

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN POBLACIONES DE *APIS MELLIFERA IBERICA* DE GALICIA (NW ESPAÑA)

MITOCHONDRIAL DNA VARIABILITY IN *APIS MELLIFERA IBERICA* POPULATION FROM
GALICIA (NW SPAIN)

Cánovas, F., P. de la Rúa, J. Serrano y J. Galián

Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Apdo.
4021. 30071 Espinardo. Murcia. España.

E-mail: fcanovas@um.es, pdelarua@um.es, jserrano@um.es, jgalian@um.es

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

ADN mitocondrial. *Apis mellifera iberica*. Galicia.
RFLP.PCR.

ADDITIONAL KEYWORDS

Mitochondrial DNA. *Apis mellifera iberica*. Galicia.
RFLP.PCR.

SUMMARY

The mitochondrial DNA of *Apis mellifera iberica*, sampled in 72 beehives and 20 localities of Galicia (Northwest Spain) have been studied. A fragment of the subunit I of the cytochrome oxidase gene and the intergenic region between the tRNA^{leu} and the subunit II of the cytochrome oxidase gene was amplified by PCR and digested with the endonucleases *HincII* and *DraI* respectively. Ninety-five percent of beehives from Lugo and La Coruña (the two Northern provinces) corresponds to the western European lineage (M), whereas in Orense and Pontevedra (the two Southern provinces) the haplotypes belonging to the African lineage (A) are more frequent. This pattern of haplotype distribution was previously known for other parts of the Iberian Peninsula, although in Galicia it shows the steepest transition. The presence of seven A haplotypes in Galicia suggests the occurrence of more than one colonising episode from the South. Further investigations are needed for assessing the influence of beekeeping, together with natural processes, in the genetic composition of bee populations of Galicia.

RESUMEN

Se ha estudiado el ADN mitocondrial de *Apis mellifera iberica* de 72 colmenas de 20 localidades de Galicia (España). Para ello se han amplificado mediante PCR un fragmento de la subunidad I del gen de la citocromo oxidasa y la región intergénica ARN^{leu} y la subunidad II del gen de la citocromo oxidasa, que se han digerido con las enzimas de restricción *HincII* y *DraI*, respectivamente. Un 95 p.100 de las colmenas de La Coruña y Lugo, las provincias más septentrionales, tienen haplotipos del linaje Europeo occidental (M), mientras que en las provincias situadas al sur, Orense y Pontevedra, presentan un ADN mitocondrial perteneciente al linaje Africano (A). Se confirma en Galicia el gradiente de distribución observado en otras regiones de la Península, aunque aquí con una transición norte-sur muy brusca. La presencia de siete haplotipos A diferentes sugiere que ha habido más de un episodio de colonización del sur de Galicia desde las regiones más meridionales. Junto a los procesos naturales de dispersión, es necesario estimar el efecto de la actividad apícola en la composición genética de las poblaciones de abejas gallegas.

Arch. Zootec. 51: 441-448. 2002.

INTRODUCCIÓN

La caracterización molecular basada en el ADN mitocondrial se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada para el estudio de la diferenciación de subespecies y razas de la abeja de la miel *Apis mellifera* L. por numerosos autores (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992; Garnery *et al.*, 1995; De la Rúa *et al.*, 1998, 1999, 2001). Esta molécula circular y de herencia materna, permite caracterizar la abeja reina a través de las obreras y así a toda la colmena, pudiendo considerarse un marcador de toda la colmena. Su estudio ha permitido elaborar diferentes hipótesis sobre la evolución de las subespecies de *A. mellifera* y definir cinco linajes evolutivos: el linaje A, incluye las subespecies africanas como *intermissa* y *scutellata*, el linaje M está formado por las subespecies de Europa Occidental, incluyendo *mellifera*, el linaje C formado por las subespecies de Europa Oriental (entre ellas *ligustica* o abeja italiana), el linaje O que abarca a las subespecies de Oriente Próximo y el Y que incluye a la subespecie *A. m. yemenitica* de Etiopía (Ruttner, 1988; Garnery, 1992; Estoup *et al.*, 1995; Franck *et al.*, 2001).

Cada uno de estos linajes presenta una composición característica en la secuencia de diferentes regiones del ADN mitocondrial, como sucede con la subunidad I del gen de la citocromo oxidasa (COI), para la que el linaje M presenta una diana de la endonucleasa *HincII* que no se encuentra en el linaje A (Hall y Smith, 1991). Entre los genes *ARNt^{leu}* y citocromo oxidasa II hay de una a tres copias de una secuencia

denominada Q, con un tamaño de 192 a 197 pares de bases (bp). El linaje C se caracteriza por presentar únicamente una copia de esta secuencia. Adyacente a la secuencia Q hay otra denominada Po (67 bp), que es característica del linaje A. Una delección en esta secuencia da lugar a la aparición de una secuencia P, de 52 bp característica del linaje M o a la secuencia P₁ de 50 bp, característica de algunos haplotipos del linaje A (De la Rúa *et al.*, 1998). A su vez, y dentro de los linajes, el tamaño de dicha región intergénica y la posición variable de las dianas de la endonucleasa *DraI* en las secuencias antes mencionadas, ha permitido describir diferentes haplotipos mitocondriales presentes en las subespecies de cada uno de los linajes evolutivos. En este caso la variabilidad de las secuencias se encuentra dentro de los linajes.

De acuerdo con los criterios taxonómicos convencionales, en la Península Ibérica se halla la subespecie *A. m. iberica* (Goetze, 1964; Ruttner, 1988). Esta subespecie se encuadra en dos de los linajes moleculares antes citados, puesto que se han encontrado tanto haplotipos del linaje A (origen africano) como del M (origen Mediterráneo occidental). La distribución de los haplotipos de esta subespecie en la Península Ibérica sugiere un gradiente norte-sur (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1995; De la Rúa *et al.*, 1999), existiendo un predominio del linaje A en la zona sur peninsular y del linaje M en el norte. Sin embargo, algunas poblaciones del norte de Portugal muestran una mayor frecuencia de haplotipos del linaje A (Franck *et al.*, 1998).

El objetivo de este trabajo es la

caracterización molecular de las poblaciones de *A. m. iberica* de Galicia, mediante el análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial. Ello permitirá completar el mapa de distribución de haplotipos y linajes de las poblaciones ibéricas de la abeja melífera, profundizar en los procesos evolutivos y biogeográficos de esta especie y disponer de datos básicos sobre su estructura genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS

Se colectaron abejas obreras de los cuadros interiores de 72 colmenas re-

partidas por las cuatro provincias de Galicia, entre los años 1998 y 2001. Estas muestras fueron preservadas en etanol absoluto y en frío hasta su análisis. Las localidades se indican en la **figura 1** y la **tabla I**.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se diseccionaron los músculos torácicos de las obreras y se dejaron secar media hora en una estufa a 37 °C. La extracción se realizó según el protocolo descrito por Walsh *et al.* (1991) con ligeras modificaciones. De la dilución final del protocolo se tomó 1 ml de ADN para la reacción de amplificación por PCR.

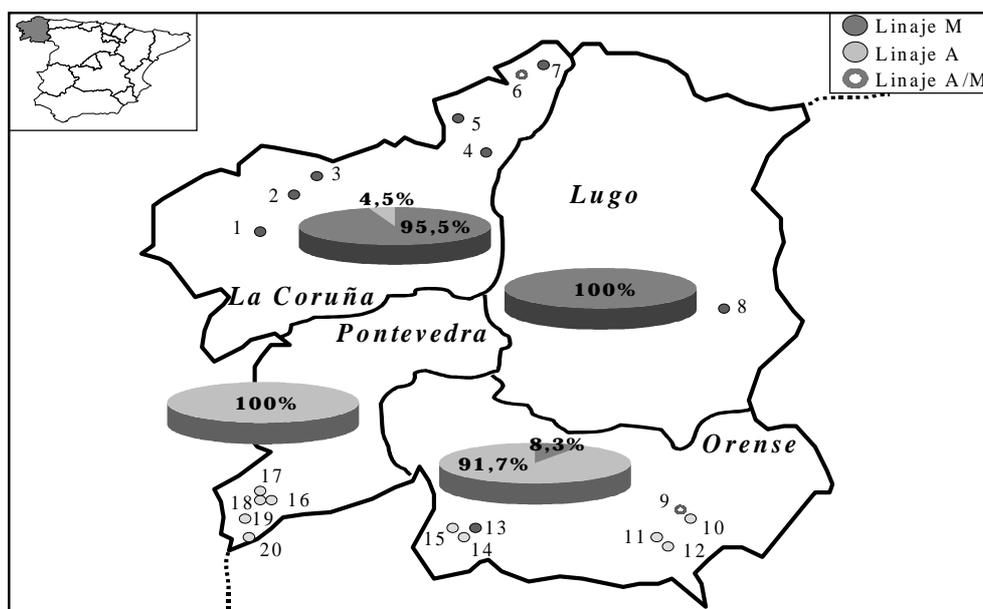


Figura 1. Localización de las muestras analizadas de *Apis mellifera iberica* y frecuencia relativa de los linajes A y M en cada provincia gallega. El número de cada localidad se corresponde con los datos de la tabla I. (Geographical localization of the analysed samples of *Apis mellifera iberica* and relative frequency of lineages A and M in the four provinces in Galicia. The numbers on the localities correspond to table I).

AMPLIFICACIÓN POR PCR Y ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

El análisis de ADN se llevó a cabo según el método descrito por Garnery *et al.* (1993) para amplificar la región intergénica ARN^{t^{leu}}-COII utilizando los cebadores: E2 (5'-GGC AGA ATA AGT GCA TTG-3') y H2 (5'-CAA TAT CAT TGA TGA CC-3'), y el de Hall y Smith (1991) para el análisis de la subunidad I del gen de la citocromo oxidasa (COI) con los cebadores del UBC Insect Mitochondrial DNA Pri-

mer Oligonucleotide Set de la Universidad de British Columbia: C1-J-2183 (5'-CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3') y L2-N-3014 (5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3'). Se utilizaron PCR beads de Pharmacia a un volumen final de 25 ml con una concentración 0,16 mM de cada cebador. Los programas de amplificación consistieron en: desnaturalización a 96 °C durante 5 min, 35 ciclos de 1 min con una temperatura de anillado de 53 °C para la región

Tabla I. Distribución de los haplotipos de ADN mitocondrial encontrados en las localidades analizadas en Galicia, obtenidos mediante el test con Dral (Garnery *et al.*, 1993); también se indica el número de colmenas analizadas en cada localidad. (Distribution of the mitochondrial DNA haplotypes found in the sampled localities in Galicia, revealed by the Dral test (Garnery *et al.*, 1993); the number of analysed colonies in each locality is indicated).

Provincia/Localidad	Número de colmenas	Haplotipos (Test de la Dral)									
		A1	A2	A3	A4	A8	A9	A11	M5	M6	
La Coruña											
Coristanco (1)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Santa Comba (2)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
Carballo (3)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
Vares (4)	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-
Pumar de Vale (5)	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-
Pena Blanca (6)	3	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-
San Fiz (7)	4	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1
Lugo											
San Miguel (8)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	3	7
Orense											
Castiñeira (9)	3	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-
Sabuguido (10)	3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Estorgás (11)	3	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-
Carvas de Abaixo (12)	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Muiños (13)	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
Lobios (14)	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Entrimo (15)	8	-	-	-	3	-	-	5	-	-	-
Pontevedra											
Casa Barreiras (16)	4	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Casa Picotas (17)	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
Burgueira (18)	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Santa Maria de Oia (19)	3	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-
O Rosal (20)	3	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-
Total	73	2	2	7	16	3	4	6	23	10	

intergénica ARN^{t_{leu}}-COII y 45 °C para la COI, extensión a 72 °C durante 1 min y desnaturalización de 45 seg a 96 °C, y por último 10 min de extensión a 72 °C. Los productos amplificados se examinaron en gel de agarosa al 1,5 p.100 en tampón TBE 1X, fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Se emplearon dos enzimas de restricción con capacidad de diagnóstico: *HincII*, que actúa sobre el gen de la citocromo oxidasa (COI) (Hall y Smith, 1991) y *DraI*, en la región intergénica ARN^{t_{leu}}-COII (Garnery *et al.*, 1993). Las reacciones de restricción fueron realizadas con 5 unidades de enzima *HincII* y *DraI* siguiendo las recomendaciones del proveedor (Gibco). Los patrones de restricción obtenidos con la enzima *HincII* se pusieron de manifiesto mediante separación electroforética en gels de agarosa al 1,5 p.100 y posterior tinción con bromuro de etidio, mientras que para la enzima *DraI* los gels fueron de acrilamida al 8 p.100 y la tinción posterior se realizó con plata (Merril *et al.*, 1981).

RESULTADOS

En la **figura 1** se presenta la distribución de frecuencias de los linajes M y A, obtenidos mediante restricción con *HincII*. Las provincias de La Coruña y Lugo presentan una mayoría de colmenas pertenecientes al linaje M, con unos porcentajes del 95,5 p.100 y 100 p.100 respectivamente. Las dos provincias más meridionales, Orense y Pontevedra, muestran una frecuencia mayor del linaje africano (A), 91,7 p.100 y 100 p.100 respectivamente.

No se han encontrado muestras con haplotipos pertenecientes al linaje C. Todas las colmenas estudiadas en cada localidad pertenecen a un solo linaje, excepto en Castiñeira (Orense) y Pena Blanca (La Coruña), donde se han encontrado muestras de ambos linajes.

La caracterización de la región intergénica ARN^{t_{leu}}-COII, mediante la combinación de su amplificación por PCR y su corte con la endonucleasa *DraI* (que produce distintos patrones de restricción), permitió detectar nueve haplotipos (**figura 2**), siete pertenecientes al linaje africano A (A1, A2, A3, A4, A8, A9 y A11) y dos pertenecientes al linaje europeo M (M5 y M6). Todos estos haplotipos habían sido descritos con anterioridad por Garnery *et al.* (1993, 1995) y De la Rúa *et al.* (1998).

De los haplotipos africanos el más frecuente es el A4 que se encuentra en todas las localidades muestreadas de Pontevedra (**tabla I**) y en una de Orense. Los otros cinco haplotipos africanos se distribuyen con una frecuencia menor en estas dos provincias y en una localidad de La Coruña. En Santa María de Oia (Pontevedra) y Entrimo (Orense) se encuentra el haplotipo A11 que es el mayoritario en esta última localidad. El haplotipo europeo occidental más frecuente es el M5 que está localizado en todas las muestras procedentes de La Coruña, en una de Orense y en Lugo, aunque en esta provincia tiene menor frecuencia que el haplotipo mayoritario M6.

DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de

las poblaciones de *Apis mellifera iberica* de Galicia, indican que los haplotipos M propios del linaje europeo occidental predominan en las dos provincias más septentrionales, La Coruña y Lugo, mientras que los haplotipos A del linaje africano son mayoritarios en Orense y Pontevedra. Estos datos confirman que el gradiente de distribu-

ción de haplotipos observado en otras regiones de la Península Ibérica (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1995), también se encuentra en Galicia aunque con una transición norte-sur muy brusca, ya que ocurre a una escala geográfica de pocas decenas de kilómetros.

Este gradiente tan acentuado no parece explicable por factores selecti-

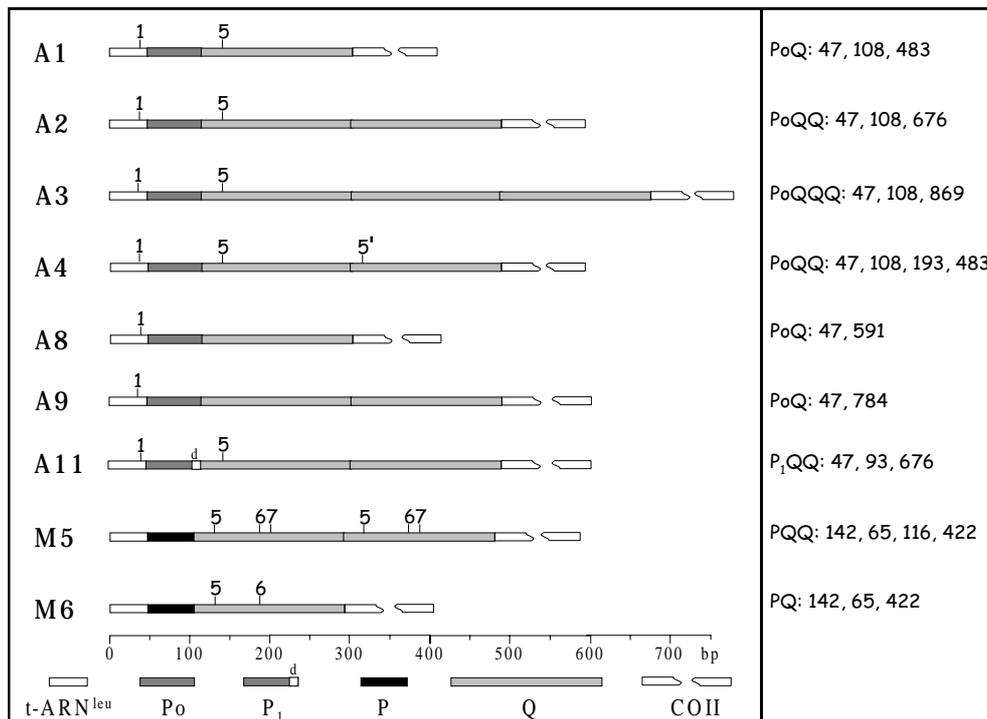


Figura 2. Mapa de restricción de los haplotipos encontrados en *Apis mellifera iberica* de Galicia (basado en Garnery 1993). A la derecha figura el tipo y el número de secuencias intergénicas P y Q de cada haplotipo. Los números arábigos encima de cada secuencia indican las dianas de corte de la enzima DraI de acuerdo con Garnery (1993), así como la longitud de los fragmentos resultante tras la digestión. (Restriction map of the haplotypes found in *Apis mellifera iberica* in Galicia (based on Garnery 1993). The intergenic sequences P and Q of each haplotype and the size of the digested fragments is indicated to the right. On top, arabic numbers indicate restriction site of DraI enzyme according to Garnery (1993)).

vos ni por la existencia de barreras geográficas manifiestas. Más plausible es la hipótesis que supone la existencia de una zona de hibridación de los dos linajes evolutivos M y A, situada entre las provincias más septentrionales y las más meridionales. La zona se habría originado por la llegada de poblaciones M posiblemente desde Asturias y de poblaciones A llegadas desde el litoral y el sublitoral de Portugal. Los datos de Franck *et al.* (1998) sobre la presencia de haplotipos A en el norte de Portugal son congruentes con esta hipótesis. La persistencia de la barrera que dificulta la expansión de los haplotipos A hacia el Norte o de los M hacia el Sur, se explica en razón del mecanismo hereditario del genoma mitocondrial, que se transmite (salvo raras excepciones) por vía materna, y por la biología reproductora de la abeja melífera. En efecto, aunque en las áreas de congregación se mezclen hembras y machos de linajes distintos durante el periodo reproductivo, las hembras con haplotipo M que hayan sido fecundadas por machos M o A, vuelven a su colmena y generan abejas igualmente M, lo que estabiliza la localización geográfica de dicho haplotipo. Igual se puede suponer para las reinas con haplotipo A.

La presencia de siete haplotipos A diferentes sugiere que ha habido episodios reiterados de colonización del sur de Galicia desde las regiones más meridionales. Conforme se va disponiendo de datos de otras regiones (De la Rúa *et al.*, en preparación) se pone de manifiesto que el linaje A presenta un gradiente latitudinal en la Península Ibérica con dirección sudoeste-nores-

te, en vez de ser simplemente sur-norte, lo que indica la posible existencia de un patrón de distribución atlántico ibero-marroquí. Otros insectos como los coleópteros carábidos incluyen especies que muestran un patrón similar (J. Serrano, comunicación personal).

Junto a los procesos naturales de dispersión es conveniente estimar el efecto de la actividad apícola en la composición genética de las poblaciones de abejas gallegas. La desaparición de colmenares debido a la varroasis u otras patologías, unido a la compra de colmenas procedentes de otras regiones peninsulares, es un fenómeno de consecuencias poco conocidas todavía. El análisis de este factor y el estudio de nuevas colmenas a una escala geográfica menor, podría corroborar la hipótesis arriba propuesta acerca del poblamiento apícola de Galicia y sentar las bases para procesos de selección y mejora usando parámetros genéticos de las poblaciones locales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a D. José Manuel Docampo por el trabajo de recolección de las muestras analizadas.

Agradecemos a Bárbara Fernández y Raquel Hernández sus comentarios y discusiones que han contribuido a mejorar este artículo.

Un revisor anónimo realizó igualmente comentarios valiosos que han mejorado el manuscrito.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto INIA RZ00-013.

BIBLIOGRAFÍA

- De la Rúa, P., J. Serrano and J. Galián. 1998. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). *Mol. Ecol.*, 7: 1543-1547.
- De la Rúa, P., J. Galián y J. Serrano. 1999. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de abejas de la miel (*Apis mellifera* L.) de la Región de Murcia. *Invest. Agr: Prod. San. Anim.*, 14: 41-49.
- De la Rúa, P., J. Galián, J. Serrano and R.F.A. Moritz. 2001. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Mol. Ecol.*, 10: 1733-1742.
- Estoup, A., L. Garnery, M. Solignac and J.M. Cornuet. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 140: 679-695.
- Franck, P., L. Garnery, M. Solignac and J.M. Cornuet. 1998. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*. 52: 1119-1134.
- Franck, P., L. Garnery, A. Loiseau, H.R. Hepburn, M. Solignac and J.M. Cornuet. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 86: 420-430.
- Garnery, L., J.M. Cornuet and M. Solignac. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.*, 1: 145-154.
- Garnery, L., M. Solignac, G. Celebrano and J.M. Cornuet. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structures of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49: 1016-1021.
- Garnery, L., E.H. Mosshine and J.M. Cornuet. 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Mol. Ecol.*, 4: 465-471.
- Goetze, G.K.L. 1964. Die Honigbiene in natürlicher und Künstlicher Zuchttauslese. Paul Parey, Hamburg.
- Hall, H.G. and D.R. Smith. 1991. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 4548-4552.
- Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman and M.H. Ebert. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in poly-acrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*. 211: 1437-1438.
- Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees pp:163-257. Springer-Verlag, Berlin.
- Smith, D.R., M.F. Palopoli, B.R. Taylor, L. Garnery, J.M. Cornuet, M. Solignac and W.M. Brown. 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *J. Hered.*, 82: 96-100.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger and R. Higuchi. 1991. Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10: 506-513.

Recibido: 9-1-02. Aceptado: 19-4-02.

Archivos de zootecnia vol. 51, núm. 196, p. 448.