

LA STRUCTURE GÉNÉTIQUE DE L'ABEILLE DE L'ÎLE DE CRÈTE (GRÈCE)

P. HARIZANIS, Maria BOUGA*

Laboratoire de Sériciculture – Apiculture, Université Agricole d'Athènes, Iera Odos 75, Athènes, 118 55, GRÈCE

*E-mail: mbouga@aua.gr

Résumé

La structure génétique des populations d'abeilles mellifères provenant de différentes zones de l'île de Crète (Grèce), correspondant à *Apis mellifera adami*, (conformément à l'analyse morphométrique de Ruttner, 1988), a été étudiée à l'aide de l'analyse RFLP de deux segments de gène mtDNA.

On a étudié soixante spécimens prélevés à des reines différentes. On a extrait le DNA total et ultérieurement, les segments de gène 16s rDNA (965 bp) et CO I (1028 bp) ont été amplifiés à l'aide du PCR. Sept et puis six enzymes de restriction ont eu au moins un site de reconnaissances pour les segments de gène 16s rDNA et CO I respectivement.

On a mis en évidence la variation intrapopulation à l'égard du segment de gène CO I, digéré à l'aide de l'enzyme de restriction BstU I.

On a découvert que la structure génétique de ces populations a été probablement modifiée à cause de la transhumance et de la croissance à raisons commerciales du nombre d'abeilles durant les dernières deux décénies. Il paraît que dans l'île de Crète il n'y a plus de populations pures d'*Apis m. adami*. Nos données, comparées à celles des recherches précédentes, montrent que l'abeille mellifère de Crète ressemble aux populations d'abeilles d'autres zones de Grèce.

Mots-clés: *Apis mellifera adami* /abeille mellifère/ mtDNA / structure génétique/ Grèce

Introduction

Traditionnellement, la taxonomie intraspécifique de l'abeille mellifère *Apis mellifera* s'est fondée sur la morphologie. À présent, on reconnaît 26 sous-espèces d'*A. mellifera*, à partir de leurs caractères morphométriques (RUTTNER 1988, 1992; SHEPPARD et al., 1997).

Plus récemment, on a appliqué à l'étude de la diversité de l'abeille mellifère les instruments génétiques, mais surtout l'analyse de la séquence DNA et l'électrophorèse de l'allozyme. Le DNA mitochondrial (mt DNA) possède certaines propriétés grâce auxquelles il est l'instrument favori dans la systématique et la biologie des populations. En général, il est hérité en lignée maternelle, sans recombinaison. Ainsi, il permet de détecter avec précision les haplotypes étrangers à l'intérieur des populations. C'est seulement l'héritage maternel de mtDNA qui a été démontré chez les abeilles mellifères (Meusel and Moritz, 1993) et par conséquent, toutes les ouvrières et tous les bourdons dans une colonie ont le même mtDNA que la reine. Toutefois, on doit prendre en considération certaines améliorations de nature technique, introduites plus ou moins récemment dans le ménage de la ruche, comme l'importation de ruches à l'étranger et la pratique de la transhumance.

En s'appuyant sur les recherches morphométriques, RUTTNER (1980) a décrit les populations d'abeilles mellifères de Crète (Mer Egée, Grèce) comme étant des *Apis mellifera adami*. Selon RUTTNER (1988), *Apis m. adami* présente des similarités morphologiques accentuées avec les sous-espèces se trouvant au Proche Orient. L'analyse de l'alloenzyme (BADINO et al., 1988) des populations d'abeilles mellifères de la Grèce (Thrace, Macédoine, Grèce Centrale et Péloponèse) et de l'île de Crète a montré qu'il y a eu une race pure en Crète.

Dans notre recherche, les populations d'abeilles mellifères de différentes zones de l'île de Crète qui, conformément à l'analyse morphométrique (Ruttner 1988) correspondent à *Apis m. adami*, ont été étudiées à l'aide de l'analyse RFLP de deux segments de gène mtDNA.

Notre but a été d'étudier la structure génétique de ces populations, pour découvrir s'il y a encore en Crête une race pure de populations d'abeilles et s'il existe une coïncidence avec l'analyse morphométrique de RUTTNER(1988).

Matériel et méthodes

On a ramassé des abeilles de 60 colonies de différentes zones de Crête (Chania, Rethymno, Heraklio Lasithi). Les endroits de prélèvement des spécimens sont montrés dans la Figure 1. Conformément à l'analyse morphométrique de RUTTNER(1988), les populations d'abeilles mellifères de ces zones correspondent à *A.m. adami*.

Les spécimens ont été transportés vivants dans les laboratoires et déposés à la température de -80 °C jusqu'à l'utilisation. On a extrait le DNA total de chaque individu, en conformité avec le protocole établi par Hunt et Page (1992), après avoir fait des modifications mineures (Bouga et al., 2003).

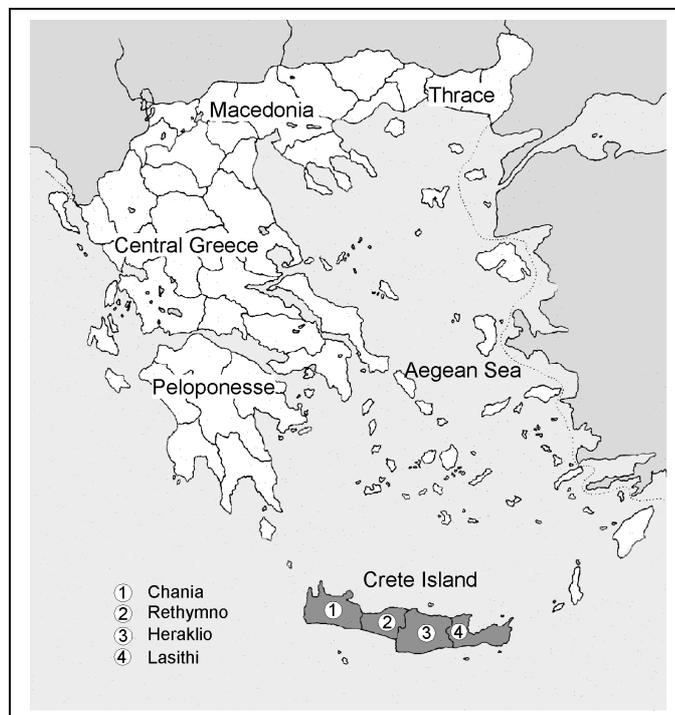


Fig. 1 - Endroits de prélèvement des spécimens de Crête : Chania, Rethymno, Heraklio, Lasithi.

On a analysé à l'aide de RFLP la variation du DNA mitochondrial, réalisée sur des produits amplifiés par PCR. On a utilisé deux sets d'amorces pour amplifier les segments de gène 16s rDNA et CO I. Les amorces utilisées pour le segment 16s rDNA ont été la paire 5- CAACATCGAGGTCGCAAACATC-3 et 3- AGTTGGGACTATGTTTTCCATG-5 (Nielsen et al., 1994) et pour le segment CO I, la paire 5-

GATTACTTCCTCCCTCATTA-3 et 3- AATAAGTCTGATAGGTCTAA-5 (NIELSEN et al., 1999). La réaction en chaîne de la polymérisation (PCR) (SAIKI et al., 1988) a été réalisée comme décrite chez BOUGA et al. (2003), de même que les conditions PCR.

Les segments amplifiés de mtDNA ont été digérés avec des enzymes de restriction. Les enzymes informatifs de restriction utilisés pour le segment de gène 16s rDNA ont été les Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I et Alu I et Sau3A I, Fok I, Bcl I, Ssp I, BstU I, et Xho I pour le segment de gène CO I.

Les segments ultérieurement digérés ont été séparés par électrophorèse en gels d'agarose 2% dans un tampon 0.5X TBE, teint avec de la bromure d'éthidium et visualisés dans une lumière UV. On a comparé les dimensions des fragments de DNA avec le marqueur PCR (Promega) appliqué sur le même gel et on les a calculées à l'aide du programme DNAfrag 3.03 (Nash, 1991). Une lettre, dans l'ordre de l'apparition, a identifié les modèles de restriction. Ultérieurement, des génotypes composites pour chaque individu ont été définis pour tous les modèles de restriction des deux segments de mtDNA.

Résultats

On a trouvé que les dimensions des segments de mtDNA amplifiés par PCR sont 964bp et 1028bp pour les segments de gène 16s rDNA et CO I respectivement. Sept et six enzymes de restriction ont eu au moins un site de reconnaissance sur les segments amplifiés 16s rDNA et CO I respectivement. Les modèles de division produits par chaque enzyme de restriction pour les deux segments de mtDNA sont présentés dans les Tableaux I et II.

Tableau I

Estimation de la dimension des fragments (en paires de base) de tous les modèles fragmentaires observés sur les segments de gène de mtDNA 16s rDNA de la population étudiée

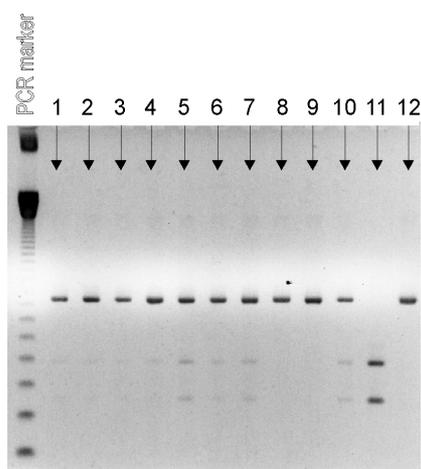
16s rDNA													
Sau3A I	Ssp I		Dra I		Hinc II		EcoR I		Pst I		Alu I		
	A		A		A		A		A		A		
548	—	628	—	557	—	598	—	492	—	621	—	572	—
416	—	336	—	407	—	366	—	472	—	343	—	392	—

Tableau II

Estimation de la dimension des fragments (en paires de base) de tous les modèles fragmentaires observés sur les segments de gène de mtDNA CO de la population étudiée

CO I												
Sau3A I	Fok I		Bcl I		Ssp I		BstU I		Xho I			
	A		A		A		A		A	B	A	
371	—	476	—	465	—	487	—	1028		—	616	—
349	—	425	—	326	—	277	—	658	—		412	—
280	—	127	—	237	—	264	—	370	—			
28	—											

La variation intrapopulation a été relevée à l'égard du segment de gène CO I digéré avec l'enzyme restrictif BstU I, comme montré dans la Figure 2.



marqueur PCR

Figure 2: Modèles de restriction des fragments après la digestion avec l'enzyme *BstU I*, chez les populations d'abeilles mellifères de: (1-3) Chania, (4-6) Rethymno, (7-9) Heraklio, (10-12) Lasithi.

Les deux haplotypes (génotypes composites) détectés chez les populations étudiées (les lettres, dans le même ordre, correspondent à l'ordre des modèles fragmentaires montrés dans les Tableaux I et II); les fréquences des haplotypes et la dimension du spécimen sont montrés dans le Tableau III.

Tableau III

Génotypes composites (haplotypes), fréquence des haplotypes et dimension du spécimen (N) de toutes les populations étudiées.

Haplotype	Génotype composite	Localité d'origine du spécimen			
		CHANIA	RETHYMNO	HERAKLIO	LASITHI
Type 1	AAAAAAAAAABA	1.000	1.000	1.000	0.933
Type 2	AAAAAAAAAAAA				0.067
	N	15	15	15	15

Discussion

L'étude du mtDNA chez les abeilles mellifères présente un intérêt particulier, car c'est le marqueur idéal de la colonie – tous les individus de la colonie ont le même haplotype (à l'exception des mutations), en conformité avec l'héritage maternel.

Les résultats de la présente étude, comparées avec celles des études antérieures, (Bouga et al., 2003) montrent que les abeilles mellifères de l'Île de Crète ressemblent à celles des autres zones de Grèce, fait dû peut-être à l'importation de reines de ces zones. Le résultat de l'Analyse Morphométrique Classique (Harizanis et al., 2001) effectuée sur les mêmes spécimens et la comparaison avec les abeilles de Macédoine (Nord de la Grèce) mettent en évidence le fait qu'entre ces populations il n'y a pas de différences statistiquement significatives. L'étude basée sur l'Analyse morphométrique et géométrique (Hatjina et al., 2002) montre qu'il y a une variabilité réduite chez les abeilles mellifères de l'Île de Crète.

Nos résultats montrent qu'il y a dans la fréquence à valeur basse un haplotype unique chez les abeilles de l'Île de Crète. Il paraît que ce haplotype soit le résultat de l'importation de reines à l'étranger ou de l'existence de la race pure d'*Apis m. adami*.

En général, il se peut que la structure génétique de la population d'abeilles mellifères se soit modifiée à cause de l'apiculture transhumante et à cause de la croissance à raisons commerciales d'abeilles dans les dernières deux décennies, et nos données semblent ne pas coïncider avec celles de l'analyse morphométrique de Ruttner (1988) en ce qui concerne l'existence d'*Apis m. adami*.

Remerciements

Les auteurs voudraient remercier le Ministère Grèque de l'Agriculture et l'Union Européenne pour l'aide financière accordée à cette recherche, conformément à la décision du Conseil de Réglementation (CE) no 1221/97.

RÉFÉRENCES

- Badino G., Celebrano G, Manino A., Ifantidis M.D. (1988) Allozyme variability in Greek Honeybees (*Apis Mellifera* L.), *Apidologie* 19 (4), 377-386.
- Bouga M., Harizanis P. C., Kiliadis G., Alahiotis S.(2003) Genetic divergence and phylogenetic relationships of Honey Bee *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA Segments, Paper in Preparation.
- Harizanis P. C, Garagani P., Bouga M. (2001) Morphometric Characters of Honey Bee of Macedonia (*Apis mellifera macedonica*), 9th National Entomological Meeting, Hellenic Entomological Society, Ioannina, 13-16 November 2001, Proceedings In Press.
- Hatjina F., Baylac M., Haristos L., Garnery L., Arnold G., Tselios D. (2002) Wing differentiation among Greek populations of honey bees (*Apis mellifera*): a geometric morphometrics analysis, poster in 7th European Congress of Entomology, October 7-13, Thessaloniki 2002.
- Hunt J.G., Page Jr.E.R. (1992) Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee, *Theor. Appl. Genet.* 85, 15-20.
- Meusel M.S, Moritz R.F.A. (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs, *Current Genetics* 24 (6), 539-543.
- Nash J.H.E. (1991) DNAfrag, program version 3.03, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada
- Nielsen D., Page Jr. R.E., Crosland M.W.J. (1994) Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations, *Experientia* 50, 867-871.
- Nielsen D., Ebert P.R., Hunt J.G., Gusmàn-Novoa E., Kinnee S. A., Page Jr. D.R.E. (1999) Identification of Africanized Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Incorporating Morphometrics and an Improved Polymerase Chain Reaction Mitotyping Procedure, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 92 (2), 167-175.
- Ruttner, F. (1980) *Apis mellifera* Adami (nssp), Die Kretische Biene, *Apidologie* 11,385-400.
- Ruttner, F. (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*, Springer – Verlag, Berlin.
- Ruttner F. (1992) "Naturgeschichte der Honigbienen", Ehrenwirth Verlag, München, Germany.
- Saiki R., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer – directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-491.
- Sheppard W.S., Arias M.C., Greech A., Meixner M.D. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta, *Apidologie* 28, 287-293.