

МОЛЕКУЛЯРНЕ РІЗНОМАНІТТЯ СПЕЙСЕРНОЇ ДІЛЯНКИ COI-COII МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ГЕНОМУ ТА ПОХОДЖЕННЯ КАРПАТСЬКОЇ БДЖОЛИ

О.В. ЧЕРЕВАТОВ^{1,1}, І.І. ПАНЧУК^{1,2}, С.С. КЕРЕК^{2,3}, Р.А. ВОЛКОВ^{1*,4}

¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012, Україна

²Національний науковий центр «Інститут бджільництва ім. П.І. Прокоповича»
вул. Академіка Заболотного, 19, Київ, 03143, Україна

E-mail: o.cherevativ@chnu.edu.ua¹, i.panchuk@chnu.edu.ua², s.kerek@yandex.ua³, r.volkov@chnu.edu.ua⁴

У наш час в Україні загрозливих масштабів набула неконтрольована гібридизація бджіл, які належать до різних підвидів або порід *Apis mellifera*. Збереження генофонду добре адаптованих до локальних природних умов місцевих бджіл є актуальною проблемою, яка не може бути вирішена без використання молекулярних методів для моніторингу генетичного складу місцевих популяцій. Для прояснення походження Карпатської бджоли та розроблення молекулярних методів її ідентифікації було здійснено розшифрування та порівняння первинної нуклеотидної послідовності ділянки CoI-CoII мітохондріального геному Карпатської бджоли та представників кількох підвидів *A. mellifera*. У дослідженні ділянці було виявлено мутацію, характерну для Карпатської бджоли та встановлено, що вона походить від центральноєвропейського підвиду *A. m. carnica* і являє собою екотип, який виник внаслідок просування цього підвиду на схід з утворенням карпатських популяцій медоносної бджоли.

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

Вступ. Суттєву загрозу для глобальної екологічної та продовольчої безпеки становить масова зимова смертність бджіл (*Apis mellifera*), яка спостерігається за останнє десятиліття по всьому світу [1, 2], в тому числі – і в Україні [3]. Однією з причин загибелі бджіл може бути втрата добре адаптованих до локальних природних умов місцевих форм *A. mellifera* внаслідок неконтрольованого завезення та розведення бджіл іншого географічного походження.

Збереження генофонду місцевих форм *A. mellifera* видається особливо актуальним питанням для України у зв'язку із значним різноманіттям природних умов та розповсюдженістю трьох

підвидів медоносної бджоли: *A. mellifera mellifera*, *A. m. carnica* та *A. m. mecedonica*, природні ареали яких частково перекриваються на території Західної України [4]. У другій половині 20 ст. в Україні були широко поширені три так звані «породи» бджіл: Темна Європейська, Карпатська та Українська степова, які, імовірно, належать до згаданих вище трьох підвидів, хоча деякі автори вважають, що Карпатську бджолу слід вважати окремим підвидом [5]. Крім того, неодноразово робилися спроби інтродукції в Україну Сирої гірської кавказької бджоли (підвид *A. m. caucasica*), яку намагались схрещувати із бджолами місцевих популяцій [6].

Попередні морфометричні дослідження нашої лабораторії показали, що на сьогодні на території Західної України внаслідок неконтрольованої гібридизації чистопородні бджоли майже відсутні [7, 8]. З'ясування генетичного складу місцевих популяцій *A. mellifera* є актуальнима проблемою, яка не може бути вирішена із використанням лише морфометричних методів та потребує використання молекулярних маркерів [9–12]. Особливо важливим видається застосування молекулярних методів для прояснення походження та таксономічного статусу Карпатської бджоли, яка має численні позитивні особливості та є широко розповсюдженою на пасіках різних регіонів України [5, 13].

У молекулярній систематиці та філогенетиці перетинчастокрилих широко застосовується мітохондріальна ДНК (мтДНК). Особливість мтДНК полягає в тому, що вона успадковується лише по материнській лінії, а присутні у її складі молекулярні маркери не роз'єднуються внаслідок рекомбінації. Особливості структури мтДНК використовують і для визначення

© О.В. ЧЕРЕВАТОВ, І.І. ПАНЧУК, С.С. КЕРЕК,
Р.А. ВОЛКОВ, 2019

підвидової належності бджоли медоносної. Для цього широко застосовують гени, які кодують різні субодиниці цитохрому оксидази (CO) [10, 12, 14] та NADH дегідрогенази (ND5) [15].

За результатами морфометричних досліджень та особливостей будови mtДНК підвиди *A. mellifera* було розподілено між чотирма еволюційними гілками – А, С, М та О [4, 10, 16, 17]. Пізніше було також запропоновано існування гілок Y та Z [14, 18].

Найчастіше для встановлення різниці між підвидами або породами *A. mellifera* застосовують порівняльний аналіз спейсерної ділянки *CoI-CoII*, яка знаходиться між генами, що кодують субодиниці цитохромоксидази I і II (COI і COII) [10, 19, 20]. Ця ділянка демонструє підвищений темп молекулярної еволюції та є мінливою за структурою. Зокрема, вона може містити різні комбінації повторюваних послідовностей Р та Q. Кількість та розміщення цих послідовностей у різних популяцій може відрізнятись [20], що може бути використано для ідентифікації підвідів [10, 21].

У нашому дослідженні ми здійснили розшифрування (сиквенування) та порівняння первинної нуклеотидної послідовності ділянки *CoI-CoII* у Карпатської бджоли та у представників кількох підвідів *A. mellifera*, що дозволило нам встановити тісний генетичний

зв'язок між Карпатською бджолою та підвідом *A. m. carnica*.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були робочі бджоли чотирьох типів Карпатської бджоли та п'яти ліній *A. m. carnica* австрійського походження, які було отримано з колекції ННЦ «Інституту бджільництва ім. П.І. Прокоповича» та громадської організації «Об'єднання матководів України» (ГО ОМУ) (таблиця). Комах консервували в 90 % етанолі і використовували для виділення сумарної ДНК [22].

Для ПЛР-ампліфікації ділянки *CoI-CoII* використовували пару праймерів prC1C2-L (5'-CCACGACGTTATTCAAGACTATCCA-3') та prC1C2-R (5'-CATATGATCAATATCATTGAT-GACCAA -3'), які комплементарні, відповідно, до 3'-кінця гену *CoI* та 5'-кінця гену *CoII* мітохондріального геному *A. m. ligustica* (реєстраційний номер у базі даних Genbank L06178 [23]). Місце гібридизації праймерів було обрано так, щоб досягти ампліфікації міжгенної спейсерної ділянки та суміжних із нею фрагментів генів *CoI* та *CoII*, які кодують першу та другу субодиниці цитохрому оксидази.

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 30 мкл містила такі компоненти: 1 нг ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (RBC Bioscience, Тайвань), 3 мМ MgCl₂, суміш dNTP – 0,2 мМ

Походження досліджених зразків *Apis mellifera*

Назва зразка	Походження зразка
Hoverla (Говерла)	с. Брестів, Закарпатська обл., Україна
Rakhivska (Рахівська)	с. Берегуйфало, Закарпатська обл., Україна
Synevyr 8 (Синевир 8)	с. Вільшани, Закарпатська обл., Україна
Synevyr 15 (Синевир 15)	с. Вільшани, Закарпатська обл., Україна
Vuchkivska (Вучківська)	с. Вучкове, Закарпатська обл., Україна
Singer 197	Carnica Singer, Австрія http://www.carnica-singer.at/
Singer 639	J. Krauter, ACA, Австрія http://www.imkerei-krauter.de/
Sklenar 47/H/47	G. Sklenar, Niederösterreichischer Imkerverband, Австрія http://www.sklenarbiene.at/
Zac-Aspetz	E. Aspetzberger, ZAC, Австрія https://www.zac.at/ ; http://bienen-erich.at/
Zac-Henni	J. Henniger, ZAC, Австрія https://www.zac.at/unser Verein/unsermitglieder/henninger-josef/index.html

Примітка. Матеріал для дослідження чотирьох типів Карпатської бджоли (Вучківська, Говерла, Рахівська, Синевир) було отримано з колекції ННЦ «Інституту бджільництва ім. П.І. Прокоповича», а п'ять ліній *A. m. carnica* (Singer 197, Singer 639, Sklenar 47, Zac-Aspetz, Zac-Henni) – від Об'єднання матководів України. ZAC – Zentrale Arbeitsgemeinschaft der Carnicazüchter; ACA – Austrian Carnica Association.

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; 49 °C, 1 хв; 72 °C, 1 хв 10 с; (3) 30 циклів 94 °C, 45 с; 52 °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 розділення у 2%-ному агарозному гелі та сиквенували на фірмі GATC (Німеччина).

Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп’ютерної програми Chromas та пакету програм комп’ютерної обробки даних DNASTAR. Отримані послідовності задепоновано у базі даних Genbank під номерами MK140896–MK140906. Вірівнювання здійснювали методом Clustal W [24], а пошук гомологічних послідовностей у Genbank – з використанням програми BLAST.

Результати та їх обговорення. З метою прояснення таксономічного статусу Карпатської бджоли нами було визначено нуклеотидну послідовність ділянки мітохондріального геному *CoI-CoII*. Електрофоретичний аналіз показав, що для всіх досліджених нами зразків ПЛР-ампліфікація цієї ділянки призводить до утворення фрагментів ДНК, розмір яких складає близько 850 нп.

Надалі ПЛР-продукти було сиквеновано, а отримані послідовності було порівняно між собою та з послідовностями, взятыми з бази даних GenBank. З’ясувалось, у всіх досліджених типів Карпатської бджоли, у двох підвидів, які належать до еволюційної гілки С (*A. m. carnica* та *A. m. ligustica*) та у двох підвидів з гілки М (*A. m. mellifera* та *A. m. intermissa*) ділянка *CoI-CoII* демонструє дуже високий рівень подібності – від 98,8 до 100 %, що свідчить про близьку спорідненість між цими двома гілками.

Водночас, рівень подібності розшифрованої ділянки між представниками гілок С та М та підвидами, які належать до гілок А (*A. m. scutellata* – реєстраційний номер KJ601784) та Z (*A. m. syriaca* – KP163643) становить 95,6–97,2 %, тоді як подібність між усіма дослідженими підвидами *A. mellifera* та спорідненим видом *A. florea* (NC021401) – лише 88,7–

89,2 %. Слід також зазначити, що різниця між представниками гілок С та М стосується лише окремих нуклеотидів, тоді як *A. m. scutellata*, *A. m. syriaca* та *A. florea* відрізняються від них також наявністю коротких (2–5 нп) інсерцій та/або делецій. Отримані нами результати підтримують попередні дані про високу подібність підвидів, що належать до гілок С та М та їх відмінність від представників гілки А [21].

Аналіз розшифрованих послідовностей ділянки *CoI-CoII* для представників гілок С та М показав наявність дев’яти однонуклеотидних мутацій (SNP – single nucleotide polymorphism), сім з яких являють собою заміну нуклеотидів (6 транзицій та 1 трансверсія), а дві – делеції (рисунок). П’ять замін нуклеотидів (SNP №1 та 6–9) дозволяють розрізняти еволюційні гілки С та М. За цими SNP Карпатська бджола належить до еволюційної гілки С.

Порівняння отриманих сиквенсів також показує, що всі чотири типи Карпатської бджоли ідентичні між собою і відрізняються специфічною делецією одного залишку цитозину (SNP № 2: 3428 4C/3C – див. рисунок) від чотирьох ліній *A. m. carnica* австрійського походження (Singer 197, Singer 639, Zac-Aspetz, Zac-Henni) та *A. m. ligustica*, які є ідентичними між собою. Варіант 4C характерний і для всіх інших досліджених форм медоносної бджоли, тобто він є еволюційно вихідним, тоді як варіант 3C виник пізніше, у спільнога предка Карпатських бджіл. Інакше кажучи, отримані дані свідчать про спільне походження досліджених типів Карпатської бджоли від *A. m. carnica*. На загал отримані дані підтримують точку зору, що Карпатська бджола є окремим екотипом (або географічною расою) підвиду *A. m. carnica*, який, імовірно, сформувався на території Карпат [25].

Сиквенована ділянка *CoI-CoII* виявилась ідентичною у чотирьох досліджених нами ліній *A. m. carnica* та у двох зразків *A. m. ligustica* (послідовності з Genbank), що додатково підтверджує думку про генетичну близькість цих двох підвидів та ілюструє складності, які виникають за необхідності їх розрізнати [10, 26]. Цікаво, що на противагу цим підвидам з еволюційної гілки С, ділянка *CoI-CoII* виявилась дуже мінливою у африканських підвидів – представників гілки А [27].

	3280	3290	3430	3510	3520	3570
Majority	CCACCT<u>T</u>AGATCAT	TCCCC<u>C</u>ACTT	AATTTT<u>A</u>ATTCAATC			TATAAA<u>A</u>AAAAAC
Hoverla
Rakhivska
Synevyr 8
Synevyr 15
Vuchkivska
Sklenar 47#2
Sklenar 47#4
Singer 197
Singer 639
Zac-Aspetz
Zac-Henni
Ligustica 1
Ligustica 2
Mellifera 18 T T
Mellifera 13 T T
Mellifera 15 T T
Intermissa T T

①	②	③	④
3630	3700	3710	3760
Majority	GATT<u>T</u>TAT	TAATAATT<u>T</u>ATTATTA	AACAAATT<u>C</u>CAAAT
Hoverla
Rakhivska
Synevyr 8
Synevyr 15
Vuchkivska
Sklenar 47#2
Sklenar 47#4
Singer 197
Singer 639
Zac-Aspetz
Zac-Henni
Ligustica 1
Ligustica 2
Mellifera 18 C C T
Mellifera 13 C C T
Mellifera 15 C C T
Intermissa C C T

⑤	⑥	⑦	⑧
3810	3820		
Majority	TGAACAATT<u>T</u>ATTCC		
Hoverla
Rakhivska
Synevyr 8
Synevyr 15
Vuchkivska
Sklenar 47#2
Sklenar 47#4
Singer 197
Singer 639
Zac-Aspetz
Zac-Henni
Ligustica 1
Ligustica 2
Mellifera 18 C C T
Mellifera 13 C C T
Mellifera 15 C C T
Intermissa C C T

Розташування поліморфних нуклеотидів (SNP 1–8) у ділянці *CoI-CoII* мтДНК *Apis mellifera*. Назви та походження досліджених зразків наведено у таблиці. Для типу Synevyr було досліджено матеріал двох генеалогічних груп (Synevyr 8 та Synevyr 15), а для лінії Sklenar 47 – двох робочих бджіл з однієї пасіки (#2 та #4). Для порівняльного аналізу було використано послідовності з бази даних Genbank: *A. m. ligustica* (Ligustica 1 – реєстраційний номер L06178, Ligustica 2 – KX908209), *A. m. mellifera* (Mellifera 13 – KJ396190, Mellifera 15 – KJ396184, Mellifera 18 – KJ396183) та *A. m. intermissa* (Intermissa – KM458618). Нумерація нуклеотидів відповідає послідовності повного мітохондріального геному *A. m. ligustica* (Ligustica 1 [23])

Нами було виявлено, що у однієї з австрійських ліній *A. m. carnica*, Sklenar 47 спостерігається специфічний для Карпатської бджоли варіант 3С (SNP № 2 – див. рисунок). Крім того, ця лінія демонструє делецію залишку аденину (SNP № 4: 3566 4A/3A), яка не спостерігається у жодній з досліджених форм *A. mellifera*. Відповідно, можна припустити, що Sklenar 47 походить від Карпатської бджоли, яка була завезена до Австрії, де пізніше і відбулася делеція 3566 4A > 3A. Отже, розповсюджені на території Австрії лінії бджіл, які традиційно відносять до *A. m. carnica* можуть мати різне походження і бути генетично неоднорідними. Виявлено нами генетична своєрідність лінії Sklenar 47 є цікавим прикладом того, що морфологічні та географічні ознаки можуть бути недостатніми для визначення генетичного походження певної лінії бджол.

Вважається, що підвиди медоносної бджоли (зокрема – гілки С) сформувалися як результат еволюційної адаптації до певних локальних еколо-географічних умов. Вони мають певні морфологічні ознаки та добре ізольовані один від одного у природі [4]. Відповідно, при проведенні генетичних досліджень при визначенні підвидової приналежності інколи береться до уваги лише географічне походження зразків та/або окремі морфологічні ознаки. Проте, цей підхід не враховує можливість антропогенної інтродукції бджіл з метою розведення та/або селекції та їх подальшої неконтрольованої гібридизації, яка за останні десятиліття набула загрозливих масштабів у різних країнах світу [7, 8, 10, 12, 28]. Саме тому у нашому досліженні ми зосередились на вивченії добре відомих референтних форм медоносних бджіл.

Результати досліджень, отримані різними авторами із використанням як морфометричних, так і молекулярно-генетичних методів свідчать про високу спорідненість підвидів, які належать до гілки С та складність їх ідентифікації, особливо за умови можливої гібридизації бджіл різного походження. Тому для остаточного прояснення питань про таксономічний статус Карпатської бджоли, спорідненість підвидів в межах гілки С та для розробки зручних молекулярних методів їх-

ньої ідентифікації необхідно провести додаткові дослідження із використанням інших ділянок мтДНК та залученням кількох еталонних зразків *A. m. ligustica* та інших підвидів.

Висновки. Порівняльний аналіз нуклеотидної послідовності ділянки CoI-CoII мтДНК показує, що Карпатська бджола належить до еволюційної лінії С. Вона походить від *A. m. carnica* і імовірно являє собою екотип, який виник внаслідок просування цього підвиду на схід з утворенням карпатських популяцій медоносної бджоли. Австрійська лінія бджіл Sklenar 47 відається близькою до Карпатської бджоли. Для остаточного прояснення її походження необхідні додаткові дослідження із залученням ширшого набору молекулярних маркерів.

Дотримання етичних стандартів. Всі міжнародні, національні та/або інституційні принципи догляду та використання тварин були дотримані.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансових установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

Подяки. Автори висловлюють щиру подяку голові громадської організації «Об'єднання матководів України» І.М. Доскочу за надання для досліджень п'яти ліній *A. m. carnica* австрійського походження, а також В.Ф. Череватову (Чернівецький національний університет ім. Юрія Федъковича) та В.В. Панну (Національний науковий центр «Інститут бджільництва ім. П.І. Прокоповича») за участь у обговоренні отриманих результатів.

MOLECULAR DIVERSITY OF THE COI-COII SPACER REGION IN THE MITOCHONDRIAL GENOME AND THE ORIGIN OF THE CARPATHIAN BEE

O.V. Cherevatov, I.I. Panchuk,
S.S. Kerek, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
Kotsiubynski str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine
Institute of Beekeeping named after P.I. Prokopovich
Academician Zabolotny str. 19, Kiev 03680, Ukraine
E-mail: o.cherevatov@chnu.edu.ua, i.panchuk@chnu.edu.ua,
s.kerek@yandex.ua, r.volgov@chnu.edu.ua

At the present time, the uncontrolled interbreeding of bees that belong to different subspecies or races of *Apis mellifera* has become a threat in Ukraine. Conserving the gene pool of local bee breeds, which are well adapted to the local environmental conditions, is an urgent problem that cannot be solved without the application of molecular methods for monitoring of the genetic composition of local populations. To clarify the origin of the Carpathian bee and to develop molecular methods for its identification, sequencing and comparative analysis of the *CoI-CoII* region of the mitochondrial genome of the Carpathian bee and representatives of several subspecies of *A. mellifera* was performed. In the studied region, a mutation specific for the Carpathian bee was discovered. It was found that Carpathian bee originates from the Central European subspecies *A. m. carnica* and represents the ecotype that arose from the migration of this subspecies to the East, which resulted in the formation of Carpathian populations of honey bees.

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ
СПЕЙСЕРНОГО УЧАСТКА *COI-COII*
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА
И ПРОИСХОЖДЕНИЕ КАРПАТСКОЙ ПЧЕЛЫ**

*А.В. Череватов, И.И. Панчук,
С.С. Керек, Р.А. Волков*

В настоящее время в Украине угрожающих масштабов приобрела неконтролируемая гибридизация пчел, принадлежащих к разным подвидам или породам *Apis mellifera*. Сохранение генофонда аборигенных пчел, хорошо адаптированных к местным условиям окружающей среды, является неотложной проблемой, которая не может быть решена без применения молекулярных методов мониторинга генетического состава местных популяций. Для прояснения происхождения Карпатской пчелы и разработки молекулярных методов ее идентификации были проведены расшифровка и сравнительный анализ первичной нуклеотидной последовательности области *CoI-CoII* митохондриального генома Карпатской пчелы и представителей нескольких подвидов *A. mellifera*. В исследуемом участке была обнаружена мутация, характерная для Карпатской пчелы. Показано, что Карпатская пчела происходит от среднеевропейского подвида *A. m. carnica* и представляет собой экотип, возникший в результате миграции этого подвида на восток, что привело к образованию карпатских популяций медоносной пчелы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Van der Zee, R., Pisa L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., Drazic, M.M., Higes, M., Kauko, L., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kralj, J., Kristiansen, P., Hernandez, R.M., Mutinelli, F., Nguyen, B.K., Otten, C., Özkiprim, A., Perna, S.F., Peterson, M., Ramsay, G., Santrac, V., Soroker, V., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wei, S., and Wilkins, 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, pp. 100–14. doi:10.3896/IBRA.1.51.1.12.
2. Brodschneider, R., Gray, A., Van der Zee, R., Adjlane, N., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo R., Coffey, M.F., Crailsheim, K., Dahle, B., Danihlík, J., Danneels, E., De Graaf, D.C., Dražić, M.M., Fedoriak, M., Forsythe, I., Golubovski, M., Gregorc, A., Grzeda, U., Hubbuck, I., Tunca, R.İ., Kauko, L., Kilpinen, O., Kretavicius, J., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Mutinelli, F., Peterson, M., Otten, C., Ozkirim, A., Raudmets, A., Simon-Delso, N., Soroker, V., Topolska, G., Vallon, J., Vejsnæs, F., and Woehl, S., 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, pp. 375–8. doi: 10.1080/00218839.2016.1260240.
3. Fedoriak, M.M., Timochko, L.I., Kulmanov, O.M., Volkov, R.A., and Rudenko, S.S., Winter losses of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Ukraine (monitoring results of 2015–2016), *Ukr. J. Ecol.*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 604–13. doi: 10.15421/2017_167.
4. Ruttner, F., Biogeography and Taxonomy of Honeybees, Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1988, pp. 283. doi: 10.1007/978-3-642-72649-1.
5. Savushkina, L.N., Races of bees regionalized in Russia, *Sci. Herald Nat. Agrar. Univ.*, 2006, vol. 94, pp. 113–7.
6. Bagriy, I.G., About relatives of Ukrainian bees, *Sci. Herald Nat. Agrar. Univ.*, 2006, vol. 94, pp. 90–3.
7. Cherevatov, V.F., Ferkaljak, V.Y., and Volkov, R.A., Uncontrolled hybridization of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Ivano-Frankivsk region. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 234–40.
8. Cherevatov, V.F., Ferkaljak, V.Y., and Volkov, R.A., Hybridization of honey bees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Chernivtsi region (Ukraine), *National Museum of Ethnography and Natural History of Moldova Sci. Bull.*, 2016, vol. 24, no. 37, pp. 62–7.
9. Metlitska, O.I., Polishchuk, V.P., and Taran, S.I., The use of comparative and molecular-genetic evaluation under study of strain genuineness of Ukrainian bees, *Animal Biol.*, 2010, vol. 12, no 1, pp. 254–9.

10. Meixner, M., Pinto, M., and Bouga, M., Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*, *J. Apic. Res.*, 2013, vol. 52, no. 4, pp. 1–28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05.
11. Achou, M., Loucif-Ayad, W., Legout, H., Hmidan, H., Alburaki M., and 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, doi: 10.4172/2153-0602.1000166.
12. Pentek-Zakar, E., Oleksa, A., Borowik, T., and Kuszza, S., Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies, *Ecol. Evol.*, 2015, vol. 5, no. 23, pp. 5456–67. doi: 10.1002/ece3.1781.
13. Polishchuk, V.P. and Gaidar, V.A., *Apairy*, Kiev: Perfect style, 2008, 284 p.
14. Franck, P., Garnery, L., and Loiseau, B.P., Genetic diversity of the Honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity*, 2001, vol. 86, pp. 420–30. doi: /10.1046/j.1365-2540.2001.00842.x.
15. Martimianakis, M., Klossa-Kilia, E., Bouga, M., and Kiliias, G., Phylogenetic relationships of Greek *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mtDNA segments (COI and ND5), *J. Apicult. Res.*, 2011, vol. 50, no. 1, pp. 42–50. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.05.
16. Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A.V., Weaver, D., and Tsutsui, N.D., Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*, *Science*, 2006, vol. 314, pp. 642–5. doi: 10.1126/science.1132772.
17. Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*, *Nat. Genet.*, 2014, vol. 46, pp. 1081–8. doi: 10.138/ng.3077.
18. Alburaki, M., Bertrand, B., Legout, H., Moulin, S., Alburaki, A., Sheppard, W.S., and Garnery, L., A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria, *BMC Genet.*, 2013, vol. 14, pp. 117–28. doi: 10.1186/1471-2156-14-117.
19. Rortais, A., Arnold, G., Alburaki M., Legout, H., and Garnery, L., Review of the DraI COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*), *Cons. Genetic Res.*, 2011, vol. 3, pp. 383–91. doi: 10.1007/s12686-010-9351-x.
20. Ostroverkhova, N.V., Konusova, O.L., Kucher, A.N., Kireeva, T.N., Vorotov, A.A., Belikh, E.A., Genetic diversity of the locus COI-COII of mitochondrial DNA in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from the Tomsk region, *Russ. J. Genet.*, 2015, vol. 51, pp. 80–90. doi: 10.1134/S102279541501010X.
21. Garnery, L., Cornuet, J., and Solignac, M., Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, *Mol. Ecol.*, 1992, vol. 1, pp. 145–54. doi: 10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.
22. Rogers, S.O. and Bendich, A.J., Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues, *Plant Mol. Biol.*, 1985, vol. 5, no. 2, pp. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
23. 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, pp. 97–117.
24. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and 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, pp. 4673–80. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
25. Kerek, S.S., Kerek, P.M., Peculiarities of breed characteristics of native bees from lowland areas of Transcarpathia, *Beekeeping of Ukraine*, 2017, vol. 2, pp. 115–28.
26. Cornuet, J., Garnery, L., and Solignac, M., Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* mitochondrial DNA, *Genetics*, 1991, vol. 128, no. 2, pp. 393–403.
27. Franck, P., Koeniger, N., Lahner, G., and Crewe, R., Evolution of extreme polyandry: an estimate of mating frequency in two African honeybee subspecies, *Apis mellifera monticola* and *A.m. scutellata*., *Insectes Soc.*, 2000, vol. 47, no. 4, pp. 464–70. doi: 10.1007/PL00001732.
28. Delaney, D.A., Meixner, M.D., Schiff, N.M., and Sheppard, W.S., Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 2009, vol. 102, no. 4, pp. 666–73. doi: 10.1603/008.102.0411.

Надійшла в редакцію 10.11.18
Після доопрацювання 19.12.18
Прийнята до друку 18.07.19