

## МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ, АЛЛОЗИМНАЯ И mtДНК ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ (*APIS MELLIFERA CYPRIA* ROLLMAN, 1879), ОБИТАЮЩИХ НА СЕВЕРЕ КИПРА

И. КАНДЕМИР, Турция, Марина Д. МАЙКСНЕР, Германия<sup>1-3</sup>, Айка ОЗКАН, Турция<sup>2</sup>, С.В. ШЕППАРД, США<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Entomology, Washington State University, Pullman WA USA, E-mail: irfankandemir@hotmail.com

<sup>2</sup>Department of Biology, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, TURKEY

<sup>3</sup>Institut für Bienenkunde, 2 Karl von Frisch Weg, 614440 Oberursel, GERMANY

### Аннотация

Нами исследована морфометрическая, аллозимная и mtДНК вариабельность популяций пчел *Apis mellifera cypria*, обитающих на севере Кипра. Анализу подвергнуты 6 популяций (40 семей) при использовании 39 морфометрических характеристик. Тесты проведены для зон Цитохром В и Карбоксилоксидазы mtДНК, для профилей энзима ограничения *Vg II* и *Hinf I*, а также для полиморфизма длины сегмента ограничения *Dra I* межгенной зоны CO I-CO II. Митохондриальная зона ND2 разделена и сравнена с единицами других подвидов. Дополнительное число 55 семей, обитающих в тех же зонах исследованы для определения аллозимной вариабельности, применяя системы из 6 энзимов. Были обнаружены очень низкие уровни аллозимной вариабельности при средней гетерозиготности в  $0,006 \pm 0,005$ . Анализ всех зон mtДНК подтвердил европейское происхождение популяций пчел, обитающих на севере Кипра. Пищеварительные профили, идентифицированные на севере Кипра были одинаковыми с профилями медоносных пчел Восточной Европы. Межгенная зона CO I-CO II имеет только единицу Q, а профили пищеварения соответствуют хаплотипу C1. Морфометрические анализы ставят пчел севера Кипра рядом с морфологической линией Востока, вместе с *A.m. anatoliaca*, *A.m. meda*, *A.m. syriaca*, *A.m. caucasica*. Филогенетическое происхождение, определенное на основе данных единицы ND2 ставят пчел Кипра в митохондриальную линию C, которая включает как морфологическую линию C, так и O.

**Ключевые слова:** Кипр / генетическая вариабельность / *Apis mellifera cypria*

### Введение

Медоносная пчела, обитающая на Кипре (*Apis mellifera cypria* Polmann) является другим примером островного подвида, как и *A.m. ruttneri* на Мальте, *A.m. adami* на Крите, *A.m. sicula* в Сицилии. Как и в случае других островных подвидов, кипрские пчелы характеризуются меньшими размерами, несмотря на то, что по их экзотическому аспекту пчеловоды хорошо их приняли в самом начале (РУТТНЕР, 1988).

Морфологические исследования РУТТНЕРА (1992) включили кипрских пчел в категорию Восточных пчел, вместе с *A.m. anatoliaca*, *A.m. meda*, *A.m. syriaca*, *A.m. caucasica*. Географическое расстояние кипрских пчел от остальных островных пчел почти одинаково – 74,6 от *A.m. anatoliaca*, 69,8 от *A.m. syriaca* и 87,3 от *A.m. meda*. Если сравнивать кипрских пчел с *A.m. anatoliaca*, можно сказать, что у первых меньшие размеры тела, чем у вторых. У них хоботок и ножки длиннее, но крылья более короткие. Среди восточных пчел у них самое длинное и гибкое брюшко (указатель St6 – 84,6). Кубитальный индекс очень высок у кипрских пчел (2,72). Особая характеристика кипрских пчел – цвет брюшка. Обитающие на Кипре и в Сирии пчелы обладают одинаковым цветом, близким к цвету египетской пчелы (*A.m. lamarckii*, бывшая *A.m. fasciata*) (Брат АДАМ, 1983). Что касается поведения, кипрские пчелы близки к *A.m. anatoliaca* (они очень агрессивны и проявляют стремление к роению (Брат АДАМ, 1983).

Несмотря на то, что *Apis mellifera cypria* является островным подвидом, у нее отмечена высокая морфометрическая вариабельность (РУТТНЕР, 1988). Недавно введенные пчелы из Турции

в Кипр вызвало, вероятно, ряд изменений морфометрического порядка. Пока не проведены подробные исследования по вопросам аллозимной и генетической на уровне ДНК variability.

### Материал и методика

Для исследований нами взяты пробы от 40 семей пчел, из 6 зон севера Кипра. Пробы хранили в этаноле 90° для анализа морфометрического и мтДНК. Из других 55 семей горной зоны взяты пробы, которые оморозили для определения биохимической variability.

**Морфометрический анализ.** 18 семей подвергнуты морфометрическому анализу. 11-15 рабочих пчел каждой пробы измеряли для определения 39 морфометрических характеристик (РУТТНЕР с сотр., 1978). Большинство характеристик измеряли камерой CCD при использовании программы морфометрического измерения (МАЙКСНЕР и МАЙКСНЕР, 1994). Пигментирование и волосистой покров измеряли микроскопом и микрометром. Для статистического анализа использовали пробы из банка данных Института пчеловодства в Оберурселе.

**Анализ аллозимов.** Из 55 семей пчел горной зоны Кипра были взяты пробы для определения аллозимной variability. Variability шести систем ферментов (*Pgm-1*, *Pgm-2*, *Hk*, *Mdh*, *Me*, *Est*, *Pgi* использована как указано выше (КАНДЕМИР и КЕНЧЕ, 1995). Частота генов, параметры генетической variability и отклонения от равновесия Харди-Вайнберг установлены при использовании программы BIOSYS-1 (СУОФОРД и ЗУЛАНДЕР, 1981).

**Анализ ДНК.** Общие нуклеиновые кислоты экстрагированы из 40 семей по методам ШЕПАРДа и МекФЕРОНА (1991). Использовали фенол-хлороформ для большого количества мтДНК. Экстракты ДНК хранили при -80 °C. Для анализа мтДНК, межгенные зоны *CO I*, *Cyt*, *CO I-CO II* были увеличены цепной реакцией полимеразы и переварены с *Hinf-I*, *Bgl II*, *Dra-I* (таблица 1). Фрагменты гели для переваривания с *Hinf-I* и *Bgl II* сепарированы на геле 2,5% агарозы (1% стандартной агарозы BIO-RAD и 1,5% агарозы Nu-Sieve). Фрагменты ограничительного переваривания *Dra-I* сепарированы на полиакриламидных гелях 10% и 7,5%.

Таблица 1

### Зоны мтДНК, пары "primer" и ферменты ограничения

Зоны	Пары "primer"	Фермент ограничения	Справки
COI-F	5'-TTAAGATCCCCAGGATCATG-3'	<i>HINF-I</i>	Sheppard et al.,
COI-R	5'-TGCAAATACTGCACCTATTG-3'		1994
<b>Cyt B- F</b>	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3'	<i>Bgl-II</i>	Sheppard et al.,
<i>Cyt B- R</i>	5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'		1994
<i>COI-COII- E2</i>	5'-GGCAGAATAAGTGCAATTG-3'	<i>Dra-I</i>	Garner et al.,
<i>COI-COII-H2</i>	5'-CAATATCATTGATGACC-3'		1993
<i>ND2-ILE</i>	5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3'		Arias and
<i>ND2-L1</i>	5'-GAATCTAATTAATAAAAAA-3'		Sheppard, 1996

### Результаты

**Морфометрия:** Предварительные результаты показали, что кипрские пчелы принадлежат восточной рамке. Все пробы сгруппировались с подвидами *A.m. anatolica*, *A.m. syriaca*, *A.m. caucasica*. *A.m. lamarskii* была подвидом, самым близким к этой группе (рис. 1).

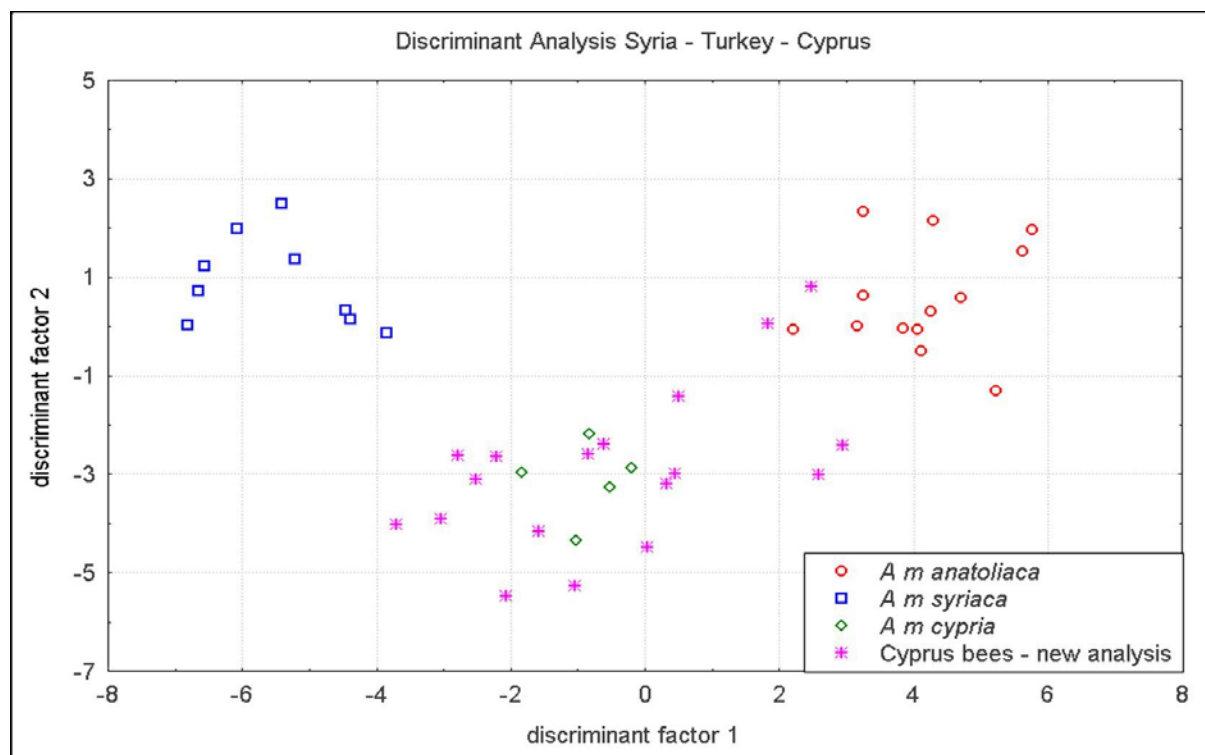


Рис. 1 – Факториальный анализ *A.m. anatoliaca*, *A.m. syriaca*, *A.m. cypria* (справочные пробы получены от Института пчеловодства в Оберурселе, Германия и пробы из северной зоны Кипра).

(сверху) Дискриминационный анализ Сирия – Турция – Кипр  
 (по вертикали) Дискриминационный фактор 2  
 (снизу) Дискриминационный фактор 1

**Аллозимы.** Из шести энзимов, тестированных для определения биохимической вариабельности, четыре оказались полиморфными у популяций пчел, обитающих на севере Кипра. Все энзиматические системы обнаружены в равновесии Харди-Вейнберг ( $P > 0,05$ ). Общая гетерозиготность пчел севера Кипра получена как  $0,006 \pm 0,005$ .

#### mtДНК

**Зона CO-I.** Ограничение зоны CO-I энзимом ограничения *Hinf I* не дало ни одного фрагмента ограничения. Все семьи показывали тот же тип фрагмента на агаро-геле, как и линия (происхождение С) с востока Средиземного моря.

**Зона Cyt B.** Здесь обнаружены два фрагмента, что представляется как сайт диагноза для европейских медоносных пчел. Все кипрские семьи пчел представляют этот сайт, показывая, таким образом, что они принадлежат линии С mtДНК.

**Зона CO I-CO II.** В этой зоне не обнаружена ни одна генетическая варибельность. Увеличенный с PCR продукт показал, что эта зона состоит только из единицы Q, как у всех линий С. Переваривание энзимом *Dra-I* не вызвал никакой вариации.

#### Единица ND2

Ген ND2 из митохондриальной ДНК разделен в двух направлениях, используя "primer" ILE и LI. 650 bp комбинировали с другими единицами ND2 из банка генов и использовали для филогенетического анализа. Три главные грозди обнаружены в филогенетическом дереве. Линии А, С и М ясно видны, а линия О включена в линию А. Среди этих линий семьи кипрских пчел включены в линию С (рис. 2).

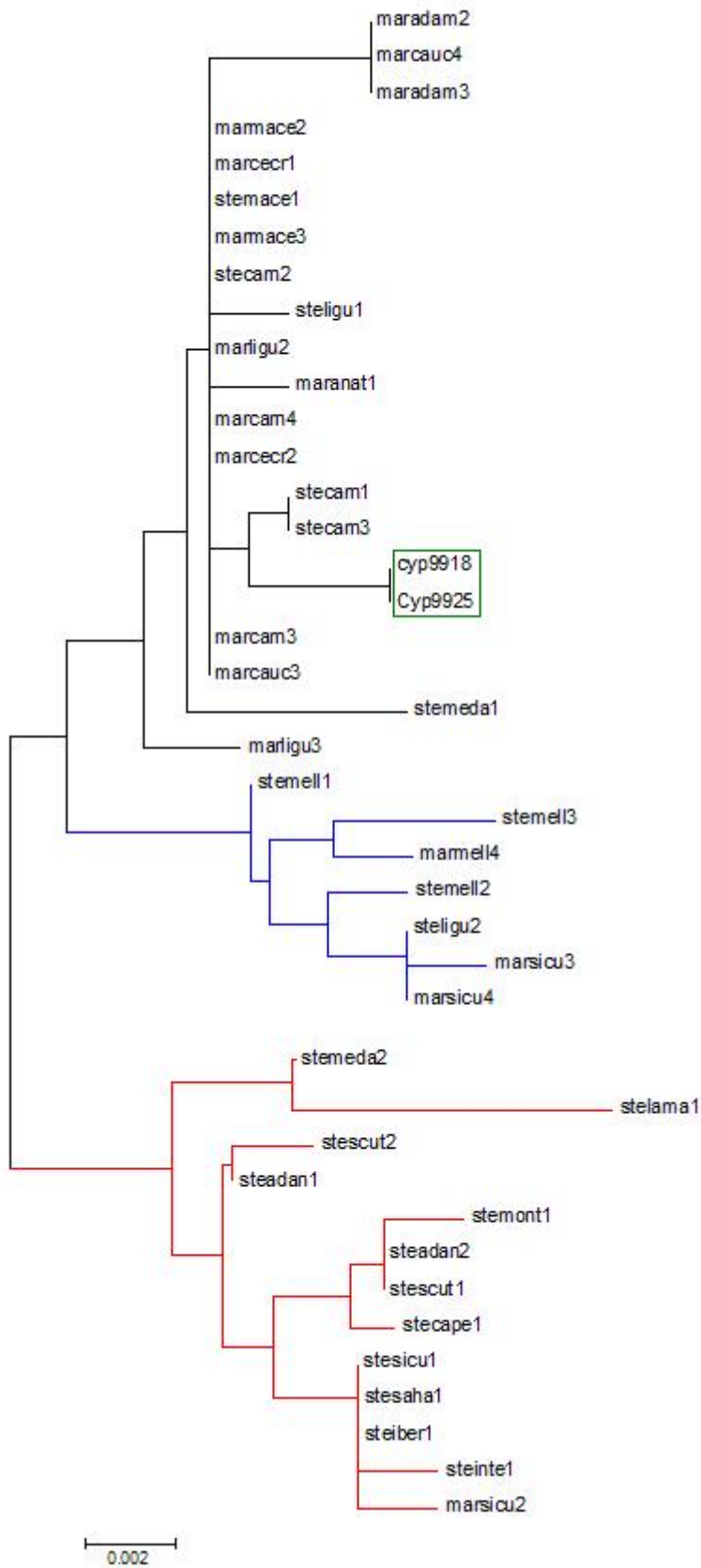


Рис. 2 – Предполагаемое дерево NJ, представляющее филогенетическое отношение между пчелами северного Кипра и другими подвидами медоносных пчел (черный цвет – линия С, голубой – линия М и красный – линия А).

## Дискуссии

### Морфометрия

В большинстве случаев пчелы, обитающие на севере Кипра классифицированы как *A.m.cypria* на основе морфометрического анализа (рис. 1). Как мы ожидали, пчелы Северного Кипра сформировали грозди с пчелами подвида линии О. Новые собранные нами пробы показали, что кипрские пчелы продолжают поддерживать морфометрическую структуру, предсказывая эффект недавнего введения (рис. 1). Среди пчел, собранных с западной зоны Кипра (цитрусовые сады), некоторые семьи показали более близкими к *A.m. anatoliaca*. Лишь три пробы считали в течение анализа как *A.m. anatoliaca*, что можно объяснить, вероятно, как результат импорта с зон континента. Можно заключать, что популяция пчел острова находится еще в высокой степени в оригинальной форме. Анализ показал также, что *A.m.cypria* в большей степени похожа на *A.m. anatoliaca*, чем *A.m. adami* и *A.m. meda*.

### Аллозимы

Морфометрический анализ показал, что пчелы западно-севера Кипра развились под влиянием процесса импорта пчел в последний период. Таким образом, новые пробы были взяты в основном из горной зоны, для определения биохимической вариабельности пчел, обитающих на севере Кипра.

Однако, не обнаружено большой вариабельности у этих пчел, как мы ожидали от островного подвида. Эта зона не загрязнена нововведенным геном, что может быть другой причиной низкого уровня гетерозиготности в горной зоне. Наоборот, обнаружена низкая генетическая вариабельность (значение  $F_{st} = 0,038$ ) у популяций зоны. Что касается системы энзимов Hk и Est, популяции являются гетерогенными.

### mtДНК

Все пробы пчел Кипра представляли одинаковый профиль mtДНК, что явно показывает, что они принадлежат митохондриальной линии С. Все митохондриальные анализы доказали это. В большинстве анализов, кипрские пчелы сходны с соседними подвидами, обитающими в Сирии и Турции, но популяции этих стран показали более высокую вариабельность. Результаты анализа зоны ND2 показали, что пробы кипрских пчел принадлежат линии С, несмотря на то, что морфометрически они принадлежат линии О.

## Выражение благодарности

Авторы благодар проф. Инчи ТОГАН и проф. Кези КАЯ, за помощь, оказанную ими для лабораторного анализа аллозим. Проведение настоящей работы поддерживали финансово д-р ШЕППАРД, частично (из фондов ZKU) д-р КАНДЕМИР.

## ЛИТЕРАТУРА

- 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
- Garner 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