

GENETISCHE STRUKTUR DER BIENEN AUF DER INSEL KRETA

P. HARIZANIS, Maria BOUGA

Laboratory of Sericulture – Apiculture, Agricultural University of Athens,
75, Iera Odos, 118 55 Athens, GRIECHENLAND
e-mail: mbouga@aua.gr

Resümee

Mithilfe der RFLP-Analyse zweier mtDNS Gensegmente untersuchten wir die genetische Struktur der Honigbienen-Populationen in verschiedenen Zonen der Insel Kreta, die gemäß der morphometrischen Analyse von RUTTNER (1968) der Rasse *Apis mellifera adami* entsprechen.

Untersucht wurden sechzig Proben, die von verschiedenen Bienenköniginnen stammten. Nach der Extrahierung der Gesamt-DNS wurden anhand der PCR-Technik 16 s rDNS (965 bp) und COI (1028 bp) Gensegmente vergrößert. Sieben bzw. sechs Einschränkungsenzyme hatten wenigstens ein Erkennungssit bei 16s rDNS bzw. COI Gensegmente.

Die Intrapopulationsvariation wurde beim Gensegment CO I festgestellt, vom Einschränkungsenzym BstU I verdaut.

Es wurde beobachtet, daß die genetische Struktur dieser Populationen in den letzten zwei Jahrzehnten wahrscheinlich durch die Wanderung und die kommerzielle Bienezucht verändert worden ist. Es scheint, daß auf der Insel Kreta keine reine Population von *Apis mellifera adami* existiert. Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorlaufenden Forschungen ergaben unsere Daten, daß die Honigbiene von Kreta den Honigbienen-Populationen aus anderen Zonen Griechenlands ähnlich ist.

Stichwörter: *Apis mellifera adami*/Honigbiene/mtDNS/genetische Struktur/Griechenland

Einleitung

Traditionellerweise fußt die intraspezifische Taxonomie der Honigbiene (*Apis mellifera*) auf der Morphologie. Gegenwärtig sind aufgrund ihrer morphometrischen Merkmale 26 Subspezies der *Apis mellifera* bekannt (RUTTNER, 1988, 1992; SHEPPARD et al., 1997).

Seit neuester Zeit werden in der Untersuchung der Diversität der Honigbienen genetische Instrumente verwendet, vor allem die Analyse der DNS-Sequenz und die Elektrophorese mit Aloyzym. Die mitochondrielle DNS (mtDNS) besitzt gewisse Eigenschaften, die aus ihr ein beliebtes Instrument in der Systematisierung und Biologie von Populationen machen. Im allgemeinen wird sie auf mütterlicher Linie ohne jedwelchen neuen Kombinationen geerbt. Auf diese Weise können die fremden Haplotypen innerhalb der Populationen ganz genau entdeckt werden. Im Falle der Honigbienen wurde nur die mütterliche Vererbung von mtDNS bewiesen (MEUSEL und MORITZ, 1993). Deswegen besitzen alle Arbeiterinnen und Drohnen eines Bienenvolkes die gleiche mtDNS wie die Bienenkönigin. Trotzdem muß auf gewisse technische Verbesserungen geachtet werden, die mehr oder weniger in der letzten Zeit in der Haltung des Bienenvolkes eingeführt wurden, wie auch auf den Import von Bienenköniginnen aus dem Ausland und der Wanderung.

RUTTNER (1980) beschrieb aufgrund von morphometrischen Untersuchungen die Honigbienen-Populationen auf der Insel Kreta (im Süden des Ägäischen Meeres, Griechenland) als *Apis mellifera adami*. Gemäß RUTTNER (1988) weist *Apis mellifera adami* bedeutende morphologische Ähnlichkeiten mit den Subspezies aus dem Nahen Osten auf. Die aloenzymatische Analyse (BADINO et al., 1988) der Honigbienen-Populationen auf dem griechischen Festland (Thrakien, Mazedonien, Zentralgriechenland und Pelopones) wie auch diejenigen der Bienenpopulationen auf Kreta ergaben, daß in Kreta eine reine Rasse existiert hatte.

In unserer Untersuchung wurden die Honigbienen-Populationen aus verschiedenen Zonen der Insel Kreta, die gemäß der morphometrischen Analyse *Apis mellifera adami* entsprachen (RUTTNER, 1988), mithilfe von RFLP-Analyse von zwei mtDNS-Gensegmenten untersucht.

Unser Ziel war das Studium der genetischen Struktur dieser Populationen, um einerseits festzustellen, ob auf der Insel Kreta tatsächlich eine reine Bienenpopulation bestanden hatte und andererseits, ob eine Übereinstimmung mit der morphometrischen Analyse von RUTTNER (1988) existierte.

Material und Methode

Es wurden Bienenproben aus 60 Bienenvölkern von verschiedenen Orten der Insel Kreta (Chania, Rethymno, Heraklion, Lasithi) genommen (Abb.1). Die Honigbienen-Populationen dieser Zonen entsprechen gemäß der morphometrischen Analyse (RUTTNER, 1988) der Rasse *Apis mellifera adami*.



Abb.1 - Ortschaften der Probenentnahme auf der Insel Kreta: Chania, Rethymno, Heraklion, Lasithi.

Die Proben wurden in lebendigem Zustand ins Labor gebracht und dort bei -80°C bis zur Verwendung bewahrt. Die GesamtDNS wurde gemäß dem von HUNT und PAGE (1992) festgelegten und ein wenig veränderten (BOUGA et al., 2003) Protokoll aus jedem Individuum gewonnen.

Die Variation der mtDNS wurde mit RFLP analysiert. Zwei „Primer“-sätze wurden für die Vergrößerung der Gensegmente 16s rDNS und CO I verwendet. Die beim 16s rDNS-Segment verwendeten „Primer“ waren das Paar 5'-CAACATCGAGGTCGCAAACATC-3' und 3'-AGTTGGGACTATGTTTTCCATG-5' (NIELSEN et al., 1994) und für das Segment CO I das Paar 5'-GATTACTTCTCCCTCATTA-3' und 3'-AATAAGTCTGATAGGTCTAA-5' (NIELSEN et al., 1999). Die Kettenreaktion der Polymerase (PCR) (SAIKI et al., 1988) erfolgte wie von BOUGA et al. (2003) beschrieben. Das gleiche gilt auch für die PCR-Bedingungen. Die vergrößerten mtDNS-Segmente wurden von den Restriktionsenzymen verdaut. Die informativen Restriktionsenzyme, die beim Gensegment 16s rDNS verwendet wurden, sind Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I und Alu I und für das Gensegment CO I: Sau3A I, Fok I, Bcl I, Ssp I, BstU I und Xho I.

Die verdauten Segmente wurden danach elektrophoretisch auf 2% Agarosegel in 0,5X TBE Puffer getrennt, mit Ethidiumbrom gefärbt und in UV Licht visualisiert. Die Dimensionen der DNS-Fragmente wurden mit dem PCR-Marker (Promega), auf dem gleichen Gel aufgetragen, verglichen und mit dem Programm DNAfrag 3.03 (NASH, 1991) errechnet. Abhängig von dem Erscheinen identifizierte ein Buchstabe die verschiedenen Restriktionspattern. Die zusammengesetzten Genotypen eines jeden Individuums wurden danach aufgrund aller Restriktionspattern der zwei mtDNS-Segmente definiert.

Ergebnisse

Die Dimensionen der PCR vergrößerten mtDNS-Segmente aller Populationen betragen 964bp und 1028bp bei 16 srDNS bzw. CO I Gensegmente. Die Tabellen I und II enthalten die Patternfragmente, erzeugt von jedem Restriktionsenzym der zwei mtDNS-Segmente.

Tabelle I

Bewertung der Fragmentdimension (grundlegende Paare) aller Fragmentierungspattern, beobachtet bei mtDNS 16s rDNS Gensegmenten der untersuchten Populationen

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

Einschätzung der Fragmentdimensionen (grundlegende Paare) aller beobachteten Fragmentpattern auf mtDNS und CO I der untersuchten Populationen

	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	—											

Die Intrapopulationsvariation beim CO I Gensegment, verdaut vom Restriktionsenzym BstU I, wurde veranschaulicht (Abb.2).

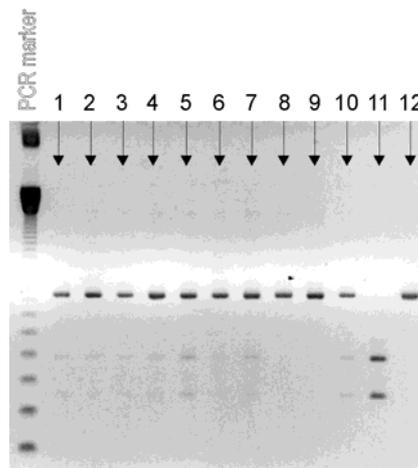


Abb.2 – Restriktionspattern der Fragmente nach Verdauung durch das Enzym BstU I bei den Honigbienenpopulationen von: (1-3) Chania, (4 – 6) Rethymno, (7 – 9) Heraklion, (10 – 12) Lasithi.

Tab. III enthält die zwei Haplotypen (zusammengesetzte Genotypen), die in den untersuchten Populationen entdeckt worden sind (die ordnungsmäßig aufeinanderfolgenden Buchstaben entsprechen der Reihenfolge der Fragmentpattern der Tabellen I und II), die Frequenz der Haplotypen und die Dimensionen der Proben.

Tabelle III

Zusammengesetzte Genotypen (Haplotypen), Frequenz der Haplotypen und Dimensionen der Probe (N) bei allen untersuchten Populationen

Haplotyp	Zusammengesetztes Genotyp	Ortschaften d. Probeentnahme			
		Chania	Rethymno	Heraklion	Lasithi
Typ 1	AAAAAAAAAABA	1.000	1.000	1.000	0.933
Typ 2	AAAAAAAAAAAA				0.067
	N	15	15	15	15

Diskussion

Die Untersuchung von mtDNS ist von größter Bedeutung bei den Honigbienen, da sie der ideale Marker des Bienenvolkes ist – alle Individuen eines Bienenvolkes teilen durch die Vererbung mütterlicherseits den gleichen Haplotyp (Mutationen ausgeschlossen).

Werden die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit denen vorhergehender Arbeiten (BOUGA et al., 2003) verglichen, dann ergibt sich, daß die Honigbienen auf der Insel Kreta genau so sind wie diejenigen aus anderen Zonen Griechenlands; eine Folge vielleicht des Ankaufs von Bienenköniginnen aus diesen Zonen. Die Ergebnisse der klassischen morphometrischen Analyse (HARIZANIS et al., 2001) der gleichen Proben und der Vergleich mit den Bienen Makedoniens (Norden Griechenlands) ergaben keine statistisch kennzeichnende Differenzen zwischen diesen Populationen. Das Studium, das auf der

geometrischen morphometrischen Analyse beruhte (HATJINA et al., 2002), ergab eine niedrige Variabilität der Honigbienen Kretas.

Unsere Ergebnisse zeigten, daß es nur einen einzigen Haplotyp der Bienen von Kreta gibt. Es scheint, daß dieser Haplotyp das Ergebnis des Imports von ausländischen Bienenköniginnen oder der Existenz der reinen Rasse *Apis mellifera adami* ist.

Es kann auch sein, daß sich die genetische Struktur der Honigbienen-Populationen durch die Wanderung und der kommerziellen Bienenzucht im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte verändert hat und daß unsere Daten mit denen der morphometrischen Analyse RUTTNERs (1988) über die Existenz von *Apis mellifera adami* nicht übereinstimmen.

Danksagung

Die Verfasser danken dem Landwirtschaftsministerium Griechenlands und der Europäischen Gemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Forschung gemäß der Bestimmung des Beschlußrates (CE) Nr. 122/97.

L I T E R A T U R

- 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 (in Vorbereitung)
- 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 Druck)
- 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., Gusmán-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.