

STRUCTURA GENETICĂ A ALBINELOR DIN INSULA CRETA (GRECIA)

P. HARIZANIS, Maria BOUGA

Laboratory of Sericulture - Apiculture, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos, 118 55, Athens, GRCIA
E-mail: mbouga@aau.gr

Rezumat

Structura genetică a populațiilor de albine melifere din diferite zone ale insulei Creta (Grecia) și anume *Apis mellifera adami* (conform analizei morfometrice a lui RUTTNER, 1988) a fost studiată cu ajutorul analizei RFLP a două segmente de gene mtADN.

Șaizeci de mostre au fost studiate, fiind prelevate de la măști diferite. A fost extras ADN total, iar ulterior segmentele de genă 16s rADN (965 bp) și CO I (1028 bp) au fost amplificate cu ajutorul PCR. Șapte respectiv șase enzime de restricție au avut cel puțin un sit de recunoaștere la segmentele de genă 16s rADN respectiv CO I.

Variația intrapopulație a fost evidențiată în ce privește segmentul de genă CO I, digerat cu ajutorul enzimei de restricție BstU I.

S-a constatat că din cauza transumanței și a creșterii comerciale de albine structura genetică a acestor populații ar fi putut fi modificată în decursul ultimelor două decenii. Se pare că pe insula Creta nu mai există populații pure de *Apis m. adami*. Datele noastre, comparate cu cele din cercetările anterioare, arată că albina meliferă din Creta pare să fie similară cu populațiile de albine melifere din alte zone ale Greciei.

Cuvinte cheie: *Apis mellifera adami* / albina meliferă / mtADN / structură genetică / Grecia

Introducere

În mod tradițional, taxonomia intraspecifică a albinei melifere (*Apis mellifera*) s-a bazat pe morfologie. În prezent, pe baza caracterelor morfometrice sunt recunoscute 26 de subspecii de *A. mellifera* (RUTTNER, 1988, 1992; SHEPPARD et al., 1997).

Mai recent, instrumentele genetice, cu precădere analiza secvenței ADN și electroforeza cu alozimă, au fost aplicate la studiul diversității albinei melifere. ADN-ul mitocondrial (mtADN) posedă anumite proprietăți, care fac din el un instrument favorit în sistematica și biologia populațiilor. El este, în general, moștenit pe linie maternă, fără recombinare. Ca atare, el permite detectarea precisă a haplotipurilor străine în interiorul populațiilor. Numai moștenirea maternă a mtADN a fost demonstrată la albinele melifere (MEUSEL și MORITZ, 1993), astfel, toate lucrătoarele și toți trântorii dintr-o colonie împărtășesc același mtADN ca și matca. Totuși, trebuie să se țină seama de anumite îmbunătățiri tehnice, introduse mai mult sau mai puțin recent în întreținerea coloniei, cum ar fi importul de măști din străinătate și practicarea transumanței.

Pe baza cercetărilor morfometrice, populațiile de albine melifere din Creta (Marea Egee de Sud, Grecia), au fost descrise de RUTTNER (1980) ca fiind *Apis mellifera adami*. Potrivit lui RUTTNER (1988), *Apis m. adami* prezintă similarități morfologice accentuate cu subspeciile din Orientul Apropiat. Analiza aloenzimatică (BADINO et al., 1988) a populațiilor de albine melifere din Grecia continentală (Tracia, Macedonia, Grecia centrală și Peloponez), precum și a celor din insula Creta arată că în Creta a existat o rasă pură.

În cercetarea noastră, populațiile de albine melifere din diferite zone ale insulei Creta, corespunzând lui *Apis m. adami* potrivit analizei morfometrice (RUTTNER, 1988), au fost studiate cu ajutorul analizei RFLP a două segmente de genă mtADN.

Obiectivul nostru a fost studierea structurii genetice a acestor populații, pentru a descoperi dacă mai există în Creta o rasă pură de populații de albine, precum și dacă există vreo coincidență cu analiza morfometrică a lui RUTTNER (1988).

Materiale și metode

Au fost colectate albine din 60 de colonii din diferite zone ale Cretei (Chania, Rethymno, Heraklion și Lasithi). Locurile de prelevare a mostrelor sunt prezentate în Figura 1. Populațiile de albine melifere din aceste zone corespund rasei *A.m. adami*, potrivit analizei morfometrice (RUTTNER, 1988).

Mostrele au fost transportate vii în laborator și depozitate la -80°C până la utilizare. ADN-ul total a fost extras de la fiecare individ, potrivit protocolului stabilit de HUNT și PAGE (1992), cu unele modificări minore (BOUGA et al., 2003).



Figura 1 – Locurile de prelevare de mostre din Creta: Chania, Rethymno, Heraklion, Lasithi

Variația ADN-ului mitocondrial a fost analizată prin RFLP, realizată pe produse amplificate prin PCR. Două seturi de amorse au fost utilizate pentru amplificarea segmentelor de gene 16s rADN și CO I. Amorsele utilizate pentru segmentul 16s rADN au fost perechea 5'-CAACATCGAGGTCGAAACATC-3' și 3'-AGTTGGGACTATGTTTTCCATG-5' (NIELSEN et al., 1994), iar pentru segmentul CO I – perechea 5'-GATTACTTCCTCCCTCATTA-3' și 3'-AATAAGTCTGATAGGTCTAA-5' (NIELSEN et al., 1999). Reacția în lanț a polimerazei (PCR) (SAIKI et al., 1988) a fost realizată așa cum este descrisă de BOUGA et al., (2003), ca și condițiile PCR.

Segmentele de mtADN amplificate au fost digerate cu enzime de restricție. Enzimele informative de restricție utilizate pentru segmentul de genă 16s rADN au fost Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I și Alu I, iar pentru segmentul de genă CO I au fost Sau3A I, Fok I, Bel I, Ssp I, BstU I și Xho I.

Segmentele digerate au fost ulterior separate electroforetic pe geluri de agaroză 2%, în tampon de 0,5X TBE, colorate cu bromură de etidiu și vizualizate în lumină UV. Dimensiunile fragmentelor de ADN au fost comparate cu marcatorul PCR (Promega), aplicat pe același gel și au fost calculate folosind programul DNAfrag 3.03 (NASH, 1991). O literă, în ordinea apariției, a identificat diferitele modele de restricție. Genotipurile compuse ale fiecărui individ au fost, ulterior definite în baza tuturor modelelor de restricție ale celor două segmente de mtADN.

Rezultate

Dimensiunile segmentelor de mtADN, amplificate prin PCR, ale tuturor populațiilor au fost 964bp și 1928bp pentru segmentele de genă 16s rADN respectiv CO I. Șapte și șase enzime de restricție au avut cel puțin un loc de recunoaștere pe segmentele amplificate 16s rADN respectiv CO I. Tabelele I și II conțin modelele de fragmentare produse de fiecare enzimă de restricție pentru cele două segmente de mtADN.

Tabelul I

Estimarea dimensiunii fragmentelor (în perechi de bază) a tuturor modelelor de fragmentare observate pe segmentele de genă mtADN 16s rADN la populațiile studiate

		16s rADN											
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	—

Tabelul II

Estimarea dimensiunii fragmentelor (în perechi de bază) a tuturor modelelor de fragmentare pe segmentele de genă de mtADN CO I la populațiile studiate

	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	—											

Variația intrapopulație a fost relevată, în privința segmentului de genă CO I, digerat cu enzima restrictivă BstU I, după cum arata Figura 2.

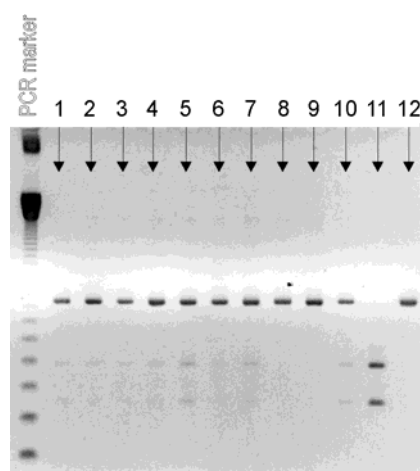


Figura 2 – Modelele de restricție ale fragmentelor după digerarea cu enzima BstU I la populațiile de albine melifere din (1-3) Chania, (4-6) Rethymno, (7-9) Heraklion, (10-12) Lasithi

Cele două haplotipuri (genotipuri compuse) detectate în populațiile studiate (literele, în ordine corespund aceleiași ordini a modelelor de fragmentare prezentate în tabelele I și II), frecvențele haplotipurilor și dimensiunea mostrei fiind prezentate în Tabelul III.

Tabelul III

Genotipurile compuse (haplotipuri), frecvența haplotipurilor și dimensiunea mostrei (N) la toate populațiile studiate

Haplotipul	Genotipul compozit	Localitatea de origine a mostrei			
		Chania	Rethymno	Heraklion	Lasithi
Tipul 1	AAAAAAAAAABA	1.000	1.000	1.000	0,933
Tipul 2	AAAAAAAAAAAA				0,067
	N	15	15	15	15

Discuții

Studierea mtADN este de interes particular în cazul albinelor melifere, deoarece este marcatorul ideal pentru colonie – toți indivizii coloniei împărtășesc același haplotip (cu excepția mutațiilor), conform cu moștenirea maternă.

Rezultatele studiului de față, comparate cu rezultatele lucrărilor anterioare (BOUGA et al., 2003) indică că albinele melifere din insula Creta arată la fel ca albinele melifere din alte zone ale Greciei, fapt care poate fi rezultatul "Importului" de mătcă din aceste zone. Rezultatele analizei morfometrice clasice

(HARIZANIS et al., 2001) ale aceluiași mostre și compararea cu cele ale albinelor melifere din Macedonia (nordul Greciei) au arătat că nu există diferențe statistice semnificative între aceste populații. Studiul bazat pe analiza morfometrică geometrică (HATJINA et al., 2002) arată că există o variabilitate redusă la albinele melifere din Creta.

Rezultatele noastre indică că există un haplotip unic la albinele melifere din Creta, în ce privește frecvența cu valoare joasă. Se pare că acest haplotip este rezultatul importului de măci străine sau al existenței rasei pure de *Apis m. adami*.

În general, se poate ca în cursul ultimelor două decenii structura genetică a populației de albine melifere să se fi modificat din cauza apiculturii transhumante și a creșterii comerciale. Se pare că datele noastre nu coincid cu cele ale analizei morfometrice a lui RUTTNER (1988) în ceea ce privește existența rasei *Apis m. adami*.

Mulțumiri

Autorii aduc mulțumiri Ministerului grec al agriculturii și Uniunii europene pentru sprijinul financiar acordat acestei cercetări, conform hotărârii Consiliului de reglementare (CE) 1221/97.

BIBLIOGRAFIE

- 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 Macedonia (*Apis mellifera macedonica*), 9th National Entomological Meeting, Hellenic Entomological Society, Ioannina, 13-16 November 2001, (sub tipar)
- 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