

2010

Universidad de Murcia,
Facultad de Veterinaria,
Departamento de Zoología y Antropología Física,
Área de Biología Animal,
Campus de Espinardo,
30100 Murcia
España

Pilar de la Rúa Tarín
Obdulia Sánchez Domingo

[Caracterización molecular de abejas de la
APICOLA MALKA S.R.L. de Argentina]

1. Descripción de las tareas realizadas

En el mes de marzo de 2010 se recibieron muestras procedentes de Argentina. Se trataba de unas 20-30 abejas de cada una de las siguientes colmenas:

A: 1, 2, 3 y 4

B: 1, 2, 3 y 4

CG: 1, 2, 3 y 4

CN: 1, 2, 3 y 4

conservadas en etanol. A su llegada se mantuvieron en un congelador a -4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. El análisis molecular se realizó usando la región intergénica comprendida entre los genes del ARNt^{leu} y la subunidad II de la citocromo oxidasa (cox2) del ADN mitocondrial, en las 16 colmenas procedentes de APICOLA MALKA S.R.L. muestreadas en el año 2010.

Las tareas realizadas han sido:

1. Recepción de las muestras, almacenamiento de las muestras en etanol absoluto a -20 °C y creación de un fichero Excel con los datos de las colmenas muestreadas.
2. Extracción de ADN de una abeja obrera adulta por colmena.
3. Amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR de la región intergénica ARNt^{leu}-cox2 y cuantificación del tamaño de amplificación.
4. Secuenciación de los fragmentos obtenidos de cada muestra.
5. Análisis de las secuencias obtenidas y determinación de los haplotipos encontrados.
6. Elaboración del informe.

2. Variabilidad del género *Apis* basada en el análisis del ADN mitocondrial.

La caracterización molecular basada en el ADNmt se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada en los estudios taxonómicos y filogenéticos debido a que permite reconstruir relaciones antecesor-descendientes por la vía materna al heredarse sólo por el óvulo, ya que el espermatozoide no aporta generalmente mitocondrias al cigoto (Meusel y Moritz, 1993; De la Rúa *et al.*, 2005). Como consecuencia de esto, toda la descendencia de una misma reina comparte su ADNmt, el cual pasa sin alteración a obreras y zánganos, salvo que se produzcan mutaciones puntuales. Esta característica del ADNmt permite caracterizar a la abeja reina y a toda la colmena con sólo estudiar el ADNmt de una obrera, pudiendo considerarse un marcador molecular a nivel de colmena.

El estudio del ADNmt ha permitido formular diferentes hipótesis sobre la evolución de las subespecies de *A. mellifera*. Los resultados de los análisis realizados han permitido definir molecularmente cinco linajes evolutivos (Garnery *et al.*, 1992, 1995; Franck *et al.*, 1998, 2000, 2001; Palmer *et al.*, 2000):

1. Linaje A: constituido por las especies africanas como *A. m. intermissa* y *A. m. scutellata*.
2. Linaje M: abarca a las subespecies de Europa Occidental, incluyendo *A. m. mellifera* y *A. m. iberiensis*.
3. Linaje C: está formado por las subespecies de Europa Oriental (entre ellas *A. m. ligustica* o abeja italiana).
4. Linaje O: incluye a las subespecies de Oriente Próximo.
5. Linaje Y: formado por la subespecie *A. m. jemenitica* de Etiopía.

La región más estudiada fue la descrita por Garnery *et al.* (1991). Esta región se encuentra entre los genes del ARN transferente de la leucina (ARNt^{leu}) y la subunidad II de la citocromo oxidasa (cox2), y está constituida por secuencias de tamaño y composición conocidas. En esta región se han descrito dos tipos de secuencias:

1. Secuencia Q: tiene un tamaño de 192 a 197 pares de bases (pb) y posee un 7,3% de guanina y citosina en su composición. Está presente en todas las subespecies y se puede encontrar de una a cuatro copias.

2. Secuencia P: compuesta sólo de adenina y timina, en algunos casos tiene un tamaño de 67 pb (denominada P₀, característica del linaje A) y en otros casos a consecuencia de una deleción puede tener 52 pb (denominada P, característica del linaje M) o puede contener 50 pb (denominada P₁ y es característica de algunos haplotipos del linaje A, De la Rúa *et al.*, 1998). Estas secuencias pueden no estar presentes (Linaje C).

La variación en el tamaño observada en esta región del ADNmt resulta de la presencia o ausencia de las secuencias P, P₀ y P₁ y de la presencia de un número variable de repeticiones en tándem de la secuencia Q (Garnery *et al.*, 1992). A su vez, dentro de cada linaje puede existir variación en el tamaño de dicha región intergénica y en la posición de las dianas de la endonucleasa *DraI* en las secuencias antes mencionadas, esto ha permitido describir diferentes haplotipos mitocondriales dentro de los linajes. En concreto, el linaje africano ha sido estudiado en detalle por Franck *et al.* (2001) y está constituido por tres sublinajes africanos:

1. Sublinaje A_I: los haplotipos incluidos en este grupo se distribuyen por todo el continente africano y la Península Ibérica; se caracterizan por presentar la secuencia P₀ y más de un punto de corte con la enzima *DraI*.
2. Sublinaje A_{II}: los haplotipos de este sublinaje se distribuyen principalmente en el Norte de África, y se identifican por presentar sólo un punto de corte con la enzima *DraI* en la región amplificada del gen del ARNt^{leu} (A8, A9 y A10).
3. Sublinaje A_{III} o de distribución atlántica: los haplotipos descritos se caracterizan por presentar la secuencia P₁ (A11, A14, A15, A16, A20 y A21).

En el caso de los haplotipos pertenecientes al linaje C de Europa Oriental o del Este, es necesaria la secuenciación debido a la ausencia de variabilidad para el test de *DraI*.

3. Resultados obtenidos del análisis del ADNmt

La amplificación de la región intergénica ARNt^{leu}-cox2 ha permitido identificar fragmentos de ADNmt de un único tamaño, correspondiente a una única secuencia de tipo Q (Figura 1).



Figura 1. Gel de agarosa mostrando los resultados de la amplificación de la región ARNt^{Leu}-cox2. Las muestras son 1: A1, 2: A2, 3: A3, 4: A4, 5: B1, 6: B2, 7: B3, 8: B4, 9: CG, 10: CG2, 11: CG3, 12: CG4, 13: CN1, 14: CN2, 15: CN3, 16: CN4. A la derecha se haya el marcador de tamaño cuya banda más intensa corresponde a un fragmento de 500 pares de bases.

Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo I, en el cual se encuentran las secuencias de nucleótidos de la región intergénica ARNt^{Leu}-cox2 obtenida en cada muestra y alineadas respecto a la secuencia de *A. mellifera* con el haplotipo C1 (EF033655) obtenida de la base de datos del Genbank.

Se han encontrado un total de cinco haplotipos diferentes: C1a, C2c, C2d, C2j y C2m, este último ha sido descrito por primera vez. Estos haplotipos se diferencian entre si en un total de cinco posiciones nucleotídicas (Figura 2).

>A.mellifera (C1)_EF033655	CTATC	}	C1a
>(A1)	CTATC		
>(A3)	CTATC		
>(A2)	CTATC		
>(A4)	CTATC		
>(B3)	CTATC	}	C2c
>(CG1)	-TATC		
>(CG4)	-TATC	}	C2d
>(B1)	-TACT		
>(B2)	-TACT		
>(B4)	-TACT		
>(CN1)	-TTCT	}	C2j
>(CN2)	-TTCT		
>(CN3)	-TTCT		
>(CN4)	-TTCT		
>(CG2)	--TCT	}	C2m
>(CG3)	--TCT		

Figura 2. Posiciones nucleotídicas variables en cada muestra. También se indica el haplotipo al que corresponde cada muestra.

El haplotipo más abundante es el C1a descrito anteriormente en la subespecie *Apis mellifera ligustica*. Los otros haplotipos se han descrito en distintas poblaciones de *A. m. carnica*.

4. Conclusiones

1. Las colonias caracterizadas mediante el análisis de la variabilidad de la región ARNt^{Leu}-cox2 pertenecen al linaje evolutivo de Europa oriental al cual también pertenecen subespecies como *A. m. carnica*, *A. m. ligústica* y el híbrido Buckfast.
2. El haplotipo C1a aparece con una mayor proporción.
3. La diversidad haplotípica encontrada en las muestras de la APICOLA MALKA S.R.L. es notable, lo que sugiere que se pueden evitar efectos indeseables derivados de la endogamia.

5. Referencias

- De la Rúa P., Serrano J. y Galián J. (1998). Mitochondrial DNA variability in the Canary Island honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology* 7: 1543-1548.
- De la Rúa P., Fuchs S. y Serrano J. (2005). Biogeography of European honeybees. En: Lodesani, M. y Costa, C. eds. *Beekeeping and conserving biodiversity of honeybees. Sustainable bee breeding. Theoretical and practical guide.* Northern Bee Books, Hebden Bridge. Pp 15-52.
- Franck P., Garnery L., Solignac M. y Cornuet J.M. (1998). The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52: 1119-1134
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M. y Cornuet J.M. (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology* 9: 907-921.
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Hepburn H.R., Solignac M. y Cornuet J.M. (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86: 420-430
- Garnery L., Vautrin D., Cornuet J.M. y Solignac M. (1991). Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie* 22: 87-92.
- Garnery L., Cornuet J.M. y Solignac M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 1: 145-154.
- Garnery L., Mosshine E.H., Oldroyd B.P. y Cornuet J.M. (1995). Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology* 4: 465-471

- Meusel M. y Moritz R.F.A. (1993). Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics* 6: 539-543.
- Palmer M.R., Smith D.R. y Kaftanoglu O. (2000). Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *Journal of Heredity* 91: 42-46.

6. Anexo II: secuencias alineadas del ADNmt

```
[
[
1 1111111112 222222223 333333334 444444445 ]
[
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 GTATTTTAA ACTTTATTA AAATTTCCC ACTTAATTCA TATTAATTTA
#A1 .....
#A3 .....
#A2 .....
#A4 .....
#B3 .....
#CG1 .....
#CG4 .....
#B1 .....
#B2 .....
#B4 .....
#CN1 .....
#CN2 .....
#CN3 .....
#CN4 .....
#CG2 .....
#CG3 .....
```

```
[
[
1 ]
[
555555556 666666667 777777778 888888889 999999990 ]
[
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 AAAATAAATT AATAACAATT TTTAATAAAA TAAATAATTA ATTTTATTTT
#A1 .....
#A3 .....
#A2 .....
#A4 .....
#B3 .....
#CG1 .....
#CG4 .....
#B1 .....
#B2 .....
#B4 .....
#CN1 .....
#CN2 .....
#CN3 .....
#CN4 .....
#CG2 .....
#CG3 .....
```

```
[
[
111111111 111111111 111111111 111111111 111111111 ]
[
000000001 111111112 222222223 333333334 444444445 ]
[
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 TATATTGAAT TTTAAATTCA ATCTTAAAGA TTTAATCTTT TTATTAAAT
#A1 .....
#A3 .....
#A2 .....
#A4 .....
#B3 .....
#CG1 .....
#CG4 .....
#B1 .....
#B2 .....
#B4 .....
#CN1 .....
#CN2 .....
#CN3 .....
#CN4 .....
#CG2 .....
#CG3 .....
```



```

[ 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111112 ]
[ 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 TAATAAATTA ATATAAATA AACAAAATA TAACAGAATA TATTTATTAA
#A1 .....
#A3 .....
#A2 .....
#A4 .....
#B3 .....
#CG1 .....
#CG4 .....
#B1 .....
#B2 .....
#B4 .....
#CN1 .....T.....
#CN2 .....T.....
#CN3 .....T.....
#CN4 .....T.....
#CG2 .....T.....
#CG3 .....T.....

[ 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 ]
[ 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 AATTTAATTT ATTAAAATTT CCACATGATT TATATTTATA TTTCAAGAAT
#A1 .....
#A3 .....
#A2 .....
#A4 .....
#B3 .....
#CG1 .....
#CG4 .....
#B1 .....C.....
#B2 .....C.....
#B4 .....C.....
#CN1 .....C.....
#CN2 .....C.....
#CN3 .....C.....
#CN4 .....C.....
#CG2 .....C.....
#CG3 .....C.....

[ 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222223 ]
[ 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[ 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 CAAATTCATA TTATGCTGAT AATTTAATTT CATTTCATA TATAGTTATA
#A1 .....
#A3 .....
#A2 .....
#A4 .....
#B3 .....
#CG1 .....
#CG4 .....
#B1 .....
#B2 .....
#B4 .....
#CN1 .....
#CN2 .....
#CN3 .....
#CN4 .....
#CG2 .....
#CG3 .....

```

```

[          3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 ]
[          0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 ATAATTATTA TTATAATTTTC AACATTAACT GTATATATTA TTTTAGATTT
#A1          .....
#A3          .....
#A2          .....
#A4          .....
#B3          .....
#CG1         .....
#CG4         .....
#B1          .....
#B2          .....
#B4          .....
#CN1         .....
#CN2         .....
#CN3         .....
#CN4         .....
#CG2         .....
#CG3         .....

[          3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333334 ]
[          5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 ATTTATAAAC AAATTCCTCAA ATTTATTTT ATTAATAAAT CATAATATTG
#A1          .....
#A3          .....
#A2          .....
#A4          .....
#B3          .....
#CG1         .....
#CG4         .....
#B1          .....
#B2          .....
#B4          .....
#CN1         .....
#CN2         .....
#CN3         .....
#CN4         .....
#CG2         .....
#CG3         .....

[          4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 ]
[          0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 AAATTATTTG AACAAATTATT CCAATTATTA TTCTATTAAT TATTTGTTTT
#A1          .....
#A3          .....
#A2          .....
#A4          .....
#B3          .....
#CG1         .....
#CG4         .....
#B1          .....
#B2          .....
#B4          .....
#CN1         .....
#CN2         .....
#CN3         .....
#CN4         .....
#CG2         .....
#CG3         .....

```

```

[          4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444445 ]
[          5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 CCATCATTAA AAATTTTATA TTTAATTGAT GAAATTGTAA ATCCTTTTTT
#A1          .....
#A3          .....
#A2          .....
#A4          .....
#B3          .....
#CG1         .....
#CG4         .....
#B1          .....
#B2          .....
#B4          .....
#CN1         .....
#CN2         .....
#CN3         .....
#CN4         .....
#CG2         .....
#CG3         .....

[          5555555555 5555555555 ]
[          0000000001 1111111112 ]
[          1234567890 1234567890 ]
#A.mellifera(C1)_EF033655 TTCAATTAAA TCAATTGGTC
#A1          .....
#A3          .....
#A2          .....
#A4          .....
#B3          .....
#CG1         .....
#CG4         .....
#B1          .....
#B2          .....
#B4          .....
#CN1         .....
#CN2         .....
#CN3         .....
#CN4         .....
#CG2         .....
#CG3         .....

```