

LA VARIATION MORPHOMÉTRIQUE, ALLOZYMIQUE ET MTDNA CHEZ LES POPULATIONS D'ABEILLES (*APIS MELLIFERA CYPRIA*, POLLMAN 1879) DU NORD DU CHYPRE

İrfan KANDEMİR, Turquie, email: irfankandemir@hotmail.com^{1,2}

Marina D. Meixner, Allemagne^{1,3}

Ayca OZKAN, Turquie²

Steve W. Sheppard, États-Unis¹

¹Department of Entomology, Washington State University, Pullman WA, États-Unis

²Department of Biology, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, Turquie

³Institut für Bienenkunde, 2 Karl von Frisch Weg, 61444 Oberursel, Allemagne

Résumé

On a examiné la variabilité morphométrique, allozymique et mtDNA chez les populations d'*Apis mellifera cypria* du nord du Chypre. On a analysé six populations (40 colonies) en employant 39 caractères morphométriques. On a testé les zones de mtDNA, Cytochrome B et Carboxyl Oxydase pour détecter les profils de l'enzyme de restriction Bgl II et Hinf I et le polymorphisme de la longueur du segment de restriction Dra I de la zone intergénique COI-COII. La région mitochondriale ND2 a été divisée en séquences et comparée avec les séquences publiées appartenant à d'autres espèces. Un nombre supplémentaire de 55 colonies des mêmes localités, dont on a ultérieurement prélevé des spécimens, a été étudié pour la variation allozymique, en employant des systèmes de six enzymes. On a détecté des niveaux très basses de la variation allozymique, avec une hétérozygotie de 0.006 ± 0.005 . L'analyse de toutes les zones mtDNA a confirmé l'origine européenne des populations d'abeilles mellifères du nord du Chypre. Les profils de digestion identifiés au nord du Chypre ont été les mêmes que pour les abeilles mellifères de l'est de l'Europe. La zone intergénique COI-COII possède seulement la séquence Q, et les profils de digestion correspondent au haplotype C1. Pourtant, l'analyse des données morphométriques situe les abeilles mellifères du nord du Chypre dans la lignée morphologique orientale, en même temps avec *A. m. anatoliaca*, *A. m. meda*, *A. m. syriaca*, et *A. m. caucasica*. L'arbre phylogénétique, construit à base des données de la séquence ND2, situe les abeilles de Chypre dans la lignée mitochondriale C qui inclut en même temps la lignée morphologique C et O.

Mots-clés: Chypre, variation génétique, *Apis mellifera cypria*

Introduction

L'abeille mellifère de Chypre (*A. m. cypria*, Pollmann 1879) est un autre exemple de sous-espèce insulaire, tout comme *A. m. ruttneri* en Malte, *A. m. adami* en Crète, *A. m. sicula* en Sicile. Comme d'autres sous-espèces insulaires, les abeilles de Chypre sont de petites dimensions, mais leur aspect exotique leur a valu une bonne réception de la part des apiculteurs d'autresfois. (RUTTNER, 1988).

Dans ses études morphométriques, RUTTNER (1992) a placé les abeilles mellifères de Chypre dans la branche orientale, avec *A. m. anatoliaca*, *A. m. syriaca*, *A. m. meda*, *A. m. caucasica*. Comme on peut s'attendre vu sa position géographique, *A. m. cypria* ressemble à ses voisines. Elles sont presque égales à *A. m. anatoliaca* (74.6), *A. m. syriaca* (69.8), et à *A. m. meda* (87.3). Comparées avec *A. m. anatoliaca*, les abeilles cypristes sont plus petites que celles anatoliennes. Pour ce qu'il y a de la dimension du corps, elles ont la trompe et les pattes plus longues, mais les ailes sont plus courtes. Dans la branche orientale, elles ont l'abdomen le plus long et le plus svelte (Index St6 84,6). L'indice cubital est très élevé chez les abeilles de Chypre (2.72). La caractéristique la plus remarquante des abeilles cypristes est la couleur de l'abdomen. Les abeilles de Chypre et de Syrie ont le même type de modèle du coloris, considéré comme proche de l'abeille égyptienne (*A. m. lamarkii*, l'ancienne *A. m. fasciata*) (Br. ADAM, 1983). S'il s'agit des caractéristiques comportementales, les abeilles de Chypre ressemblent beaucoup à *A. m. anatoliaca*, car elles sont très agressives et ont la tendance d'essaimer facilement (Br. ADAM, 1983).

Malgré le fait d'être une sous-espèce insulaire, on a remarqué qu'*A. m. cypria* possède une variation morphométrique élevée (RUTTNER, 1988). L'introduction récente d'abeilles de Turquie au nord du Chypre peut avoir entraîné certaines modifications de nature morphométrique et l'on pourrait se demander combien de ces introductions de date récente ont affecté les colonies d'abeilles du nord du Chypre. De même, il n'y a non plus des études détaillées sur la variation allozymique et génétique au niveau du DNA.

Pour continuer d'aborder ces problèmes liés à la variation génétique d'*A. m. cypria* et à son rapport avec la lignée O, on a procédé à un prélèvement détaillé de spécimens. Dans cette étude, on communique les résultats de l'analyse complète du mtDNA, de la morphométrie et des allozymes chez l'abeille de Chypre, *A.m. cypria*.

Matériel et méthodes

Un total de 40 colonies ont été soumises au prélèvement de spécimens dans 6 locations du nord du Chypre. Les spécimens ont été préservés en 90% éthanol en vue de l'analyse morphométrique et mtDNA. On a collecté en plus, des spécimens de 55 colonies de la zone montagnarde, et on les a congelés ensuite pour déterminer la variation biochimique chez les populations d'abeilles du nord du Chypre.

L'analyse morphométrique: Un nombre total de 18 colonies a été soumis à l'analyse morphométrique. Entre 11-15 ouvrières par spécimen ont été disséquées et mesurées pour 39 caractères morphométrique selon RUTTNER et al. (1978). La plupart des caractères a été mesurée à l'aide d'une caméra CCD, en utilisant un programme de mesurage morphométrique (MEIXNER et MEIXNER, 1994). La pigmentation et la pilosité ont été mesurées avec un microscope de dissection et avec un micromètre oculaire. L'analyse statistique a été réalisée en employant des spécimens de référence de la base de données de l'Institut für Bienenkunde, Oberursel.

L'analyse des allozymes: Après l'analyse préliminaire, on a prélevé des spécimens d'un nombre supplémentaire de 55 colonies de la zone montagnarde, en vue de déterminer la variation allozymique. La variabilité dans six systèmes d'enzymes (*Pgm-1* et *Pgm-2*, *Hk*, *Mdh*, *Me*, *Est*, et *Pgi*) a été utilisée comme décrit en haut (KANDEMIR et KENCE, 1995). Les fréquences des gènes, la somme des paramètres de la variation génétique et les déviations de l'équilibre Hardy-Weinberg ont été déterminées en employant le programme BIOSYS-1 (SWOFFORD et SELANDER, 1981).

L'analyse DNA: Le nombre total d'acides nucléiques a été extrait de 40 colonies suivant les méthodes décrites par SHEPPARD et McPHERON (1991). L'extraction a compris le protocole d'extraction phénol-chloroforme, mis au point pour une grande quantité de mtDNA circulaire intact. Les extraits de DNA ont été stockés à -80°C . Pour l'analyse mtDNA, les régions intragéniques *COI*, *Cyt B* et *COI-COII* ont été amplifiées par la réaction en chaîne de la polymérase et digérés avec *Hinf-I*, *Bgl II*, et *Dra-I* respectivement, suivant les recommandations du producteur (Tableau 1). Des fragments de gel pour les digestions *Hinf-I* et *Bgl II* ont été séparés en un gel contenant 2.5% d'agarose, ayant 1% d'agarose standard BIO-RAD et 1.5% d'agarose Nu-Sieve. Les fragments de digestion restrictive *Dra-I* ont été toutesfois séparés en gels de polyacrylamide 10% et 7.5%. Ensuite, les gels ont été colorés avec de la bromure d'éthidium et photographiés pour la documentation dans une lumière UV.

Table 1

Les zones de mtDNA, les paires d'amorce et les enzymes de restriction utilisés

Zones	Paires d'amorce	Enzyme de restriction	Références
COI-F COI-R	5'-TTAAGATCCCCAGGATCATG-3' 5'-TGCAAATACTGCACCTATTG-3'	<i>Hinf-I</i>	Sheppard et al., 1994
Cyt B- F Cyt B- R	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'	<i>Bgl-II</i>	Sheppard et al., 1994
COI-COII- E2 COI-COII-H2	5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3' 5'-CAATATCATTGATGACC-3'	<i>Dra-I</i>	Garnery et al., 1993

ND2-ILE
ND2-L1

5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3'
5'-GAATCTAATTAATAAAAAA-3'

Arias and
Sheppard, 1996

Résultats

La morphométrie: Les résultats préliminaires ont mis en évidence le fait que les abeilles de Chypre faisaient partie de la branche orientale. Tous les spécimens de Chypre ont été groupés avec les sous-espèces *anatoliaca*, *syriaca*, et *caucasica*. *A. m. lamarkii* a été la sous-espèce la plus proche de cette grappe (Figure 1).

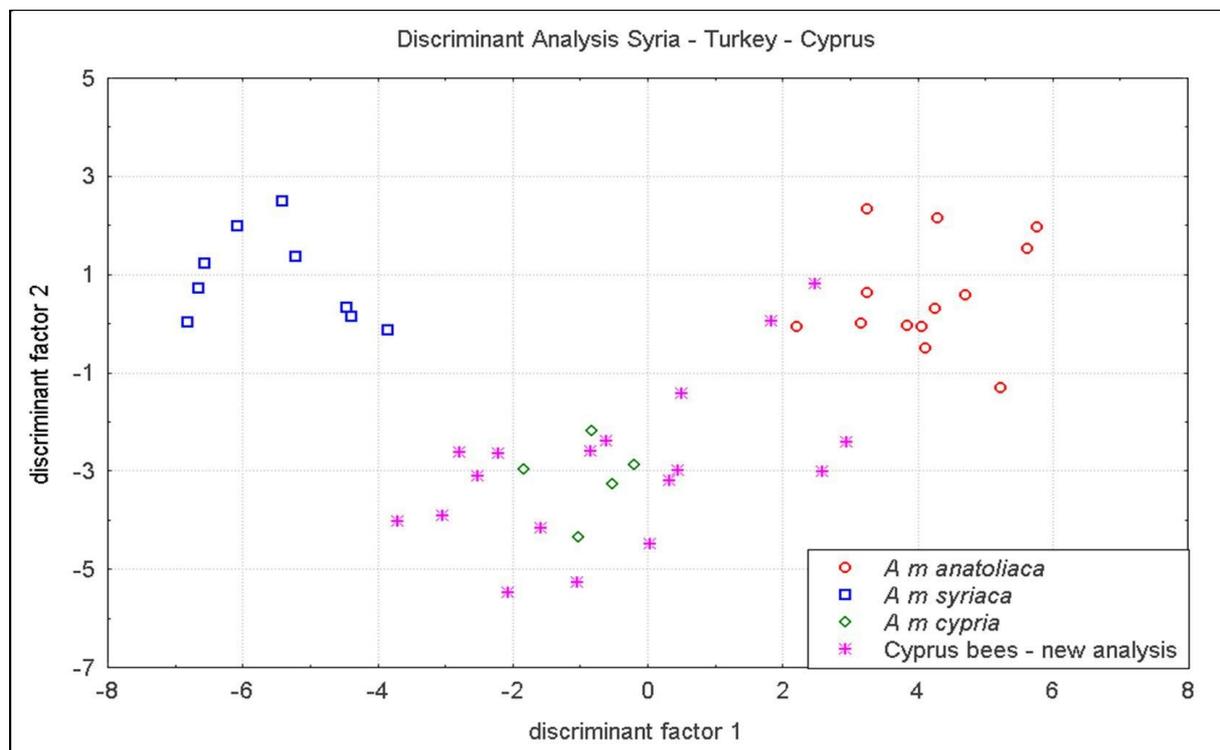
Allozymes: Chez les populations d'abeilles du nord du Chypre, du total de six enzymes testés pour la variation biochimique, quatre ont été mis en évidence comme étant polymorphiques. Tous les systèmes enzymatiques étaient dans l'état d'équilibre Hardy-Weinberg ($P > 0.05$). L'hétérozygotie totale chez les abeilles du nord du Chypre a été calculée comme étant de 0.006 ± 0.005 .

mtDNA:

La zone CO-I: La restriction de la zone *COI* avec l'enzyme restrictif *Hinf I* n'a produit aucun fragment de restriction. Toutes les colonies présentaient le même type de fragment non digéré sur un gel d'agarose, tout comme la lignée C de l'est de la Méditerranée.

La zone Cyt B: La digestion de cette région a mené à l'apparition de deux fragments, ce qui représente un site de diagnostic pour les abeilles mellifères européennes. Toutes les colonies de Chypre présentent ce site, indiquant ainsi qu'elles font partie de la lignée C de mtDNA.

La zone COI-COII: On n'a identifié aucune variation génétique dans cette zone. Le produit amplifié avec PCR a montré que cette région consiste seulement dans la séquence Q, comme trouvé dans toutes les lignées C. La digestion avec l'enzyme de restriction *Dra-I* n'a produit aucune variation. Elles présentent toutes le même type de profils de digestion restrictive.



(en haut) L'analyse discriminatoire Syrie – Turquie – Chypre

(verticalement) Le facteur discriminant 2
(en bas) Le facteur discriminant 1

Fig. 1. - L'analyse factorielle d'*A.m. anatoliaca*, *A.m. syriaca*, *A.m.cypria* (spécimens de référence d'Oberursel) et spécimens du nord du Chypre.

La division en séquences ND2:

Le gène ND2 du DNA mitochondrial a été divisé en séquences dans les deux directions, en employant les amorces ILE et L1. Un total de 650 bp lisibles a été combiné avec d'autres séquences ND2, stockées dans la banque de gènes, et on les a utilisées dans l'analyse phylogénétique. Trois grappes principales ont été visualisées dans l'arbre phylogénétique construit par l'annexion des voisins. Les lignées (origines) A, C et M se sont clairement distinguées, et la lignée O a été insérée dans la lignée A. Parmi ces lignées, les colonies de Chypre ont été placées dans la lignée C (Figure 2).

Discussion

La morphométrie:

Dans la plupart des cas, une claire allocation des abeilles du nord du Chypre aux spécimens classifiés comme *A. m. cypria* de la collection de référence, a résulté de l'analyse morphométrique (Figure 1). Comme attendu, les abeilles du nord du Chypre se sont réunies en grappes avec la sous-espèce de la lignée O. Un nouveau set d'abeilles a montré que les abeilles de Chypre continuent à maintenir leur structure morphométrique, anticipant l'effet de la récente introduction, comme on a pu remarquer dans l'analyse factorielle (Figure 1). Parmi les abeilles collectées dans la partie nordique du Chypre (dans les livades d'agrumes), il y a eu quelques colonies plus proches d'*A. m. anatoliaca*, chose peu surprenante. Seulement trois des spécimens – tous provenant de la pratique de l'apiculture moderne – ont été désignés dans l'analyse comme *A. m. anatoliaca*, devant probablement être attribués aux colonies importantes du nord du Chypre continental. Ainsi, compte tenu de ces résultats, on peut conclure que la population d'abeilles de cette île se trouve encore, dans une très grande mesure, dans la forme initiale. Aussi, cette analyse montre-t-elle qu'*A. m. cypria* ressemble d'avantage à *A. m. syriaca* et à *A. m. anatoliaca* qu'à *A. m. adami* et *A. m. meda*.

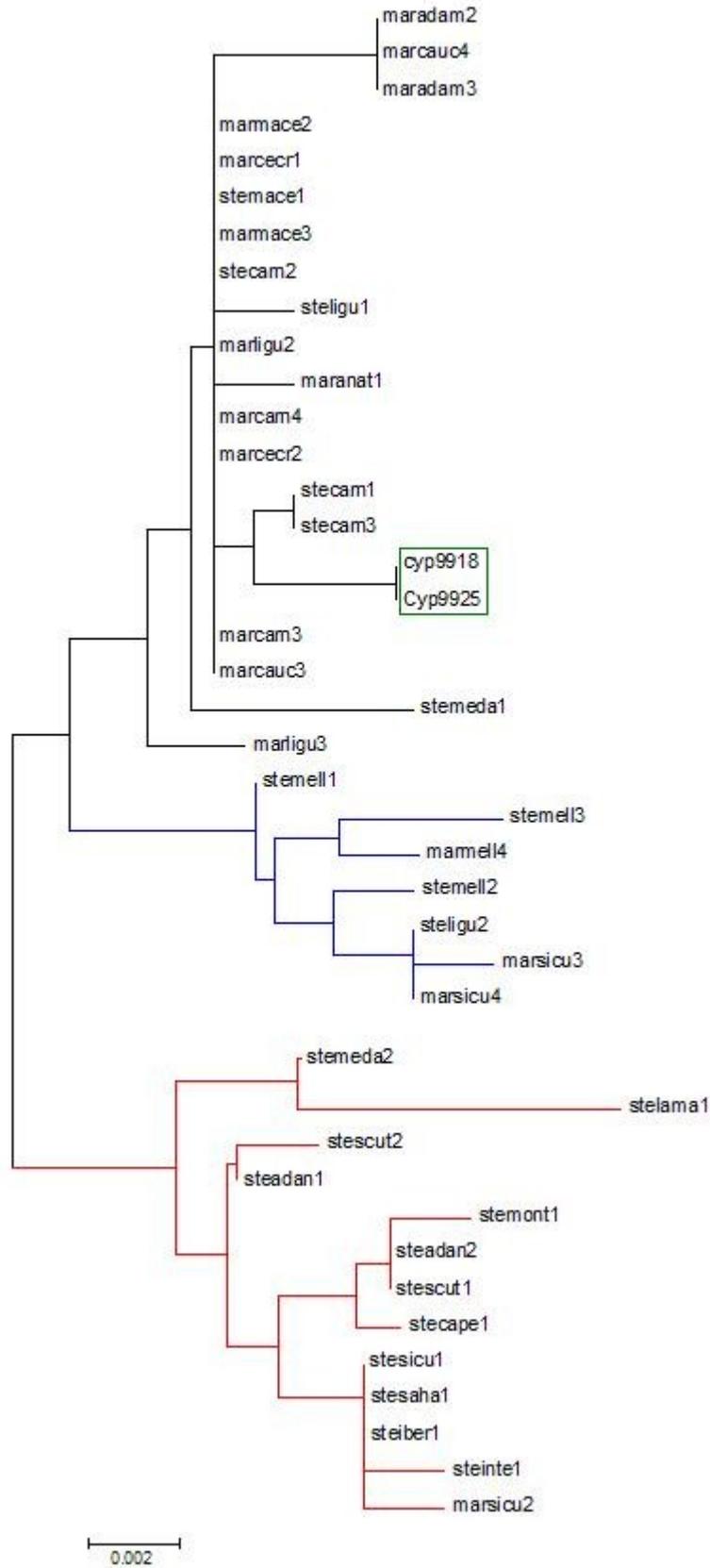


Fig. 2 - Un arbre présomptif NJ présentant le rapport phylogénétique entre les abeilles du nord du Chypre et d'autres sous-espèces d'abeilles mellifères, fondé sur la réplication 1000 (noir: la lignée C; bleu: la lignée M et rouge: la lignée A).

Les allozymes:

L'analyse morphométrique a mis en évidence le fait que la région de l'ouest de la partie nordique du Chypre a été influencée par les introductions de date récente. Par conséquent, les nouveaux prélèvements de spécimens ont été effectués en général dans la région montagnarde, pour détecter la variation biochimique chez les abeilles du nord du Chypre.

Pourtant, il n'y a pas une grande variabilité chez les abeilles du nord du Chypre, comme on pourrait s'attendre d'une espèce insulaire. En plus, au delà du fait que cette zone n'est pas polluée par aucun gène introduit récemment, celle-ci pourrait être une autre raison pour les niveaux bas d'hétérozigosité dans la zone montagnarde. Mais au contraire, on a mis en évidence une différenciation génétique très réduite (la valeur F_{st} est de 0.038) chez les populations de cette région. La présence de quelques niveaux réduits de variabilité pourrait représenter un autre argument en faveur de la morphométrie, en ce qui concerne la maintenance d'un statut original des abeilles de Chypre. Pour ce qu'il y a du système d'enzymes *Hk* et *Est*, les populations sont hétérogènes.

mtDNA:

Tous les spécimens de Chypre ont présenté le même profil de mtDNA, ce qui prouve clairement qu'ils font partie de la lignée mitochondriale C. Tous les types différents d'analyse mitochondriale (la digestion avec Cytochrome B de la région Bgl II, la digestion avec Carboxyl Oxidase I de la région HinfI, la digestion de la région COI-COII et DraI) ont compté dans cette conclusion. Dans la plupart des analyses, les abeilles de Chypre ressemblent beaucoup aux sous-espèces voisines de Syrie et de Turquie, pendant que les populations de ces pays présentent une variabilité beaucoup plus grande. Aussi, le résultat de l'analyse séquentielle de la ND2 a montré que les spécimens d'*A. m. cypria* font partie de la lignée C même si, selon l'analyse morphométrique, ils entrent dans la lignée O.

Remerciements

Les auteurs voudraient exprimer leur gratitude à Prof. Dr. Inci TOGAN et à Prof. Dr. Zeki KAYA pour le support de laboratoire accordé lors de la réalisation de l'analyse allozymique. La présente étude a été possible grâce aux donations faites par Dr. Sheppard et elle a été partiellement soutenue par une bourse accordée (des fonds ZKU) par Dr. Kandemir.

RÉFÉRENCES

- Adam, B. 1983 In search of best strains of honeybees. 2nd Edition, Northern Bee Books, UK. 206p.
- Arias M.C, Sheppard W.S. (1996) Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. Mol. Phyl. Evol. 5, 557–566.
- 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.
- Kandemir I., Kence A. (1995) Allozyme variability in the central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) populations, *Apidologie* 26, 503–510.
- Meixner M.D., Meixner A. (1997) Bee morphometric. Version 1.02.
- Ruttner F. (1988) Biogeography and Taxonomy of Honeybees, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363–381.
- Ruttner, F. 1988 Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Swofford, D.L., Selander, R.B. 1981 "BIOSYS-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics" *The Journal of Heredity*, 72, 281-283.
- Sheppard, W.S, Arias, M.C., Shimanuki, H. 1994 "Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)" *Bull. Entomol. Res.*, 84, 551-554