

CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A *APIS MELLIFERA CARNICA* POLLMANN ÎN SLOVENIA

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

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

Rezumat

Albina *carnica* (*Apis mellifera carnica*) și linia filogenetică C a albinelor melifere ca un întreg sunt puțin studiate genetic și de aceea structura genetică a populației de albine *carnica* din Slovenia a fost estimată prin analiza mitocondrială și nucleară a ADN. Albinele au fost colectate din 269 localități din Slovenia. Au fost incluse în analiză, ca grupuri externe mostre de albine din Grecia, Cehia, Croația, Germania și Franța. Mostrele din Slovenia sunt caracterizate printr-un nivel redus al diferențierii genetice în regiunile COI și COII ale mtADN. Ele au fost desemnate pentru un haplotip mtADN nou identificat, numit C2C. Același haplotip a fost găsit în grupurile externe croat și polonez, precum și la unele mostre provenite din Germania și Cehia. Un nivel redus de variabilitate al populației de albine *carnica* din Slovenia a fost, de asemenea, observat, la toate cele șase loci microsateleți studiate, evidențiindu-se o structură deosebit de omogenă a populației de albine indigene din Slovenia. Pe baza analizei microsateleților populațiile din Croația și Cehia nu au prezentat diferențe semnificative față de cea din Slovenia. Pe de altă parte, o diferențiere genetică ridicată a fost observată față de populația de *A. m. macedonica*, exprimând, de asemenea, un haplotip specific mtADN, desemnat ca C2D. Haplotipul deja descris, C1, a fost găsit la albinele din Austria, precum și la câteva mostre provenite din grupul exterior ceh. Singurul haplotip originar din linia filogenetică non-C a fost caracteristic pentru mostra de albine din Franța (haplotipul A8). Ca atare, rezultatele arată că albina *carnica* din Slovenia continuă să reprezinte una din sursele majore pentru fondul de gene indigene de *A. m. carnica*.

Cuvinte cheie: biodiversitate / albina *carnica* / analize genetice

Introducere

Apis mellifera este o specie înalt politică. Pe baza morfometriei, 24 de subspecii recunoscute din Lumea veche pot fi grupate în trei linii de evoluție (RUTTNER et al., 1978): albinele melifere europene (M), africane (A) și nord-mediteraneene (C). Grupul de albine din centrul și nord-estul Mediteranei constă din cinci subspecii strâns legate geografic (*A. m. sicula* Montagano, *A. m. ligustica* Spinola, *A. m. cecropia* Kieseewetter, *A. m. macedonica* Ruttner și *A. m. carnica* Pollmann; RUTTNER, 1988). Albina *carnica*, *Apis mellifera carnica* Pollman, este nativă din Slovenia și câteva regiuni din fosta Iugoslavie, sudul Austriei și părți din Ungaria, România și Bulgaria (RUTTNER, 1988). *A. m. carnica* s-a răspândit din zonele sale native în țările din centrul și nordul Europei, SUA și Canada. Cauzele principale ale acestui proces au fost comportamentul blând al *A. m. carnica* față de apicultori, buna producție de miere din primăvară, din vară, bazată pe mana coniferelor.

Analiza mtADN a devenit o abordare larg utilizată în studierea biogeografiei subspeciilor de *A. mellifera*. Trei linii de evoluție a albinelor melifere au fost identificate în urma studierii regiunii COI-COII intens variabile (CORNUET et al., 1991). Variabilitatea în regiunea COI-COII rezultă din suprapunerea variației de lungime (prezența/absența secvenței P, numărul de secvențe Q repetate, posibile mici deficiențe) și din substituirea nucleotidelor. Doar trei haplotipuri (C1 la *A. m. ligustica*, C2a la *A. m. carnica*, Cb2 la *A. m. caucasica*) au fost identificate în cadrul linei filogenetice C (FRANCK et al., 2000) și nici o variație nu a fost observată în cadrul subspeciilor. Mai mult, în studiile genetice despre populația subspeciilor de *A. mellifera* au fost folosite tot mai mult loci de microsatelit cu variabilitate mărită (FRANCK et al., 2000; DE LA RÚA et al., 2001). Structura generală finală a speciilor cu cele trei ramuri evolutive principale, a fost scoasă în evidență tot prin studierea microsateleților (ESTOUP et al., 1995; FRANCK et al., 1988).

Obiectivul studiului de față este caracterizarea și analizarea variabilității genetice a *A. m. carnica* indigene în Slovenia, precum și sesizarea unor posibile căi genetice către sub-populațiile de albine melifere mai mult sau mai puțin înrudite din Europa.

Material și metode

Au fost analizate un total de 323 lucrătoare de albine. Au fost colectate mostre din 269 colonii de albine din întreaga Slovenia. În analiză au mai fost incluse zece mostre de albine *carnica* din Croația, nouă mostre de albine din Cehia, 10 din Grecia (*A. m. macedonica*) și 25 din liniile de albine selectate în programul de creștere din insula Unije, din Croația. Acestea au format grupurile externe (Tabelul I). ADN-ul total a fost extras din capul, toracele și picioarele lucrătoarelor, potrivit protocolului stabilit de BEYE și RAEDER (1993). ADN-ul izolat a fost utilizat pentru ADN-ul mitocondrial și analiza microsateleților. Regiunea mtADN care include gena tARNLeu, regiunea intergenică COI-COII și terminația 5' a genei COII a fost

amplificată folosind protocolul descris de GARNERY et al., (1993). Au fost realizate restricția cu Dral pe 119 mostre și secvențierea a 27 de mostre. Toate mostrele de albine au fost analizate pentru șase loci microsateiți: Ap53 (FRANCK et al., 1999), A7, A24, A88, A43 (ESTOUP et al., 1995) și A8 (FRANCK et al., 1998). Statistica genetica populației a fost calculată cu programul GENETIX (BELKHIR et al., 1999).

Rezultate și discuții

ADN mitocondrial

Cu excepția mostrelor din linia selectată provenită din Franța, toate celelalte mostre au fost caracterizate prin secvențe de mtADN din linia filogenetică C (Tabelul I).

Tabelul I

Detalii ale mostrelor, dimensiunea acestora și haplotipurile de mtADN COI-COII găsite la fiecare populație

| Subspecia | Originea mostrei | N ₁ | N ₂ | Haplotipul COI-COII |
|--------------------------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|
| <i>A. mellifera carnica</i> | Slovenia | 269 | 65 (6) | C2C |
| | Croația | 10 | 10 (2) | C2C |
| | Cehia | 9 | 9 (4) | C1 și C2C |
| <i>A. mellifera macedonica</i> | Grecia | 10 | 10 (3) | C2D |
| Liniiile selectate | | | | |
| Hohen Neuendorf | Germania | 5 | 5 (2) | C2C |
| Buckfast J | Germania | 5 | 5 (3) | C2D |
| Polonia | Polonia | 5 | 5 (3) | C2C |
| K 111 | Austria | 5 | 5 (2) | C1 |
| Toulouse | Franța | 5 | 5 (2) | A8 |
| Total | | 323 | | |

N₁ = numărul de lucrătoare inclus în analiza microsateiților; N₂ = numărul de lucrătoare inclus în analiza mtADN. În paranteză, numărul mostrelor secvențiale.

Toate haplotipurile identificate în studiul de față nu pot fi definite în funcție de cele deja publicate. Au fost detectate două noi haplotipuri ale liniei filogenetice C, deosebindu-se de cele deja descrise numai prin tranzițiile diferite pe siturile polimorfice deja cunoscute (Tabelul II). Populațiile de *A. m. carnica* erau monomorfe, fiind caracterizate prin haplotipul nou identificat, desemnat ca C2C. Mostre din subspecia *A. m. macedonica* au fost găsite de asemenea ca fiind monomorfe pentru noul haplotip C2D.

Tabelul II

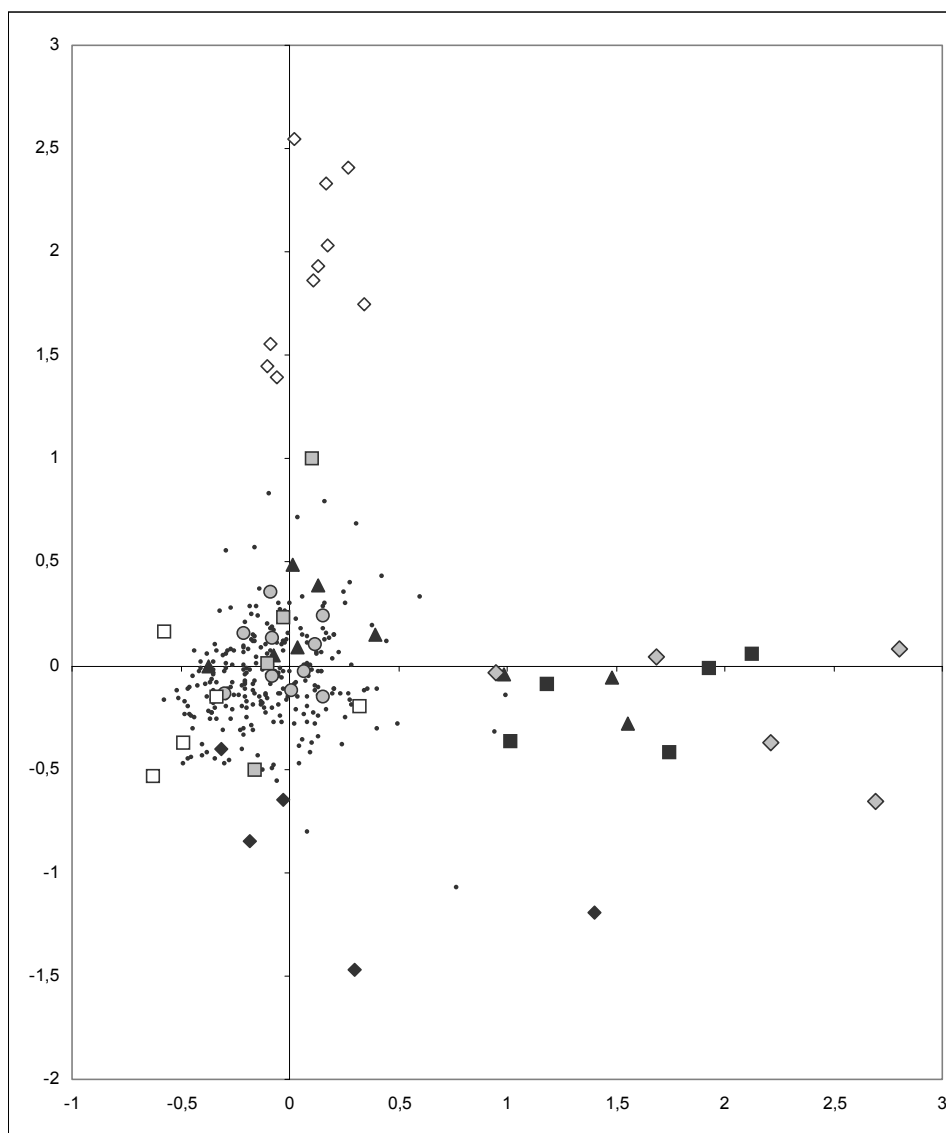
Nucleotidele din cinci poziții variabile deja descrise ale regiunii mtADN COI-COII, diferențiind haplotipurile liniei filogenetice C a *A. mellifera*

| Desemnarea haplotipului | Situl polimorfic | | | | | |
|--|------------------|------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Haplotipurile descrise anterior ale liniei filogenetice C (Franck et al., 2001; J.-M. Cornuet, com. personală) | C1 | CCCC | C | T | T | C |
| | C2A | CCC | A | T | C | T |
| | C2B | CCC | C | A | C | T |
| Desemnarea propusă a haplotipului | | | | | | |
| <i>A. m. carnica</i> (Slo, Cro), "Polonia", "Hohen Neuendorf" | C2C | CCC | C | T | T | C |
| <i>A. m. macedonica</i> ; "Buckfast J" | C2D | CCC | C | T | C | T |
| "K 111" | C1 | CCCC | C | T | T | C |

Microsateiții

Toate cele șase loci microsateiți au fost polimorfe în toate mostrele analizate. Pentru detectarea diferitelor fonduri de bază genetice la toate mostrele analizate, a fost efectuată analiza corespondenței multidimensionale. Potrivit analizei "cluster", nu a fost depistată nici o diferențiere între subpopulațiile din

Slovenia. Este evidentă foarmarea de "cluster" la toate mostrele de *A. m. carnica* din Slovenia și Croația (Figura 1). Mostrele de *A. m. macedonica* au format "clusteri" complet separați și deosebit de omogeni. Albinele din liniile selectate aveau relații diferite față de populațiile native de albine carnica. Structura lor genetică reflectă amestecul controlat al albinelor carnica și al albinelor de altă origine în trecut.



A. m. carnica (Slovenia)
A. m. carnica (Croația)
A. m. carnica (Cehia)
A. m. macedonica
Linia selectată "Hohen Neuendorf"
Linia selectată "Buckfast J"
Linia selectată "Polonia"
Linia selectată "K 111"
Linia selectată "Toulouse"

Figura 1 – Diagrama distribuției tuturor mostrelor de *A. m. mellifera* analizate conform analizei corespondenței

Concluzii

Potrivit rezultatelor analizelor moleculare, populația de albine melifere din Slovenia și Croația pare foarte uniformă, aproape nediferențiată. În consecință, populațiile de *A. m. carnica* din Slovenia și Croația pot fi considerate curat native, fără introducerea altor subspecii sau linii filogenetice.

BIBLIOGRAFIE

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