

VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN POBLACIONES DE ABEJAS DE LA MIEL (*Apis mellifera* L.) DE LA REGION DE MURCIA

P. DE LA RUA
J. GALIAN
J. SERRANO

Dpto. de Biología Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Murcia. Apdo. 4021. 30071 Espinardo (Murcia)

RESUMEN

Se ha estudiado el ADN mitocondrial de abejas domésticas (*Apis mellifera iberica*) de 36 colmenas fijas de ocho localidades de Murcia (sudeste de España), mediante amplificación con la PCR de la región intergénica situada entre los genes del tARN_{leu} y de la citocromo oxidasa II, y la digestión posterior de los fragmentos resultantes con la endonucleasa *Dra* I. También se han secuenciado dichos fragmentos. Los resultados indican que un 97,22 % de las colmenas corresponden al linaje A de subespecies y razas con ADN mitocondrial africano, que predomina en el sur de la Península Ibérica, mientras que solo una colmena corresponde al linaje C de abejas de Europa del este (*Apis mellifera ligustica*). Tras la digestión con *Dra* I de la citada región intergénica, se han encontrado tres haplotipos distintos, dos pertenecientes al linaje A (haplotipos A2 86,11%; A1 11,11%), y otro al linaje C. Los resultados indican que las colmenas fijas son homogéneas en el ADNmt y no muestran introgresión génica a partir de otras cercanas que son trashumantes o en las que se han introducido reinas "italianas". Una menor adaptabilidad de las reinas importadas y la baja tasa de tales importaciones, figuran entre las posibles explicaciones de estos resultados.

PALABRAS CLAVE: *Apis mellifera*
Variabilidad ADNmt
Haplotipos
Murcia

INTRODUCCION

Durante la última década se han realizado numerosos estudios del ADN mitocondrial (ADNmt) de la abeja doméstica, que han supuesto avances notables para conocer la diferenciación y la evolución de subespecies y razas (Cornuet *et al.*, 1991; Cornuet y Garnery, 1991; Garnery *et al.*, 1992; Smith y Brown, 1988, 1990; Smith *et al.*, 1991), así como el análisis de la variabilidad poblacional (revisión en Moritz, 1994; Garnery *et al.*, 1995). La disponibilidad de la secuencia completa del ADNmt de la abeja (Crozier y Crozier, 1993), permite determinar las fuentes de variabilidad que existen en el pequeño cromosoma circular mitocondrial.

Recibido: 12-3-98

Aceptado para su publicación: 1-10-98

El interés creciente en el ADNmt se justifica por el hallazgo de una alta variabilidad que subyace a una homogeneidad relativa en cuanto a la morfología externa. Así, por ejemplo, se admite que existe una sola subespecie morfológica en la Península Ibérica, *Apis mellifera iberica*, (Goetze, 1964; Ruttner, 1988), en la que es posible distinguir algunos subgrupos mediante el análisis morfométrico (Orantes y García, 1995). Sin embargo, esta subespecie tiene dos tipos de ADNmt, cada uno de los cuales presenta ligeras variantes o haplotipos. Un tipo se denomina M, es propio de la subespecie *A. mellifera mellifera* (mediterráneo occidental), y es más frecuente en las poblaciones de *Apis mellifera iberica* del norte de la Península Ibérica, haciéndose más raro hacia el sur. El otro linaje se denomina A por ser propio de las subespecies africanas, incluyendo a *A. mellifera intermissa*, y su frecuencia decrece según un gradiente sur – norte (Garnery *et al.*, 1995). Estos resultados corroboran la conclusión de Smith *et al.* (1991), sobre el origen híbrido de *Apis mellifera iberica* a partir de las subespecies *mellifera* e *intermissa*. Un tercer linaje C (de caucásico) se encuentra en Europa Oriental y caracteriza, entre otras, a la raza de *Apis mellifera ligustica*, es decir, las denominadas “abejas italianas”.

Los linajes M y A son polimorfos debido a la variabilidad de la secuencia del espaciador intergénico situado entre los genes del tARN_{leu} y la citocromo oxidasa II (COII) (Crozier *et al.*, 1989), mientras que el linaje C es invariable. Una fuente de variabilidad consiste en la presencia de una a tres copias de una secuencia denominada Q, que tiene de 192 a 197 pares de bases (bp). Otra secuencia denominada P0 tiene 67 bp y puede faltar enteramente o presentar una delección (secuencias P con 52 bp y P1 con 50 bp) (Cornuet *et al.*, 1991; De la Rúa *et al.*, 1998). Un tercer polimorfismo se refiere a la localización variable de las dianas para diversas endonucleasas de restricción (Garnery *et al.*, 1992, 1993, 1995). Sólo con la endonucleasa *Dra* I se han encontrado en la Península Ibérica hasta la fecha cuatro haplotipos del linaje M y ocho del linaje A (Garnery *et al.*, 1995).

Los diversos haplotipos del ADNmt hallados en la Península Ibérica se refieren a un número limitado de muestras, por lo que es necesario profundizar en el análisis de otras poblaciones. Este trabajo tiene como objetivo determinar la variabilidad genética de 36 colmenas fijas de la Región de Murcia y la posible introgresión de genes provenientes de abejas de regiones adyacentes o de colmenares trashumantes, dado que son numerosas las colmenas que pasan el invierno en Murcia para trasladarse a otras zonas de la península en las demás estaciones (A. Franco, com. pers.). Igualmente se pretende evaluar el efecto que supone la importación de reinas de otras poblaciones europeas de abejas con fines productivos, ya que también el ADNmt de *A. mellifera ligustica* carece de cualquiera de las secuencias P antes mencionadas (linaje C), mientras que *A. mellifera iberica* siempre tiene una de ellas, bien la de tipo P (linaje M), bien la de tipo P0 (linaje A) (Cornuet *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992, 1993, 1995).

MATERIAL Y METODOS

Muestras. Se colectaron de tres a cinco individuos de 36 colmenas durante julio de 1997, seleccionando las que permanecen en la región de Murcia durante todo el año y no han tenido importaciones recientes de reinas foráneas. Las obreras se preservan en etanol absoluto hasta su procesamiento en el laboratorio. Las localidades de muestreo así como el número de colmenas muestreadas en cada una de ellas se indican en la Figura 1.

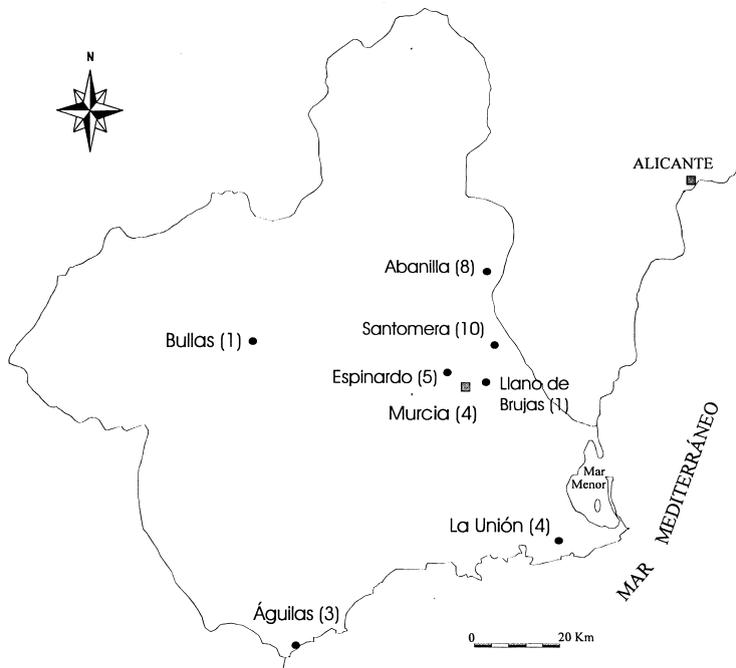


Fig. 1.—Localización y número de muestras de la abeja doméstica, *Apis mellifera iberica*, que se han empleado para analizar la variabilidad del ADNmt.

*Localities and number of hives of honeybees, *Apis mellifera iberica*, sampled for ADNmt variability.*

Extracción de ADN. Antes de proceder a la extracción, las abejas se lavan en un tampón conteniendo NaCl 128mM, CaCl₂ 1,5 mM, KCl 5 mM, pH 7,4, a temperatura ambiente durante una hora y se dejan secar toda la noche en una estufa a 80 °C (Garnery *et al.*, 1993). El ADN se extrae de la cabeza y el tórax siguiendo diferentes métodos: extracción típica con fenol-cloroformo, kit DNA Clean-up System de PROMEGA que se usó siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones, y extracción salina que brevemente consiste en triturar con arena la cabeza y el tórax e incubar este homogeneizado a 55 °C con tampón de extracción o de lisis (50 mM Tris HCl pH 8,0, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1% β-mercaptoetanol) y proteínaasa K (10 mg/ml). Pasada 1 h, se añade NaCl 5M y se centrifuga 30 min a 13500 rpm. El ADN se precipita con etanol absoluto y se resuspende en 100 µl de TE pH 7,6.

Amplificación por PCR y digestiones. Las secuencias de ADN se amplifican en un termociclador Perkin Elmer Cetus 480. Los cebadores utilizados son de la casa Pharmacia Biotech y se corresponden con secuencias conocidas del ADN mitocondrial de *Apis mellifera* y *Drosophila yakuba* (Garnery *et al.*, 1992). Se han usado las polimerasas de Promega o Biotaq. Una mezcla de reacción típica contiene el tampón apropiado para cada enzima (1X), 1,5 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de dNTPs, 0,15 µM de cada cebador, 1 µl de la dilución apropiada de ADN en dH₂O y 3 unidades de polimerasa para un volumen final de 100 µl. El programa para la amplificación es el siguiente: desnaturalización inicial de 5 min a 96 °C, 30 ciclos de 1 min 30

seg de anillado a 50 °C, extensión de 1 min 30 seg a 72 °C y desnaturalización a 96 °C durante 30 seg, y por último 1 ciclo de 1 min de anillado a 50 °C y 10 min de extensión a 72 °C. Los productos de la amplificación se visualizan tras la separación electroforética en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE, teñidos con bromuro de etidio. Estos geles se fotografían con película Polaroid bajo luz ultravioleta o usando el programa Eagle en un ordenador personal.

Las digestiones se preparan usando alicuotas de 10 µl del producto de PCR y cinco unidades de la enzima *Dra* I de Pharmacia Biotech o Gibco BRL. Estas digestiones se mantienen en un baño a 37 °C durante 4 a 12 h y los fragmentos resultantes se visualizan en geles de acrilamida al 8 %. Tras la tinción con bromuro de etidio se fotografían usando el programa Eagle o la película Polaroid.

Secuenciación automática y análisis de las secuencias. El kit usado es el de secuenciación cíclica con cebadores marcados con fluoresceína de Amersham Life Science, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cebadores fueron elegidos y diseñados de tal forma que se pudiera secuenciar la doble cadena de ADN de los diferentes insertos en ambos sentidos.

El análisis de las secuencias se ha realizado en un ordenador Macintosh usando los programas Megalign, DNASTar, y el paquete PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, versión 3.1; Swofford, 1993). También se ha usado el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versión 1.01; Kumar *et al.*, 1993) en un ordenador compatible.

RESULTADOS

La amplificación de la región intergénica del ADN mitocondrial mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, da lugar a tres fragmentos de distinta longitud, 815, 619 y 573 pares de bases, y que se corresponden con tres combinaciones diferentes de las secuencias P₀ y Q (Tabla 1). Tras la digestión del espaciador intergénico con la enzima *Dra* I se han encontrado tres haplotipos que difieren en el patrón de restricción de la región intergénica tARN_{leu} y COII (Tabla 2 y Fig. 3). Los haplotipos A1 y A2 pertenecen al linaje A de subespecies y razas africanas, al incluir una secuencia de tipo P₀. Son el P₀Q (A1) y el P₀QQ (A2) (Fig. 2). El tercer haplotipo carece de secuencia P y tiene una sola secuencia Q, por lo que corresponde al linaje C (*Apis mellifera ligustica*) procedente del este europeo e Italia.

TABLA 1

TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE LA REGION TRNALEU-COII AMPLIFICADOS POR PCR Y DE LOS FRAGMENTOS RESULTANTES DE SU DIGESTION CON LA ENZIMA *DRA* I, Y TIPOS DE SECUENCIAS Y HAPLOTIPOS CORRESPONDIENTES

Size of PCR amplified segments of the tRNA_{leu}-COII region of the honeybee and of digested fragments with Dra I restriction enzyme, with indication of the resulting sequences and haplotypes

Tamaño del fragmento de PCR (pares de bases)	Tipo de secuencia	Tamaño de los fragmentos de restricción (pares de bases)	Haplotipo
815	P ₀ QQ	47-109-659	A2
619	P ₀ Q	47-109-463	A1
563	Q	41-47-65-420	C1

TABLA 2

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS HAPLOTIPOS DE ADN MITOCONDRIAL EN LAS DISTINTAS LOCALIDADES MUESTREADAS EN LA REGION DE MURCIA, HALLADOS MEDIANTE EL TEST DE DRA I (GARNERY ET AL., 1993)

Geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the region of Murcia after the use of the Dra I test (Garnery et al., 1993)

Localidad	N.º de colmenas	Haplotipos		
		(A2)	(A1)	(C1)
Abanilla	8	7	1	0
Aguilas	3	3	0	0
Bullas	1	1	0	0
Espinardo	5	5	0	0
Llano de Brujas	1	1	0	0
Murcia	4	2	1	1
Santomera	10	8	2	0
La Unión	4	4	0	0
Total	36	31	4	1

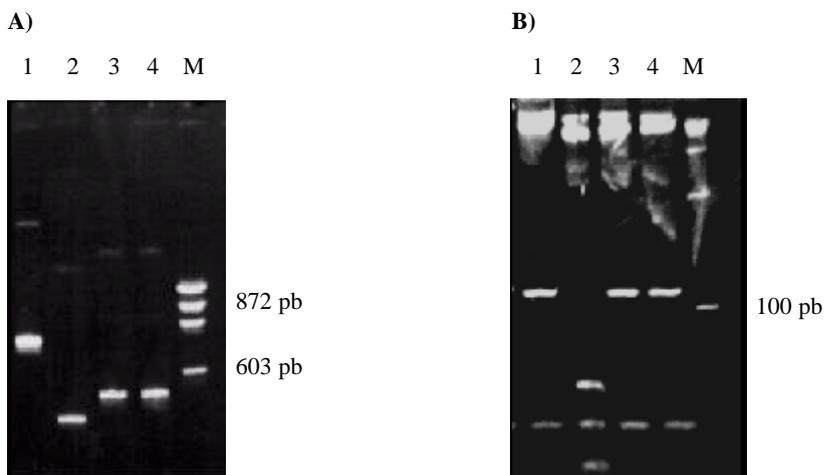


Fig. 3.—Patrones de restricción de la región intergénica tRNA_{Leu} - COII del ADNmt de cuatro muestras de abejas de Murcia. La foto A es de un gel de acrilamida al 5 % que muestra los fragmentos grandes tras la digestión con *Dra I* y la B muestra los fragmentos pequeños. La calle 1 corresponde al haplotipo A2, la calle 2 al haplotipo C1 y las calles 3 y 4 al haplotipo A1. La calle M en la foto A corresponde al marcador de tamaño ϕ X174/Hae III y en la foto B corresponde a la escalera de 100 pb.

Restriction patterns of the intergenic region tRNA_{Leu} - COII of mtDNA of four samples of honeybees from Murcia. Photo A corresponds to a 5% acrylamide gel showing the large fragments after digestion with Dra I, and photo B corresponds to the small fragments. Lane 1 corresponds to the haplotype A2, lane 2 to the haplotype C1 and lanes 3 and 4 to the haplotypes A1. Lane M in photo A corresponds to the size marker ϕ X174/Hae III and in photo B corresponds to the 100 bp ladder.

TABLA 3

VARIABILIDAD DE HAPLOTIPOS OBTENIDOS MEDIANTE EL TEST DE DRA I EN DISTINTAS PROVINCIAS DE ESPAÑA Y PORCENTAJE DEL HAPLOTIPO A2 EN CADA CASO

Haplotype variability resulting after applying the Dra I test in different provinces of Spain with particular reference to the A2 haplotype

Provincia	N.º colmenas	Diversidad de haplotipos	% de A2	Fuente
San Sebastián	35	11,42%	–	Garnery <i>et al.</i> (1995)
Huesca	36	8,33%	–	„
Segovia	26	26,92%	23%	„
Toledo	16	37,5%	50%	„
Sevilla	59	18,6%	66%	„
Murcia	36	5,71%	86,11%	presente trabajo
Islas Canarias	36	6,55%	–	De la Rúa <i>et al.</i> (1998)

La escasa variabilidad que presentan las poblaciones de abejas de Murcia con respecto al ADNmt (8,33 %), es inferior al de otras provincias (Tabla 3). Así, por ejemplo, en Sevilla se han encontrado tres haplotipos del linaje M y ocho haplotipos del linaje A (Garnery *et al.*, 1995). Estos resultados se explican en parte por la elección para este estudio de colmenares que no han experimentado trashumancia durante muchos años y en los que además no se han introducido reinas importadas de otras zonas geográficas. Sin embargo, los fenómenos de introgresión que pudieran haber ocurrido en colmenares cercanos a los muestreados debidos a la trashumancia y a la importación de reinas, hacían esperar el hallazgo de una variabilidad mayor.

Esta falta de variabilidad ya ha sido encontrada en algunas zonas de Marruecos y Túnez, en las que sólo se encuentran haplotipos del linaje africano a pesar de que se conocen importaciones reiteradas de reinas de otras razas. Garnery *et al.* (1995) han propuesto para este caso que las reinas importadas tienen una adaptación menor a las condiciones locales y por tanto una menor probabilidad de sobrevivir. Tal hipótesis podría ser también aplicable a los resultados hallados en Murcia, aunque hay constancia de la pervivencia de colmenas de abejas “amarillas” (probablemente *A. mellifera ligustica*) en Murcia durante varios años mediante cuidados diversos (A. Franco, com. pers.). Por el momento, no se dispone de datos para concluir si la baja frecuencia hallada para el haplotipo C1, propio de la subespecie italiana, se debe a las causas propuestas por Garnery *et al.* (1995), o a que la proporción de importaciones con respecto al elevado número de reinas nativas no es significativa. De aquí que sea necesario analizar una muestra más amplia y representativa de los colmenares de la región de Murcia y precisar el nivel de importaciones de reinas y la evolución de las colmenas derivadas de las mismas, para aclarar este interrogante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los siguientes apicultores la ayuda desinteresada en la recogida de muestras de sus colmenas: Rafael Rosa, Antonio Ramírez, Francisco Fernández, Antonio Calvo, Marcelo Morante, José Soler y especialmente a Antonio Franco por su ayuda en todo momento, aportando muestras y todo tipo de información. Este

trabajo ha sido realizado gracias a la financiación de la Consejería de Agricultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

SUMMARY

Variability of mitochondrial DNA in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) of the region of Murcia (Southeastern Spain)

The variability in the mitochondrial DNA of honeybees (*Apis mellifera iberica*) has been studied sampling thirty-six fixed hives from eight localities of Murcia (Southeastern Spain). The intergenic region between tRNA^{Leu} and cytochrome-oxidase II genes has been amplified by PCR and digested with the restriction enzyme *Dra* I. The amplified fragments have also been sequenced. A high percentage (97.22%) of the samples belongs to the African lineage of subspecies and races that predominates in Southeastern Spain. Digestion with *Dra* I shows that there are the haplotypes A2 (86.11%) and A1 (11.11%) of lineage A, whereas there is only one sample belonging to the lineage C of bees coming from Eastern Europe (which includes *Apis mellifera ligustica*). The hives are markedly homogeneous and do not show introgression from close hives in which importation of Italian queens is known; the variability was supposed to be higher because of annual changes of locality belonging to different Spanish regions. A lower adaptation of foreign queens to local conditions and a low rate of queen importation are discussed as possible explanations to these results.

KEY WORDS: *Apis mellifera*
mitochondrial DNA variability
haplotypes
Spain

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CORNUET J.M., 1983. Reproduction, génétique et sélection de l'abeille. Bulletin Technique Apicole, 10, 13-36.
- CORNUET J.M., FRESNAYE J., 1989. Étude biométrique de colonies d'abeilles d'Espagne et du Portugal. Apidologie, 20, 93-101.
- CORNUET J.M., GARNERY L., 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. Apidologie 22, 627-642.
- CORNUET J.M., GARNERY L., SOLIGNAC M., 1991. Putative function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. Genetics, 128, 393-403.
- CROZIER R.H., CROZIER Y.C., MACKINLAY A.G., 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. Molecular Biology and Evolution 6, 399-411.
- CROZIER R. H., CROZIER Y. C. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics, 133, 97-117.
- DE LA RUA P., SERRANO J., GALIAN J., 1998. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). Molecular Ecology, 7, 1543-1547.
- GARNERY L., CORNUET J.M., SOLIGNAC M., 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Molecular Ecology, 1, 145-154.
- GARNERY L., SOLIGNAC M., CELEBRANO G., CORNUET J.M., 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. Experientia, 49, 1016-1021.
- GARNERY L., MOSSHINE E.H., OLDROYD B.P., CORNUET J.M., 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. Molecular Ecology, 4, 465-471.
- GOETZE G. K.L., 1964. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Paul Parey, Hamburg.
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M., 1993. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park.
- MORITZ R.F.A., 1994. Molecular Biology of the honeybee. Advances in Insect Physiology 25, 105-149.
- ORANTES BERMEJO F.J., GARCIA FERNANDEZ P., 1995. Morphological variability of *Apis mellifera iberica* in different apiaries of Southern Spain. Journal of Apicultural Research 34, 23-30.
- RUTTNER F., 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer Verlag, Berlin.

- SMITH D.R., BROWN W.M., 1988. Polymorphism in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*, 44, 257-260.
- SMITH D.R., BROWN W.M., 1990. Restriction endonuclease cleavage site and length polymorphisms in mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica* (Hymenoptera, Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 83, 81-88.
- SMITH D.R., PALOPOLI M.F., TAYLOR B.R., GARNERY L., CORNUET J.M., SOLIGNAC M., BROWN W.M., 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 82, 96-100.
- SMITH, D.R., GLENN, T.C., 1995. Aozyme polymorphism in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 86, 12-16.
- SWOFFORD D.L., 1993. PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1, Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign.