

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ХАРАКТЕРИЗОВАНИЕ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA CARNICA* POLLMANN, ОБИТАЮЩЕЙ В СЛОВЕНИИ

СУШНИК С., П. КОЗМУС, Я. ПОКЛУКАР, В. МЕГЛИЧ, СЛОВЕНИЯ

S. SUŠNIK, P. KOZMUS, J. POKLUKAR, V. MEGLIČ
Agricultural Institute of Slovenia, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, SLOVENIA

Аннотация

Apis mellifera carnica и филогенетическая линия С пока мало исследованы. Что касается генетической структуры популяции этих пчел, обитающих в Словении, она была оценена в результате митохондриального и нуклеинового анализа ДНК. Пробы пчел взяты из 269 местностей Словении. Для анализов нами использованы и пробы пчел из Греции, Чехии, Хорватии, Германии и Франции. Пробы из Словении показали низкий уровень генетической вариабельности в областях CO I и COII mtДНК. Они были фиксированы для новоидентифицированного гаплоида mtДНК, названного С2С. Одинаковый гаплотип найден в хорватской и польской группах, а также у некоторых проб из Чехии и Германии. Низкий уровень вариабельности популяции краинской пчелы, обитающей в Словении отмечен также в случае подопытных шести микросателлитов, показывая очень гомогенную структуру популяции словенских пчел. Популяции пчел из Чехии и Хорватии не показали достоверных различий с популяцией Словении (по анализу микросателлитов). С другой стороны, высокая генетическая вариабельность отмечена по отношению к популяции *A.m. macedonica*, показывая также специфичный гаплотип mtДНК, определенный как С2D. Описанный уже гаплотип С1, обнаружен у пчел из Австрии, а также в случае нескольких проб из Чехии. Единственный гаплотип, происходящий из филогенетической линии не-С отмечен у проб из Франции (гаплотип А8). Следовательно, результаты показывают, что краинская пчела из Словении продолжает быть и в настоящее время важным источником общего фонда коренных генов *Apis mellifera carnica*.

Ключевые слова: биоразнообразие / краинская пчела / генетические анализы.

Введение

Apis mellifera – высоко политипичный вид. На основе морфометрии, 24 подвидов Старого мира можно группировать в трех линиях эволюции (РУТТНЕР с сотр., 1978): европейские медоносные пчелы (М), африканские (А) и северно-среднеморские (С). Группа пчел, обитающих в центре и северо-востоке Средиземного моря состоит из 5 тесно географически связанных подвидов (*A.m. sicula* Montagano, *A.m. ligustica* Spinola, *A.m. secropia* Kieseewetter, *A.m. macedonica* Ruttner, *A.m. carnica* Pollmann; РУТТНЕР, 1988). Краинская пчела *A.m. carnica* Pollmann происходит из Словении и нескольких областей бывшей Югославии, юга Австрии и нескольких областей Венгрии, Румынии и Болгарии (РУТТНЕР, 1988). *A.m. carnica* распространилась в странах центра и севера Европы, США и Канаде. Причинами этого процесса были незлобивость этих пчел, их высокая медопродуктивность весной и летом.

Анализ mtДНК широко применяется для изучения биогеографии подвидов медоносной пчелы. В результате изучения зоны интенсивной вариабельности CO I-CO II (КОРНУЕ с сотр., 1991) идентифицированы три линии медоносной пчелы. Вариабельность области CO I-CO II является результатом вариации длины (присутствие/отсутствии единицы Р, число повторяющихся единиц Q, замена нуклеотидов). В рамках филогенетической линии С идентифицированы лишь три гаплотипа (С1 у *A.m. ligustica*, С2а у *A.m. carnica*, Сb2 у *A.m. caucasica*) (ФРАНК с сотр., 2000). Общая структура вида с тремя главными рамками развития выявлена в результате исследования микросателлитов (ЕСТУП с сотр., 1995; ФРАНК с сотр., 1998).

Цель данной работы состоит в характеризовании и анализировании генетической вариабельности *A.m. carnica*, обитающей в Словении.

Материал и методика

Аналізу подвергнуты 323 пчелы. Для этого собраны пробы из 269 семей разных зон Словении. Для анализов использовали и 10 проб краинских пчел из Хорватии. В качестве внешних групп нами использованы 9 проб пчел из Чехии, 10 проб из Греции (*A.m. macedonica*) и 25 пчел линий программы выращивания пчел на острове Уние (Хорватия) (таблица 1). Общая ДНК экстрагирована из головы, брюшка и ножек рабочих пчел (по протоколу БЕВЕ и РЕДЕР, 1993). Изолированную ДНК использовали для митохондриальной ДНК и анализа микросателлитов. Зона mtДНК, включая ген tARNLeu, межгенную зону CO I-CO II и конец 5' гена CO II была увеличена по указаниям ГАРНЕРИ с сотр. (1993). Для 119 проб осуществлено ограничение Dral, а для 27 проб – разделение на единицы. Все пробы анализированы для шести микросателлитов: Ap53 (ФРАНК с сотр., 1999), A7, A24, A88, A43 (ЕСТУП с сотр., 1995), и A8 (ФРАНК с сотр., 1998). Статистику генетики популяции определили по программе ГЕНЕТИКС (БЕЛКХИР с сотр., 1998).

Результаты и дискуссии

Митохондриальная ДНК

За исключением проб линии из Франции, все остальные пробы характеризованы единицами мтДНК филогенетической линии С (таблица I).

Таблица I

Детали проб, их размеры и гаплотипы мтДНК CO I-CO II, обнаруженные у каждой популяции

Подвид	Происхождение пробы	N ₁	N ₂	Гаплотип CO I-CO II
<i>A. MELLIFERA CARNICA</i>	Словения	269	65 (6)	C2C
	Хорватия	10	10 (2)	C2C
	Чехия	9	9 (4)	C1 and C2C
<i>A. MELLIFERA MACEDONICA</i>	Греция	10	10 (3)	C2D
Отселектированные линии				
Хозн Неуендорф	Германия	5	5 (2)	C2C
Бакфаст J	Германия	5	5 (3)	C2D
Польша	Польша	5	5 (3)	C2C
К 111	Австрия	5	5 (2)	C1
Тулуза	Франция	5	5 (2)	A8
	Всего	323		

N1 ... number of honeybee workers included in microsatellite analysis

N2 ... number of honeybee workers included in mtDNA analysis; the number of sequenced samples is indicated in parenthesis

Все идентифицированные нами гаплотипы не могут быть определены в отношении с уже опубликованными. Были обнаружены два новых гаплотипа филогенетической линии С (таблица II). Популяции *A.m. carnica* были одноморфными и характеризованы по новому идентифицированному гаплоиду, обозначенному как C2C. Пробы подвида *A.m. macedonica* оказались также одноморфными для нового гаплоида C2D.

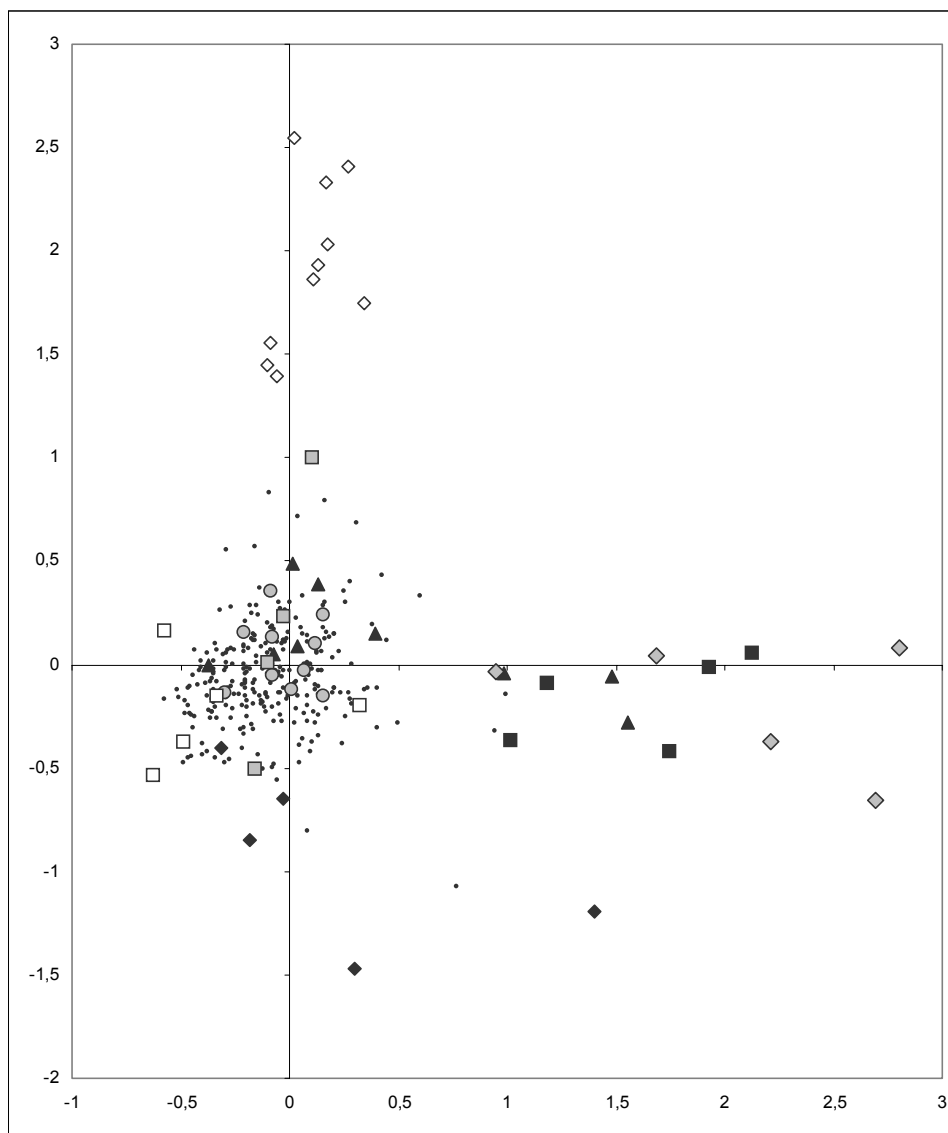
Таблица II

Нуклеотиды пяти описанных уже позиций зоны мтДНК CO I-CO II, которые дифференцируют гаплотипы филогенетической линии С *Apis mellifera*

	Обозначение гаплотипа	Полиморфный сайт				
		1	2	3	4	5
Описанные выше гаплотипы филогенетической линии С (Франк с сотр., 2001; Ж.М Корнуге, личное сообщение)	C1	CCCC	C	T	T	C
	C2A	CCC	A	T	C	T
	C2B	CCC	C	A	C	T
	Предложенное обозначение гаплотипа					
<i>A.m. carnica</i> (Словения, Хорватия), "Польша" "Hohen Neuendorf"	C2C	CCC	C	T	T	C
<i>A.m. macedonica</i> ; "Buckfast J"	C2D	CCC	C	T	C	T
"К 111"	C1	CCCC	C	T	T	C

Микросателлиты

Во всех анализированных пробах все роды микросателлиты оказались полиморфными. Для определения различных основных генетических основ анализированных проб нами анализировано многоразмерное сходство. По анализу гроздей не идентифицированно никакой разницы между подвидами, обитающими в Словении. Явно видно было формирование грозди всех проб *A.m. carnica* из Словении и Хорватии (рис. 1). Пробы *A.m. macedonica* сформировали особенную и очень гомогенную гроздь. Пчелы отселектированных линий выявили разное соотношение чем природные популяции краинской пчелы. Их генетическая структура отражает контролируемую смесь в прошлом краинской пчелы с другими породами.



- A.m. carnica* (Словения)
- A.m. carnica* (Хорватия)
- A.m. carnica* (Чехия)
- A.m. macedonica*
- Отселектированная линия "Hohen Neuendorf"
- Отселектированная линия "Buckfast J"
- Отселектированная линия "Польша"
- Отселектированная линия "К 111"
- Отселектированная линия "Тулуза"

Рис. 1 Диаграмма распределения анализированных проб *A.m. carnica* согласно анализу соотношения

Выводы

По результатам молекулярного анализа популяция медоносных пчел, обитающих в Словении и Хорватии качается очень однообразной, почти недифференцированной. Следовательно, популяции *A.m. carnica* из Словении и Хорватии можно считать туземными, без введения других подвидов или филогенетических линий.

ЛИТЕРАТУРА

- 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