

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПЧЕЛ, ОБИТАЮЩИХ НА ОСТРОВЕ КРИТ, ГРЕЦИЯ

П. ХАРИЗАНИС, Мария БУГА, ГРЕЦИЯ

P. HARIZANIS, Maria BOUGA

Laboratory of Sericulture - Apiculture, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos, 118 55, Athens, GREECE

E-mail: mbouga@aau.gr

### Аннотация

Генетическая структура популяций медоносной пчелы, обитающих в различных зонах острова Крит, Греция, принадлежащих *Apis mellifera adami* (по морфометрическому анализу РУТТНЕРА, 1988) нами исследованы с помощью анализа RFLP двух сегментов генов мтДНК.

Исследованию подвергнуты 60 проб, взятых от разных маток. Экстрагирована общая ДНК, а потом сегменты гена 16s рДНК (965 bp) и CO I (1028 bp) были преувеличены с помощью PCR. Семь и, соответственно, шесть ферментов ограничения имели не менее одного сайта опознавания у сегментов гена 16s рДНК и, соответственно, CO I.

Внутрипопуляционная вариация отмечена у сегмента гена CO I, перевариваемого с помощью фермента ограничения BstU I.

Обнаружено, что по всей вероятности, генетическая структура этих популяций модифицирована из-за кочевки и коммерческого разведения пчел в течение последних двух десятилетий. Предполагаем, что на острове Крит нет чистых популяций *Apis mellifera adami*. Наши данные, сравнительно с данными предыдущих исследований, показывают, что медоносная пчела, обитающая на острове Крит, подобна популяциям пчел, обитающих в других зонах Греции.

**Ключевые слова:** *Apis mellifera adami* / медоносная пчела / мтДНК / генетическая структура / Греция

### Введение

Традиционно, внутриспецифичная таксономия медоносной пчелы *Apis mellifera* основывалась на морфологии. В настоящее время признаны 26 подвидов *Apis mellifera* на основе их морфометрических признаков (РУТТНЕР, 1988, 1992; ШЕППАРД с сотр., 1997).

В последнее время генетические инструменты, главным образом, анализ единицы ДНК и электрофорез алозимом применены для исследования разнообразности медоносной пчелы. Митохондриальная ДНК (мтДНК) располагает определенными свойствами, благодаря чему она предпочитается в систематике и биологии популяций. Вообще она передается наследственно по материнской линии без рекомбинирования. Следовательно, она позволяет точно обнаруживать чужеродные хаплотипы внутри популяций. У медоносных пчел продемонстрирована передача по наследству только по материнской линии (МОЙЗЕЛЬ и МОРИЦ, 1993). Таким образом, все рабочие пчелы и все трутни одной семьи имеют такую же мтДНК, как и матка. Однако, следует иметь в виду ряд технических улучшений ухода за пчелами ульями, например импорт маток из-за рубежа и применение кочевки.

На основе морфометрических исследований, обитающие на Крите (южное Эгейское море, Греция) популяции медоносных пчел описаны РУТТНЕРОМ (1980) как *Apis mellifera adami*. По РУТТНЕРУ (1988) *Apis mellifera adami* представляет морфологические сходства с подвидами, обитающими на Ближнем Востоке. Алоэнзиматический анализ (БАДИНО с сотр., 1988) популяций медоносных пчел, обитающих в континентальной Греции (Македония, Центральная Греция, Фракия и Пелопоннес), а также на Крите, показали, что на острове Крит обитала чистая порода.

В нашей работе, популяции медоносных пчел *Apis mellifera adami* различных зон острова Крит (РУТТНЕР, 1988) исследованы с помощью анализа RFLP двух сегментов гена мтДНК.

Цель нашей работы – изучение генетической структуры этих популяций для обнаруживания, имеется ли ныне на Крите чистая порода пчел и какое-нибудь совпадение с морфометрическим анализом РУТТНЕРА (1988).

### Материал и методика

Были взяты пчелы из 60 пчелиных семей, обитающих в разных зонах Крита (Чания, Ретимно, Гераклио, Ласити). Места взятия проб представлены на рис. 1. Популяции медоносных пчел этих зон соответствуют, по морфометрическому анализу РУТТНЕРА (1988) *Apis mellifera adami*.

Пробы транспортированы живыми до лаборатории; их хранили при –80 °С. От каждой пчелы экстрагировали общую ДНК по протоколу ХУНТА и ПЕЙДЖА (1992), после незначительных изменений (БУГА с сотр., 2003).

Вариация митохондриальной ДНК анализирована RFLP. Использованы две партии "primer" для увеличения сегментов генов 16s рДНК и CO I. Использованные "primer" для сегмента 16s рДНК были пара 5'-СААСАТСГАГГТСГСААААТС-3' и 3'-АГТТГГГГАСТАТГТТТТССАТГ-5' (НИЛЬСЕН с сотр., 1994), а для сегмента CO I – пара 5'-ГАТТАСТТССТССТКАТТА-3' и 3'-ААТААГТСТГАТАГГТСТАА-5' (НИЛЬСЕН с сотр., 1999). Реакция полимеразы (PCR) (САИКИ с сотр., 1988) получена, как она описана БУГА с сотр. (2003). Увеличенные сегменты мтДНК переварили

энзимами ограничения. Применяемые информационные энзимы ограничения для сегмента гена 16s гДНК были Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I и Alu I, а для сегмента гена CO I, были Sau3A I, Fok I, Bcl I, Ssp I, BstU I и Xho I.

Переваренные сегменты были затем сепарированы электрофоретически на гелях агароза 2% в буфере 0,5XTBE, окрашенном бромидом этидия. Размеры фрагментов ДНК сравнены с маркером PCR (Promega), применяемым на том же геле. Они определены программой ДНК frag 3,03 (Nash, 1991). Буква, в порядке появления, идентифицировала различные модели ограничения. Генотипы для каждой особи были затем определены из всех моделей ограничения двух сегментов мтДНК.



Рис. 1 Места взятия проб пчел на Крите: Чания, Ретимно, Гераклио, Ласити

## Результаты

Размеры сегментов мтДНК, увеличенные PCR определены как 964 bp и 1928 bp для сегментов гена 16s гДНК и, соответственно CO I. Семь и шесть энзимов ограничения занимали не менее одного места обнаруживая на сегментах 16s гДНК и, соответственно CO I. Модели фрагментирования, производимые каждым энзимом ограничения для двух сегментов мтДНК представлены в таблицах I и II.

Таблица I

Размеры фрагментов всех моделей фрагментирования на сегментах генов мтДНК 16s гДНК

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

Таблица II

Размеры фрагментов всех моделей фрагментирования на сегментах генов мтДНК CO I

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	—											

Внутрипопуляционная вариация сегмента гена CO I, переваренного энзимом ограничения BstU I показана на рис. 2

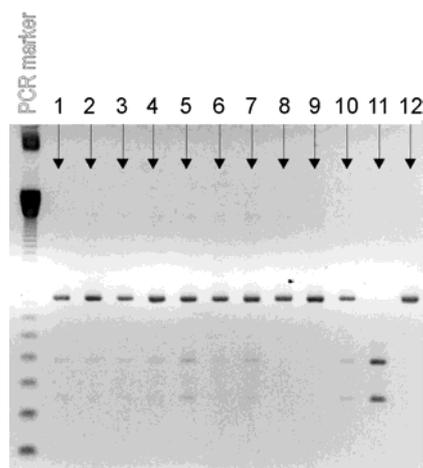


Рис. 2 – Модели ограничения фрагментов после переварения энзимом *BstU I* у популяций медоносных пчел в Чания (1-3), Ретимно (4-6), Гераклио (7-9), Ласити (10-12).

Два гаплотипа, обнаруженные в исследованных популяциях, частота гаплотипов и размер пробы представлены в таблице III.

Таблица III

**Хаплотипы, их частота и размер пробы (N) у всех исследованных популяций**

Хаплотип	Генотип	Местность			
		Чания	Ретимно	Гераклио	Ласити
Тип 1	AAAAAAAAAABA	1.000	1.000	1.000	0.933
Тип 2	AAAAAAAAAAAA				0.067
	N	15	15	15	15

**Дискуссии**

Изучение мтДНК представляет особый интерес в случае медоносной пчелы так как она является идеальным маркером для семьи – все особи семьи имеют тот же гаплоид (за исключением мутаций), согласно материнскому наследству.

Результаты настоящей работы, сравненные с результатами предыдущих работ (БУГА с сотр., 2003) показывают, что медоносные пчелы, обитающие на острове Крит подобны пчелам, обитающим в других зонах Греции. Это может быть результатом импорта маток из этих зон. Результаты классического морфометрического анализа (ХАРИЗАНИС с сотр., 2001), проведенные в случае этих же проб и сравненные с результатами изучения пчел из Македонии (север Греции) показали, что нет достоверных статистических различий между этими популяциями. Исследование с помощью геометрического морфометрического анализа (ХАТЖИНА с сотр., 2002) показали, что имеется невысокая вариабельность у медоносных пчел, обитающих на Крите.

Наши результаты выявляют, что имеется уникальный гаплотип у пчел, обитающих на Крите, в том, что касается частоты низких значений. Оказывается, что этот гаплоид является результатом импорта иностранных маток или существования чистой породы *A.m. adami*.

Возможно, что генетическая структура популяции медоносной пчелы модифицировалась из-за кочевки и коммерческого разведения пчел в течение последних двух десятилетий. Наши данные совпадают с данными морфометрического анализа РУТТНЕРА (1988) в том, что касается существования породы *A.m. adami*.

**Выражение благодарности**

Авторы благодарят Министерству сельского хозяйства Греции и Европейскому Сообществу за финансовую поддержку, оказанную для проведения данного исследования, согласно Решению Совета Регламентирования Но 1221/97.

ЛИТЕРАТУРА

- 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 Macedonica (*Apis mellifera macedonica*), 9<sup>th</sup> 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 7<sup>th</sup> 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), DNAsfrag, 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