

## Mitochondrial DNA variability in South African honeybees (*Apis mellifera* L)

RFA Moritz<sup>1</sup>, JM Cornuet<sup>2</sup>, P Kryger<sup>1</sup>,  
L Garnery<sup>2</sup>, HR Hepburn<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut für Biologie, Technische Universität Berlin, Franklinstr 28/29, 10587 Berlin, Germany;

<sup>2</sup> Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés, INRA/CNRS,  
BP 23, 91440 Bures-sur-Yvette, France;

<sup>3</sup> Dept Entomology and Zoology, Rhodes University, PO Box 94, Grahamstown 6140, South Africa

**Summary** — The mtDNA size variability of honeybees (*Apis mellifera*) in a sample of 102 colonies covering the area south of the 27th parallel of latitude in Africa was analyzed using PCR. A region between the CO I and CO II genes revealed four different size variants one of which being a novel mitotype for honeybees not fitting the previously published repeat pattern in the region (a fragment P<sub>0</sub> with 69 bp and varying number of fragment Q of 196 bp length). This region, which has been shown to be useful for the biogeographic classification of *Apis mellifera* subspecies, only partially corresponded to the known distribution of African subspecies of honeybees based on morphometrical and physiological data. The P<sub>0</sub>QQ-type was the most common with an overall frequency of 0.76. The region which has been addressed as the hybrid zone between *A m capensis* and *A m scutellata* showed no mitotype variability and was monomorphic for the P<sub>0</sub>QQ type. A considerable length polymorphism was found north and east of this region with a frequency of 0.57 for P<sub>0</sub>QQ type and 0.36 for the P<sub>0</sub>Q type. Less common were the P<sub>0</sub>QQQ type (0.02) and a type not fitting the known P and Q repeat system (0.02). Digestion of the region with the *DraI* restriction enzyme revealed previously undetected mtDNA variability in *Apis mellifera* populations.

***Apis mellifera scutellata* / *Apis mellifera capensis* / mtDNA / polymorphism**

### INTRODUCTION

To understand the dynamics of selection in natural populations of honeybees one needs suitable inheritable markers. These can be morphological characters if the gene effects on character expression are strong and genetic variance is high. Environmental effects, however, may interfere with character expression and thus weaken the discriminatory power of the morphological char-

acters. The usefulness of biometrical studies for honeybee phylogeny and subspecies classification is not debatable (for a review see Ruttner, 1988), yet clearly studies at the level of the DNA avoid such problems and several authors have shown the power of nuclear DNA probes to reveal genetic variability in honeybee populations (Hall, 1986, 1990; Oldroyd *et al.*, 1993). Most common, however, is the analysis of mitochondrial DNA, which has been shown to be very

useful for the classification of honeybees. Subspecies specific mtDNA variability has been found and repeatedly used to analyze the biogeography of honeybees (Hall and Smith, 1991; Smith *et al*, 1989; Cornuet and Garnery 1991; Garnery *et al*, 1992). Special attention has been given to the length variability within the COI and COII coding region, which was independently sequenced by Crozier (Crozier *et al*, 1989; Crozier and Crozier, 1992) and Cornuet with co-workers (Cornuet *et al*, 1991; Garnery *et al*, 1992). The insert can be excised with *Bcl* and appears in length variants ranging from 1150 to 1600 bp. Depending on the mitotype it consists of a sequence P of 54 bp and various numbers of a second sequence Q of 196 bp length. African honeybees are characterized by a sequence P<sub>O</sub> instead of P with one substitution, a 2 bp deletion, and a 16 bp insert (Garnery, 1992). The Q sequence has been found with as many as four repeats (Garnery *et al*, 1992). Using this length variability and restriction site information, Garnery *et al* (1992) were able to develop a phylogeographic map of the putative colonization of Europe and Africa by honeybees. They found three major colonizing branches, two invading Europe north of the Mediterranean and one colonizing Africa which is in contrast to a similar model proposed on the basis of biometrical data by Ruttner (1988).

Whereas the major branches of honeybee subspecies can be classified by this length variability, this has not been shown for subspecies of the African continent. As many as eight different subspecies have been described for Africa south of the Sahara (Ruttner, 1988) but there are yet no specific mtDNA markers that classify individual subspecies. Some claims on subspecies specific variability are based on too small a sample size to allow for the establishment of race typical markers. Meusel and Moritz (1992) found length variability between *A m scutellata* and *A m capensis*, but clearly their sample size ( $n = 10$ ) was

too small to draw any conclusions that are meaningful at the subspecies level. In this paper we study the length variability of a DNA region between the tRNA Leu and the COII gene in the mitochondrial genome on a representative sample of South African honeybee colonies to determine whether the P<sub>O</sub>Q repeat system is helpful to characterize and discriminate between African subspecies of *A mellifera*.

## MATERIALS AND METHODS

Adult workers were sampled from 102 colonies at 29 different locations as shown in figure 1. The samples were stored in 70% ethanol for over 2 years before they were processed for molecular DNA analysis. The thoraces of single workers were washed for 2 h in 10 ml insect Ringer (0.128 M NaCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, pH 7.4 with NaOH) at room temperature. The samples were either dried overnight under vacuum or lyophilized. The dried samples were homogenized in 1.5 ml Eppendorf tubes containing 300  $\mu$ l Wilson buffer (100 mM Tris- HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl 0.1 % SDS, 50 mM dithiothreitol). 500  $\mu$ l Wilson buffer and 10  $\mu$ l proteinase K (20 mg/ml) were added to perform protein digestion for 2 h at 50°C. The sample was protein extracted twice with buffer saturated phenol/chloroform (1:1) and spun at 5000 rpm after each extraction to separate the aqueous and organic solvent phases. 1/10 sample volume of 3 M sodium acetate and 2 volumes ethanol were added for precipitation of the DNA overnight at -20°C. The DNA was pelleted at 12000 rpm and washed once with 75% ethanol. The DNA sample was re-suspended in sterile water.

Two primers, *E2* and *H2* (for sequences see Garnery *et al*, 1992), flanking the length variability were chosen for the polymerase chain reaction following Garnery *et al* (1992). 1 ml of each DNA sample was used in the PCR cocktail which consisted of 5  $\mu$ l 10x reaction buffer (provided by the *Taq* polymerase supplier) 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 units *Taq* polymerase, 110 mM dNTP, 1 mM *E2* primer, 1 mM *H2* primer. The reaction mix was topped with a drop of mineral oil. The polymerase reaction was repeated 35 times under the following thermo-cycling conditions : 45 s at 92°C  $\rightarrow$  45 s at 42°C  $\rightarrow$  120 s at 62°C.

The PCR product was electrophoretically separated in a 1.5% agarose gel at 100 V for 2.5 h. The gels were stained with ethidium bromide and photographed over a UV light screen.

To obtain more information on the PCR product we performed a *Dral* digest (10 µl sample DNA, 9.5 µl H<sub>2</sub>O, 0.5 µl *Dral* at 35°C for 3 h) on each sample and analyzed the fragment pattern on either two gels (10% and 5% acrylamide) or a single 7% acrylamide gel (250 V for 1.5 h) if resolution was sufficient. *Dral* was chosen because the PCR product is highly AT-rich, allowing for many potential *Dral* sites (TTT/AAA).

## RESULTS

Due to size and *Dral* restriction site polymorphisms, a total of nine different mitotypes were detected (fig 2). The P<sub>0</sub>QQ type was most common with an overall frequency of 0.76; P<sub>0</sub>Q had a frequency of 0.20. Only two samples from Warmbaths (53) and Piet Retief (51) in northern Transvaal fitted the P<sub>0</sub>QQQ type. Two samples from Durban (40) had a length that did not fit the classical P and Q fragment repeat pattern found by Cornuet *et al* (1991). The PCR product had a size of about 950 bp, which is between the P<sub>0</sub>QQ and P<sub>0</sub>QQQ type and does not correspond to any recombination of the P<sub>0</sub> and Q fragments. In the *Dral* digest, the typical 109 bp band is lacking (Garnery *et al*, 1993) and instead a fragment of about 85 bp is visible in the 7% agarose gel. This is an indication for a replacement of the P<sub>0</sub> fragment by a very short sequence of about 20 bp only. The pattern is consistent with three Q fragments being present in the PCR product.

Not all P<sub>0</sub>QQ mitotypes were identical, as the *Dral* digests revealed. In total, we found five different patterns, which allowed for further discrimination between the samples. In the southern part of the sampling area we found extremely low or no length polymorphisms. In this area (samples #1–#37) only one colony, in Knysna (Cape Province), was of the P<sub>0</sub>Q type and all other

41 samples showed the P<sub>0</sub>QQ mitotype. The monomorphic region extends from Cape Town in the south to about the 31° parallel of latitude in the north. In more northern samples we found significantly greater mtDNA variability at the sample locations. The frequencies of the haplotypes at the various sample locations appear in table I.

## DISCUSSION

Our results show that the dominant mitotype in southern Africa carries the P<sub>0</sub>QQ insert between the tRNA and COII genes. Since the honeybee samples used have been analyzed morphometrically by Crewe *et al* (1993) we can compare mitotypes with the racial status of the samples. Seven of the observed *Dral* digest patterns are novel and do not fit those published by Garnery *et al* (1993). Although mitotypes with the short P<sub>0</sub>Q insert appeared at a frequency of 0.2, this type is particularly rare south of the 31° latitude. Nevertheless, length variability of this mitochondrial region alone seems to be an unreliable parameter to discriminate between subspecies in South Africa. Meusel and Moritz (1992) reported on a P<sub>0</sub>QQQ type in *Apis mellifera capensis* which was not found in this study. Yet their sample was based on an import of *A m capensis* queens to Germany that were maintained over several years through artificial insemination. The long P<sub>0</sub>QQQ insert is clearly not typical for *A m capensis* as we can see in the present study. Also surprising is the high variability found north of 30° latitude. As many as nine different mitotypes could be identified in the north, in contrast to only two in the south.

One explanation for the asymmetry is that adjacent populations or subspecies feed into the mtDNA pool of the northern honeybee populations. Indeed *Apis mellifera adansonii* in the north-west and *A m litorea* along the north-east coast are well defined sub-

species that potentially can have race specific mtDNA types. However, the samples collected in Transvaal (#49–#54) also revealed the high variability, yet the morphometric evaluation of the same samples (Crewe *et al*, 1993) indicated that these honeybees exactly fit the classical phenotype of *A m scutellata*. Furthermore, morphological variability is low in this area giving no sign for hybridization at the subspecies level.

Another explanation could be that the mitotype of *A m capensis* extends far into the geographic area of *A m scutellata*. Due to the thelytoky of laying workers and the spread of this trait as far north as the 31st° parallel of latitude (Hepburn and Crewe, 1991) such a cyto-nuclear disequilibrium could be possible in theory, but it certainly requires more information on both mitochondrial and nuclear DNA variability before any reasonable conclusions can be drawn.

At present only the following seems clear. The size variability which proved to be informative for the analysis of the three major subspecies branches, fails to correspond to the clear cut classifications of the South African subspecies, *A m scutellata* and *A m capensis* as obtained through morphometry. The digests with *DraI* revealed seven new mitotypes in addition to the 21 previously reported by Garnery *et al* (1993), which confirms the potential for the use of this technique as a powerful tool in population genetic studies of honeybees.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Gisela Liebrich for skilful technical assistance. We wish to thank the DFG and the DARA for granting financial support to RFAM and PK. This work is dedicated to our friend and mentor Prof Dr Friedrich Ruttner on the occasion of his 80th birthday.

#### Deutsche Version

## Mitochondriale DNA-Variabilität in südafrikanischen Honigbienen (*Apis mellifera* L)

**Zusammenfassung** — Die mtDNA Längenvariabilität bei Honigbienen (*Apis mellifera* L) wurde in einer Stichprobe von 102 Völkern im Bereich südlich des 27. Breitengrads in Afrika mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Die Region zwischen den COI und COII Genen zeigte 4 verschiedene Längenvarianten. Ein Typus war bislang noch nicht beschrieben und paßt nicht in das bekannte repetitive DNA-Muster in diesem Bereich (ein Fragment P<sub>0</sub> mit 69 Bp und eine variable Anzahl von Fragmenten Q mit einer Länge von 196 Bp). Obwohl diese Region zur biogeographischen Analyse von *Apis mellifera* Rassen mit Erfolg herangezogen worden ist, gibt es nur eine begrenzte Übereinstimmung von mtDNA Variabilität mit morphologischen und physiologischen Rassenmerkmalen im südlichen Afrika. Insgesamt war der P<sub>0</sub>QQ-Typ am häufigsten vertreten. Die Region, die als Hybridzone zwischen *A m capensis* und *A m scutellata* beschrieben worden ist, war monomorph für den P<sub>0</sub>QQ - Typ. Beachtliche Längenvariabilität wurde nördlich und östlich dieser Region gefunden, mit Frequenzen für P<sub>0</sub>QQ von 0,57 und P<sub>0</sub>Q von 0,36. Weniger häufig war der P<sub>0</sub>QQQ-Typus mit einer Frequenz von 0,02 und ein Typ, der nicht in das P/Q Muster paßt (0,02). Die Restriktion der COI-COII Region mit *DraI* ergab weitere bislang unbeschriebene mtDNA Variabilität in *Apis mellifera* Populationen.

*Apis mellifera scutellata* / *Apis mellifera capensis* / mtDNA / Polymorphismus

## EINLEITUNG

Das Verständnis der Selektionsdynamik in natürlichen Populationen der Honigbiene kann nur mit Hilfe geeigneter vererbbarer Marker untersucht werden. Dies können morphologische Merkmale sein, wenn starke Geneffekte die Merkmalsausprägung beeinflussen und die genetische Variabilität groß ist. Umweltbedingte Variabilität kann jedoch leicht die Trennschärfe morphologischer Merkmale vermindern. Obwohl der Nutzen klassischer biometrischer Studien für die Phylogenie der Honigbiene und der Klassifizierung von Rassen unbestritten ist (für eine Übersicht siehe Ruttner, 1988), umgehen DNA Studien das Problem der Umwelteffekte und etliche Autoren nutzen daher Kern DNA Sonden zur Darstellung genetischer Variabilität bei Honigbienen (Hall, 1989; Oldroyd *et al.*, 1993). Die Analyse der mtDNA wurde jedoch am häufigsten zur Klassifizierung von Honigbienenrassen eingesetzt und rassenspezifische mtDNA Variabilität wurde wiederholt zur Analyse der Biogeographie der Honigbiene eingesetzt (Hall und Smith, 1991; Smith *et al.*, 1989; Cornuet *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992). Besonders Aufmerksam wurde dabei der Längenvariabilität in der COI-COII Region zuteil, die unabhängig von Crozier *et al.* (1989); Crozier und Crozier (1992) sowie Cornuet und Mitarbeitern (Cornuet *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992) sequenziert wurde. Die variable Region ist flankiert von zwei *Bcl* I - Schnittstellen und variiert zwischen 1150–1600 Bp. Abhängig vom Mitotypus besteht sie aus einer Sequenz P (54 Bp) und einer variablen Anzahl von Fragmenten Q (196 Bp). Afrikanische Honigbienen sind statt dem Fragment P durch ein Fragment P<sub>0</sub>, mit einer Substitution, einer 2 Bp Deletion und einer 16 Bp Insertion gekennzeichnet. Für das Q Fragment wurden Mitotypen mit bis zu 4 Repeats gefunden und Garnery und Cornuet (1992) konnten mit Hilfe dieser Variabilität eine

phylogeographische Karte über die mögliche Kolonisation Europas und Afrikas mit Honigbienen entwickeln. Im Gegensatz zu Ruttner (1988) fanden sie drei Kolonisationsäste, zwei nördlich des Mittelmeeres und einer südlich, der nach Afrika hineinreicht.

Obwohl die mtDNA Variabilität zur Analyse der Hauptäste der Phylogeographie der Honigbiene im Mittelmeerraum genutzt wurde, steht die Untersuchung des Afrikanischen Kontinents weitgehend aus. Für keine der acht beschriebenen Rassen Afrikas (Ruttner, 1988) sind bislang typische mitochondriale Marker gefunden. Einige Arbeiten sind auf zu kleine Stichproben basiert, als daß sie repräsentative Informationen über rassenspezifische Mitotypen erlauben. So fanden Meusel und Moritz (1992) zwar Längenvariation zwischen *A m scutellata* und *A m capensis* aber die Stichprobe von 10 Völkern war deutlich zu klein, um rassensrelevante Aussagen machen zu können. In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir die Längenvariabilität zwischen dem tRNA<sup>Leu</sup>- und dem COII-Gen im mitochondrialen Genom in einer repräsentativen Stichprobe südafrikanischer Honigbienen. Wir untersuchen, ob das P<sub>0</sub>Q Repeat-System geeignet ist, auch die südafrikanischen Rassen der Honigbiene zu analysieren.

## MATERIAL UND METHODE

Adulte Arbeiterinnen wurden von 102 Völkern an 29 verschiedenen Standorten, wie in Abbildung 1 dargestellt, gesammelt. Die Proben wurden in 70%igem Alkohol über zwei Jahre gelagert, bevor sie für die molekulare DNA-Analyse verwandt wurden. Die Thoraces einzelner Arbeiterinnen wurden 2 Stunden in Insektenringer (0,128 M NaCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, pH 7,4 mit NaOH) bei Zimmertemperatur gewaschen. Die Proben wurden entweder über Nacht unter Vakuum getrocknet oder lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 300 µl Wilson-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl;

0,1% SDS; 50 mM Dithiotheritol) homogenisiert. Für den Verdau der Proteine wurden 500 µl Wilson- Puffer sowie 10 µl Proteinase K zugegeben und für 2 Stunden auf 50°C erhitzt. Die Proteine wurde zweimal mit puffergesättigter Phenol/Chloroform (1:1) - Lösung extrahiert und die wäßrige und Lösungsmittelphase mit einer kurzen Zentrifugation (5000 Upm) separiert. Natriumacetat (3 M, 1/10 des Probenvolumens) und Ethanol (2-faches Probenvolumen) wurden für die DNA-Präzipitation (bei -20°C, über Nacht) hinzugegeben. Die DNA wurde bei 12 000 Upm pelletiert und einmal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die Probe in sterilem Wasser resuspendiert.

Zwei Primer, *E2* und *H2* (siehe Garnery *et al*, 1992 für die Sequenzen), die den Bereich der Längenvariabilität flankieren, wurden für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gemäß Garnery *et al* (1992) eingesetzt. 1 µl der DNA-Probe wurde in folgendem PCR-Ansatz eingesetzt: 5 µl 10 Reaktionspuffer (bereitgestellt vom *Taq*-Polymerase Hersteller), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 Units *Taq*-Polymerase, 110 µM dNTP, 1 mM *E2* Primer, 1 mM *H2* Primer. Die Reaktionslösung wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und die Polymerase-Reaktion wurde 35 mal unter folgendem Thermoprofil durchgeführt: 45 s bei 92°C → 45 s bei 42°C → 120 s bei 62°C.

Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5% igen Agarosegel bei 100 V über 2,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und über einer UV-Analysenleuchte fotografiert. Mit Hilfe einer Restriktion mit dem Enzym *Dral* (10 µl DNA-Probe, 9,5 µl H<sub>2</sub>O, 0,5 µl *Dral* bei 35°C, 3 h) wurden die DNA-Fragmentmuster entweder in je einem 5%igen und einem 10%igen oder einem 7%igen Polyacrylamidgel (1,5 h bei 250 V) dargestellt. Das Enzym *Dral* wurde gewählt, da durch den hohen AT-Anteil in der variablen Region viele potentielle *Dral* Schnittstellen (TTT/AAA) zu erwarten sind.

## ERGEBNISSE

Durch Längen- und Schnittstellenvariabilität konnten insgesamt 9 verschiedene Mitotypen dargestellt werden (Abb 2). Der P<sub>0</sub>QQ-Typus war mit einer Frequenz von 0,76 am häufigsten in der Stichprobe vertreten. P<sub>0</sub>Q hatte lediglich eine Frequenz

von 0,20. Nur zwei Proben in Warmbaths (#53) und Piet Retief (#51) zeigten den P<sub>0</sub>QQQ-Typus. Zwei Proben aus Durban (#40) hatten eine Länge, die nicht dem klassischen P und Q Muster von Cornuet *et al* (1991) entsprachen. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von etwa 950 Bp und liegt damit zwischen dem P<sub>0</sub>QQ- und dem P<sub>0</sub>QQQ-Typus und paßt zu keiner P und Q Kombination. Im *Dral* Verdau fehlt die typische 109 Bp Bande (Garnery *et al*, 1993) und statt dessen findet man eine 85 Bp große Bande im 7%igen Agarosegel. Dies weist auf einen Austausch des P<sub>0</sub> Fragments durch ein sehr kurzes DNA Stück von etwa 20 Bp hin. Das Muster paßt zu drei Q Fragmenten im PCR-Produkt.

Nicht alle P<sub>0</sub>QQ - Mitotypen waren identisch, wie der *Dral* Verdau zeigt. Insgesamt fanden wir fünf verschiedene Muster, die eine weitere Klassifizierung der Proben erlaubten. Im südlichen Teil des Probengebietes waren Polymorphismen allerdings äußerst selten. Im Bereich der Sammelorte #1-#37 fanden wir nur in einem einzigen Volk in Knysna den P<sub>0</sub>Q-Typus alle anderen Völker entsprechen P<sub>0</sub>QQ Typus a (Abb 2). Diese monomorphe Region erstreckt sich von Kapstadt im Süden bis zum 31° Breitengrad im Norden. In Proben weiter nördlich finden wir eine deutlich größere mtDNA-Variabilität. Tabelle I zeigt die Häufigkeiten der Haplotypen an den verschiedenen Standorten.

## DISKUSSION

Unsere Ergebnisse zeigen, daß der häufigste Mitotypus bei Honigbienen im südlichen Afrika das P<sub>0</sub>QQ-Fragment im variablen Bereich zwischen dem tRNA<sup>Leu</sup> und dem COII-Gen trägt. Sieben der beobachteten *Dral* Restriktionsmuster sind neu beschrieben und passen nicht in die Musterpalette von Garnery *et al* (1993). Obwohl der P<sub>0</sub>Q-Typus insgesamt mit einer Frequenz von

0,2 auftritt, ist er nur in einem einzigen Volk südlich des 31. Breitengrads gefunden worden. Die Längenvariabilität alleine scheint jedoch dennoch ein ungeeigneter Parameter zur Klassifizierung der Rassen zu sein. Meusel und Moritz (1992) berichten über einen P<sub>0</sub>QQQ-Typus bei *Apis mellifera capensis*, den wir in dieser Studie nicht gefunden haben. Allerdings war ihre Studie auf Nachkommen von wenigen Importköniginnen nach Deutschland basiert, die über instrumentelle Besamung als künstliche Linien gehalten werden mußten. Offensichtlich ist der P<sub>0</sub>QQQ-Typus kein typischer Vertreter von *A m capensis*, wie die vorliegende Studie zeigt. Am meisten überrascht jedoch die hohe Variabilität, die wir nördlich des 31. Breitengrads gefunden haben. Neun Mitotypen konnten dort identifiziert werden, im Gegensatz zu zwei Haplotypen im Süden.

Eine Erklärung für diese Asymmetrie könnte dadurch gegeben sein, daß angrenzende Populationen in den mtDNA-Pool der nördlichen Honigbienenpopulationen eindringen. Tatsächlich sind *A m adansonii* im Nordwesten und *A m litorea* entlang der Nordostküste wohl definierte Rassen mit potentiell rassentypischer mtDNA. Viele der hochvariablen Proben wurden allerdings in Transvaal gefunden, in einem Gebiet, das als autochthones Verbreitungsgebiet von *A m scutellata* angesehen wird (Crewe *et al*, 1993). Eine biometrische Analyse der hier molekular untersuchten Proben ergab, daß die Bienen exakt dem *A m scutellata* Phänotyp entsprechen (Crewe *et al*, 1993). Zudem war die Variabilität der untersuchten morphologischen Merkmale gering, so daß es keinerlei Hinweise für eine potentielle Hybridisierung auf der Rassenebene gibt.

Eine andere Erklärung könnte sein, daß der *A m capensis* Mitotypus sich weit in das Verbreitungsgebiet von *A m scutellata* erstreckt. Ein Cyto-nukleares Ungleichgewicht scheint durchaus möglich, wenn man die thelytoke Parthenogenese legender

Arbeiterinnen und die Verbreitung dieser Eigenschaft bis zum 31. Breitengrad (Hepburn und Crewe, 1991) berücksichtigt. Zur Prüfung dieser Hypothese wird es allerdings notwendig sein, mehr empirische Daten bezüglich der Kern- und mtDNA Variabilität zu gewinnen.

Derzeitig scheint nur folgendes klar. Die Längenvariabilität der mtDNA, die zur Analyse der drei biogeographischen Hauptäste der Honigbienenrassen hilfreich war, kann nicht zur Stützung der morphometrischen Klassifikation der südafrikanischen Bienenrassen herangezogen werden. Der Verdau des variablen Bereichs mit *Dral* zeigte 7 neue Mitotypen zu den bereits 21 vorher gefundenen (Garnery *et al*, 1993) und bestätigt damit den Nutzen dieser Technik als wertvolles Werkzeug in populationsgenetischen Studien der Honigbiene.

## DANKSAGUNG

Wir danken Gisela Liebrich für versierte technische Assistenz. Die DFG und die DARA gaben RFAM und PK finanzielle Unterstützung. Diese Arbeit ist unserem Freund und Lehrer Prof Dr F Ruttner zu seinem 80 Geburtstag gewidmet.

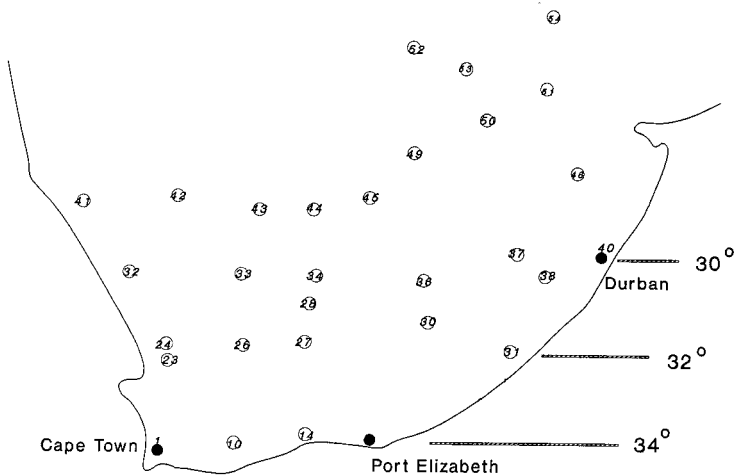
**Résumé — Variabilité de l'ADN mitochondrial chez les abeilles (*Apis mellifera* L) d'Afrique du Sud.** L'ADN mitochondrial (ADNmt) de l'abeille se caractérise par une variabilité de longueur entre les gènes codant pour l'ARN de transfert de la leucine (ARNt-Leu) et la cytochromoxydase II. Un court fragment P de 54 paires de bases et une ou plusieurs répétitions de la séquence Q, constituée de 196 paires de bases, est caractéristique de cette région d'ADN. Les races africaines d'*A mellifera* se distinguent par un fragment P<sub>0</sub> de 68 paires de base à la place du fragment P (Garnery *et al*, 1992). Dans ce travail nous étudions la variabilité de l'ADNmt chez les abeilles d'Afrique du Sud. Des ouvrières ont

été prélevées dans 102 colonies réparties en 29 localités (fig 1) et conservées dans l'éthanol. Après un stockage de 2 ans l'ADN a été extrait au laboratoire selon la méthode de routine. La région d'ADN où se trouve la variabilité de longueur a été amplifiée par PCR avec les amorces E2 et H2 (voir Garnery *et al*, 1992 pour la séquence). Le produit de PCR a été ensuite coupé par l'enzyme de restriction *DraI* et le profil du fragment analysé. On a trouvé les variantes de longueur P<sub>0</sub>Q, P<sub>0</sub>QQ, P<sub>0</sub>QQQ, ainsi qu'un nouveau type XQQQ, et un total de 9 mitotypes différents (fig 2). C'est au nord du 31<sup>e</sup> parallèle qu'on trouve la plus forte variabilité de l'ADNmt. Là, tous les mitotypes sont présents. Au sud de cette ligne, dans une région qui était considérée depuis longtemps comme une zone d'hybridation entre *A m capensis* et *A m scutellata* ou comme l'aire de répartition autochtone d'*A m capensis*, seul le mitotype P<sub>0</sub>QQ était présent, à l'exception d'une colonie à Knysna (localité n° 14).

Le fait que dans les régions limitrophes de la région étudiée aient lieu des intro-

gressions des races adjacentes dans l'aire d'*A m scutellata* peut expliquer l'assymétrie de la variabilité de l'ADNmt. En effet les échantillons prélevés au hasard dans le Transvaal présentaient une forte variabilité. Cette région était considérée depuis longtemps comme l'aire de répartition d'*A m scutellata* (Crewe *et al*, 1994). Une autre explication pourrait provenir de l'introgresion assymétrique d'*A m capensis* dans l'aire de répartition d'*A m scutellata*. En raison de la parthénogenèse thélytoque des ouvrières pondieuses de l'abeille du Cap, on peut s'attendre théoriquement à un déséquilibre cyto-nucléaire. Des analyses complémentaires qui prennent en compte l'ADN nucléaire sont encore nécessaires avant de tirer des conclusions définitives. Malgré ces questions en suspens, les résultats montrent que la méthode (restriction par *DraI* du produit de PCR) constitue un outil hautement efficace pour l'analyse génétique des populations d'abeilles.

#### ***A m scutellata* / *A m capensis* / polymorphisme / mtDNA / population génétique**



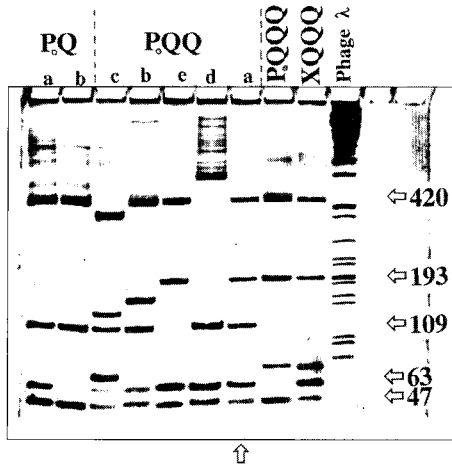
**Fig 1.** Map of the sample locations in southern Africa.

**Abb 1.** Karte der Sammelorte im südlichen Afrika



**Table I.** Mitotype frequencies at the sample locations ( $n$  = number of colonies).**Table I.** Mitotypen Frequenzen an den verschiedenen Sammelstandorten ( $n$  = Anzahl gesammelter Völker).

Location	Colonies		Frequency of									
	(n)		$P_0Q$		$P_0QQ$				$P_0QQQ$		$XQQQ$	
			a	b	a	b	c	d	e			
Capetown	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Heidelberg	10	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Knysna	14	7	0.14	0	0.86	0	0	0	0	0	0	0
Citrusdal	23	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Calvinia	24	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Sutherland	26	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Beaufort West	27	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Victoria West	28	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Queenstown	30	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Port St John	31	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Garies	32	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Tontelbos	33	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Britstown	34	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Zastron	36	4	0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0	0
Underberg	37	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ixopo	38	4	0	0.25	0.75	0	0	0	0	0	0	0
Durban	40	3	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67
Alexander Bay	41	4	0.25	0	0.5	0.25	0	0	0	0	0	0
Ariemsvlei	42	4	0.5	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0
Uppington	43	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Postmasberg	44	4	0	0.25	0.5	0	0	0	0.25	0	0	0
Warrenton	45	4	0.5	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0
Vryheid	48	4	0.25	0	0.75	0	0	0	0	0	0	0
Klerksdorp	49	3	0	0	0.67	0	0	0.33	0	0	0	0
Nigel	50	3	0.67	0	0.33	0	0	0	0	0	0	0
Piet Retief	51	8	0.38	0	0.5	0	0	0	0	0.13	0	0
Thabazimbi	52	4	0.25	0	0.75	0	0	0	0	0	0	0
Warmbaths	53	4	0.25	0	0.5	0	0	0	0	0	0.25	0
Hoedspruit	54	4	0.75	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0



**Fig 2.** Electropherogram showing the various haplotypes found in the study. The  $P_0$ QQ type *a* in lane 7 represents the most common mitotype in the *capensis* area and the so-called hybrid zone to *scutellata*. The fragment sizes of type  $P_0$ QQ-*a* are shown in the electropherogram which was calibrated with a Phage 1 *Pst*I digest. The other types are found north and east of this area. **Abb 2.** Elektropherogramm der verschiedenen Haplotypen, die in der vorliegenden Studie gefunden wurden. Der  $P_0$ QQ Typus *a* (Spur 7) ist der häufigste im A m *capensis* Verbreitungsgebiet und der sogenannten Hybridzone zu A m *scutellata*. Die anderen Haplotypen werden nördlich und östlich dieses Gebiets gefunden. Die Fragmentgrößen des  $P_0$ QQ-*a* Typs sind am Rand des Gels angegeben, das mit Phage 1 DNA (*Pst*I Restriktion) kalibriert wurde.

## REFERENCES

- Cornuet JM, Garnery L, Solignac M (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L mitochondrial DNA. *Genetics* 128, 393-403
- Cornuet JM, Garnery L (1991) Phylogenetic relationship in the genus *Apis* inferred from mitochondrial sequence data. *Apidologie* 22, 627-642
- Crewe RM, Hepburn HR, Moritz RFA (1993) Morphometric analysis of two southern African races of honeybee. *Apidologie* 25, 61-70
- Crozier RH, Crozier YC (1992) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization. *Genetics* 133, 97-117
- Crozier RH, Crozier YC, and Mackinklay AG (1989) The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: Evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol Biol Evol* 6, 399-411
- Garnery L (1992) Variabilité de l'ADN mitochondrial de l'abeille domestique : implications phylogénétiques. Doctoral thesis, Université Paris VI
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol Ecol* 1, 145-154
- Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49, 1016-1021
- Hall HG (1986) DNA differences found between Africanized and European honeybees. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4874-4877
- Hall HG (1990) Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics* 125,611-621
- Hall HG, Smith DR (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilines using amplified mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88,4548-4552
- Hepburn HR, Crewe RM (1991) Portrait of the Cape honeybee, *Apis mellifera capensis*. *Apidologie* 22, 567-580
- Meusel MS, Moritz RFA (1992) Mitochondrial DNA length variation in the cytochrome oxidase region of honey bee (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 23, 147-150
- Oldroyd BP, Sheppard WS, Stelzer JA (1993) Genetic characterization of the bees of Kangaroo Island, South Australia. *J Apic Res* (in press)
- Ruttner F (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Smith DR, Taylor OR, Brown WM (1989) Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature (Lond)* 339, 213-215