

## MORPHOMETRISCHE, ALLOZYMALE UND mtDNS-VARIATION DER BIENENPOPULATIONEN VON *APIS-MELLIFERA-CYPRIA*-POLLMANN IM NORDEN ZYPERNS

I. KANDEMIR<sup>1</sup>, Marina D. MEIXNER<sup>2</sup>, Ayca OZKAN<sup>1</sup>, St.W. SHEPPARD<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, TÜRKIE  
e-mail: [irfankandemir@hotmail.com](mailto:irfankandemir@hotmail.com)

<sup>2</sup>Institut für Bienenkunde, Karl von Frisch Weg 2, 614440 Oberursel, DEUTSCHLAND

<sup>3</sup>Department of Entomology, Washington State University, Pullman WA, USA

### Resümee

Untersucht wurde die morphometrische, allozymale und mtDNS Variabilität der *Apis-mellifera-cypria*-Population im Norden Zyperns. Sechs Populationen (40 Bienenvölker) wurden anhand von 39 morphometrischen Merkmalen untersucht. Die Zytocrom B und Karboxiloxidase Regionen der mtDNS wurden auf die Profile der Restriktionsenzyme Bgl II und Hinf I und auf den Polymorphismus der Länge des Restriktionssegments Dra I der intergenetischen Zone CO I – CO II analysiert. Die mitochondrielle Region ND2 wurde sequenziert und mit den veröffentlichten Sequenzen anderer Subspezies verglichen. Zusätzliche 55 Bienenvölker aus der gleichen Ortschaft dienten der Untersuchung der allozymalen Variation, wobei 6 Enzymsysteme verwendet wurden. Es wurden sehr niedrige Niveaus der allozymalen Variation festgestellt, mit einer durchschnittlichen Heterozygotie von  $0,006 \pm 0,005$ . Die Analyse aller mtDNS Regionen bestätigte die europäische Herkunft der Honigbienenpopulation aus dem Norden Zyperns. Die Verdauungsprofile, die im Norden Zyperns gefunden wurden, waren die gleichen wie die der Honigbienen von Osteuropa. Nur die CO I – CO II Zwischengenregion besitzt die Q-Sequenz und die Verdauungsprofile entsprechen dem C1 Haplotyp. Die Analyse der morphometrischen Daten situierte die Honigbienen aus dem Norden Zyperns in die östliche morphologische Linie, zusammen mit *A.m. monticola*, *A.m. meda*, *A.m. syriaca* und *A.m. caucasica*. Ein phylogenetischer Stammbaum, aufgrund der Daten der ND2-Sequenz aufgestellt, plaziert die Zypern-Honigbienen in die mitochondrielle C-Linie, die sowohl die morphologische C- als auch O-Linien erfaßt.

**Stichwörter:** Zypern/genetische Variation/*Apis mellifera cypria*

### Einleitung

Die Honigbiene von Zypern (*A.m. cypria*, Pollmann 1879) ist ein weiteres Beispiel einer Insel-Subspezies, genau wie *A.m. ruttneri* auf Malta, *A.m. adami* auf Kreta und *A.m. sicula* auf Sizilien. Ähnlich anderer Inselsubspezies sind die Bienen von Zypern von kleinerem Ausmaß. Wegen ihrem exotischen Aussehen wurden sie zu Beginn von den Imkern gut aufgenommen (RUTTNER, 1988).

In seinen morphometrischen Untersuchungen plazierte RUTTNER (1992) die Honigbienen von Zypern in die östliche Linie, zusammen mit *A.m. anatolica*, *A.m. syriaca*, *A.m. meda* und *A.m. caucasica*. Aus der Sicht der geographischen Position sieht *A.m. cypria* genau wie ihre Nachbarinnen aus. Der Abstand zu *A.m. anatolica* (74,6), *A.m. syriaca* (69,8) und *A.m. meda* (87,3) ist fast gleich. Werden die Zypernbienen mit den Anatolienbienen verglichen, dann sind die ersteren kleiner, haben aber längere Rüssel und Beine, doch kürzere Flügel. Innerhalb der östlichen Linie haben sie den längsten und schlankesten Hinterleib (St6 – 84,6). Der Kubitalindex der Zypernbienen ist sehr hoch (2,72). Ihr ausgeprägtes Merkmal ist die Farbe des Hinterleibs. Die Zypern- und Syrienbienen haben das gleiche Farbmodell, das sich dem der ägyptischen Biene (*A.m. lamarckii*, gewesene *A.m. fasciata*) nähert (BRUDER ADAM, 1983). Die Verhaltensweisen der Zypernbienen ähneln denen der Anatolienbienen - sie sind sehr aggressiv und schwarmfreudig (BRUDER ADAM, 1983).

Obwohl sie eine Inselsubspezies ist, verzeichnet *A.m. cypria* eine hohe morphometrische Variation (RUTTNER, 1988). Die neueste Einführung von Bienen aus der Türkei in den Norden Zyperns könnte einige morphometrische Veränderungen verursacht haben und es stellt sich die Frage, inwieweit die letzten Einführungen die Bienenvölker im Norden Zyperns beeinflußt haben. Außerdem gibt es keine eingehende Studien über die allozymale und genetische Variation auf DNS-Niveau.

Zur weiteren Untersuchung dieser Fragen im Zusammenhang mit der genetischen Variation bei *A.m. cypria* und ihrem Verhältnis innerhalb der O Linie nahmen wir eingehende Proben. In der vorliegenden Arbeit teilen wir die Ergebnisse der vollständigen Analyse der mtDNS, der Morphometrie und der Allozyme der Zypernbiene, *A.m. cypria*, mit.

### Material und Methode

Die Proben wurden aus 40 Bienenvölkern aus 6 Ortschaften im Norden Zyperns eingesammelt. Bis zur morphometrischen und der mtDNS-Analyse wurden sie in Äthanol 90<sup>0</sup> gehalten. Aus weiteren 55 Bienenvölkern in Gebirgsgegenden wurden andere Mustern gesammelt und tiefgekühlt, um die biochemische Variation der Bienenpopulationen im Norden Zyperns zu bestimmen.

## Morphometrische Analyse

Insgesamt 18 Bienenvölker wurden morphometrisch analysiert. Die 11 bis 15 Arbeiterinnen einer Probe wurden seziiert und gemäß RUTTNER et al. (1978) 39 morphometrische Merkmale gemessen. Die Messung erfolgte vor allem mit einer CCD-Kamera und einem morphometrischen Meßprogramm (MEIXNER und MEIXNER, 1994). Die Körperfarbe und die Haarbekleidung wurden mit einem Seziernmikroskop und einem Augennikrometer gemessen. Die statistische Analyse erfolgte mit Referenzproben aus der Datenbank des Instituts für Bienenkunde von Oberursel.

## Analyse der Allozyme

Nach einer vorhergehenden Analyse wurden aus zusätzlichen 55 Bienenvölkern der Gebirgsgegend eingehende Proben eingesammelt, um die allozymale Variation festzustellen. Die Variabilität von 6 Enzymsystemen (*Pgm-1* und *Pgm 2*, *Hk*, *Mdh*, *Me*, *Est* und *Pgi*) wurde, wie weiter oben beschrieben, verwendet (KANDEMIR und KENCE, 1995). Die Frequenz der Genen, die Parameter der genetischen Variation und die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden mit dem Programm BIOSYS-1 (SWOFFORD und SELANDER, 1981) bestimmt.

## DNS-Analyse

Gemäß der von SHEPPARD und McPHERON (1991) beschriebenen Methoden wurden die gesamten Nukleinsäuren aus 40 Bienenvölkern extrahiert. Die Extrahierung bestand im Protokoll der Phenol-Chloroform-Extrahierung, bestimmt für eine große Menge an intakter zirkulärer mtDNS. Die DNS-Extrakte wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Analyse von mtDNS wurden die Intergenregionen *CO I*, *Cyt* und *CO I-CO II* durch die Kettenreaktion der Polymerase vergrößert und gemäß der Empfehlungen des Herstellers (Tab. I) mit *Hinf-I*, *Bgl II* bzw. *Dra-I* verdaut. Die Gelfragmente für die Verdauungen mit *Hinf-I* und *Bgl II* wurden auf Agargel 2,5% getrennt. Dieses Agargel bestand aus 1% Standardagar BIO-RAD und 1,5% Nu-Sieve-Agar. Die Fragmente der restriktiven Verdauung *Dra-I* wurden aber auf Polyacrylamidgel 10% und 7.5% getrennt. Danach wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt und zur Dokumentation im UV-Licht fotografiert.

Tabelle I

mtDNS-Regionen, Primärpaare und verwendete Restriktionsenzyme

| Regionen                    | Primärpaare  | Restriktionsenzyme | Literatur                   |
|-----------------------------|--|--------------------|-----------------------------|
| COI-F<br>COI-R              | 5'-TTAAGATCCCCAGGATCATG-3'<br>5'-TGCAAATACTGCACCTATTG-3'             | <i>Hinf-I</i>      | Sheppard et al.,<br>1994    |
| Cyt B- F<br>Cyt B- R        | 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3'<br>5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3' | <i>Bgl-II</i>      | Sheppard et al.,<br>1994    |
| COI-COII- E2<br>COI-COII-H2 | 5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3'<br>5'-CAATATCATTGATGACC-3'                  | <i>Dra-I</i>       | Garnery et al.,<br>1993     |
| ND2-ILE<br>ND2-L1           | 5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3'<br>5'-GAATCTAATTAATAAAAAA-3'              |                    | Arias und<br>Sheppard, 1996 |

## Ergebnisse

### Morphometrie

Die Präliminaranalysen ergaben, daß die Zypernbienen dem östlichen Zweig angehören. Alle Zypernproben wurden mit den Subspezies *anatoliaca*, *syriaca* und *caucasica* gruppiert. *A.m. lamarckii* war die Subspezies, die sich diesem Cluster am meisten näherte (Abb.1).

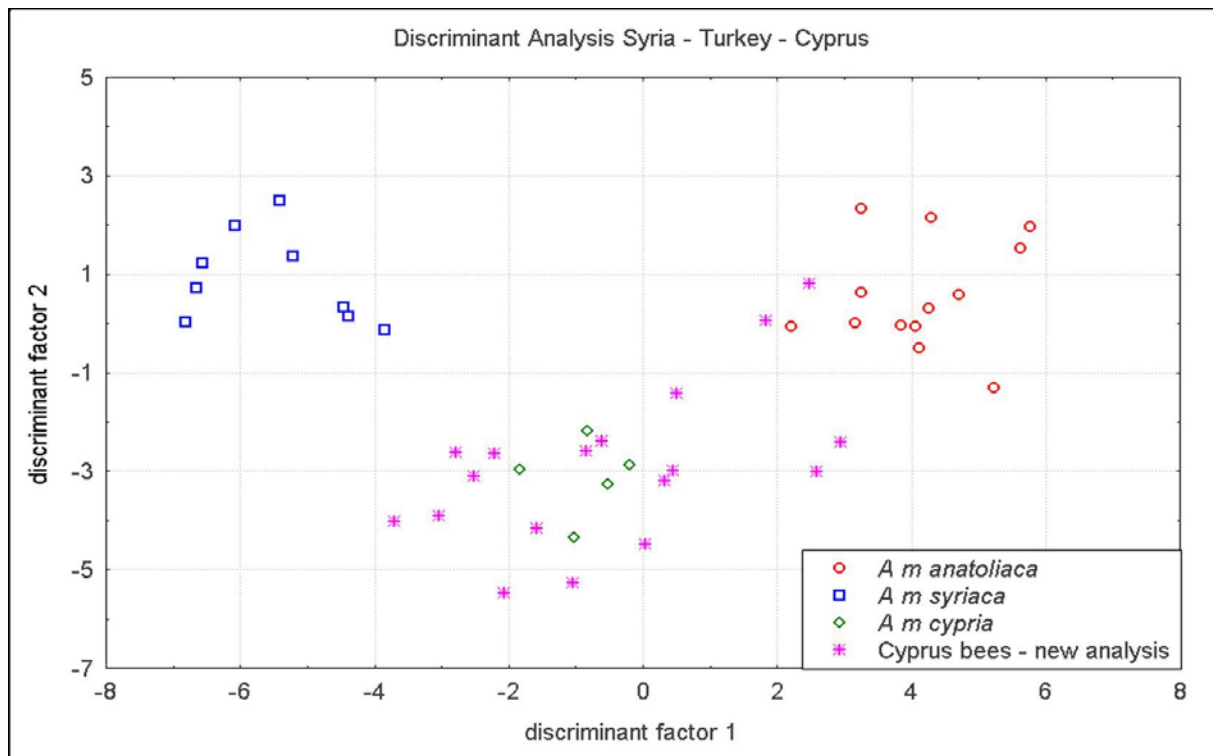


Abb. 1 – Faktoranalyse von *A.m. anatoliaca*, *A.m. syriaca*, *A.m. cypria* (Referenzproben von Oberursel) und den Proben vom Norden Zyperns.

### Allozyme

Von den sechs für die biochemische Variation getesteten Enzymen waren vier polymorphisch in den Honigbienenpopulationen aus dem Norden Zyperns. Alle Enzymsysteme befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $P > 0,05$ ). Die insgesamt Heterozygotie für die Bienen aus dem Norden Zyperns wurde als  $0,006 \pm 0,005$  errechnet.

### MtDNS

**Region CO-I:** Die Restriktion der Region CO-I mit dem Restriktionsenzym *Hinf I* ergab kein einziges Restriktionsfragment. Alle Bienenvölker hatten den gleichen unverdauten Fragmenttyp auf Agargel wie die mittelländische östliche C Linie.

**Region Cyt B:** Die Verdauung dieser Region ergab zwei Fragmente, die ein Diagnosesitus für die europäischen Honigbienen darstellen. Alle Zypernbienenvölker haben dieses Situs, ein Zeichen dafür, daß sie der C Linie der mtDNS angehören.

**Region CO I – CO II:** In dieser Region wurde keine genetische Variation verzeichnet. Das mit PCR vergrößerte Produkt zeigte, daß diese Region nur aus einer einzigen Q-Sequenz besteht, genau wie bei allen C Linien. Die Verdauung mit dem Restriktionsenzym *Dra-I* verursachte keine Variation. Alle hatten die gleiche Art der Profile der restriktiven Verdauung.

### ND2-Sequenzierung

Das ND2-Gen der mitochondrialen DNS wurde in beide Richtungen sequenziert, wurden ILE- und L1-Primäre verwendet. Ein insgesamt Wert von lesbaren 650 bp wurde mit anderen ND2-Sequenzen kombiniert, die sich in der Genbank befanden und die bei der phylogenetischen Analyse Verwendung fanden. Im phylogenetischen Baum, gebaut von Neighbor Joining, wurden drei Hauptcluster gesichtet. Die A, C und M Linien waren eindeutig sichtbar, die O Linie war in die A Linie einverleibt. In all diesen Linien befanden sich die Zypernbienenvölker in der C Linie (Abb.2).

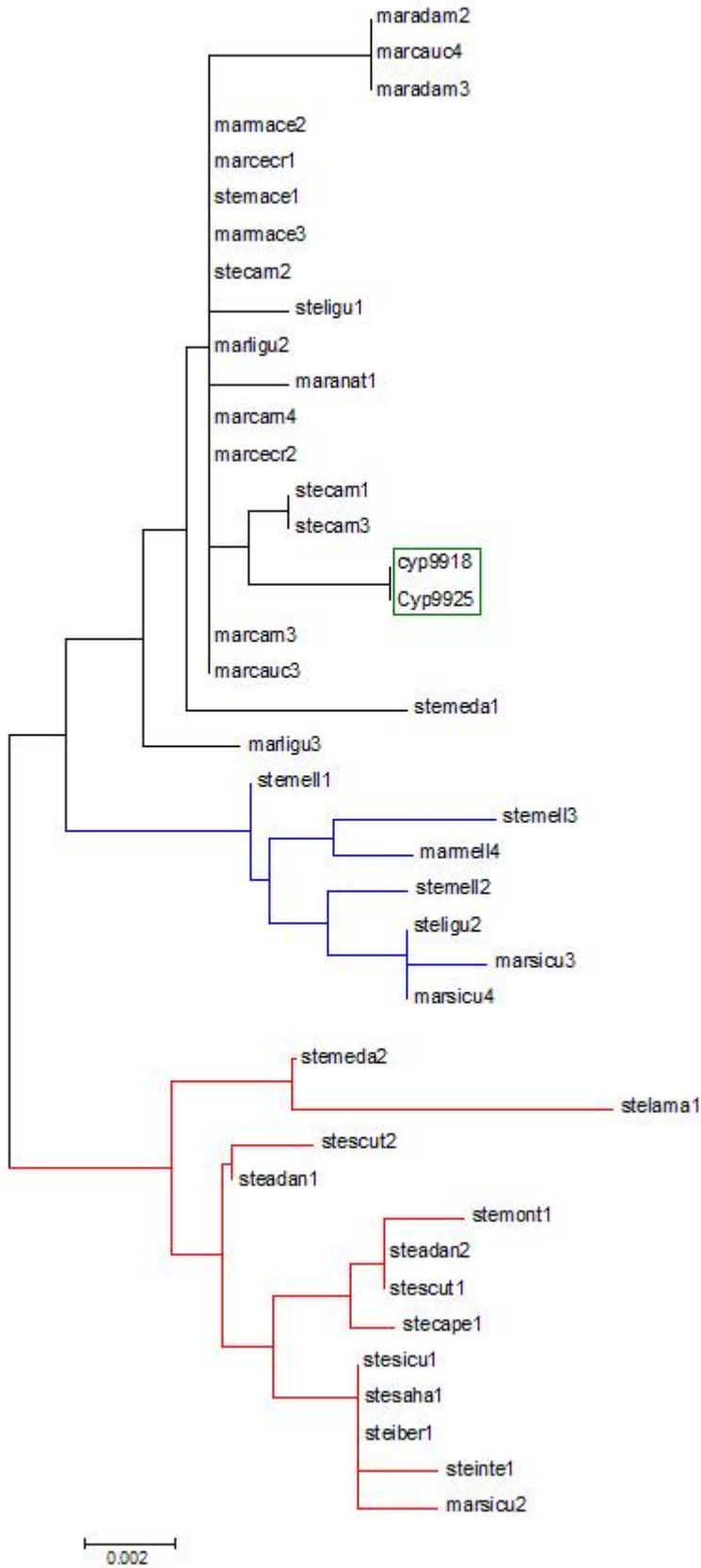


Abb.2 – Ein mutmaßlicher NJ Baum, der das phylogenetische Verhältnis der Bienen aus dem Norden Zyperns mit den anderen Honigbienen subspezies nach 1000 Replikationen veranschaulicht (schwarz = C Linie, blau = M Linie und rot = A Linie).

## Diskussionen

### Morphometrie

In den meisten Fällen wurden die Bienen aus dem Norden Zyperns aufgrund der morphometrischen Analyse den als *A.m. cyprica* klassifizierten Proben der Referenzsammlung klar zugeteilt (Abb.1). Die Bienen aus dem Norden Zyperns bildeten, wie erwartet, ein Cluster mit der Subspezies der Linie O. Ein neuer Bienensatz veranschaulichte, daß die Zypernbienen ihre morphometrische Struktur weiterhin beibehalten und auf diese Weise der Wirkung der neuen Einführung entgegensehen, was anhand der Faktoranalyse beobachtet wurde (Abb.1). Von den aus dem Westen von Nordzypern (Zitrusgärten) eingesammelten Bienen waren einige Bienenvölker, die sich *A.m. anatoliaca* näherten, eine nicht überraschende Tatsache. Nur drei dieser Proben – alle aus modernen Bienenständen – wurden in der Analyse als *A.m. anatoliaca* betrachtet. Ursache dazu waren wahrscheinlich die Einfuhre vom Festland nach Nordzypern. Aufgrund dieser Ergebnisse kann schlußfolgert werden, daß die Bienenpopulation der Insel sich in einem gewissen Maße noch in ihrer Originalform befindet. Eine weitere Beobachtung ist, daß *A.m. cyprica* *A.m. anatoliaca* viel mehr ähnelt als *A.m. adami* und *A.m. meda*.

### Allozyme

Die morphometrische Analyse zeigte, daß der westliche Teil von Nordzypern von den neuesten Einführungen beeinflusst wurde. Deshalb wurden die letzten Proben vor allem aus der Gebirgsgegend eingesammelt, um die biochemische Variation der Bienen in Nordzypern zu entdecken.

Es bestand aber keine große Variabilität der Bienen aus Nordzypern, die eigentlich bei einer Inselsubspezies zu erwarten gewesen wäre. Außerdem ist dieses Areal keinem neu eingeführten Gen ausgesetzt, was seinerseits ein Grund der niedrigen Heterozygotieniveaus in der Gebirgsgegend sein könnte. Im Gegenteil, bei den Populationen aus dieser Zone wurde eine niedrige genetische Differenzierung ( $F_{st} = 0,038$ ) festgestellt. In Anbetracht der *Hk* und *Est* Enzyme waren die Populationen heterogen. Die Anwesenheit einiger Niveaus mit niedriger Variabilität könnte ein weitere Unterstützung zugunsten der Morphometrie und der Aufrechterhaltung eines Originalstatus der Zypernbienen sein.

### MtDNS

Alle Zypernproben hatten das gleiche mtDNS-Profil, ein eindeutiger Beweis dafür, daß sie der mitochondriellen C Linie angehören. Alle verschiedene Arten von mitochondrieller Analyse (Verdauung mit Cytochrom B der *Bgl II* Region, Verdauung mit Karboxiloxidase I der *Hinfl* Region, die Verdauung der Region *CO I – CO II* und *Dra I*) führten zu dieser Schlußfolgerung. Bei den meisten Analysen ähnelten die Zypernbienen den Subspezies aus Syrien und der Türkei, während die Populationen aus diesen Ländern eine viel größere Variabilität aufwiesen. Das Ergebnis der sequentiellen Analyse der *ND2* Region ergab, daß die *A.-m.-cyprica*-Proben zu der C Linie gehören, obwohl sie morphometrisch der O Linie angehören.

### Danksagung

Die Verfasser danken Prof.Dr. Inci TOGAN und Prof.Dr. Zeki KAYA, für die Unterstützung der Allozyme-Laboranalysen. Die vorliegende Arbeit erfreute sich der finanziellen Unterstützung durch Dr. SHEPPARD und teilweise durch Dr. KANDEMIR.

## LITERATUR

- Adam, B. 1983 In search of best strains of honeybees. 2<sup>nd</sup> 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.
- Garnerly 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 MD., 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