідовностей у Genbank – з використанням програми BLAST.

Результати та їх обговорення. Для з'ясування поліморфізму медоносних бджіл України нами аналізувалась нуклеотидна послідовність ділянки гена *ColII*. Крім референтних зразків для порівняння використовувались зразки робочих бджіл, які було отримано з трьох областей. Для порівняння використовувались зразки традиційної західноєвропейської лінії підвиду

A. m. carnica – Troisek 1075, а також лінія Карпатської породи – Vuchkivska. В якості еталону порівняння для підвиду *A. m. macedonica* був взятий зразок з Греції (Greece), яку цей підвид заселяє згідно природного ареалу. Також для порівняння використовувалась послідовність гена *CoII* підвиду *A. m. mellifera*, яка доступна у міжнародній базі даних GenBank (зразок *Mellifera* GB, реєстраційний номер KJ396183).

З використанням виділеної ДНК проведено ПЛР. ПЛР-продукти було сиквеновано, а отримані послідовності було порівняно між собою та з послідовністю, взятою з бази даних GenBank (рис. 1)

Порівняння розшифрованих послідовностей спейсерної ділянки *COII* досліджуваних нами бджіл показало відносно високий рівень їх гомології між собою та послідовністю, яка була взята нами для порівняння з бази даних GenBank. Проте, в деяких ділянках аналізовані послідовності демонструють одонуклеотидний поліморфізм (single nucleotide polymorphism, SNP) внаслідок якого досліджувані зразки розподіляються на дві групи.

У зразків бджіл Selyatin, Peremyshlyany та у референтних ліній Карпатської породи Vuchkivska, австрійської Troisek 1075 досліджувана ділянка *CoII* виявилась ідентичною. При цьому по відношенню до еволюційно віддаленої групи, куди належить зразок *Mellifera*-GB та інші порівнювані зразки спостерігається специфічна транзиція $T \rightarrow C$ (SNP №2 – див. рис. 1.).

Отже, на пасіках гірської частини Чернівецької та Львівської областей присутні бджоли, які по материнській лінії імовірно походять від Карпатської породи. В той же час зразки Khmelnytskyi, Yarmolyntsi та Ust-Putila демонструють іншу специфічну заміну нуклеотиду $T \rightarrow C$, яка присутня у Greece та притаманна підвиду *A. m. macedonica* (SNP №1 – див. рис.). Можливим поясненням таких результатів є походження зразків Khmelnytskyi, Yarmolyntsi та Ust-Putila від Української степової породи. Присутність генетичного матеріалу цієї породи закономірне для території Хмельницької області, проте на території Чернівецької області не відповідає офіційному районуванню (Про бджільництво: Закон України No 184/82).

У жодному з досліджених зразків українських бджіл не було виявлено SNP, характерних для *A. m. mellifera*. Це вказує на відсутність серед досліджуваних бджіл генетичного матеріалу Темної європейської породи, яка належить до цього підвиду. Витіснення *A. m. mellifera* іншими підвидами, які краще пристосовані до потепління клімату, спостерігається і в інших країнах Європи (Parejo et al., 2016).

Підвиди *A. mellifera* еволюційно сформувались в результаті адаптації до місцевих еколого-географічних умов. Конкретні підвиди ізольовані один від одного у природі та мають характерні морфологічні ознаки (Ruttner, 1988a, b; Поліщук та ін., 2008). Відповідно, для ідентифікації порід ефективно використовують морфометричний аналіз (Ruttner, 1988b).

Majority

Greece
Khmelnytskyi
Ust-Putila
Yarmolyntsi
Selyatin
Peremyshlyany
Troisek 1075
Vuchkivska
Mellifera GB

ATGATTTTATATTTAT

10 20

.....C.....
.....C.....
.....C.....
.....C.....
.....
.....
.....
.....
.....

1

ATAAACAAATTTTCAAATTTAT

40 150 160

.....
.....
.....
.....
.....C.....
.....C.....
.....C.....
.....C.....
.....T.....

2

Рис. 1. Розташування поліморфних нуклеотидів (SNP) у гені *CoII* мтДНК *Apis mellifera*.

Назви та походження досліджених зразків наведено у таблиці. Для порівняльного аналізу було використано послідовність гена *CoII* *A. m. mellifera* (*Mellifera*-GB - реєстр. номер KJ396183) з бази даних Genbank

Fig. 1. Location of polymorphic nucleotides (SNPs) in the *CoII* gene of *Apis mellifera* mtDNA.

The names and origins of the tested samples are given in the table. For comparative analysis, the *CoII* gene sequence of *A. m. mellifera* (*Mellifera*-GB - accession number KJ396183) from the Genbank database was used.

Проте, такі методи не враховують можливість інтродукції бджіл на непритаманні їм території з метою розведення та/або селекції та їх подальшої неконтрольованої гібридизації, яка за останні десятиліття набула загрозливих масштабів у різних країнах світу (Meixner et al., 2013; Pentek-Zakar et al., 2015). Попередні морфометричні дослідження також показали, що на сьогодні на українських пасіках переважно зустрічаються гібридні форми бджіл, які не відповідають стандартам жодної породи (Череватов та ін., 2014; Череватов та ін., 2016).

Висновки. Таким чином, аналіз нуклеотидної послідовності ділянки *ColII* мтДНК показує, що виявлені у цьому гені специфічні мутації дозволяють розрізнити українські аборигенні породи *A. mellifera*. На території гірської частини Чернівецької області виявлено бджіл, які походять від Карпатської та від Української степової порід. Таке близьке співіснування гірських бджіл та бджіл, що населяють рівнинні території імовірно пов'язане з їх антропогенною інтродукцією.

Подяка. Автори висловлюють щире подяку проф. Р.А. Волкову (Чернівецький національний університет) за участь у обговоренні отриманих результатів та поради при підготовці рукопису.

Список літератури:

- Григорків Л.М. Вплив процесу селекції на формування внутрішньопородного типу Українських степових бджіл. // Бджільництво України. – 2017. – Вип. 2. – С. 49–55.
- Григорчук Д.І., Рабоконь А.М., Поставойтова А.С., Пірко Н.М., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Оцінка генетичного різноманіття бджіл в Україні за допомогою мікросателітних маркерів. // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2020. – Том 26. – С. 56–60. doi: 10.7124/FEEO.v26.1241
- Метлицька О.І., Ковтун С.І., Палькіна М.Д. ДНК-паспортизація порід бджіл України в системі збереження і вдосконалення їх генофонду. // Вісн. аграрної науки. – 2015. – Т. 93, № 7. – С. 39–43.
- Метлицька О.І., Поліщук В.П., Таран С.І. Застосування методів морфометрії та молекулярно-генетичної оцінки при визначенні чистопородності українських бджіл. // Біологія тварин. 2010. – Т. 12, № 1. – С. 254–259.
- Панчук І.І., Волков Р.А. Практикум з молекулярної генетики. Чернівці: Рута, 2007. – 120 с.
- Поліщук В., Гайдар В., Корбут О. Пасіка. Київ: ПрофКнига, 2008. – 284 с.
- Про бджільництво: Закон України № 184/82 від 20.09.2000. Офіційний вісник України від 10.11.2000 р., № 43, стор. 245, стаття 1872, код акта 16996/2000. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0736-00#Text>
- Федоряк М.М., Тимочко Л.І., Кульманов О.М., Руденко С.С., Делі О.Ф., Подобівський С.С., Мельниченко Г.М., Бродшнайдер Р., Волков Р.А. Втрати колоній медоносних бджіл (*Apis mellifera* L.) в Україні за результатами зимівлі 2016-2017 рр. в рамках міжнародного моніторингу. // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). – 2018. – Т. 10, Вип. 1. – С. 37–46. doi: 10.31861/biosystems2018.01.037
- Череватов В., Феркаляк В., Волков Р. Гібридизація пчели медоносної (*Apis mellifera* L.) на території Черновицької області (Україна). // National Museum of Ethnography and Natural History of Moldova. Sci. Bull. – 2016. – Vol. 24, No 37. – P. 62–67.
- Череватов В., Феркаляк В., Волков Р. Неконтрольована гібридизація бджоли медоносної (*Apis mellifera* L.) на території Івано-Франківської області. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, No. 2. – С. 234–240.
- Achou M., Loucif-Ayad W., Legout H., Hmidan H., Alburaki M., Garnery L. An insightful molecular analysis reveals foreign honeybees among Algerian honeybee populations (*Apis mellifera* L.). // J. Data Mining Genom. Proteom. – 2015. – Vol. 6, No 1. – P. 1–6. doi: 10.4172/2153-0602.1000166
- Brodschneider R., Gray A., Zee R. Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. // J. Apicult. Res. – 2016. – Vol. 55, No. 5. – P. 375–378. doi: 10.1080/00218839.2016.1260240.
- Carreck N., Neumann P. Honey bee colony losses. // J. Apicult. Res. – 2010. – Vol. 49. – P. 1–6. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.01.
- Cherevatov O.V., Panchuk I.I., Kerek S.S., Volkov R.A. Molecular diversity of the Col-CoII spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the Carpathian bee. // Cytol. Genet. – 2019. – Vol. 53, No 4. – P. 276–281.
- Crozier R.H., Crozier Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. // Genetics. – 1993. – Vol. 133, No. 1. – P. 97–117.
- Garnery L., Cornuet J., Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. // Mol. Ecol. – 1992. – Vol. 1. – P. 145–154.
- Meixner M., Pinto M., Bouga M. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. // J. Apic. Res. – 2013. – Vol. 52, No 4. – P. 1–28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05
- Parejo M., Wragg D., Gauthier L., Vignal A., Neumann P., Neuditschko M. Using whole-genome sequence information to foster conservation efforts for the European Dark honey bee, *Apis mellifera mellifera*. // Front. Ecol. Evol. – 2016. – Vol. 4, No 140. – P. 1–15. doi: 10.3389/fevo.2016.00140.
- Pentek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusz S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. // Ecol. Evol. – 2015. – Vol. 5, No 23. – P. 5456–5467. doi: 10.1002/ece3.1781
- Rizzo J., Rouchka E. Review of Phylogenetic Tree Construction. University of Louisville. Louisville: Department of computer engineering and computer scienc. – 2007. – 1–7 p.

21. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 5, No. 2. – P. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
 22. Rortais A., Arnold G., Alburaki M. Review of the *DraI* COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). // *Cons. Genetic Res.* – 2011. – Vol. 3. – P. 383–391.
 23. Rowley D., Coddington J., Gates M., Norrbom A., Ochoa R., Vandenberg N., Greenstone M. Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. // *Molecular Ecology Notes.* – 2007. – Vol. 7. – P. 915–924. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01905.x
 24. Ruttner F. Breeding techniques and selection for breeding of the honeybee. *British Isles Bee Breed. Assoc.* – 1988. – 152 p.
 25. Ruttner F., Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. – 1988. – 283 p. doi: 10.1007/978-3-642-72649-1
 26. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – Vol. 22, No 22. – P. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
 27. Van der Zee R., Pisa L., Andonov S. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. // *J. Apicult. Res.* – 2009. – Vol. 51, No. 1. – P. 100–114. doi:10.3896/IBRA.1.51.1.12
- References:**
1. Grygorkiv LM. The influence of process selection on the formation of intrabreed type of the Ukrainian steppe bees. *Beekeeping in Ukraine.* 2017; 2: 49–55.
 2. Hryhorchuk DI, Rabokon AM, Postovoiitova AS, Pirko NM, Pirko YaV, Blume YaB. Evaluation of genetic diversity of honey bee in Ukraine analyzed by the SSR-markers. *Factors Experimental Evol. Organisms.* 2020; 26: 56–60.
 3. Metlytska OI, Kovtun SI, Palkina MD. DNA-certification of breeds of bees of Ukraine in the system of preservation and development of their gene pool. *Bull. Agricult. Sci.* 2015; 93(7): 39–43.
 4. Metlytska OI, Polishchuk VP, Taran SI. The use of comparative and molecular-genetic evaluation under study of strain genuineness of Ukrainian bees. *Animal Biol.* 2010; 12(1): 254–259.
 5. Panchuk II, Volkov RA. *A Practical Course in Molecular Genetics.* Chernivtsi: Ruta; 2007.
 6. Polishchuk V, Gaidar V, Korbut O. *Apiary.* Kiev: PerfectStyle; 2008.
 7. On beekeeping: Law of Ukraine No. 184/82 of September 20, 2000. *Official Gazette of Ukraine* dated 10.11.2000, № 43, P. 245, Article 1872, Act Code 16996/2000.
 8. Fedoriak MM, Tymochko LI, Kulmanov OM, Rudenko SS, Deli OF, Podobivskiy SS, Melnychenko GM, Brodschneider R, Volkov RV. Honey bee (*Apis mellifera* L.) colony losses in Ukraine after the winter of 2016–2017 within the international monitoring. *Sci. Herald Chernivtsy University. Biol. (Biol. Systems).* 2018; 10(1): 37–46.
 9. Cherevatov VF, Ferkaljak VY, Volkov RA. Hybridization of honey bees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Chernivtsy region (Ukraine). *National Museum of Ethnography and Natural History of Moldova. Sci. Bull.* 2016; 24(37): 62–67.
 10. Cherevatov VF, Ferkaljak VY, Volkov RA. Uncontrolled hybridization of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Ivano-Frankivsk region. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine.* 2014; 12(2): 234–240.
 11. Achou M, Loucif-Ayad W, Legout H, Hmidan H, Alburaki M, Garnery L. An insightful molecular analysis reveals foreign honeybees among Algerian honeybee populations (*Apis mellifera* L.). *J. Data Mining Genom. Proteom.* 2015; 6(1): 1–6. doi: 10.4172/2153-0602.1000166
 12. Brodschneider R, Gray A, Zee R. Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *J. Apicult. Res.* 2016; 55(5): 375–378. doi: 10.1080/00218839.2016.1260240
 13. Carreck N, Neumann P. Honey bee colony losses. *J. Apicult. Res.* 2010; 49: 1–6. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.01
 14. Cherevatov OV, Panchuk II, Kerek SS, Volkov RA. Molecular diversity of the CoI-CoII spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the Carpathian bee. *Cytol. Genet.* 2019; 53(4): 276–281. doi: 10.3103/S0095452719040030
 15. Crozier RH, Crozier YC. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics.* 1993; 133(1): 97–117.
 16. Garnery L, Cornuet J, Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1992; 1: 145–154. doi:10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.
 17. Meixner M, Pinto M, Bouga M. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 2013; 52(4): 1–28. doi:10.3896/IBRA.1.52.4.05
 18. Parejo M, Wragg D, Gauthier L, Vignal A, Neumann P, Neuditschko M. Using whole-genome sequence information to foster conservation efforts for the European Dark honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Front. Ecol. Evol.* 2016; 4(140) 1–15. doi:10.3389/fevo.2016.00140.
 19. Pentek-Zakar E, Oleksa A, Borowik T, Kusz S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecol. Evol.* 2015; 5(23): 5456–5467. doi:10.1002/ece3.1781
 20. Rizzo J, Rouchka E. Review of Phylogenetic Tree Construction. University of Louisville. Louisville: *Department of computer engineering and computer scienc.* 2007.
 21. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985; 5(2): 69–76. doi: 10.1007/BF00020088
 22. Rortais A, Arnold G, Alburaki M. Review of the *DraI* COI-COII test for the conservation of the black hon-

- eybee (*Apis mellifera mellifera*). *Cons. Genetic Res.* 2011; 3: 383-391. doi: 10.1007/s12686-010-9351-x
23. Rowley D, Coddington J, Gates M, Norrbom A, Ochoa R, Vandenberg N, Greenstone M. Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Molecular Ecology Notes.* 2007; 7: 915–924. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01905.x
 24. Ruttner F. *Breeding techniques and selection for breeding of the honeybee*. British Isles Bee Breed. Assoc; 1988.
 25. Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 1988. doi: 10.1007/978-3-642-72649-1
 26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994; 22(22) 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
 27. Van der Zee R, Pisa L, Andonov S. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *J. Apicult. Res.* 2009; 51(1): 100-114. doi:10.3896/IBRA.1.51.1.12

POLYMORPHISM OF THE *COII* GENE OF HONEY BEES IN THE WESTERN REGIONS OF UKRAINE

O. V. Cherevatov, N. M. Roshka

*Due to active human intervention in natural genetic and population processes, survival and distribution areas of honey bees have been negatively affected. Preservation of the gene pool of aboriginal bees that are well adapted to local environmental conditions is an urgent problem that cannot be solved without the use of molecular methods to monitor the genetic composition of local populations. This type of research requires the use of state-of-the-art approaches based on application of molecular markers. In the molecular taxonomy of insects, mitochondrial cytochrome oxidase genes are widely used to identify closely related forms. The peculiarity of mtDNA is that it is maternally inherited, and the mitochondrial molecular markers are not separated by recombination. The *CoII* gene encoding the second subunit of cytochrome oxidase is widely used to discriminate the subspecies of honey bee. Therefore, to assess the distribution of different subspecies / breeds of *Apis mellifera* in Ukraine, the 5'-region of the *CoII* gene was sequenced and compared for bees from different geographical regions. In the *CoII* gene, base substitutions were found, which makes it possible to distinguish between honey bees of the Carpathian and Ukrainian steppe breeds, which are widespread in Ukraine. It has been revealed that the distribution of these breeds does not always correspond to the official zoning. The widespread practice in Ukraine of transporting the genetic material of *Apis mellifera* from different regions leads to uncontrolled hybridization and poses a threat to the preservation of aboriginal breeds of honey bees.*

*Keywords: biodiversity, molecular evolution and phylogeny, mitochondrial DNA, cytochrome oxidase, *Apis mellifera**

Отримано редколегією 28.09.2020