

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *APIS MELLIFERA CARNICA* POLLMANN EN ESLOVENIA

S. SUŠNIK, P. KOZMUS, J. POKLUKAR, V. MEGLIČ

Instituto de Agricultura de Eslovenia, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, ESLOVENIA

Resumen

La abeja *carniola* (*Apis mellifera carnica*) y la línea filogenética C de las abejas, en su conjunto, aún están poco estudiadas desde el punto de vista genético, y la estructura genética poblacional de las abejas *carniola* de Eslovenia se ha evaluado por medio del análisis mitocondrial y nuclear del ADN. Las abejas se recogieron en 269 localidades de Eslovenia, y muestras de abejas de Grecia, Chequia, Croacia, Alemania y Francia se incorporaron al estudio, como grupos exteriores. Las muestras de Eslovenia se caracterizan por un bajo nivel de diferenciación genética en las regiones CO I y CO II del mtADN. Estas se fijaron para un haplotipo de mtADN nuevamente identificado, designado como C2C. Este mismo haplotipo fue encontrado en los grupos exteriores croata y polaco y también en algunas de las muestras provenientes de Alemania y Chequia. La escasa variabilidad de la población de abejas *carniola* de Eslovenia fue observada asimismo para todos los seis loci microsatélites estudiados, evidenciando una estructura muy homogénea de la población de abejas nativas de Eslovenia. Las poblaciones de Croacia y Chequia no presentaron diferencias significativas respecto a la de Eslovenia, tras el análisis de los microsatélites. Por otra parte, fue observada una gran diferenciación genética respecto a la población de *A. m. macedonica*, expresando asimismo un haplotipo específico mtADN, designado como C2D. El haplotipo ya descrito, C1, fue encontrado en las abejas de Austria y en unas cuantas muestras provenientes del grupo exterior checo. El único haplotipo con origen en la línea filogenética non C fue característico para la muestra de abejas de Francia (haplotipo A8). Por consiguiente, los resultados muestran que la abeja *carniola* de Eslovenia sigue siendo una de las fuentes más importantes para el fondo común de genes indígenas de *A. m. carnica*.

Palabras clave: biodiversidad / abeja *carniola* / análisis genéticos

Introducción

Apis mellifera es una especie altamente polítipica. Morfométricamente 24 especies reconocidas del Viejo Mundo se pueden agrupar en tres líneas evolutivas de descendencia (RUTTNER et al., 1978): las abejas melíferas europeas (M), africanas (A) y nortemediterráneas (C). El grupo de abejas del centro y el noreste mediterráneo consta de cinco subespecies estrechamente unidas desde el punto de vista geográfico (*A. m. sicula* Montagano, *A. m. ligustica* Spinola, *A. m. cecropia* Kieseewetter, *A. m. macedonica* Ruttner y *A. m. carnica* Pollmann; RUTTNER, 1988). La abeja *carniola*, *Apis mellifera carnica* Pollmann, es nativa de Eslovenia y algunas regiones de la ex Yugoslavia, el sur de Austria y partes de Hungría, Rumanía y Bulgaria (RUTTNER, 1988). *A. m. carnica* se fue extendiendo desde sus zonas nativas a los países del centro y el norte europeo, EE.UU. y Canadá. Las principales causas de este proceso fue el carácter dócil de *A. m. carnica* hacia los apicultores, su buen rendimiento en miel en primavera y también en verano, gracias al mielato de coníferas.

El análisis mtADN se ha convertido en una prueba ampliamente practicada para el estudio de la biogeografía de las subespecies de *A. mellifera*. Se identificaron tres líneas evolutivas de descendencia de las abejas melíferas tras el estudio de la región altamente variable CO I - CO II (CORNUET et al., 1991). La variabilidad en la región CO I - CO II resulta de la superposición de la variación de longitud (presencia/ausencia de la secuencia P, número de secuencias Q repetidas, posibles pequeñas borraduras, y también de la sustitución de los nucleótidos). Sólo tres haplotipos (C1, en *A.m. ligustica*, C2a, en *A.m. carnica*, Cb2, en *A.m. caucasica*) se identificaron en la línea filogenética C (FRANK et al., 2000) y no se comprobó ninguna variación dentro de la subespecie. Aparte de esto, también los loci microsatélites de alta variación se utilizan cada vez más en los estudios de genética poblacional, efectuados sobre las subespecies de *A. mellifera* (FRANK et al., 2000; DE LA RUA et al., 2001). La estructura general final de la especie, con sus tres principales ramas evolutivas, fue evidenciada ella también estudiando los microsatélites (ESTOUP et al., 1995; FRANK et al., 1998).

En conclusión, la finalidad del presente estudio ha sido caracterizar y analizar la variabilidad genética de *A.m. carnica* nativa de Eslovenia, y seguir las posibles vías genéticas hacia las subpoblaciones de abejas más o menos emparentadas de Europa.

Material y métodos

Se analizó un total de 323 obreras de abejas. Se recogieron muestras de 269 colonias de abejas de toda Eslovenia. Se incorporaron al análisis también diez muestras de abejas *carniola* de Croacia. Aparte de esto, nueve muestras de abejas de Chequia, 10 de Grecia (*A.m. macedonica*) y 25 de las líneas de abejas selectas del programa de cría de la isla de Unije de Croacia se utilizaron como grupos exteriores (Tabla I). El ADN total fue extraído de la cabeza, el tórax y las patas de las obreras, de conformidad con el protocolo establecido por BEYE y RAEDER (1993). El ADN aislado se utilizó para el ADN mitocondrial y el análisis de los microsatélites. La región mtADN, incluyendo el gen tARNLeu, la región intergénica CO I - CO II y la

extremidad 5' del gen CO II fueron amplificadas de conformidad con el protocolo descrito por GARNERY et al. (1993). Se efectuaron la restricción con Dral sobre 119 muestras y la secuencialización de 237 muestras. Todas las muestras de abejas se analizaron para seis loci microsátélites; Ap53 (FRANK et al., 1999), A7, A24, A88, A43 (ESTOUP et al., 1995) y A8 (FRANK et al., 1998). La estadística de la genética poblacional se calculó empleando el programa GENETIX (BELKHIR et al., 1998).

Resultados y discusiones

ADN mitocondrial

Salvo las muestras de la línea selecta procedente de Francia, todas las demás se caracterizaron por secuencias de mtADN de la línea filogenética C (Tabla I).

Tabla I

Detalles de las muestras, su tamaño y los haplotipos de mtADN CO I - CO II, encontrados en cada población

Subespecie	Origen de la muestra	N ₁	N ₂	Haplotipo CO I - CO II
<i>A. mellifera carnica</i>	Eslovenia	269	65 (6)	C2C
	Croacia	10	10 (2)	C2C
	Chequia	9	9 (4)	C1 y C2C
<i>A. mellifera macedonica</i>	Grecia	10	10 (3)	C2D
Líneas selectas				
Hohen Neuendorf	Alemania	5	5 (2)	C2C
Buckfast J	Alemania	5	5 (3)	C2D
Polonia	Polonia	5	5 (3)	C2C
K111	Austria	5	5 (2)	C1
Toulouse	Francia	5	5 (2)	A8
	Total	323		

N1 ... número de obreras incluidas en los análisis microsátélites.

N2 ... número de obreras incluidas en los análisis mtADN; el número de muestras secuenciales va entre paréntesis

Todos los haplotipos identificados en el presente estudio no se pueden definir en función de los ya publicados. Se detectaron dos nuevos haplotipos de la línea filogenética C, distintos de los ya descritos tan sólo por las distintas transiciones por los sitios polimórficos ya conocidos (Tabla II). Las poblaciones de *A.m. carnica* eran monomorfas, caracterizándose por el haplotipo nuevamente identificado, designado como C2C. Muestras de la subespecie *A.m. macedonica* también fueron identificadas como monomorfas para el nuevo haplotipo C2D.

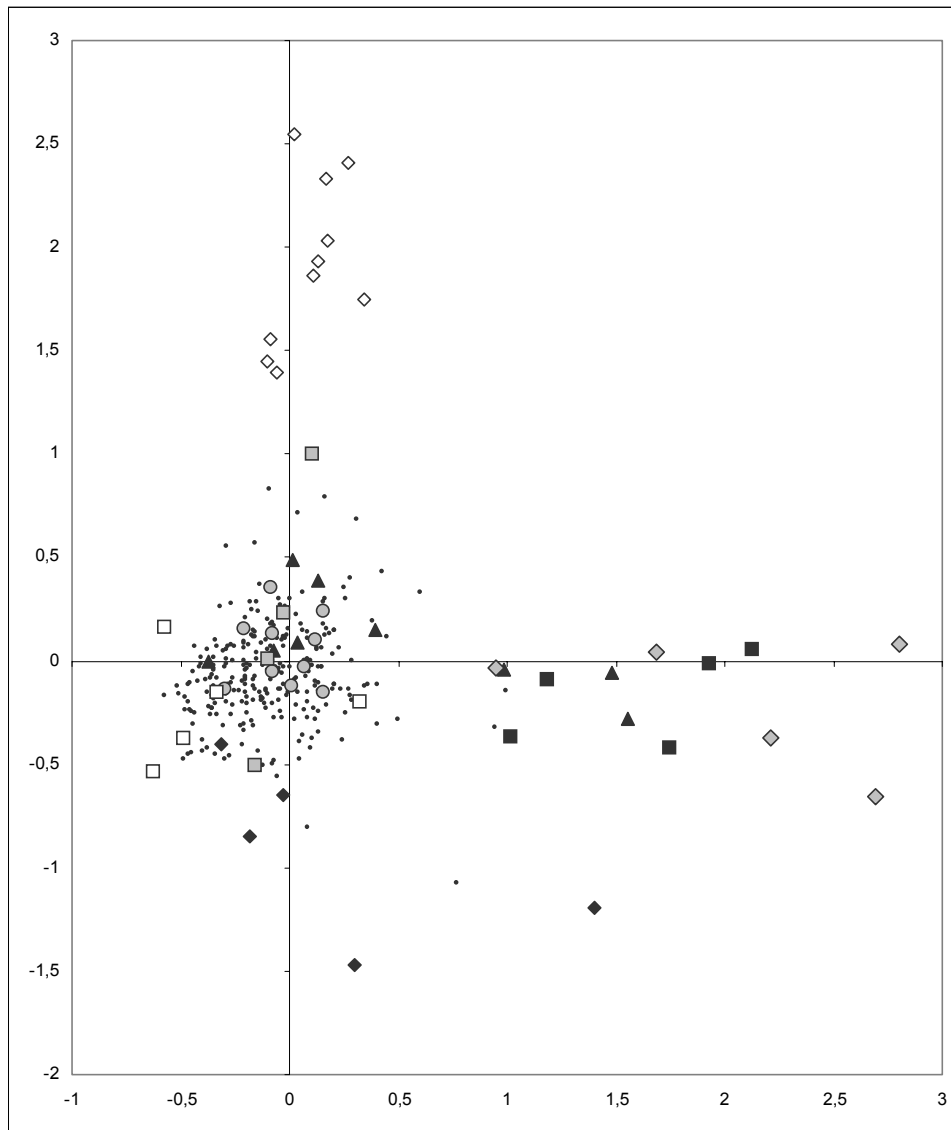
Tabla II

Los nucleótidos de las cinco posiciones variables ya descritas de la región mtADN CO I - CO II, que diferencian los haplotipos de la línea filogenética C de *A. mellifera*

	Designación del haplotipo	Sitio polimórfico				
		1	2	3	4	5
Haplotipos anteriormente descritos de la línea filogenética C (Franck et al., 2001; J-M. Cornuet, comunic. personal)	C1	C	C	C	T	T
	C2A	C	C	A	T	C
	C2B	C	C	C	A	C
	Designación propuesta del haplotipo					
<i>A.m. carnica</i> (Eslo, Cro), "Polonia", "Hohen Neuendorf"	C2C	C	C	C	T	T
<i>A.m. macedonica</i> ; "Buckfast J"	C2D	C	C	C	T	C
"K 111"	C1	C	C	C	T	T

Microsátélites

Todos los seis loci microsátélites fueron polimórficos en todas las muestras estudiadas. Para la detección de los distintos fondos genéticos básicos en todas las muestras analizadas, se efectuó el análisis de la correspondencia multidimensional. Según el análisis de Cluster, no se comprobó ninguna diferenciación entre las subpoblaciones de Eslovenia. Es evidente la formación de un cluster de todas las muestras de *A.m. carnica* de Eslovenia y Croacia (Figura 1). Las muestras de *A.m. macedonica* formaron un cluster completamente separado y muy homogéneo. Las abejas de las líneas selectas evidenciaron una relación distinta respecto a las poblaciones nativas de abejas carniola. Su estructura genética refleja la mezcla dirigida de abejas carniola y de otro origen del pasado.



- A.m. carnica* (Eslovenia)
- A.m. carnica* (Croacia)
- A.m. carnica* (Chequia)
- A.m. macedonica*
- Línea selecta "Hohen Neuendorf"
- Línea selecta "Buckfast J"
- Línea selecta "Polonia"
- Línea selecta "K 111"
- Línea selecta "Toulouse"

Figura 1 - Diagrama de la distribución de todas las muestras de *A.m. mellifera* analizadas según el análisis de la correspondencia.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados del análisis molecular, la población de abejas melíferas de Eslovenia y Croacia parece ser muy homogénea, casi sin diferenciar. Por consiguiente, a las poblaciones de *A.m. carnica* de Eslovenia y Croacia se les puede considerar como nativamente marcadas, sin introducción de otras subespecies o líneas filogenéticas.

BIBLIOGRAFIA

- Belkhir K., Borsa P. (1998), GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>, Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II, Montpellier (France)
- Beye M., Raeder U. (1993), Rapid DNA preparation from bees and %GC fractionation, *BioTechniques* 14, 372-374
- Cornuet J.-M., Garnery L., Solignac M. (1991), Putative origin and function of the intergenic region COI and COII of *Apis mellifera*: mitochondrial DNA, *Genetics*, 1128, 393-403
- De la Rúa P., Galian J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001a), Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands, *Mol. Ecol.* 10, 1733-1742
- Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. (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., Coussy H., Le Conte Y., Solignac M., Garnery L., Cornuet J.-M. (1999), Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee, *Insect Mol. Biol.* 8, 419-421
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.-M. (2000), Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), *Mol. Ecol.* 9, 907-921
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B. P., Hepburn H. R., Solignac M., Cornuet J.-M. (2001), Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity* 86, 420-430
- Franck P., Garnery L., Solignac M., 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
- 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
- Ruttner F. (1988), Biogeography and taxonomy of honeybees, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 284 pp
- Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. (1978), Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L., *Apidologie* 9, 363-381