

Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya

MD Meixner¹, WS Sheppard², A Dietz³, R Krell⁴

¹ Institut für Bienenkunde (Polytechnische Gesellschaft), JW Goethe Universität,
Frankfurt am Main, Karl-von-Frisch-Weg 2, 61440 Oberursel, Germany;

² USDA-ARS, Bee Research Laboratory, Bldg 476, BARC-E, Beltsville, MD 20705;

³ Dept of Entomology, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA;

⁴ Istituto Sperimentale per La Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura,
Via Leonida Rech 36, 00156 Rome, Italy

Summary — 43 samples of honey bees from three different regions in Kenya were analyzed morphometrically and surveyed for electrophoretic variation at five enzyme loci (malate dehydrogenase, phosphoglucosmutase, malic enzyme, esterase and hexokinase). Discriminant analysis of the morphometrical measurements classified most samples from above 2000 m as *Apis mellifera monticola* and samples from below as *A m scutellata*. Some samples collected in the Ngong region (2000 m) had intermediate positions in this analysis. All enzyme loci in the study were polymorphic, with Est and HK showing the highest degree of polymorphism. For ME, PGM and Est, new alleles are reported. A homogeneity Chi² test showed significant heterogeneity between members of the two subspecies. Analysis of the allozyme data by a Distance Wagner procedure resulted in two main clusters, consisting of *A m monticola* from Mt Elgon and Mt Kenya in one and all other populations in a second cluster. Savanna and mountain bees from Ngong formed a separate subcluster. These findings strengthen the hypothesis that the disjunct *A m monticola* populations are descendants of a common ancestor now restricted to mountain refugia.

***Apis mellifera monticola* / *Apis mellifera scutellata* / allozymes / morphometry / Kenya**

INTRODUCTION

The geographic variability and taxonomy of the honey bee, *Apis mellifera*, in Africa is not as thoroughly studied as in Europe. The data collections serving as bases for taxonomic studies are fewer and smaller (Ruttner, 1988, 1992). In early taxonomic studies evaluating the geographic variability of African honey bees, all the bees south of the Sahara desert were believed to belong to a single subspecies, *Apis mellifera adansonii* Latreille (Buttel-Reepen, 1906; Kerr and Portugal

Araujo, 1958). Subsequently it was determined that the races of East and West Africa could be morphometrically discriminated and Ruttner (1976) suggested restriction of the name *A m adansonii* to the western strain and *Apis mellifera scutellata* Lapeletier to the bee of East and South Africa.

In 1961, Smith described two additional races based on morphometric analysis, *A m litorea* in the coastal plains and *A m monticola* in mountainous areas of Tanzania, suggesting ecological separation between these races and the savanna bee. Subsequent

morphometric analyses (Ruttner, 1976, 1988; Ruttner and Kauhausen, 1985) indicated the existence of continuous variation and an ecocline between *A m monticola* and *A m scutellata*. Based on analysis of bees from the Kilimanjaro region Meixner *et al* (1989) reported that *A m monticola* is a separate race with partial reproductive isolation from *A m scutellata*.

Although in the last decade allozyme analysis became a widely used instrument to study honey bee racial relationships (Badino *et al*, 1983, 1984; Cornuet, 1982; Sheppard and Berlocher, 1984, 1985; Sheppard and McPheron, 1986), comparatively little experimental work has been done on allozymes of African honey bees (Ndiritu *et al*, 1986). Most of the knowledge accrued to date comes from studies on Africanized bees in South and Central America (Sylvester, 1982; Del Lama *et al*, 1988, 1990; Sheppard *et al*, 1991) or comparisons of these bees with colonies obtained from South Africa (Nunamaker and Wilson, 1981), but no multi-locus study on a large collection of honey bees from Africa has been conducted. Thus, the allozymic variability of the honey bee in Africa and its potential to provide an additional source of data for taxonomic studies is still unknown.

The objective of this paper is to determine allozymic variability of honey bees in Kenya and to evaluate differences in allozyme patterns of morphometrically classified *A m scutellata* and *A m monticola*.

MATERIALS AND METHODS

43 samples of honey bees were collected in three mountainous and neighbouring savanna regions of Kenya: at Mt Elgon and environment, around Mt Kenya and in the Ngong region, close to Nairobi (fig 1). Bees were taken from traditional or modern hives, stocked with swarms of local bees. Live workers were collected and stored in dry ice, transported to Beltsville and stored at -85°C until electrophoretic analysis.

A subset of each sample (about 20 bees) was transferred to 70% ethanol and shipped to Oberursel where the bees were analysed morphometrically. The measurements for morphometrical classification were taken from 15 workers per sample using methods modified from Ruttner (1988). The statistical analysis was performed with the programs 'factor' and 'discriminant' in SPSS/PC+. Classified samples of *A m monticola* and *A m scutellata* from the Oberursel morphometric data bank were used as reference for subspecies identification.

For allozyme study, five enzyme systems known to be polymorphic in European bees were selected; MDH-1, ME, PGM-1, Est-3 and HK. The electrophoresis was carried out on crude head-thorax homogenates on 11% horizontal starch gels using three different buffer systems (table I). At least 15 workers per sample were analysed. Enzyme activity was visualized using standard histochemical staining methods (Harris and Hopkinson, 1976).

According to the sampling localities and the results of the morphometrical analysis, the allozyme data of the samples studied were pooled into six population groups. For each locus, allozyme frequencies and average heterozygosity were computed. Allozyme frequencies of the two races were compared with a homogeneity Chi^2 test. A Distance-Wagner-analysis of the Prevosti genetic distances was performed to visualize similarities between population groups, using the Biosys program of Swofford and Selander (1981).

RESULTS

Morphometric analysis

In general samples collected from forested areas above 2000 m altitude were classified as *A m monticola* and samples from lower altitudes with savanna type vegetation as *A m scutellata*. The characters that contributed most to the discrimination were pilosity, body size and pigmentation, as known from honey bees in Tanzania (Meixner *et al*, 1989). A large portion of the

samples from the Ngong area (collected at 2000 m) displayed intermediate discriminant scores indicating a certain degree of hybridization between the two races.

Figure 2 shows the result of a discriminant analysis in which the samples were grouped together according to their collecting site and the classification as mountain or savanna bee. The three populations of *A m monticola* are grouped together to the left, away from the clusters of *A m scutellata* to the right. The mountain and savanna bees from Mt Elgon and Mt Kenya are positioned closer together than direct neighbours from the same area (except for one misclassified *monticola* sample from Mt Kenya). In contrast, all *A m monticola* samples collected in the Ngong Hills are situated close to the *A m scutellata* cluster showing some degree of hybridization between *A m scutellata* and *A m monticola*.

Allozymes

All five loci investigated were polymorphic in the samples studied. The allele frequencies for the six populations in study are shown in table II.

MDH-1

The polymorphism of MDH-1 in Kenya consisted of three alleles: MDH¹⁰⁰, MDH⁸⁰ and MDH⁶⁵. As MDH-1 is the most extensively studied locus in African and Africanized bees, the MDH¹⁰⁰ allele frequencies met expectations, with MDH¹⁰⁰ frequency ranging between 0.97 and 1.00. MDH⁸⁰ was rare and MDH⁶⁵ was found only in a single colony.

ME

In general, this locus was nearly fixed for the allele ME¹⁰⁰ in the populations. In one colony, a previously unknown allele, ME¹¹⁷,

was found. The heterozygous individuals exhibited a five-banded staining pattern, confirming the tetrameric structure of this enzyme in honey bees, as suggested by Sheppard and Berlocher (1984). To our knowledge, no crossing experiments on ME have been conducted.

PGM-1

This locus showed a polymorphism consisting of three alleles, PGM¹⁰⁰, PGM⁷⁵ (Del Lama *et al*, 1985; Sheppard and McPherson, 1986) and the previously unreported PGM¹²⁰. The frequency of PGM¹⁰⁰ was higher than 0.97 in all samples analysed and fixed in some populations.

Est-3

Of the loci studied, Est-3 showed the highest degree of polymorphism. We found the three known alleles Est¹⁰⁰, Est¹³⁰ and Est⁷⁰ and a previously unreported one. The new allele, Est¹⁰, is quite unusual, travelling just one tenth of Est¹⁰⁰. The frequency of Est¹⁰⁰ was less than 0.95 in all populations.

HK

HK showed two alleles, HK¹⁰⁰ and HK⁸³, known from Africanized bees in South America (Del Lama *et al*, 1988). Whereas the frequency of HK¹⁰⁰ ranges between 0.97 and 0.99 in savanna populations and the bees from Ngong, it was significantly lower in the mountain bees of Mt Kenya (0.79) and Mt Elgon (0.73). Thus, this polymorphism may have some importance for discriminating *A m scutellata* from *A m monticola*.

Table III shows the results of a homogeneity Chi² test between samples of the two races. There is significant heterogeneity between members of the two subspecies — mainly caused by the differences of the allele frequencies of hexokinase. Consid-

ering the loci singly, only ME and Est failed to show significant heterogeneity between the two subspecies.

The Distance Wagner analysis of the matrix of the Prevosti genetic distances (table IV) is shown in figure 3. Two main clusters emerge: the *A m monticola* populations of Mt Elgon and Mt Kenya are grouped together in one cluster, whereas all the other populations are combined in a second cluster including the two populations from the Ngong area as a separate subcluster.

DISCUSSION

The results of this study show that there is considerable genetic variability in honey bees from East Africa. Whereas the variability of MDH, the only locus previously investigated in African honey bees, was about the same as reported by Nunamaker and Wilson (1981) and Ndiritu *et al* (1986), the loci Est and HK were remarkably polymorphic. Polymorphism of HK in honey bees has been previously reported only from Africanized bees in South America (Del Lama *et al*, 1988, 1990), the allele frequency of HK¹⁰⁰ ranging between 0.396 and 0.553 in Brazil (Del Lama *et al*, 1988), much lower than the mean frequency of 0.81 for *A m monticola* and 0.98 for *A m scutellata* found in this study. There might be several reasons for this difference – geographic variability of the HK polymorphism within Africa resulting in higher frequencies of HK⁸³ in South Africa where the source population of the New World Africanized honey bees originated, or founder effects following the introduction of a small number of queens to Brazil.

The three previously unreported alleles for ME, PGM and Est-3 we found are rare in our samples and have not been reported from Africanized honey bee populations in the New World. This fact, too, can be explained by the loss of genetic variation

that followed the severe population bottleneck, when African bees were set free in Brazil. By this kind of sampling error, rare alleles are expected to be lost first. A similar situation is observed in the United States, where several enzymes (ME, PGM) are fixed for one allele although they are reported to be polymorphic from Europe (Sheppard, 1988).

The results of the morphometric analysis show that the *A m monticola* populations from distant areas are very similar to each other and that, in contrast, there is great divergence between the mountain bees and the nearby *A m scutellata* populations on Mt Kenya and Mt Elgon. These results, and the characters they are based on, correspond to the situation observed on Mt Kilimanjaro and Mt Meru in Tanzania (Meixner *et al*, 1989). In the Ngong area, however, the separation between members of the two races appears to be less distinct, the total of the Ngong bees being more similar to *A m scutellata*. This observation indicates some degree of hybridization between the two races in the Ngong Hills which is perhaps correlated to the environmental change in this region. Here, the natural habitats of mountain forest and savanna no longer exist but have been replaced by cultivated areas of gardens and plantations.

The same result is found when looking at the allozyme data. *A m monticola* bees from Mt Elgon and Mt Kenya show similar allozyme variation, resulting in the aggregation of these two populations in one cluster in the Distance Wagner analysis. The bees from Ngong are incorporated in the cluster of *A m scutellata* and show little subdivision between samples classified as *A m monticola* and *A m scutellata*. This pattern supports the hypothesis of hybridization between the races in the Ngong area, generated on the morphometric results.

Thus, we conclude that bees from distant mountainous regions are more similar to each other than to their nearby *A m scutellata* neighbours. Whereas many morpho-

logical characters discriminating *A m scutellata* from *A m monticola*, eg body size and pilosity, are known to be subject to selection forces in honey bees (Ruttner, 1988) and thus less reliable in estimating relationships among taxonomic units, allozymes are estimated to be more neutral with respect to selection (Berlocher, 1984). Therefore the disjunct populations of *A m monticola* may be explained as descendants of a common ancestor now restricted to forested refugia in mountains as suggested by Meixner *et al* (1989), rather than ecologically adapted 'varieties' of *A m scutellata*, generated by continuous variation and selection.

As we concentrated our experiments on loci known to be polymorphic in honey bees and found substantial additional variation, a more complete survey for allozyme variation in African bees may find new polymorphic enzymes for the species. In the last decades, considerable taxonomic work has been performed on the honey bee sub-

species of Africa (Ruttner, 1976, 1981, 1988; Ruttner and Kauhausen, 1985; Meixner *et al*, 1989), but the limited sampling across the continent permits only an 'overview' (Ruttner, 1988) of racial diversity. Our results indicate that allozyme analysis may be more useful for African than New World genetic studies, as is true for Europe (Sheppard, 1988). Extended studies including additional loci and samples of surrounding subspecies (*A m litorea*, *yemenitica* and *adansonii*) would certainly help to obtain a more complete picture of the geographic variability of *Apis mellifera* in Africa.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank F Ruttner for his encouragement and support and N Koeniger for valuable discussion and helpful comments on the manuscript. Financial support for M Meixner was provided by the Fazit Foundation in Frankfurt am Main, Germany.

Deutsche Version

Morphologische und Allozymatische Variabilität von Honigbienen aus Kenia

Zusammenfassung — 43 Proben von Honigbienen aus drei verschiedenen Regionen von Kenia wurden morphometrisch untersucht. Außerdem wurde die elektrophoretische Variabilität von fünf Enzymloci (Malatdehydrogenase, Phosphoglucomutase, Malat Enzym, Esterase und Hexokinase) analysiert. In der Diskriminanzanalyse der morphometrischen Meßdaten wurden die meisten Proben, die oberhalb von 2000 m gesammelt worden waren, als *Apis mellifera monticola* und Proben aus niedrigeren Lagen als *A m scutellata* klassifiziert. Einige der im Gebiet von Ngong (2000 m) gesammelten Proben nahmen in dieser Analyse intermediäre Positionen ein. Alle untersuchten Enzymloci waren polymorph, wobei Est und HK den höchsten Grad an Variabilität zeigten. Für ME, PGM und Est wurden neue Allele gefunden. Ein χ^2 Kontingenztest zeigt, daß zwischen Angehörigen der beiden geographischen Rassen signifikante Heterogenität nachzuweisen ist. Die Auswertung der Allozymdaten mittels einer Distance Wagner Analyse ergibt zwei Hauptcluster, wobei *A m monticola* Proben von Mt Elgon und Mt Kenya in einem Cluster, und alle anderen Populationen zu einem zweiten Cluster zusammengefaßt werden. Dabei bilden die Berg- und Savannenbienen aus Ngong einen separaten Subcluster. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die disjunkten Populationen von *A m monticola* heute auf Rückzugsgebiete beschränkte Nachkommen gemeinsamer Vorfahren sind.

***Apis mellifera monticola* / *Apis mellifera scutellata* / Allozyme / Morphometrie / Kenia**

EINLEITUNG

Die geographische Variabilität und Taxonomie der Honigbiene, *Apis mellifera*, wurde in Afrika noch nicht so gründlich untersucht wie in Europa, da die als Grundlage für taxonomische Studien dienenden Datensammlungen kleiner und nicht so zahlreich sind (Ruttner, 1988, 1992). In frühen taxonomischen Untersuchungen, die sich mit der geographischen Variation der Honigbiene in Afrika befassen, wurden alle Bienen südlich der Sahara als einheitliche Rasse *Apis mellifera adansonii* Latreille angesehen (Buttel-Reepen, 1906; Kerr und Portugal Araujo, 1958). Später wurde festgestellt, daß sich die geographischen Rassen von West- und Ostafrika morphometrisch unterscheiden lassen und Ruttner (1976) schlug vor, den Namen *A m adansonii* auf die westliche Rasse zu begrenzen und den Bienen in Ost- und Südafrika den Namen *A m scutellata* Lepeletier zu geben.

1961 beschrieb Smith auf der Grundlage morphometrischer Messungen zwei weitere Rassen, *A m litorea* in den Küstenebenen und *A m monticola* in bergigen Gebieten in Tanzania. Er ging dabei von einer rein ökologischen Trennung zwischen diesen beiden Rassen und der Savannenbiene aus. Später folgende morphometrische Analysen (Ruttner, 1976, 1988; Ruttner and Kauhainen, 1985) gaben Hinweise auf kontinuierliche Variation und eine Ökoline zwischen *A m monticola* und *A m scutellata*. Auf der Grundlage von Untersuchungen an Bienen aus dem Gebiet des Kilimanjaro berichteten Meixner *et al* (1989), daß es sich bei *A m monticola* um eine eigenständige Rasse mit partieller reproduktiver Isolation gegenüber *A m scutellata* handelt.

Obwohl die Analyse von Allozymvariation in den letzten Jahren mehrfach zum Studium intraspezifischer Variation bei der Honigbiene eingesetzt wurde (Badino *et al*, 1983, 1984; Cornuet, 1982; Sheppard und

Berlocher, 1984, 1985; Sheppard und McPheron, 1986), sind bis jetzt nur sehr wenige Untersuchungen an Honigbienen aus Afrika durchgeführt worden (Ndiritu *et al*, 1986). Der größte Teil des heutigen Wissensstandes stammt aus Untersuchungen an afrikanisierten Bienen aus Süd- und Zentralamerika (Sylvester, 1982; Del Lama *et al*, 1988; Sheppard *et al*, 1991) oder Vergleichen dieser Bienen mit Völkern aus Südafrika (Nunamaker und Wilson, 1981), jedoch ist bis jetzt noch keine Studie, die mehrere Enzymloci einschließt, an einer größeren Sammlung von Bienen durchgeführt worden. Daher ist die Allozymvariabilität der Honigbiene in Afrika und ihr potentieller Nutzen als zusätzliche Datenquelle für taxonomische Studien noch unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Allozymvariabilität von Honigbienen in Kenia zu ermitteln und festzustellen, ob Unterschiede in den Allozymspektren von morphometrisch klassifizierten Proben von *A m scutellata* und *A m monticola* existieren.

MATERIAL UND METHODEN

43 Proben von Honigbienen wurden in drei Gebirgs- und angrenzenden Savannenregionen in Kenia gesammelt: am Mt Elgon und Umgebung, am Mt Kenya und Umgebung und in den Ngong Hills, in der Nähe von Nairobi (Abb 1). Aus traditionellen oder modernen Beuten wurden Arbeiterinnen abgesammelt und in Trockeneis abgetötet und konserviert. Die Proben wurden nach Beltsville transportiert und bis zur elektrophoretischen Analyse bei -85°C aufbewahrt.

Ein Teil jeder Probe (etwa 20 Bienen) wurde in 70% Ethanol überführt und in Oberursel morphometrisch untersucht. Die Messungen für die morphometrischen Analysen wurden nach Methoden von Ruttner (1988) an 15 Arbeiterinnen pro Probe durchgeführt. Die statistischen Analysen wurde mit den Programmen 'factor' und 'discriminant' des Programmpaketes SPSS/PC+ berechnet. Klassifizierte Proben von *A m monticola* und *A m scutellata* aus der morphometrischen Datenbank in Oberursel wurden als Referenzen für die Identifizierung der Proben benutzt.

Für die Untersuchung der Allozyme wurden fünf Loci, die in Europa polymorph sind, ausgewählt: MDH-1, ME, PGM-1, Est-3 und HK. Die Elektrophorese wurde auf 11% Stärkegelelen unter drei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt (Tabelle I). Dabei wurden mindestens 15 Arbeiterinnen pro Probe untersucht. Die Enzymaktivität wurde durch Färbung mittels histochemischer Standardmethoden sichtbar gemacht (Harris und Hopkinson, 1976).

Die Allozymdaten der Proben wurden entsprechend den Sammelorten und dem Ergebnis der morphometrischen Analyse in sechs Populationsgruppen zusammengefaßt. Für jeden Locus wurden die Allelfrequenzen und die mittlere Heterozygotie berechnet. Die Allelfrequenzen der beiden geographischen Rassen wurden mit einem χ^2 Homogenitätstest verglichen. Um Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Populationsgruppen sichtbar zu machen, wurde eine Distance Wagner Analyse auf der Basis der genetischen Distanzen nach Prevosti durchgeführt. Für alle populationsgenetischen Berechnungen wurde das Biosys-Programm von Swofford und Selander (1981) benutzt.

ERGEBNISSE

Morphometrische Analyse

Im allgemeinen wurden Proben aus bewaldeten Gebieten über 2000 m als *A m monticola* und Proben aus niedrigeren Lagen mit Savannenvegetation als *A m scutellata* klassifiziert. Dabei leisteten Merkmale wie Behaarung, Körpergröße und Pigmentierung den größten Beitrag zur Trennung der beiden Rassen, wie bereits für Honigbienen in Tanzania nachgewiesen wurde (Meixner *et al*, 1989). Ein großer Teil der Proben aus Ngong, die in 2000 m Höhe gesammelt worden waren, hatte intermediäre Diskriminanzwerte, was auf eine gewisse Hybridisierung zwischen den beiden Rassen hindeutet.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis einer Diskriminanzanalyse, in welcher die Proben nach ihrem Sammelort und ihrer Einord-

nung als Berg- oder Savannenbiene dargestellt sind. Die drei Populationen von *A m monticola* bilden auf der linken Seite ein Cluster, der deutlich getrennt von den Proben von *A m scutellata* auf der rechten Seite liegt. Die Berg- bzw Savannenbienen vom Mt Kenya und Mt Elgon liegen dichter zusammen als jeweilige Nachbarn aus demselben Gebiet (außer einer offensichtlich fehleingeordneten *monticola* Probe vom Mt Kenya). Im Gegensatz dazu liegen die als *A m monticola* identifizierten Proben aus den Ngong Hills näher am Cluster von *A m scutellata* und weisen so auf eine Hybridisierung zwischen den Rassen hin.

Allozyme

Alle untersuchten Loci erwiesen sich in den analysierten Proben als polymorph. Die Allelfrequenzen für die sechs Populationsgruppen sind in Tabelle II dargestellt.

MDH-1

In Kenia zeigt MDH-1 einen Polymorphismus mit drei Allelen: MDH¹⁰⁰, MDH⁸⁰ und MDH⁶⁵. Die Allelfrequenzen von MDH entsprachen etwa den Erwartungen, da dieser Locus der bei weitem am besten untersuchte in afrikanischen und afrikanisierten Bienen ist. Die Frequenz von MDH¹⁰⁰ lag im Bereich von 0,97 bis 1,00, MDH⁸⁰ war selten und MDH⁶⁵ wurde nur in einem Volk gefunden.

ME

Dieser Locus war in nahezu allen Populationen fixiert für das Allel ME¹⁰⁰. In einem Volk wurde das bisher unbekannte Allel ME¹¹⁷ gefunden. Die heterozygoten Individuen zeigten nach der Färbung ein fünfbandiges Muster und bestätigten damit die von Sheppard und Berlocher (1984) vorge-

schlagene tetramere Struktur dieses Enzyms. Nach unserem Wissen wurden jedoch noch keine Kreuzungsexperimente auf diesem Locus durchgeführt.

PGM-1

Dieser Locus war mit drei Allelen polymorph, PGM¹⁰⁰, PGM⁷⁵ (Del Lama *et al.*, 1985; Sheppard und McPheron, 1986) und dem vorher unbekanntes PGM¹²⁰. Die Allelfrequenz von PGM¹⁰⁰ war in allen Proben höher als 0,97 und in einigen Populationen fixiert.

Est-3

Dieser Locus zeigt von allen untersuchten Enzymen den am stärksten ausgeprägten Polymorphismus. Wir fanden die drei bekannten Allele Est¹⁰⁰, Est¹³⁰ und Est⁷⁰, sowie ein vorher unbekanntes. Dieses, Est¹⁰, hatte die ungewöhnliche Laufdistanz von nur etwa einem Zehntel von Est¹⁰⁰. Die Frequenz von Est¹⁰⁰ lag in allen Populationen niedriger als 0,95.

HK

Der Locus HK war mit zwei Allelen polymorph, HK¹⁰⁰ und das von afrikanisierten Bienen in Südamerika bereits bekannte HK⁸³ (Del Lama *et al.*, 1988). Während die Allelfrequenz von HK¹⁰⁰ in Savannenbienen sowie in Ngong zwischen 0,97 und 0,99 schwankt, liegt sie in Bergbienen am Mt Kenya (0,79) und Mt Elgon (0,73) signifikant niedriger. Daher könnte dieser Polymorphismus einige Bedeutung für die statistische Trennung zwischen *A m monticola* und *A m scutellata* besitzen.

In Tabelle III ist das Ergebnis eines Chi² Homogenitätstests zwischen den Proben der beiden Rassen zusammengefaßt. Zwischen den Angehörigen der beiden Subspezies wurde signifikante Heterogenität

festgestellt, die hauptsächlich auf die großen Unterschiede in den Allelfrequenzen von Hexokinase zurückzuführen ist. Betrachtet man die Loci hier einzeln, so zeigen nur ME und Est keine signifikante Heterogenität zwischen den beiden Subspezies.

Abbildung 3 zeigt das Dendrogramm der Distance Wagner Analyse auf der Basis der genetischen Distanzen nach Prevosti (Tabelle IV). In dieser Analyse entstehen zwei Hauptcluster: die Populationen von *A m monticola* an Mt Kenya und Mt Elgon werden in einem Cluster vereinigt, während alle anderen Populationen den zweiten Cluster bilden. In diesem sind die beiden Populationen aus der Region um Ngong zu einem separaten Subcluster zusammengefaßt.

DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen bemerkenswerte genetische Variabilität in Honigbienen aus Ostafrika. Während die Variabilität von MDH, dem einzigen bisher in afrikanischen Bienen untersuchten Locus, etwa den von Nunamaker und Wilson (1981) und Ndiritu *et al.* (1986) berichteten Ergebnissen entspricht, sind die Loci Est und HK ausgesprochen polymorph. Polymorphismus von HK in Honigbienen ist bisher nur von afrikanisierten Bienen in Südamerika bekannt (Del Lama *et al.*, 1988, 1990), wobei die Allelfrequenz von HK¹⁰⁰ in Brasilien zwischen 0,396 und 0,553 schwankt (Del Lama *et al.*, 1988). Dies ist viel niedriger als die in dieser Untersuchung ermittelte mittlere Frequenz von 0,81 für *A m monticola* und 0,98 für *A m scutellata*. Es gibt mehrere mögliche Ursachen für diesen Unterschied – innerhalb von Afrika könnte eine geographische Variabilität dieses Polymorphismus bestehen und die Frequenz von HK⁸³ in Südafrika, wo die Ursprungspopulation der südamerikanischen afrikanisierten Bienen herkommt, kann höher

sein als in Kenia. Als weitere Ursache könnte ein Gründereffekt aufgrund der kleinen Anzahl der nach Südamerika eingeführten Königinnen in Frage kommen.

Die drei von uns neu beschriebenen, vorher unbekanntenen Allele für ME, PGM und Est sind in unseren Proben selten und wurden bisher nicht in afrikanisierten Honigbienen der Neuen Welt gefunden. Auch diese Tatsache kann durch den Verlust genetischer Variabilität erklärt werden, der als Folge des Flaschenhalses in der Population durch die Einfuhr der afrikanischen Bienen nach Brasilien auftrat. Eine ähnliche Situation ist in den USA zu beobachten, wo einige Enzymloci (zB ME und PGM) für ein Allel fixiert sind, obwohl aus Europa Polymorphismen bekannt sind (Sheppard, 1988).

Die Ergebnisse der morphometrischen Analyse zeigen, daß Populationen von *A m monticola* aus entfernten Gebieten einander sehr ähnlich sind. Im Gegensatz dazu konnten erhebliche Unterschiede zwischen Bergbienen an Mt Kenya und Mt Elgon und den jeweils unmittelbar benachbarten Populationen von *A m scutellata* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen der an Kilimanjaro und Mt Meru in Tanzania beobachteten Situation (Meixner *et al*, 1989). Im Gebiet von Ngong scheinen jedoch die Unterschiede zwischen Angehörigen der beiden Rassen weniger deutlich zu sein und diese Bienen sind insgesamt mehr *A m scutellata* ähnlich. Diese Beobachtung weist auf eine gewisse Hybridisierung zwischen den beiden Rassen in den Ngong Hills hin, die vielleicht mit Veränderungen der Umwelt in diesem Gebiet zusammenhängt. Die natürlichen Habitate Bergregenwald und Savanne existieren hier nicht mehr, sondern wurden von landwirtschaftlichen Kulturen mit Gärten und Plantagen abgelöst.

Betrachtet man die Variabilität der Allozyme, so findet man dasselbe Ergebnis. Als *A m monticola* klassifizierte Bienen von Mt

Elgon und Mt Kenya zeigen eine ähnliche Variation der Allozyme, und werden daher in der Distance Wagner Analyse in einem Cluster vereinigt. Die Bienen aus Ngong werden in den Cluster von *A m scutellata* aufgenommen und zeigen wenig Unterschiede zwischen Proben die zuvor als *A m monticola* und solchen die als *A m scutellata* klassifiziert wurden. Diese Struktur unterstützt die auf der Basis der morphometrischen Ergebnisse aufgestellte Hypothese, daß in Ngong Hybridisierung zwischen den beiden Rassen stattfindet.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, daß Bienen aus entfernten Gebirgsregionen einander ähnlicher sind als ihren jeweiligen unmittelbaren *A m scutellata* Nachbarn. Während viele morphologische Merkmale, die zur Diskriminierung zwischen den Rassen beitragen, zB Körpergröße und Behaarung, bei Honigbienen Selektionskräften unterworfen sind (Ruttner, 1988) und daher weniger verlässliche Einschätzungen von Verwandtschaft zwischen verschiedenen Taxa liefern, geht man davon aus, daß sich Allozyme im Hinblick auf Selektion neutraler verhalten (Berlocher, 1984). Daher können die disjunkten Populationen von *A m monticola* als Nachkommen gemeinsamer Vorfahren angesehen werden, die heute auf bewaldete Rückzugsgebiete beschränkt sind, wie von Meixner *et al* (1989) vorgeschlagen wurde. Die Hypothese der ökologisch besser angepaßten *A m scutellata*, die an den Bergen durch kontinierliche Variation und Selektion entsteht, erscheint vor dem Hintergrund dieser Daten weniger zutreffend.

Da wir den Schwerpunkt unserer Experimente auf Enzymloci legten, die in Europa als polymorph bekannt waren, und dabei zusätzliche Variation fanden, könnte eine vollständigere Untersuchung der Allozymvariation in Afrika neue polymorphe Enzyme für die Art *Apis mellifera* auffinden. In den letzten Jahren wurde erhebliche Arbeit auf dem Gebiet der intraspezifischen Taxono-

mie der Honigbiene in Afrika geleistet (Ruttner, 1976, 1981, 1988; Ruttner und Kauhhausen, 1985; Meixner *et al*, 1989), jedoch erlaubt die begrenzte Anzahl der bisher gesammelten Proben von diesem Kontinent nur einen allgemeinen 'Überblick' (Ruttner, 1988) über die Vielfalt der geographischen Rassen. Unsere Ergebnisse geben Hinweise darauf, daß die Untersuchung von Allozymen für genetische Studien an Bienen in Afrika besser geeignet ist, als in der Neuen Welt, wie es auch für Europa zutrifft (Sheppard, 1988). Ausführlichere Studien, die zusätzliche Loci sowie Proben von umgebenden Subspezies (*A m litorea*, *yemenitica* und *adansonii*) einschließen sollten, würden sicherlich dazu beitragen, ein vollständigeres Bild der geographischen Variation von *Apis mellifera* in Afrika zu erhalten.

DANKSAGUNG

Wir möchten F Ruttner für seine Unterstützung und vielen wertvollen Anregungen danken. Unser besonderer Dank gilt auch N Koeniger für viele Diskussionen und hilfreiche Kommentare zu dem Manuskript. Die Fazit Stiftung in Frankfurt am Main gewährte finanzielle Unterstützung für M Meixner.

Résumé — Variabilité morphologique et allozymique de l'abeille du Kenya. Quarante-trois échantillons d'abeilles (*Apis mellifera* L) ont été prélevés dans les montagnes et les savanes du Kenya (fig 1). Des mesures morphométriques ont été faites sur 15 abeilles par échantillon et soumises à une analyse statistique multivariée. Des échantillons d'*A m monticola* et d'*A m scutellata* de la banque de données morphométriques d'Oberursel ont été utilisés comme référence pour l'identification des sous-espèces. La variabilité des locus de 5 enzymes, malate déshydrogénase (MDH-1), enzyme malique (ME), phosphogluco-

mutase (PGM-1), estérase (Est-3) et héxokinase (HK), a été étudiée par électrophorèse sur 15 abeilles par échantillon. Les fréquences des allozymes et l'hétérozygotie moyenne ont été calculées pour chaque locus et comparées à l'aide d'un test Chi² d'homogénéité. Une analyse de la distance de Wagner a été réalisée sur les distances génétiques de Prevosti. D'après l'analyse morphométrique la plupart des échantillons prélevés au-dessus de 2 000 m ont été classés comme *A m monticola* et ceux prélevés en-dessous comme *A m scutellata*. Une forte proportion des échantillons provenant de Ngong (2 000 m) a donné des résultats intermédiaires, indiquant un degré d'hybridation entre les 2 races (fig 2). L'électrophorèse des allozymes a montré que tous les locus étudiés étaient polymorphes, Est et HK présentant le plus fort polymorphisme (tableau II). Pour ME, PGM et Est on a trouvé des allèles qui n'avaient pas encore été signalés. Il existe une hétérogénéité significative entre les membres des 2 races (tableau III). Si l'on considère les locus individuellement, seuls ME et Est ne montrent pas d'hétérogénéité significative entre les 2 sous-espèces. L'analyse de la distance de Wagner a fourni 2 groupes principaux : l'un était constitué par les échantillons classés comme *A m monticola* et venant du mont Kenya et du mont Elgon, le second rassemblait tous les autres groupes y compris les abeilles des zones montagneuses et des savanes du mont Ngong, qui formait un sous-groupe séparé (fig 3). Les résultats montrent que les abeilles *A m monticola* des régions montagneuses éloignées se ressemblent plus par leurs caractéristiques morphologiques et allozymiques qu'elles ne ressemblent aux abeilles voisines *A m scutellata*. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle les populations séparées d'*A m monticola* sont plutôt des descendantes d'un ancêtre commun actuellement limité aux zones refuges de montagne que des écotypes adaptés d'*A m scutellata* générés par une variation et une

sélection continues. Il se peut qu'une étude plus complète de la variation allozymique chez les abeilles d'Afrique procure de nouveaux enzymes polymorphes car nous avons trouvé une variation supplémentaire en n'examinant que 5 locus. Des études approfondies portant sur plusieurs locus et

sur des échantillons des sous-espèces environnantes aideraient certainement à obtenir une image plus complète de la variabilité géographique d'*A mellifera* en Afrique.

***A m monticola* / *A m scutellata* / morphométrie / allozyme / Kenya**

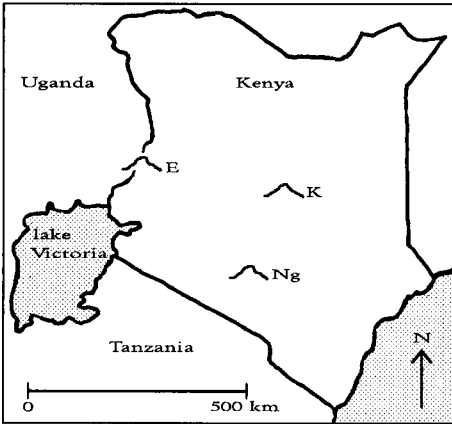


Fig 1. Overview map of Kenya showing the collecting areas. Key to regions: E: Mt Elgon and environment; K: Mt Kenia and environment, Ng: Ngong Hills.

Abb 1. Übersichtskarte über die Lage der Sammelgebiete in Kenia. Abkürzungen: E: Mt Elgon und Umgebung, K: Mt Kenia und Umgebung, Ng: Ngong Hills.

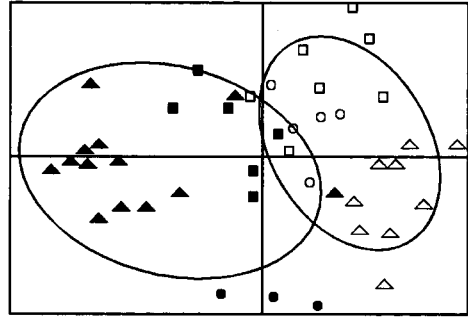


Fig 2. Positions of the samples studied in a discriminant analysis. Abscissa: discriminant function 1, ordinate: discriminant function 2. The ellipses of confidence (75%) are given. Key to symbols: circles: samples collected at Mt Elgon and environment; triangles: samples collected at Mt Kenia and environment; squares: samples collected in the Ngong area. Open symbols indicate samples classified as *A m scutellata*; filled symbols indicate *A m monticola*.

Abb 2. Positionen der untersuchten Proben in einer Diskriminanzanalyse. Abszisse: Diskriminanzfunktion 1, Ordinate: Diskriminanzfunktion 2. Kreise: Proben von Mt Elgon und Umgebung; Dreiecke: Proben von Mt Kenia und Umgebung; Quadrate: Proben aus Ngong. Offene Symbole bezeichnen Proben, die als *A m scutellata*, gefüllte Symbole Proben, die als *A m monticola* klassifiziert wurden.

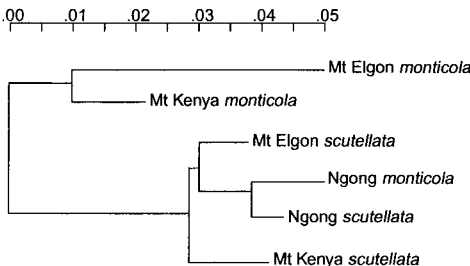


Fig 3. Distance-Wagner-analysis of the six populations of *Apis mellifera* from Kenya in study. The analysis was performed on the basis of the Prevosti genetic distances.

Abb 3. Distance Wagner Dendrogramm der sechs untersuchten Populationen aus Kenia. Die Analyse wurde auf der Basis der genetischen Distanzen nach Prevosti durchgeführt.

Table I. Tested polymorphic enzyme systems and buffers for electrophoresis.

Table I. *Untersuchte polymorphe Enzymsysteme und Puffermischungen für die Elektrophorese.*

EC no *	Enzyme	Buffer system **
1.1.1.37	Malate dehydrogenase	A
1.1.1.40	Malic enzyme	A
2.7.5.1	Phosphoglucumutase	A
3.1.1.1	Esterase	B
2.7.1.1	Hexokinase	C

* Enzyme commission. ** A: Continuous Tris-citrate, pH 8.6 (Berlocher, 1980). B: Discontinuous lithiumhydroxide-Tris-citrate, pH 8.5 (Selander *et al*, 1971). C: Tris-EDTA-maleate, pH 7.4 (Spencer *et al*, 1964).

Table III. Contingency Chi² analysis of five loci in *A m scutellata* and *A m monticola*. N_{All}-number of alleles per locus.

Table III. *Chi² Kontingenzzanalyse der fünf Loci in A m scutellata und A m monticola. N_{All}: Anzahl der Allele pro Locus; DF: Anzahl der Freiheitsgrade.*

Locus	N _{All}	χ ²	DF	P
MDH	3	6.271	2	0.0435
ME	2	1.749	1	0.1860
PGM	3	6.982	2	0.0305
Est	4	7.589	3	0.0553
HK	2	49.272	1	0.0000
Total		71.863	9	0.0000

Table IV. Matrix of the jackknifed Prevosti genetic distances between the populations. The standard deviations are given in parentheses. Key to populations: see table II.

Table IV. *Matrix der jackknife-korrigierten genetischen Distanzen nach Prevosti. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben. Bezeichnung der Populationen wie in Tabelle II.*

	elmont	elscut	kenmont	kenscut	ngmont
elmont					
elscut	0.080 (0.0066)				
kenmont	0.054 (0.0065)	0.049 (0.0029)			
kenscut	0.087 (0.0064)	0.020 (0.0018)	0.055 (0.0020)		
ngmont	0.112 (0.0065)	0.032 (0.0022)	0.069 (0.0034)	0.035 (0.0022)	
ngscut	0.091 (0.0084)	0.013 (0.0019)	0.056 (0.0032)	0.023 (0.0020)	0.021 (0.0024)

Table II. Allele frequencies of the five enzymes in study. Key to populations: *elmont*: *A m monticola*, Mt Elgon; *elscut*: *A m scutellata*, Mt Elgon; *kenmont*: *A m monticola*, Mt Kenya; *kenscut*: *A m scutellata*, Mt Kenya; *ngmont*: *A m monticola*, Ngong; *ngscut*: *A m scutellata*, Ngong. N: number of haploid genotypes; N_C: number of colonies studied. H_{exp}: expected heterozygosity according to Hardy-Weinberg-equilibrium; H_{obs}: observed heterozygosity.

Tabelle II. Allelfrequenzen der fünf untersuchten Enzymloci. Bezeichnung der Populationen: *elmont*: *A m monticola*, Mt Elgon; *elscut*: *A m scutellata*, Mt Elgon; *kenmont*: *A m monticola*, Mt Kenya; *kenscut*: *A m scutellata*, Mt Kenya; *ngmont*: *A m monticola*, Ngong; *ngscut*: *A m scutellata*, Ngong. N: Anzahl der haploiden Genotypen; N_C: Anzahl der untersuchten Völker. H_{exp}: erwartete Heterozygotie nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz; H_{obs}: beobachtete Heterozygotie.

Population Locus	<i>elmont</i>	<i>elscut</i>	<i>kenmont</i>	<i>kenscut</i>	<i>ngmont</i>	<i>ngscut</i>
MDH						
N	90	150	338	270	150	210
N _C	3	5	12	9	5	7
MDH ¹⁰⁰	1.000	1.000	0.973	0.981	0.980	1.000
MDH ⁸⁰	0.000	0.000	0.021	0.019	0.020	0.000
MDH ⁶⁵	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000
H _{exp}	0.000	0.000	0.052	0.036	0.039	0.000
H _{obs}	0.000	0.000	0.053	0.037	0.040	0.000
ME						
N	90	150	340	270	150	210
N _C	3	5	12	9	5	7
ME ¹⁰⁰	1.000	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000
ME ¹¹⁷	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
H _{exp}	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000
H _{obs}	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000
PGM-1						
N	90	150	336	270	150	210
N _C	3	5	12	9	5	7
PGM ¹⁰⁰	1.000	1.000	0.979	1.000	0.993	0.990
PGM ¹²⁰	0.000	0.000	0.003	0.000	0.007	0.010
PGM ⁷⁵	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000
H _{exp}	0.000	0.000	0.041	0.000	0.013	0.019
H _{obs}	0.000	0.000	0.042	0.000	0.013	0.019
EST-3						
N	90	150	338	270	168	212
N _C	3	5	12	9	5	7
EST ¹⁰⁰	0.933	0.913	0.917	0.963	0.824	0.896
EST ¹³⁰	0.033	0.067	0.065	0.026	0.176	0.099
EST ⁷⁵	0.011	0.000	0.015	0.011	0.000	0.005
EST ¹⁰	0.022	0.020	0.003	0.000	0.000	0.000
H _{exp}	0.129	0.162	0.155	0.072	0.292	0.188
H _{obs}	0.133	0.173	0.166	0.074	0.324	0.170
HK-1						
N	88	150	342	270	150	210
N _C	3*	5	12	9	5	7
HK ¹⁰⁰	0.733	0.967	0.789	0.981	0.993	0.986
HK ⁸³	0.266	0.033	0.211	0.019	0.007	0.014
H _{exp}	0.485	0.065	0.333	0.036	0.013	0.028
H _{obs}	0.477	0.067	0.339	0.037	0.013	0.028

The allele frequencies were corrected for the queen's genotype if the queen was carrying the rare allele.

* Die Allelfrequenz wurde für den Genotyp der Königin korrigiert, wenn diese das seltenere Allel trug.

REFERENCES

- Badino A, Celebrano G, Manino A (1983) Population structure and MDH-1 locus variation in *Apis mellifera ligustica*. *J Hered* 74, 443-446
- Badino A, Celebrano G, Manino A (1984) Population genetics of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin) and its relationship with neighbouring subspecies. *Boll Mus Reg Sci Nat Torino* 2, 571-584
- Berlocher SH (1980) An electrophoretic key for distinguishing species of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) as larvae, pupae or adults. *Ann Entomol Soc Am* 73, 131-137
- Berlocher SH (1984) Insect Molecular Systematics. *Annu Rev Entomol* 29, 403-433
- Buttel-Reepen H v (1906) Apistica. Beiträge zur Systematik, Biologie, sowie zu geschichtlichen und geographischen Verbreitung der Honigbiene (*Apis mellifica* L), ihrer Varietäten und der übrigen *Apis*-Arten. *Veröff Zool Mus Berlin* 118-120
- Cornuet JM (1982) The MDH polymorphism in some West Mediterranean honeybee populations. Proc 9th Cong IUSSI, Boulder (USA)
- Del Lama MA, Mestriner MA, Paiva JCA (1985) Est-5 and PGM: new polymorphisms in *Apis mellifera*. *Rev Brasil Genet* 8, 17-27
- Del Lama MA, Figueiredo RA, Soares AEE, Del Lama SN (1988) Hexokinase polymorphism in *Apis mellifera* and its use for Africanized honeybee identification. *Brazil J Genet* 11, 287-197
- Del Lama MA, Lobo JA, Soares AEE, Del Lama SN (1990) Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honey bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie* 21, 271-280
- Harris H, Hopkinson DA (1976) *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Co, Amsterdam, American Elsevier, New York
- Kerr WE, Portugal Araujo V de (1958) Raças de abelhas de África. *Garcia de Orta* 6, 53-59
- Meixner M, Ruttner F, Koeniger N, Koeniger G (1989) The mountain bees of the Kilimanjaro region and their relation to neighbouring bee populations. *Apidologie* 20, 165-174
- Ndiritu DW, Mutugi N, Ndung'u S (1986) Variation in malate dehydrogenase allozymes among honeybee populations in Kenya. *J Apic Res* 25, 234-237
- Nunamaker RA, Wilson WT (1981) Comparison of MDH allozyme patterns in the African honey bee (*Apis mellifera adansonii* L) and the Africanized populations of Brazil. *J Kans Entomol Soc* 54, 704-710
- Ruttner F (1976) African races of honeybees. *Proc Int Beekeep Congr* 25, Bucharest, Apimondia, 325-344
- Ruttner F (1981) Taxonomy of honeybees of tropical Africa. *Proc Int Beekeep Congr* 28, Bucharest, Apimondia, 271-277
- Ruttner F (1988) *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer, Heidelberg, New York
- Ruttner F (1992) *Naturgeschichte der Honigbienen*. Ehrenwirth, München
- Ruttner F, Kauhausen D (1985) Honeybees of tropical Africa: ecological diversification and isolation. Proc 3 Int Conf Apic Trop Climates, Nairobi, 45-51
- Selander RK, Smith MH, Yang SY, Johnson WE, Gentry JB (1971) Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in genetics VI. *Univ Texas Publs* 7103, 49-90
- Sheppard WS (1988) Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations. *Ann Entomol Soc Am* 81, 886-889
- Sheppard WS, Berlocher SH (1984) Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. *J Apic Res* 23, 64-69
- Sheppard WS, Berlocher SH (1985) New allozyme variability in Italian honey bees. *J Hered* 76, 45-48
- Sheppard WS, McPheron BA (1986) Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. *Apidologie* 17, 21-31
- Sheppard WS, Soares AEE, DeJong D, Shimamura H (1991) Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie* 22, 643-652
- Spencer N, Hopkinson DA, Harris H (1964) Phosphoglucumutase polymorphism in man. *Nature* 204, 742-745
- SPSS/PC+ (1988) *Advanced statistics V2.0*, SPSS Inc, Chicago, IL, USA

- Smith FG (1961) The races of honeybees in Africa. *Bee World* 42, 255-260
- Swofford DL, Selander RB (1981) Biosys-1. A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Hered* 72, 281-283
- Sylvester HA (1982) Electrophoretic identification of Africanized honeybees. *J Apic Res* 21, 93-97