

## MOLEKULÄRE CHARAKTERISIERUNG VON *APIS MELLIFERA CARNICA* POLLMANN IN SLOWENIEN

S. SUŠNIK, P. KOZMUS, J. POKLUKAR, V. MEGLIČ

Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, SLOWENIEN

### Resümee

Die Carnicabiene (*Apis mellifera carnica*) und die phylogenetische Linie C der Bienen als ein Ganzes wurden genetisch wenig studiert und deshalb prüften wir die genetische Struktur der Carnicapopulation in Slowenien mit mitochondrieller und Nuklearanalyse der DNS. Die Bienenproben wurden aus 269 Ortschaften Sloweniens eingesammelt. Wir nahmen in die Analyse auch Bienenproben aus Griechenland, Tschechien, Kroatien, Deutschland und Frankreich als ausländische Gruppen auf. Die Proben aus Slowenien charakterisierten sich durch ein herabgesetztes Niveau der genetischen Differenzierung der CO I und CO II Regionen der mtDNS. Sie wurden auf neu identifiziertes mtDNS-Haplotyp bezogen, C2C genannt. Der gleiche Haplotyp wurde auch in den kroatischen und polnischen Gruppen und auch in einigen Proben aus Deutschland und der Tschechei angetroffen. Das herabgesetzte Variabilitätsniveau der Carnicapopulation in Slowenien wurde bei allen sechs untersuchten Mikrosatellitloci beobachtet und dabei eine außergewöhnlich homogene Struktur der einheimischen Bienenpopulation festgestellt. Bei der Mikrosatellitenanalyse wiesen die Populationen aus Kroatien und der Tschechei keine signifikanten Differenzen gegenüber den slowenischen auf. Andererseits wurde im Vergleich zur A.-m.-macedonica-Population eine hohe genetische Differenzierung festgestellt, ausgedrückt durch einen spezifischen mtDNS-Haplotyp, C2D genannt. Der schon beschriebene Haplotyp, C1, wurde bei den Bienen aus Österreich und bei einigen Proben der tschechischen Gruppe angetroffen. Der einzige Haplotyp, der aus der phylogenetischen non-C Linie stammte, A8 Haplotyp, war für die Bienenproben aus Frankreich charakteristisch. Die Ergebnisse veranschaulichten auf diese Weise, daß die Carnicabiene in Slowenien weiterhin eine der Hauptquellen des gemeinsamen einheimischen A.-m.-carnica-Genenfonds ist.

**Stichwörter:** Biodiversität/Carnicabiene/genetische Analysen

### Einleitung

*Apis mellifera* ist eine hochpolytypische Spezies. Aufgrund der Morphometrie können 24 anerkannte Subspezies der Alten Welt in drei Entwicklungslinien gruppiert werden: europäische (M), afrikanische (A) und Honigbienen aus dem Norden der Mittelmeergegend (C) (RUTTNER et al., 1978). Die Bienenpopulationen aus dem Zentrum und dem Nordosten des Mittelmeergebiets bestehen aus fünf geographisch stark verbundenen Subspezies [(*A.m. sicula* Montagano, *A.m. ligustica* Spinola, *A.m. cecropia* Kieseewetter, *A.m. macedonica* Ruttner und *A.m. carnica* Pollmann (RUTTNER, 1988)]. Die Carnicabiene, *Apis mellifera carnica* Pollmann, ist eine einheimische Biene Sloweniens und einiger Regionen des ehemaligen Jugoslawiens, des südlichen Teils Österreichs und einiger Teile Ungarns, Rumäniens und Bulgariens (RUTTNER, 1988). *A.m. carnica* verbreitete sich in ihren einheimischen Zonen in den Ländern Mittel- und Nordeuropas, in USA und Kanada. Die Hauptursachen dieses Prozesses war das sanfte Verhalten von *A.m. carnica*, die gute Honigproduktion im Frühjahr und im Sommer, das letztere dank dem Honigtau der Nadelbäume.

Die mtDNS-Analyse ist ein weit verwendetes Verfahren in der biogeographischen Untersuchung der *A.-mellifera*-Subspezies. Drei Evolutionslinien der Honigbienen wurden infolge der Untersuchung der sich stark verändernden Region CO I – CO II identifiziert (CORNUET et al., 1991). Die Variabilität in der Region CO I – CO II entsteht durch die Überlappung der Längevariation (An-/Abwesenheit der Sequenz P, Zahl der wiederholten Q-Sequenzen, mögliche kleine Deletionen) und durch die Substitution der Nukleotide. Im Rahmen der phylogenetischen Linie C wurden nur drei Haplotypen (C1 bei *A.m. ligustica*, C2a bei *A.m. carnica* und Cb2 bei *A.m. caucasica*) identifiziert (FRANCK et al., 2000) und im Rahmen der Subspezies keine Variation beobachtet. Noch mehr, die Mikrosatellitloci mit hoher Variation werden in immer größerem Maße bei den genetischen Untersuchungen der Populationen der *A.-mellifera*-Subspezies verwendet (FRANCK et al., 2000; DE LA RÚA et al., 2001). Die allgemeine Endstruktur der Spezies mit den drei Hauptentwicklungslinien wurde durch das Studium der Mikrosatelliten ebenfalls veroffenbart (ESTOUP et al., 1995; FRANCK et al., 1998).

Ziel des vorliegenden Studiums waren Charakterisierung und Analyse der genetischen Variabilität der einheimischen *A.m. carnica* und die Verfolgung, insofern möglich, der eventuellen genetischen Bahnen, die zu mehr oder weniger verwandten Honigbienen-Subpopulationen Europas führen.

### Material und Methode

Es wurden insgesamt 323 Arbeiterinnen analysiert. Es wurden Proben aus 269 Bienenvölker aus ganz Slowenien genommen. Die Analyse erfaßte auch 10 Proben aus Kroatien, 9 Proben aus der Tschechei, 10 Proben aus Griechenland (*A.m. macedonica*) und 25 Proben von selektionierten Linien, die dem Zuchtprogramm auf der Insel Unije (Kroatien) entstammen (Tab. I). Die gesamte DNS wurde aus Kopf, Tracheen und Arbeiterinnen extrahiert, gemäß des von BEYE und RAEDER (1993) festgelegten Protokolls. Die isolierte DNS wurde für die mtDNS und für die Analyse der Mikrosatelliten verwendet. Die mtDNS-Region, die das Gen tRNA<sup>Leu</sup>, die intergenetische Region CI I=CO II und das 5'-Ende des CO II-Gens erfaßte, wurde durch ein Protokoll amplifiziert, das von GARNERY et al. (1993) beschrieben wurde.

Unternommen wurde die Restriktion mit Dral bei 119 Proben und die Sequenzierung von 27 Proben. Alle Bienenproben wurden für sechs Mikrosatellitenloci analysiert: Ap53 (FRANCK et al., 1999), A7, A24, A88, A43 (ESTOUP et al., 1995) und A8 (FRANCK et al., 1998). Die genetische Statistik der Population wurde mit dem GENETIX-Software berechnet (BELKHIR et al., 1998).

### Ergebnisse und Diskussionen

#### Mitochondrielle DNS

Außer den Proben der selektierten Linie aus Frankreich wurden alle anderen Proben durch die mtDNS-Sequenzen der phylogenetischen Linie C charakterisiert (Tabelle I).

Tabelle I

Einzelheiten der Proben, ihre Ausmaße und COI-COI-Haplotypen, die in jeder Population vorkamen

Subspezies	Probeherkunft	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	COI-COI-Haplotyp
<i>A. mellifera carnica</i>	Slowenien	269	65 (6)	C2C
	Kroatien	10	10 (2)	C2C
<i>A. mellifera macedonica</i>	Rep. Tschechei	9	9 (4)	C1 und C2C
	Griechenland	10	10 (3)	C2D
<b>Selektierte Linien</b>				
„Hohen Neuendorf“	Deutschland	5	5 (2)	C2C
„Buckfast J“	Deutschland	5	5 (3)	C2D
„Polen“	Polen	5	5 (3)	C2C
„K 111“	Österreich	5	5 (2)	C1
„Toulouse“	Frankreich	5	5 (2)	A8
	Insgesamt		323	

N<sub>1</sub> = Zahl der in die Mikrosatellitenanalyse einbezogenen Honigbienenarbeiterinnen

N<sub>2</sub> = Zahl der in die mtDNS-Analyse einbezogenen Honigbienenarbeiterinnen. Die Zahl der sequenzierten Proben ist in den Klammern angeführt.

Alle im vorliegenden Studium identifizierten Haplotypen konnten nicht gemäß der schon veröffentlichten bestimmt werden. E wurden zwei neue Haplotypen der phylogenetischen Linie C entdeckt, die sich von den schon beschriebenen Haplotypen nur im unterschiedlichen Übergang zu den schon bekannten polymorphen Sites unterschieden (Tab. II). Die *A.-m.-carnica*-Populationen waren monomorphisch und nur durch einen neu entdeckten Haplotyp gekennzeichnet, C2C genannt. Proben von *A.-m.-macedonica*-Subspezies wurden auch als monomorphisch für den neuen Haplotyp C2D aufgefunden.

Tabelle II

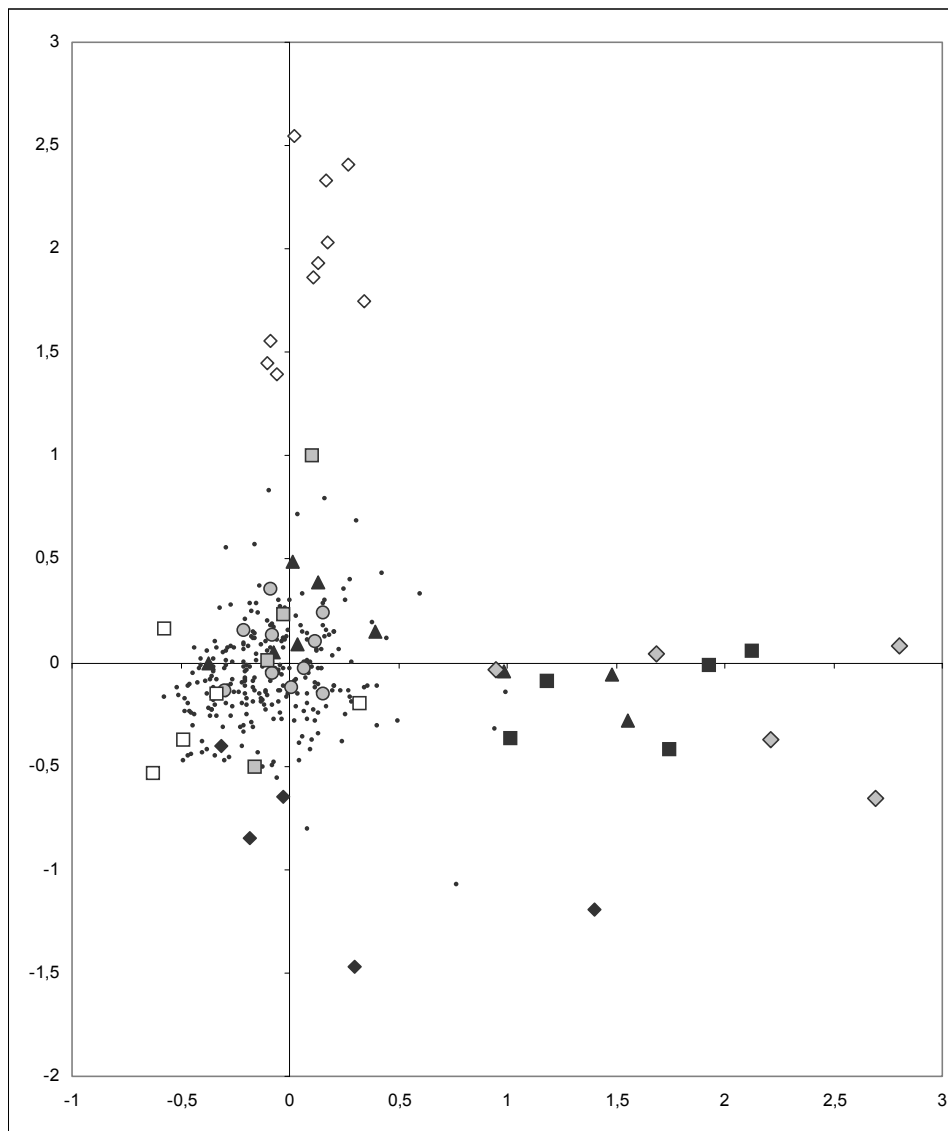
Nukleotide in den fünf schon beschriebenen variablen Positionen der Region COI-COI mtDNS, Differenzierung der Haplotypen der phylogenetischen Linie C von *A. mellifera*

Bestimmung des Haplotyps		Polymorphe Sites				
		1	2	3	4	5
Schon beschriebene Haplotypen der phylogenetischen Linie C (FRANCK et al., 2001; CORNUET, pers. Mitt.)	C1	CCCC	C	T	T	C
	C2A	CCC	A	T	C	T
	C2B	CCC	C	A	C	T
Vorgeschlagene Bestimmung des Haplotyps						
<i>A. m. carnica</i> (Slo, Cro), „Polen“, „Hohen Neuendorf“ <i>A. m. macedonica</i> , „Buckfast J“, „K 111“	C2C	CCC	C	T	T	C
	C2D	CCC	C	T	C	T
	C1	CCCC	C	T	T	C

#### Mikrosatelliten

In allen untersuchten Proben waren alle sechs Mikrosatellitenloci polymorphisch. Zur Entdeckung der verschiedenen gemeinsamen genetischen Fonds der analysierten Proben wurde die multidimensionale Korrespondenzanalyse durchgeführt. Gemäß der Clusteranalyse wurde kein Unterschied zwischen den slowenischen Subpopulationen beobachtet. Das Clustering der *A.-m.-carnica*-Proben aus Slowenien und Kroatien ist eindeutig (Abb.1). Die *A.-m.-macedonica*-Proben bildeten ein vollkommen separates und stark einheitliches Cluster. Die Bienen der verschiedenen selektierten Linien wiesen ein unterschiedliches Verhältnis mit den einheimischen Carnica-Bienenpopulationen auf. Ihre genetische Zusammensetzung

widerspiegelt die kontrollierte Vermischung der Carnicabienen mit Bienen anderer Herkunft in der Vergangenheit.



- A.m. carnica* (Slowenien)
- A.m. carnica* (Kroatien)
- A.m. carnica* (Tschechei)
- A.m. macedonica*
- Selektionierte Linie "Hohen Neuendorf"
- Selektionierte Linie „Buckfast J“
- Selektionierte Linie „Polen“
- Selektionierte Linie „K111“
- Selektionierte Linie „Toulouse“

Abb.1 – Diagramm der Verteilung von allen analysierten *A.-mellifera*-Proben aufgrund der entsprechenden Analysen

### Schlußfolgerung

Gemäß der Ergebnisse der molekulären Analyse sind die slowenischen und kroatischen Honigbienenpopulationen scheinbar stark einheitlich, fast nicht differenzierbar. Demgemäß können die *A.-m.-carnica*-Populationen von Slowenien und Kroatien als ausgeprägt einheimisch betrachtet werden, ohne der Einführung von anderen Subspezies oder phylogenetischen Linien.

## LITERATUR

- Belkhir K., Borsa P. (1998) GENETIX, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations. <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>, Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Beye M., Raeder U. (1993) Rapid DNA preparation from bees and %GC fractionation, *BioTechniques* 14, 372-374.
- Cornuet J.-M., Garnery L., Solignac M. (1991) Putative origin and function of the intergenic region COI and COII of *Apis mellifera*: mitochondrial DNA, *Genetics*, 1128, 393-403.
- De la Rúa P., Galian J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001a) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands, *Mol. Ecol.* 10, 1733-1742.
- Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models, *Genetics* 140, 679-695.
- Franck P., Coussy H., Le Conte Y., Solignac M., Garnery L., Cornuet J.-M. (1999) Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee, *Insect Mol. Biol.* 8, 419-421.
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.-M. (2000) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), *Mol. Ecol.* 9, 907-921.
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B. P., Hepburn H. R., Solignac M., Cornuet J.-M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity* 86, 420-430.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data, *Evolution* 52, 1119-1134.
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., *Experientia* 49, 1016-1021.
- Ruttner F. (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 284 pp.
- Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L., *Apidologie* 9, 363-381.