

Genetische Integrität der
Dunklen Europäischen Honigbiene
(*Apis mellifera mellifera*)
aus geschützten Patientengruppen:

Eine genomweite Bewertung
mit SNPs und mt DNA Sequenzdaten

Aus dem Blatt der Bienenforschung 53 (2): 269-278 (2014) © 2014 IBRA

(Übersetzt von Ole Brüns)

ORIGINAL FORSCHUNG ARTIKEL

Genetische Integrität der Dunklen Europäischen Honigbiene (*Apis mellifera mellifera*) aus geschützten Patientengruppen: Eine genomweite Bewertung mit SNPs und mt DNA Sequenzdaten

M Alice Pinto *
1 Dora Henriques
1 Julio Chávez-Galarza
1 Per Kryger
2 Lionel Garnery
3 Van Romée der Zee
4 Bjørn Dahle
5,6 Gabriele Soland-Reckeweg
7 Pilar de la Rúa
8 Raffaele Dall'Olio
9 Norman L Carreck
10,11 Spencer und J Johnston

1 Mountain Research Centre (CIMO), Polytechnischen Institut von Bragança,
Campus de Sta. Apolonia, Apartado 1172 5301-855 Bragança, Portugal.
2 Århus University, Flakkebjerg, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse, Dänemark.
3 Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 45 Avenue des Etats-Unis,
78035 Versailles, Frankreich.
4 Niederlande Zentrum für Bienenforschung, NL-9014 CC Tersoal, Niederlande.
5 Norwegian Imkerbund, NO-2040 Kløfta, Norwegen.
6 Norwegische Universität für Lebenswissenschaften, PO Box 5003, NO-1432 AS, Norwegen.
7 Apigenix, Gaicht 19, 2513 Twann, Schweiz.
8 Area de Biología Tier, Dpto.de Zoología y Antropología Física, Universidad de Murcia,
Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spanien.
9 Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Via di Saliceto 80,
40128 Bologna, Italien.
10 Labor der Imkerei und Sozial Insekten, School of Life Sciences, University of Sussex,
Falmer, Brighton, East Sussex, BN1 9QG, UK.
11 Internationale Bee Research Association, 6, Centre Court, Main Avenue, Treforest, CF37 5YR, UK.
12 Abteilung Entomologie, Texas A & M University, College Station, Texas 77843-2475, USA.

Zusammenfassung

Die Erkenntnis, dass der Dunkle Europäische Honigbiene, *Apis mellifera mellifera*, wird zunehmend in ihrem heimischen Bereich gedroht hat, die LED-Einrichtung von Schutzprogrammen und Schutzgebiete in ganz Westeuropa. Zurück Molekular Umfragen zeigten, dass trotz Management-Strategien, um die genetische Integrität der *A. m. mellifera* zu bewahren, mussten geschützt Populationen eine messbare Komponente ihrer Gen-Pool, aus kommerziellen C-Linie Honigbienen ab. Beide Sequenzdaten von der tRNA hier verwendeten wir *leu-cox2* intergenischen Region und eine mtDNA genomweiten Scans, mit über 1183 Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs), die genetische Vielfalt und Einkreuzung in mehreren Ebenen zu bewerten geschützt Populationen von *A. m. mellifera*, die dann mit Proben von ungeschützten Populationen gesammelt verglichen wurden. Die mtDNA-Analyse von die geschützten Populationen ergab eine Einzelkolonie trägt eine Fremd Haplotyp, während SNPs zeigten unterschiedliche Ebenen der Einkreuzung hin von praktisch Null in Norwegen bis etwa 14% in Dänemark. Einkreuzung war insgesamt höher in ungeschützten (30%) als in der Bevölkerung geschützt (8%), und wird in großer Vielfalt SNP Ebenen des ehemaligen reflektiert, obwohl gegen Vielfalt Spiegel wurden für mtDNA beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass trotz kontrollierter Zucht, einige geschützte Populationen noch Anpassungen an den Management-Strategien zur weiteren Säuberung erfordern Fremd Allele, die von SNPs identifiziert werden können.

Einführung

Honigbiene Vielfalt ist das wichtigste Erbe, das wir können verlassen, um zukünftige Generationen von Imkern, wie es die rohe bildet Material, auf dem natürliche und künstliche Selektion betreibt. Verlust von genetische Vielfalt kann nur adaptive Reaktion Honigbienen „zu behindern modernen Imkerei und immer anspruchsvolleren Umwelt Bedingungen, und vielleicht weltweit Kolonie Rückgänge verknüpft werden (VanEngelsdorp und Meixner, 2010), obwohl die letztere ist selbst Debatte (Harpur et al, 2012, 2013;.. De la Rúa et al, 2013). Durch Beimischung von divergierenden Honigbiene Unterarten (allgemein gefördert durch Imker bei der Verwendung von kommerziellen Fremdköniginnen) gibt es eine Schwellen Bewegung auf native genetische Vielfalt zu schützen (De la Rúa et al., 2009; Dietemann et al., 2009; Meixner et al., 2010). Die Organisation Societas Internationalis pro Conservatione *Apis melliferae melliferae* (SICAMM), gegründet 1995 für den Schutz der Dunkelheit Europäische Honigbiene, *Apis mellifera mellifera* (Ruttner et al., 1990) ist ein Beispiel für eine solche Bewegung. Europa ist die Wiege für die Honigbiene Differenzierung, die geführt der Entwicklung der 10 Unterarten unter den 30 derzeit anerkannten (Ruttner, 1988; Hepburn und Radloff, 1998; Engel, 1999; Sheppard und Meixner, 2003; Meixner et al., 2011), wodurch, die eine wesentlicher Bestandteil der gesamten Honigbiene Vielfalt. Diese 10 europäischen Unterarten sind in zwei Evolutionslinien unterteilt: die Western European (Linie M) und die osteuropäische (Linie C). Linie M erstreckt sich über ein breites Gebiet von Nord Iberische Halbinsel im Süden bis nach Skandinavien im Norden und von die britischen Inseln im Westen bis zum Ural im Osten (Ruttner, 1988). In diesem riesigen Gebiet nur durch zwei Unterarten besetzt, obwohl die meisten ist es die Heimat von *A. m. mellifera*. Linie C in einem kleineren auftritt geografischen Gebiet, die den Apennin und Balkan-Halbinseln, im Norden durch die Alpen und im Süden von Sizilien und grenzt die Westen ägäischen Inseln (Ruttner, 1988). Doch weist diese letztere Linie eine größere Anzahl von Unterarten, einschließlich der beiden am häufigsten in der gewerblichen Bienenzucht weltweit eingesetzt: der italienische Honigbiene *A. m. ligustica* und die Krainer Biene *A. m. Carnica*. Die native Verteilung von europäischen Honigbienen hat konfrontiert Erhöhung Herausforderungen durch Faktoren berücksichtigt außerhalb Imkerei Aktivität (z.B. Agrochemikalien, Lebensraumverlust und Fragmentierung) und beekeeping-Verwandte Faktoren, von denen Einschleppung von Schädlingen und Krankheitserregern und bewusste Einführung fremder Königinnen gehören zu den schädlich. Diese Faktoren können zu Verlusten von lokalen genetischen Vielfalt führen durch eine Senkung der effektiven Populationsgröße und durch Störungen Co-Komplexe entwickelt Gens als Folge der Paarungen mit ausländischen Unterart schließlich zu introgressiven Hybridisierung (Muñoz et al., 2012). Der Dunkle Europäische Honigbiene ist wahrscheinlich die meisten europäischen Unterarten durch die oben bedroht Mensch- vermittelten Faktoren,

unter denen Einkreuzung hat eine wichtige Rolle (Jensen et al, 2005;.. Soland-Reckeweg et al, 2009; Oleksa et al, 2011). Schwellen Anerkennung der Bedeutung der Verwendung von einheimischen Unterarten als eine Quelle von genetischen Ressourcen für eine nachhaltige Bienenhaltung hat dazu geführt, Einrichtung von Schutzgebieten in Nordeuropa angestrebt. Erhaltung der genetischen Integrität des Dunklen Europäischen Honigbiene (Dela Rúa et al., 2009; Soland-Reckeweg et al., 2009; Meixner et al. 2010; Oleksa et al., 2011). In diesen Schutzgebieten ausgewählt Zucht Aktien werden an isolierten Belegstellen, um zu verhindern, gepaart Gen fließen von unerwünschten Quellen, vor allem aus ausländischen Königinnen von C abgeleitet-lineage Abstammung. Die Beurteilung der Werte der Einkreuzung in Zuchtbeständen ist eine wichtige Tätigkeit in diesen Programmen. Dabei beurteilten wir Vielfalt und Einkreuzung Ebenen der *A. m. mellifera* Honigbienenenvölker von mehreren geschützten Populationen in Nordeuropa abgetastet. Zu dass Ende, sowohl die mitochondriale DNA (mtDNA) Folge analysierten wir Daten der tRNA leu-cox2 intergenischen Region und einer genomweiten Scan 1183 polymorphe Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) (Meixner et al., 2013), die stellt die beste Abdeckung, jemals durchgeführt wird, des Kerngenoms der *A. m. mellifera* Populationen IN-enthalten Einsparprogrammen. Wir fanden, dass einige Populationen noch geschützt halten einen bedeutenden Bestandteil der C-Linie Abstammung hindeutet, dass Managementstrategien von einigen Schutzprogrammen sein müssen verfeinert, um Programmziele zu erreichen.

Material und Methoden

Insgesamt 114 Proben Dohne, die jeweils eine Einzelkolonie waren aus zufällig ausgewählten Kolonien zwischen 2010 und 2011 gesammelt. Siebenundsiebzig Kolonien wurden in der heimischen Bereich der in die Stichprobe M-Linie Unterart *A. m. mellifera*, darunter England (8), Frankreich (15), Belgien (3), Dänemark (10), den Niederlanden (15), der Schweiz (6), Schottland (10) und Norwegen (10). Die acht Proben aus England und fünf aus Frankreich wurden von ungeschützten Bevölkerung gesammelt (Im Folgenden „ungeschützten Gruppe“). Die restlichen Proben vertreten geschützt reine Zuchtpopulationen (im Folgenden als „Geschützte Gruppe“), die auf den Inseln (Læsø, Dänemark gedeckt haben; Texel, Niederlande; Colonsay, Schottland) oder in isolierten Gegen Stationen auf dem Kontinent (Frankreich, Belgien, der Schweiz und Norwegen) aufrechterhalten, um *A. m. mellifera* genetischen Identität (Abb. 1). Ein Referenzsammlung von 37 Proben, die C-Linie Vielfalt (Im Folgenden „Bezugsgruppe“), wurde in der Mutter erhalten Palette von *A. m. Carnica* und *A. m. ligustica* aus Serbien (9), Kroatien (11) und Italien (17) sind. Proben wurden aus gesammelten die Bienenstöcke und bei -20 ° C bis Molekular in absolutem Ethanol gespeichert Analyse.

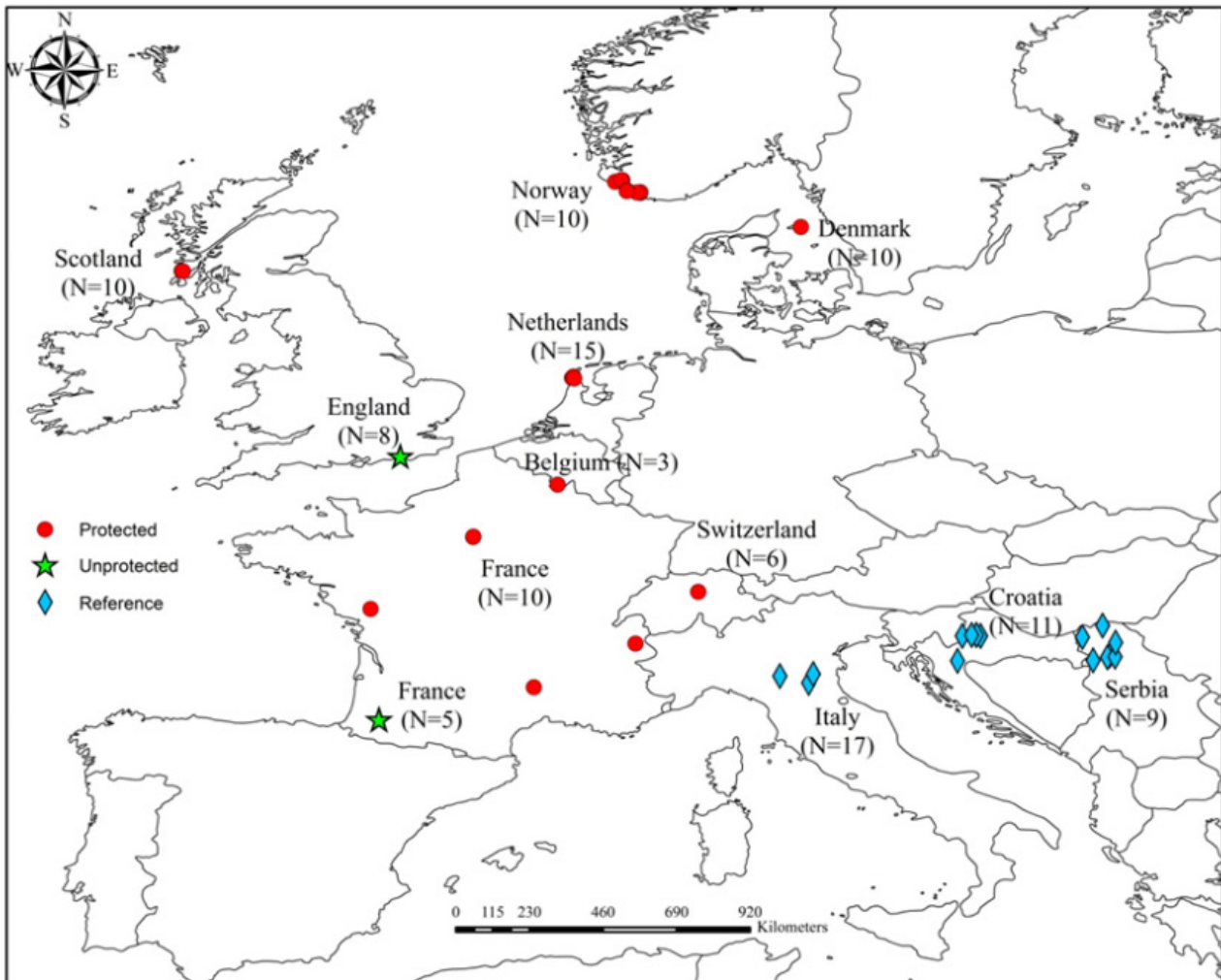


Abbildung 1.

Standort der geschützten und ungeschützten Gruppen, in die Stichprobe Mutterbereich der M-Linie *A. m. mellifera* (Westeuropa), und der Referenzgruppe in der in den heimischen Bereich des C-Stichprobe Linie *A. m. ligustica* und *A. m. Carnica* (Osteuropa) Unterarten. Die Anzahl der Kolonien abgetastet pro Standort war variabel. Probengrößen sind in Klammern angegeben.

DNA-Extraktion und mitochondrialen DNA-Analyse

Gesamt-DNA wurde unter Verwendung einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert,(25: 24: 1) übertragen (Sambrook et al., 1989) aus dem Thorax

des 114 Proben. Die mtDNA wurde mit der hoch polymorph tRNA analysiert COX2 intergenischen Region, die unter Verwendung der Primer amplifiziert und E2 H2 und die PCR-Reaktion und Bedingungen Garnery et al geschrieben.(1993), mit geringfügigen Modifikationen. Nach Quantifizierung in einer Routine Agarose-Gel, wurden PCR-Produkte zu MacroGen für direkte Sequenzierung geschickt in beiden Richtungen. Die Sequenzen wurden manuell überprüft Basis Berufung und mit veröffentlichten Sequenzen in GenBank ausgerichtet mit MEGA-Version 5.03 (Tamura et al., 2011), um die Identifizierung zu ermöglichen Haplotypen.

Die neuen Haplotypen und Varianten wurden nach dem Namen die Konvention früher festgelegt (Garnery et al., 1998) und vor kurzem für M-Linie überprüft (Rortais et al., 2011). Einzel-Nukleotid-Polymorphismus-Analyse Insgesamt 1536 SNP-Loci wurden für die 114-Drohne Proben genotypisiert mit Illumina Bead-Array-Technologie und die Illumina Goldengate® alle spezifischen Extensionsuntersuchung (Illumina, San Diego, CA, USA) mit einem benutzerdefinierte Oligo Pool Assay (OPA), nach Herstellerprotokolle. Weitere Details zu diesem hoch Multiplex-Genotypisierung Assay Technik kann in Shen et al. (2005). Die OPA wurde geändert von der in Whitfield et al. (2006) durch den Ersatz 401 invariant SNPs aus der expressed sequence tag (EST) stammenden mit polymorphen Genom abgeleitete SNPs ausgewählt, um eine zu produzieren gesetzt mehr gleichmäßige Abdeckung des Genoms (Chávez-Galarza et al., 2013) Die modifizierte OPA enthalten 376 SNPs, die EST-abgeleitete waren und somit innerhalb von codierenden Regionen befindet. Die restlichen 1160 wurden ausgewählt etwa gleich weit sein, ohne Rücksicht auf die Position innerhalb oder in der Nähe kodierenden Regionen. Genotyp Berufung wurde mit geführt Illumina Genom Studio® Datenanalyse-Software. Für jede Probe, der Intensität Cluster automatisch von der Software erzeugt wurden manuell geprüft und bearbeitet werden, wenn notwendig. SNPs mit schlecht voneinander getrennte Cluster oder niedrige Signale aus dem Datensatz ausgeschlossen. Um die genomische Position zu erhalten, die jeweils SNP 100 bp flankierenden Sequenz wurde mit BLAST in die Honigbiene Montage 4.5 abgebildet NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Nur SNPs, die perfekt aufeinander abgestimmt ein einzigartige Position in Montage 4.5 wurden beibehalten. Genomischen Position war ermittelt mit Hilfe des Map Viewer-Tool in NCBI.Die genetische Vielfalt wurde für jeden SNP und jeder Population bewertet Verwendung unvoreingenommene Schätzungen der Gen-Vielfalt (Nei, 1987) und Allel-Fülle, ein Maß für die Anzahl der Allele unabhängig von der Proben Größe (Petit et al., 1998). Die mittlere Anzahl von Allelen (N_a), die Anzahl der effektive Allele (N_e) und unvoreingenommene Vielfalt (u_h) wurden unter Verwendung berechnet GenAEx 6.4 (Peakall und Smouse 2006), während Allel-Reichtum (R_s) wurde mit HP-RARE 1.1 (Kalinowski, 2005) berechnet, die implementiert die Verdünnung Methode. Die individuelle Bayes-basierten Cluster-Algorithmus implementiert. In der Struktur 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) wurde eingesetzt, um zu schließen Beimischung Proportionen (Q) in Bevölkerungsstichproben in den gesammelten heimischen Bereich von *A. m. mellifera*. Die Zahl der angestammten Cluster (K) wurde mit der Beimischung Abstammung und korrelierten Allel geschätzt Frequenz-Modelle mit der Option unbeaufsichtigt. Das Programm wurde eingestellt für 750.000 Markov-Kette Monte Carlo Iterationen nach einer anfänglichen Burn-In von 250.000. Über 20 unabhängige Läufe für jeden K (von 1 bis 5) wurden durchgeführt, um die Konsistenz Läufe bestätigen.

Tabelle 1

Anzahl der M und C-Haplotypen pro abgetastet Lage und Gruppe. Buchstaben unter Haplotypen beziehen sich auf Varianten. Die geschützte und ungeschützten Gruppen beziehen sich auf Kolonien von Erhaltung und ungeschützten Bereichen im heimischen Bereich von *A.m* beprobt *mellifera* sind. Die Referenzgruppe wurde in der heimischen Bereich von *A. m* beprobt. *ligustica* (Italien) und *A.m. Carnica* (Serbien und Kroatien). Ausnahme für M8, C1, C1b, C2c-K, die übrigen Varianten sind neu (siehe Sequenzdaten in Bild S1 und GenBank unter den Zugangsnummern KF274625 - . KF274641).

Buchstaben N bezeichnet Probengröße.

Location	N	M4														M4'	M7	M8	M64	C1			C2				
		a	b	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	a	a			C1	b	h	c	d	e	j	k	
Protected																											
France	10	4									2	1		1			1	1									
Belgium	3			1									1											1			
Denmark	10		10																								
Netherlands	15			10	3	2																					
Switzerland	6						5	1																			
Scotland	10														10												
Norway	10		3	4					2	1																	
Total	64	4	13	15	3	2	5	1	2	1	2	1	1	1	10		1	1						1			
Unprotected																											
England	8			1	3																			4			
France	5	1																		1			2		1		
Total	13	1		1	3															1			2	4	1		
Reference																											
Italy	17															5			12								
Serbia	9																			1			1	6	1		
Croatia	11																		1				1	3	5	1	
Total	37															5			13	1			2	9	6	1	
Grand total	114	5	13	16	6	2	5	1	2	1	2	1	1	1	10	5	1	1	13	1	1	2	11	11	1	1	

Tabelle 2

Anzahl der polymorphen SNP-Loci (von insgesamt 1183) und die Vielfalt schätzt, für mtDNA und SNPs pro abgetastet Lage und Gruppe. Die geschützten und ungeschützten Gruppen beziehen sich auf Kolonien von Erhaltung und ungeschützten Bereichen im heimischen Bereich von *A. m. mellifera*, jeweils. Die Referenzgruppe wurde in der heimischen Bereich von *A. m. mellifera* (Italien) und *A. m. Carnica* (Serbien und Kroatien). Polymorphe SNPs wurden durch ein Abschneidekriterium von 0,02 für das kleinere Allel definiert, wie in Chavez-Galarza et al. (2013). N_a die mittlere Anzahl von Allele pro SNP, N_e die Anzahl der effektiven Allele, h der unvoreingenommene Vielfalt und R_s die Allel-Reichtum.

Standardfehler stehen in Klammern.

Location	Poly-morphic	Private	Na		Ne		uh		Rs	
			Mt DNA	SNPs	Mt DNA	SNPs	Mt DNA	SNPs	Mt DNA	SNPs
Protected										
France	733	0	6	1.713 (0.013)	4.167	1.325 (0.009)	0.844	0.233 (0.005)	1.800	1.220 (0.005)
Belgium	279	0	3	1.234 (0.012)	3.000	1.187 (0.010)	1.000	-	1.800	1.126 (0.007)
Denmark	738	0	1	1.624 (0.014)	1.000	1.296 (0.009)	0.000	0.211 (0.006)	1.000	1.199 (0.005)
Netherlands	755	1	3	1.638 (0.014)	1.991	1.217 (0.008)	0.533	0.156 (0.005)	1.515	1.151 (0.005)
Switzerland	575	0	2	1.486 (0.015)	1.385	1.292 (0.010)	0.333	0.211 (0.007)	1.303	1.191 (0.006)
Scotland	405	0	1	1.342 (0.014)	1.000	1.179 (0.009)	0.000	0.122 (0.005)	1.000	1.116 (0.005)
Norway	332	0	4	1.281(0.013)	3.333	1.145 (0.008)	0.778	0.099 (0.005)	1.737	1.094 (0.005)
All group	1020	1	17	1.938 (0.07)	7.262	1.258 (0.008)	0.876	0.179 (0.004)	1.869	1.176 (0.004)
Unprotected										
England	827	0	3	1.699 (0.013)	2.462	1.406 (0.010)	0.679	0.280 (0.006)	1.633	1.261 (0.006)
France	817	11	4	1.691 (0.013)	3.571	1.512 (0.011)	0.900	0.361 (0.07)	1.800	1.320 (0.007)
All group	1073	0	7	1.907 (0.08)	5.121	1.555 (0.009)	0.805	0.354 (0.005)	1.836	1.339 (0.005)
Reference										
Italy	709	1	2	1.599 (0.014)	1.710	1.273 (0.009)	0.441	0.182 (0.005)	1.428	1.176 (0.005)
Serbia	590	0	4	1.499 (0.015)	2.077	1.262(0.009)	0.583	0.186 (0.006)	1.549	1.173 (0.006)
Croatia	681	0	5	1.576 (0.014)	3.270	1.267(0.009)	0.764	0.186 (0.006)	1.727	1.177 (0.005)
All group	969	1	7	1.819 (0.011)	4.319	1.297(0.009)	0.790	0.198 (0.005)	1.779	1.196 (0.005)
All groups	1183	13	25	2.000 (0.000)	12.101	1.686 (0.008)	0.925	0.388 (0.004)	1.921	1.386 (0.004)

Ergebnisse

Mitochondrien-DNA Sequenzanalyse des tRNA leu-cox2 intergenischen Region des 114 Kolonien produzierte insgesamt sieben verschiedenen Haplotypen alle gehören um Linien M und C (Tabelle 1). Zu den Kolonien der Referenzgruppe, gehörte die C-Linie, mit Ausnahme von fünf Kolonien aus Italien, hegte eine einzige neue Variante der M7-Haplotyp (M7A, Zugangsnummer KF274639; Feige. S1). Während Kolonien aus Serbien und Kroatien waren überwiegend von C2 Abstammung, waren Kolonien aus Italien C1, obwohl vier und zwei Varianten wurden für beide Haplotypen bzw. identifiziert. Kolonien, die die A. m. mellifera geschützten Gruppe durchgeführt Haplotypen, die zu M-Linie, mit Ausnahme einer einzigen Kolonie aus C2 Belgien. Die Mehrheit dieser Kolonien (51 von 64; Tabelle 1) hegte eine einzige Haplotyp von M4 Abstammung, obwohl es 13 Varianten (all Roman), die voneinander um sechs 1-2 bp Indels unterscheiden, 14 Übergänge, von denen zwei in COX2 Bereich waren auch nicht, und Drei Trans (Fig. S1). Drei weitere Haplotypen festgestellt wurden in den übrigen Kolonien: M8 (eine Kolonie von Frankreich) und dem Roman M4a „(10 Kolonien aus Schottland; Zugangsnummer KF274638) und M64 (eine Kolonie von Frankreich, Zugangsnummer KF274640). Während Mütter Zusammensetzung der geschützten Gruppe war praktisch der M-Linie Abstammung (63 von 64) zeigte der ungeschützten Gruppe eine hohe (8 von 13) Anteil der C-Haplotypen, einschließlich der neu beschriebenen C1h (Zugangsnummer KF274641; Abb. S1) in einer Kolonie von erkannt Frankreich. Trotz dieser Feststellung der drei Gruppen, die Vielfalt-Schätzungen waren für die größte geschützte Gruppe (Tabelle 2).

Einzel-Nukleotid-Polymorphismen-Analyse

Von 1536 SNP-Loci untersucht, 353 wurden aus dem Datensatz ausgeschlossen aus den folgenden Gründen: 124 zeigte wenig voneinander getrennte Cluster oder Low-Signale, 167 waren monomorph (von einem Cut-off-Kriterium definiert $> 0,98$ für die Frequenz der häufigste Allel, wie in Chávez-Galarza et al., 2013) in allen Bevölkerungsgruppen, 54 konnte nicht in platziert werden sequenzierten Genom Honigbiene, und acht hatten ein Doppelspiel im sequenzierten Genom. Dementsprechend wird der endgültige Satz von SNPs verwendet in all nachfolgenden Analysen nummeriert 1183. Die meisten Proben (72 von 114) zeigte ein Anruf Rate von mehr als 99%, während 38 und drei waren über 95% und 90% betragen. Eine Probe aus Serbien war aus dem Datensatz ausgeschlossen, weil es einen Aufruf Rate von 43,2%. Die 1183 Restnutzungs SNPs wurden in den 16 Gestänge verteilt Gruppen (LG) im Bereich von 4,6 SNP / Mb (33 SNPs) in LG16 auf 6,1 SNP / Mb (81 SNPs) in LG7 mit einem Durchschnitt von 5,4 SNP / Mb, wodurch die eine feine Abdeckung der Honigbiene Genom. Die Moll Allelfrequenz (MAF) Verteilung an der SNP-Loci 1183 für die drei Gruppen ist in den Figuren beschrieben. S2, S3 und S4.

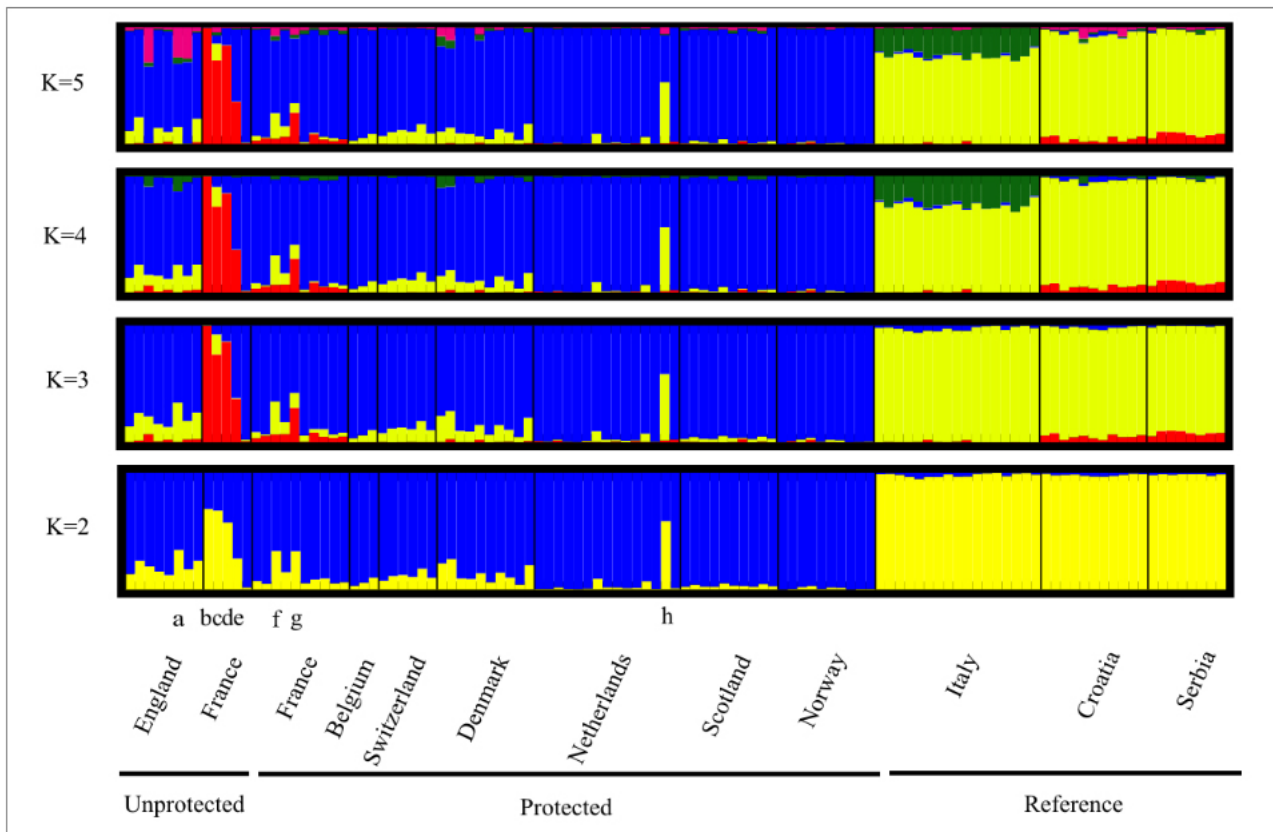


Abbildung 2:

Geschätzte Bevölkerungsstruktur und Beimischung Ebenen mit Struktur erhalten, basierend auf 1183 SNP-Loci. Jeder einzelne repräsentiert durch eine Bar, die in K Kragen Segmente, die die individuelle Mitgliedschaft geschätzten Anteilen (Q) in K Cluster repräsentieren partitioniert ist. Schwarze Linien einzelnen Individuen von verschiedenen Orten in den drei untersuchten Gruppen geclustert (geordnet von links nach rechts): ungeschützt, geschützt und Bezugsgruppen. Die Kleinbuchstaben (ah) markieren die gleichen Kolonien in den. 2 und 4.

Genetische Vielfalt:

Die Zahl der polymorphen SNP-Loci und Diversity-Maßnahmen pro Standort und die Gruppen werden in Tabelle 2 gezeigt. Mehrzahl von SNPs variable waren zwischen den Gruppen, was darauf hindeutet, dass die meisten genetischen Variation zwischen gemeinsam genutzten Honigbienen bewohnen (westlichen und östlichen) Europa. Die Anzahl der Privat SNPs variiert zwischen Null und Eins in allen Orten außer die ungeschützte Französisch-Probe, die 11 private SNPs durchgeführt. Auseinander aus der mittleren Anzahl der Allele, wurden alle anderen Diversity-Maßnahmen höchstens in der ungeschützten Gruppe ($N_e = 1,555$, $u_h = 0,354$, $R_s = 1,339$). Im Gegensatz dazu zeigte die geschützte Gruppe die niedrigsten Schätzungen der effektive Anzahl der Allele ($N_e = 1,258$), unvoreingenommene Vielfalt ($u_h = 0,179$) und Allel-Reichtum ($R_s = 1,176$), mit Norwegen die Anzeige der niedrigsten Werte ($N_e = 1,145$, $u_h = 0,099$, $R_s = 1,094$) unter allen abgetastet Standorten. Muster der genetischen Variation und Mischung, mit abgeleiteten STRUKTUR für eine Anzahl von K-Cluster von zwei bis fünf sind in gezeigt. 2. Für $K = 2$, der die wahrscheinlichste Zahl nach dem Delta; K Methode (Evanno et al., 2005), Kolonien der Referenzgruppe bildeten eine Cluster (gelb markiert) mit einer durchschnittliche Mitgliedschaft Koeffizient $0,98 \pm 0,002$ (SE). Mehrere Kolonien der ungeschützten Gruppe ergab, beigemischten Abstammung mit einer Mitgliedschaft Anteil im gelben Cluster so hoch wie in Frankreich $0,69$ und $0,34$ in England (Bilder 2 und 3). Im Gegensatz, Kolonien der geschützten Gruppe aus Norwegen und Schottland zeigten die größte Mitgliedschaft Koeffizienten in der blau-Cluster mit durchschnittlich Werte von $0,99 \pm$

0,003 und $0,97 \pm 0,003$ (Fig. 3) jeweils reflektierende praktisch keine Einkreuzung von der Referenzgruppe. Kolonien von der Niederlande angezeigt niedrigen Einkreuzung Ebenen, sowie, mit Ausnahme für eine Einzelkolonie mit der Wahrscheinlichkeit der Zuweisung an die gelbe Cluster von 0.59. Die anderen Vertreter der geschützten Gruppe angezeigt größer Einkreuzung Ebenen mit durchschnittlich Mitgliedschaft Proportionen der blaue Cluster variierend von $0,86 \pm 0,02$, in Dänemark, auf $0,88 \pm 0,01$, in der Schweiz (Abb. 3). Da der K Cluster-Nummer erhöht ($k = 3$), die Hauptänderung in der Genom-Partitionierung wurde für drei Kolonien beobachtet (Durch Buchstaben b, c und d in den Figuren gekennzeichnet. 2 und 3) des ungeschützten Französisch Bevölkerung, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von Belegung ($0,87 \pm 0,07$) dem Cluster rot markiert (Abb. 2). Strukturanalyse durch zusätzliche Referenzunterarten ergab, dass diese drei Kolonien geteilt gemeinsame Vorfahren mit afrikanischen Unterarten (Daten nicht gezeigt). Hauptkomponentenanalyse (PCA, Abb. 4) unterstützt die Muster durch die Struktur offenbart. Die erste Komponente (PC1) zwei getrennte Hauptcluster von Kolonien des Referenz osteuropäischen gebildet Gruppe und Kolonien der westeuropäischen Gruppe der Erwägung, dass PC2 trennt Kolonien des ungeschützten Gruppe aus Frankreich, die ausgestellt die höchsten Introgression (Fig. 2 und 3). PCA gibt die Nicht C-Linie Ursprung introgressed Gene in diese Kolonien. Beide Struktur und PCA zeigte eine enge Beziehung zwischen den Populationen Norwegen, Schottland und den Niederlande.

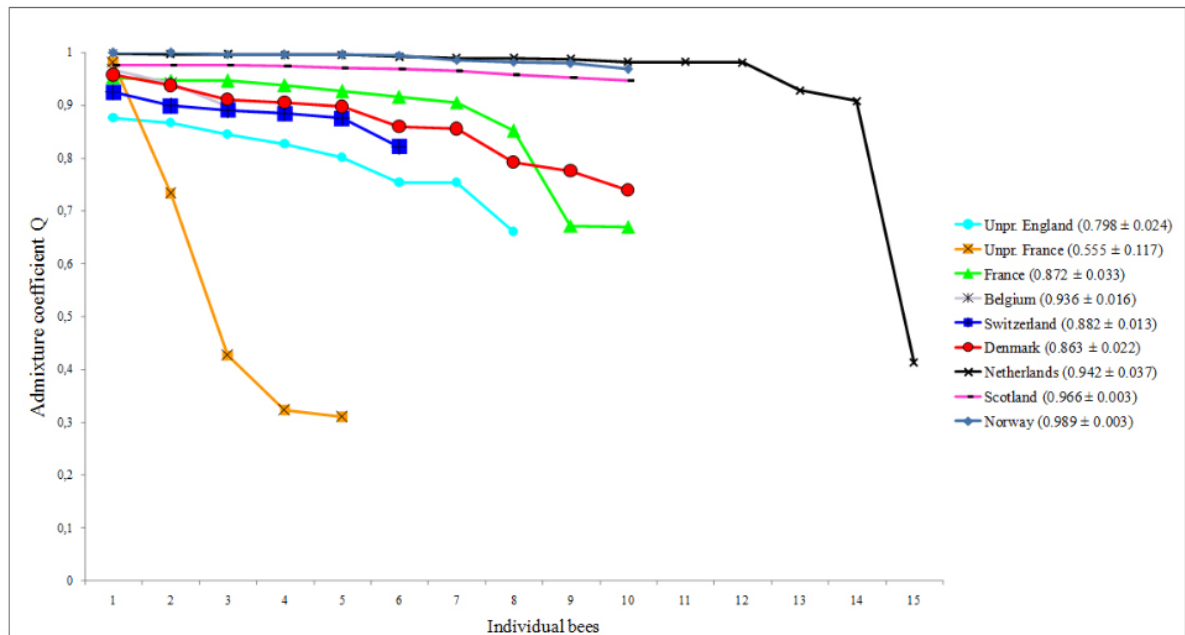


Abbildung 3:

Verteilung der hinteren meine Schätzungen der Mitgliedschaft Anteil (Q), in der blauen Gruppe von Abb. 2, für jede einzelne der geschützten und ungeschützten Gruppen mit Struktur erhalten, bezogen auf 1183 SNP-Loci, für $K = 2$. Durchschnittliche Mitgliedschaft Anteil $\pm$ SE für jede Lage, an der rechten Seite des Diagramms angegeben.

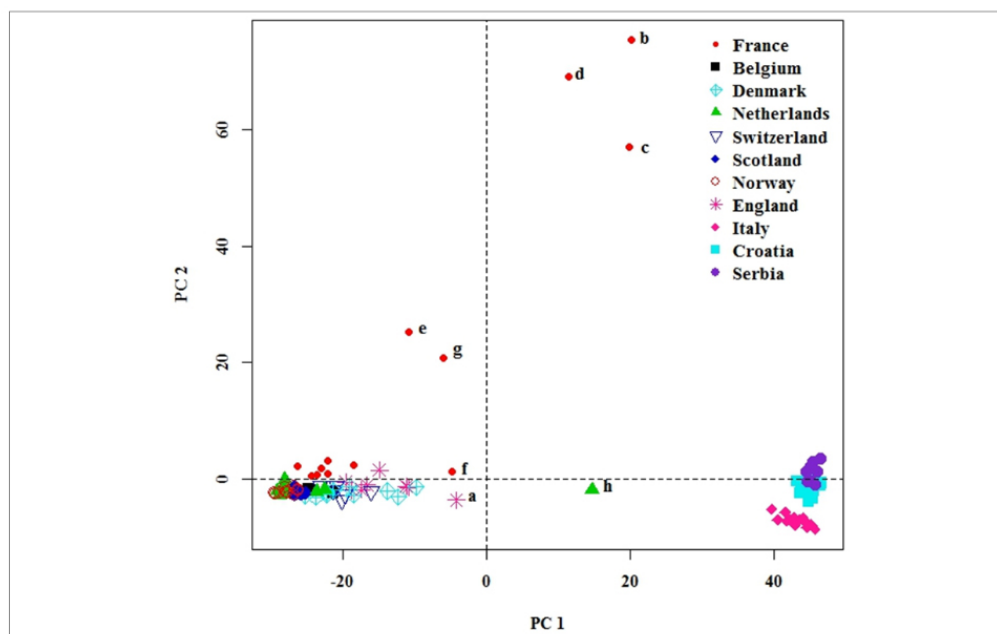


Abbildung 4:

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf der Grundlage der 1183 SNP-Loci. PC1 trennt Kolonien in Osteuropa abgetastet (native Bereich von *A. M. Carnica* und *A. m. ligustica*) aus Kolonien in Westeuropa (native Palette von *A. m. mellifera*) abgetastet wohin PC2 trennt Kolonien die ungeschützte Gruppe aus Frankreich. Die Kleinbuchstaben (ah) markieren die gleichen Kolonien in den. 2 und 4 PC1 und PC2 erklären 42,2% und 6,1% der Varianz auf.

Diskussion

Diese Studie legt nahe, dass die Bemühungen A. m zu erhalten. mellifera haben erwies sich in den meisten Schutzprogramme erfolgreich, obwohl es ist ein klarer Beweis, dass Kolonien von einigen Populationen noch geschützt tragen einen wichtigen Bestandteil der C-Linie Abstammung. Während mtDNA zeigte eine einzelne C-Linie abgeleitet Kolonie zeigte SNPs unterschiedlichen Ebenen der Beimischung über Standorte hinweg. Kolonien aus Norwegen und Schottland bilden die homogenste und die „reinste“ Populationen mit durchschnittlich Mitgliedschaft Proportionen in der A. m. mellifera Cluster höher als 0,99 und 0,97 auf. Kolonien aus den Niederlanden waren auch homogen und zeigte hohe Anteile der einzelnen Genotyp Mitgliedschaften in der A. m. mellifera Cluster, außer für einen einzelnen hoch introgressed Kolonie, die eine aktuelle Einführung darstellen könnte Veranstaltung in die geschlossene Zucht geschützt Bevölkerung. Kolonien aus Frankreich, Belgien, der Schweiz und Dänemark ausgestellt höhere Zumischung Proportionen, obwohl ihre Genome sind meist von A. m abgeleitet. mellifera ($Q > 0,86$). Frühere Studien mit Mikrosatelliten gemeldet unteren Einkreuzung Proportionen in der gleichen Bevölkerung der Schweiz (Soland-Reckeweg et al., 2009), Schottland und Dänemark (Jensen et al., 2005). Während diese Diskrepanz könnte sein, durch eine Probenahmewirkung oder einer zeitlichen Änderung erläutert, ist es auch möglich, dass die Genom-weiten Scan ist die Erfassung versteckten Einkreuzung unentdeckt durch die Mikrosatelliten-Loci. Zwar können wir Umfragen, die verwendet werden, nicht zu vergleichen verschiedene molekulare Marker, zeigte diese Studie, dass diejenigen Bevölkerungs noch halten eine wichtige C-abgeleiteten Komponente hindeutet, dass das Management Strategien in den Schutzprogramme umgesetzt haben nicht war bei der Säuberung alle ausländischen Allele erfolgreich. Diese Feststellung erfordert Anpassungen in Naturschutzstrategien, die eine bessere beinhalten könnte Steuerung von Paarungen, wenn Einkreuzung ist noch nicht abgeschlossen. Alternativ kann ein gründlichere Auswahl innerhalb der einzelnen Populationen Erhaltung kann notwendig, während sorgfältig beobachten das Risiko weiter zu reduzieren Mutter genetische Vielfalt. Ebenen der mtDNA Vielfalt waren in der geschützten Gruppe als höhere in der Vergleichsgruppe. Dieser Befund ist konsistent mit früheren Studien, die höher mütterlichen Vielfalt in M als in C-Linie gemeldet haben, Populationen (Garnery et al, 1998;.. Franck et al, 2000;.. Jensen et al, 2005). Diese Ungleichheit hat der kürzeren intergenischen zugeschrieben charakteristische Sequenz von C-Linie (sie das P-Element fehlt, und es besitzt einen einzigen Q-Element) mit weniger Möglichkeiten der Vervielfältigung / Löschen des Q-Elements (Cornuet et al., 1991). Sequenzanalyse, die in dieser Studie für jede durch Kolonie, erlaubte die Identifizierung der Variation, die gegangen wäre von der Volks PCR-RFLP-Methode als Dral Test bekannt unentdeckt (Garnery et al., 1993). In dieser Studie wurde die PCR-RFLP-Muster M4 die häufigste in beiden geschützten und ungeschützten Gruppen deckungsgleich mit früheren Erhebungen von A. m. mellifera (Garnery et al, 1998;.. Jensen et al., 2005; Oleksa et al 2011. Rortais et al., 2011). Aber unsere Sequenzdaten unterschieden 13 Varianten der M4 Muster auf, dass Kolonien, die aus Frankreich, Belgien, den Niederlanden, der Schweiz und Norwegen nicht von einem einzigen Vorfahren abstammen mütterlichen, als Dral Test (Garnery et al., 1993) würde vorgeschlagen haben. SNP Vielfalt zeigten ein anderes Muster: geschützt und Referenz Gruppen zeigten ähnliche Vielfalt Ebenen, wenn auch niedriger als die durch die ungeschützte Gruppe ausgestellt. Angesichts der Natur der zugemischten letzteren Gruppe war dies eine erwartete Ergebnis als Beimischung ist ein wichtiger Mechanismus zur Erhöhung der genetischen Vielfalt in verwalteten Honigbiene Populationen (Harpur et al., 2012). Genetische Vielfalt ist wichtig bei Bevölkerung und Kolonieebene, und ihre Abnahme hat in Verbindung gebracht worden letzten Honigbiene Rückgänge in Europa und Nordamerika (vanEngelsdorp und Meixner, 2010). Auf Bevölkerungsebene, ist die genetische Vielfalt erforderlich für die Bevölkerung, sich zu entwickeln, um mit immer anspruchsvollen Umweltbedingungen (zB neue Parasiten, neue Krankheiten und Pflanzenschutzmittel). In der Kolonie Ebene ist die genetische Vielfalt wichtig, Kolonie Gesundheit (Tarpy, 2003; Seeley und Tarpy, 2007) und Fitness (Seite, 1980; Mattila und Seeley, 2007; Oldroyd und Fewell, 2007). Mischung kann führen zu einer erhöhten genetischen Vielfalt, aber es kann auch Kompromisse lokalen Anpassungen durch Unterbrechung Zusammenarbeit entwickelt Gen-Komplexen durch Feinabstimmung natürliche Selektion über Evolutionszeit (De la Rúa et al., 2013). Dementsprechend einheimischen Honigbiene Unterart darstellen Stauseen einzigartige Kombinationen von Genen und Anpassungen an lokale Bedingungen, die müssen, erhalten und an künftige Generationen von Imker übergeben werden.

Wir stehen tief in der Schuld zahlreicher Menschen:

Gilles Fert und Andrew Abrahams für die Bereitstellung von Honig Bienenproben; Danny Weber für die Erlaubnis, die OPA zu verwenden; Colette Abbey für die DNA-Extraktion und Laufgoldengate-Tests; Clare Gill für die Unterstützung bei der GenomeStudio Software und für die Bereitstellung der Einrichtungen an der Texas A & M University für SNP-Genotypisierung; José Rufino für Bereitstellung von Rechenleistung für die Ausführung der Simulationen. Drei Gutachter gemacht aufschlussreiche Kommentare zu einer früheren Fassung des Manuskripts. Goldengate SNP-Daten wurden mit Unterstützung aus der gesamten erzeugten Systeme Genomics Initiative an der Texas A & M University in Zusammenarbeit mit der Texas A & M AgriLife Research. Julio Chávez-Galarza wurde unterstützt von Fundação para a Ciência e Tecnologia durch das Promotionsstipendium SFRH / BD / 68682/2010.

Finanzielle Unterstützung für diese Forschung zur Verfügung gestellt wurde.