

## LA CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE D'*APIS MELLIFERA CARNICA* POLLMANN DE SLOVÉNIE

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

L'Institut d'Agriculture de Slovénie, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, Slovénie

### Résumé

L'abeille *carniola* (*Apis mellifera carnica*) et la lignée phylogénétique C des abeilles sont encore peu étudiées génétiquement dans leur totalité et la structure génétique de la population d'abeilles *carniola* de Slovénie a été estimée à l'aide des analyses mitochondriale et nucléaire de DNA. Les abeilles ont été collectées de 269 localités de Slovénie; des spécimens d'abeilles de Grèce, République Tchèque, Croatie, Allemagne et France ont été inclus dans l'analyse, comme des groupes extérieurs. Les spécimens de Slovénie sont caractérisés par un niveau réduit de la différenciation génétique dans les zones COI et COII de mtDNA. Ils ont été fixés pour un haplotype de mtDNA, nouvellement identifié et désigné comme C2C. Le même haplotype a été trouvé chez les groupes extérieurs croate et polonais, tout comme chez certains spécimens provenus d'Allemagne et de la République Tchèque. Le niveau réduit de variabilité de la population d'abeilles *carniola* de Slovénie a été aussi observé pour tous les six loci microsatellites étudiés, montrant une structure très homogène de la population d'abeilles indigènes de Slovénie. Les populations de Croatie et de République Tchèque n'ont pas présenté des différences significatives en comparaison avec celle de Slovénie, lors de l'analyse des microsatellites. En plus, on a observé une différenciation génétique élevée envers la population *A. m. macedonica*, qui met en évidence aussi un haplotype spécifique de mtDNA, désigné comme C2D. Le haplotype déjà décrit, C1, a été trouvé chez les abeilles d'Autriche et chez quelques spécimens provenus du groupe extérieur tchèque. Le seul haplotype originaire de la lignée phylogénétique non-C a été caractéristique pour le spécimen d'abeilles de France (le haplotype A8). Par conséquent, les résultats montrent que l'abeille *carniola* de Slovénie représente encore une des sources majeures du fonds commun de gènes indigènes d'*A. m. carnica*.

**Mots-clés:** biodiversité, abeille *carniola*, analyses génétiques

### Introduction

*Apis mellifera* est une espèce hautement polytypique. À base de la morphométrie, on a établi 24 de sous-espèces reconnues dans le monde ancien pouvant être groupées dans trois lignées évolutives de descendance (RUTTNER *et al.*, 1978), les abeilles mellifères européennes (M), africaines (A) et nord méditerranéennes (la lignée C). Le groupe d'abeilles du centre et nord-est de la Méditerranée consiste en cinq sous-espèces étroitement liées géographiquement (*A.m. sicula* Montagano, *A. m. ligustica* Spinola, *A. m. cecropia* Kieseewetter, *A. m. macedonica* Ruttner et *A. m. carnica* Pollmann; RUTTNER, 1988). L'abeille *carniola*, *Apis mellifera carnica* Pollmann est originaire de Slovénie et de quelques régions de l'ancienne Yougoslavie, du sud de l'Autriche et de quelques parties d'Hongrie, de Roumanie, et de Bulgarie (Ruttner, 1988). *A. m. carnica* s'est répandue de ses zones natives dans les pays du centre et nord de l'Europe, les États Unis, et le Canada. Les causes principales de ce processus ont été le comportement doux d'*A. m. carnica* envers les apiculteurs, la bonne production de miel de printemps, et aussi la production d'été, basée sur la miellée des arbres conifères.

L'analyse de mtDNA a été une approche largement utilisée dans l'étude de la biogéographie des sous-espèces d'*A. mellifera*. Trois lignées révolutionnaires d'abeilles mellifères ont été aussi trouvées en étudiant la haute variabilité de la région COI-COII (CORNUET *et al.*, 1991). La variabilité de la région COI-COII résulte de la superposition de la longueur de la variation (présence/absence de la séquence P, nombre de séquences Q réitérées, probablement de petites radiations) et des substitutions de nucléotides. Seulement trois haplotypes (C1 chez *A. m. ligustica*, C2a chez *A. m. carnica*, C2b chez *A. m. caucasica*) ont été trouvés comme appartenant à la lignée phylogénétique C (FRANCK *et al.*, 2000) et aucune variation n'a été observée à l'intérieur des sous-espèces. En plus, des loci microsatellites ayant une grande variabilité ont été de plus en plus employés pour des études génétiques de la population des sous-espèces d'*A. mellifera* (FRANCK *et al.*, 2000; DE LA RÚA *et al.*, 2001). La structure finale des espèces avec leur trois branches évolutives principales a été aussi mise en évidence par l'analyse des microsatellites (ESTOUP *et al.*, 1995; FRANCK *et al.*, 1998).

Le but de la présente étude est donc de caractériser et d'analyser la variabilité génétique d'*A. m. carnica* indigène de Slovénie et de suivre de possibles voies vers des sous-espèces plus ou moins apparentées d'abeilles mellifères de l'Europe.

### Matériel et méthodes

On a analysé un total de 323 ouvrières d'abeilles. On a collecté des spécimens de 269 colonies d'abeilles de toute la Slovénie. On a inclus dans l'analyse dix échantillons d'abeilles *carniola* de Croatie. En plus, neuf spécimens d'abeilles de la République Tchèque, dix de Grèce (*A. m. macedonica*) et 25 des lignées d'abeilles sélectionnées dans le programme d'élevage de l'Île Unije de Croatie ont été utilisés comme des groupes extérieurs (Tableau 1). Le DNA total a été extrait de la tête, du thorax et des pattes des ouvrières, en conformité avec le protocole établi par BEYE et RAEDER (1993). Le DNA isolé a été utilisé pour le DNA mitochondrial et pour l'analyse des microsatellites. La zone de mtDNA, comprenant le gène tRNA<sup>Leu</sup>, la zone intragénique COI-COII et le bout 5' du gène COII ont été amplifiés, en employant le protocole décrit par GARNERY et al. (1993). On a réalisé la restriction avec *DraI* sur 119 spécimens et la division en séquences de 27 spécimens. Tous les spécimens d'abeilles ont été analysés pour six loci microsatellites; Ap53 (Franck et al., 1999), A7, A24, A88, A43 (Estoup et al., 1995) et A8 (FRANCK et al., 1998). La statistique de la génétique de la population a été calculée en employant l'application GENETIX (BELKHIR et al. 1998).

### Résultats et discussion

#### Le DNA Mitochondrial

Exception faisant les spécimens de la lignée sélectionnée, provenant de France, tous les autres spécimens ont été caractérisés par des séquences de mtDNA de la lignée phylogénétique C (Tableau 1).

Tableau 1

Détails des spécimens, leur dimension et les haplotypes COI-CO II de mtDNA trouvés chez chacune des populations.

Sous-espèces	Origine du spécimen	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	Haplotype COI-COII
<i>A. mellifera carnica</i>	Slovénie	269	65 (6)	C2C
	Croatie	10	10 (2)	C2C
	République Tchèque	9	9 (4)	C1 et C2C
<i>A. mellifera macedonica</i>	Grèce	10	10 (3)	C2D
Lignées sélectionnées				
Hohen Neuendorf	Allemagne	5	5 (2)	C2C
Buckfast J	Allemagne	5	5 (3)	C2D
Polen	Pologne	5	5 (3)	C2C
K 111	Autriche	5	5 (2)	C1
Toulouse	France	5	5 (2)	A8
	Total	323		

N1 ... nombre d'abeilles ouvrières dans l'analyse de microsatellites

N2 ... nombre d'abeilles ouvrières dans l'analyse de mtDNA; le nombre de spécimens divisés en séquences comme indiqué entre parenthèses

On ne peut pas définir tous les haplotypes de la présente étude en fonction de ceux déjà publiés. On a détecté deux nouveaux haplotypes de la lignée phylogénétique C, se différenciant des autres déjà décrits seulement par les transitions différentes à travers les sites polymorphiques déjà connus (Tableau 2). Les

populations d'*A. m. carnica* ont été monomorphiques, étant caractérisées par le haplotype nouvellement identifié, désigné comme C2C. Des spécimens de la sous-espèce *A. m. macedonica* ont été aussi trouvés comme étant monomorphes pour le nouveau haplotype C2D.

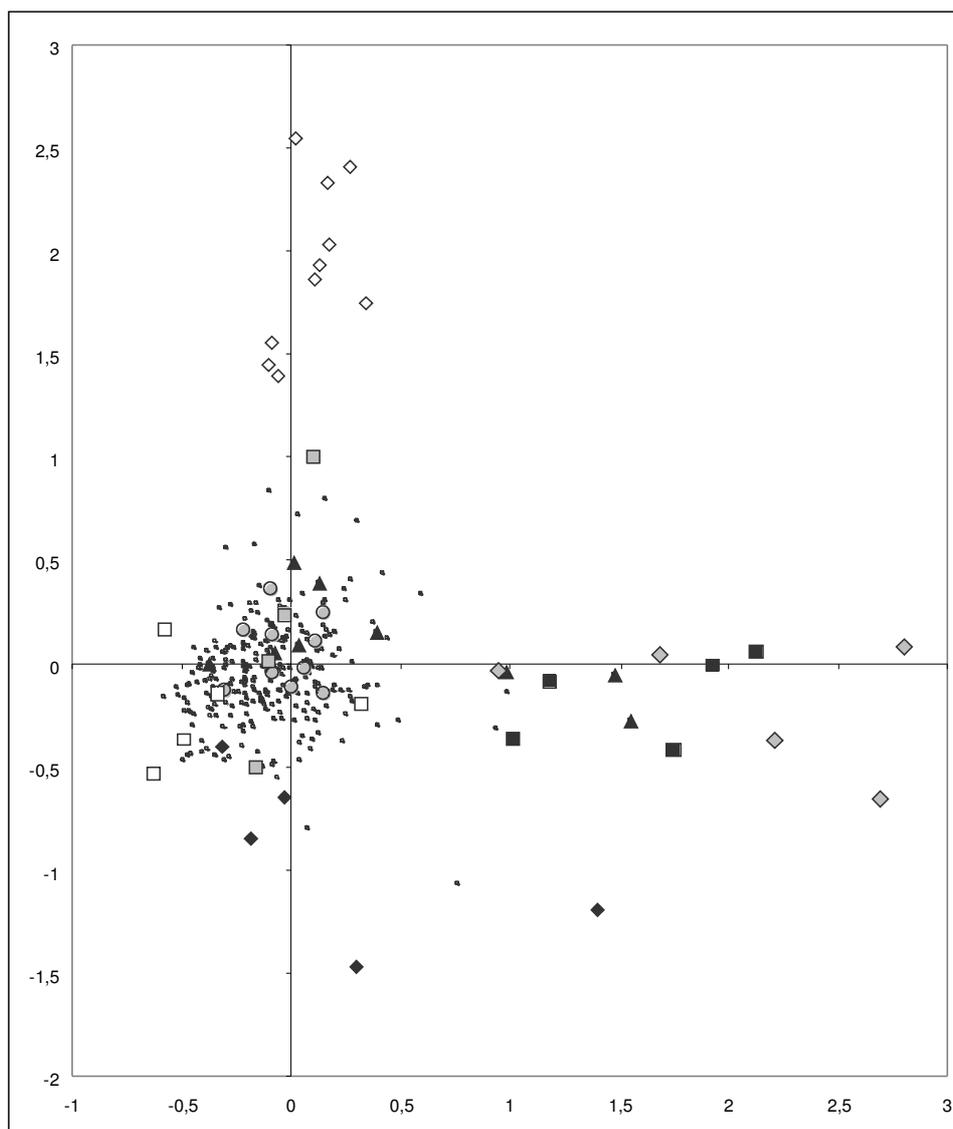
Tableau 2

**Nucléotides des cinq positions variables déjà décrites de la région CO I-CO I de mtDNA, différenciant les haplotypes de la lignée phylogénétique C d'*A. mellifera***

	Désignation du haplotype	Site polymorphique				
		1	2	3	4	5
Haplotypes de la lignée C antérieurement décrits (Franck <i>et al.</i> , 2001; J.-M. Cornuet, pers. com.)	C1	CCCC	C	T	T	C
	C2A	CCC	A	T	C	T
	C2B	CCC	C	A	C	T
	Désignation proposée du haplotype					
<i>A. m. carnica</i> (Slo, Cro), "Poland", „Hohen Neuendorf“	C2C	CCC	C	T	T	C
<i>A. m. macedonica</i> ; "Buckfast J" "K 111"	C2D	CCC	C	T	C	T
	C1	CCCC	C	T	T	C

**Les Microsatellites**

Tous les six loci microsatellites ont été polymorphiques pour tous les spécimens analysés. Pour détecter les différents niveaux génétiques chez tous les spécimens analysés, on a effectué l'analyse de la correspondance multidimensionnelle. Dans l'analyse de la grappe, on n'a identifié aucune différenciation entre les sous-populations de Slovénie. Il est évident que tous les spécimens d'*A. m. carnica* de Slovénie et de Croatie se sont réunis en grappe (Figure 1). Les spécimens d'*A. m. macedonica* ont formé une grappe complètement différente et très homogène. Les abeilles des lignées sélectionnées ont mis en évidence un rapport différent en comparaison avec les populations natives d'abeilles carniola. Leur structure génétique reflète l'appariement contrôlé dans le passé entre des abeilles carniola et des abeilles d'une autre origine.



- A.m. carnica* (Slovénie)
- A.m. carnica* (Croatie)
- A.m. carnica* (République Tchèque)
- A.m. macedonica*
- Lignée sélectionnée "Hohen Neuendorf"
- Lignée sélectionnée "Buckfast J."
- Lignée sélectionnée "Pologne"
- Lignée sélectionnée "K 111"
- Lignée sélectionnée "Toulouse"

### Conclusion

Conformément aux résultats de l'analyse moléculaire, les populations d'abeilles mellifères de Slovénie et de Croatie semblent uniformes, ne pouvant presque pas être différenciées. Par conséquent, les populations d'*A. m. carnica* de Slovénie et de Croatie peuvent être considérées comme natives au plus haut degré, sans aucune introduction d'autres sous-espèces ou d'autres lignées phylogénétiques.

### RÉFÉRENCES

- Belkhir K., Borsa P. (1998) GENETIX, logiciel sous Windows™ 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.