



16 MAR. 1999

Variabilidad genética, análisis molecular y
filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de
Apis mellifera (Linneo 1758)
(Hymenoptera: Apidae)

UNIVERSIDAD DE MURCIA



1562912

Pilar de la Rúa Tarín



Universidad de Murcia

1999





Universidad de Murcia

Variabilidad genética, análisis molecular y
filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de

Apis mellifera (Linneo 1758)

(Hymenoptera: Apidae)

Memoria presentada por Pilar de la Rúa Tarín.
para optar al grado de Doctora en Biología

Trabajo dirigido por los profesores
D. José Serrano Marino, Catedrático y
D. José Galián Albaladejo, Profesor Titular
del Departamento de Biología Animal y de la Universidad de
Murcia.

Murcia, Marzo de 1999.





D. JUAN JOSÉ PRESA ASENSIO, Director del
Departamento de Biología Animal.

CERTIFICA:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado "**Variabilidad genética, análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de *Apis mellifera* (Linneo 1758) (Hymenoptera: Apidae)**", ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección de los Drs. D. José Serrano Marino y D. José Galián Albaladejo y de acuerdo con la normativa vigente.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado, en Murcia, a 15 de marzo de mil novecientos noventa y nueve.

Fdo.: D. Juan José Presa Asensio





D. JOSÉ SERRANO MARINO, Catedrático de Biología
Animal de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado "**Variabilidad genética, análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de *Apis mellifera* (Linneo 1758) (Hymenoptera: Apidae)**", ha sido realizado bajo mi dirección por D^a. Pilar de la Rúa Tarín.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Murcia, a 15 de marzo de 1999.

Fdo.: D. José Serrano Marino.





D. JOSÉ GALIÁN ALBALADEJO, Profesor Titular de
Biología Animal de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado "**Variabilidad genética, análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de *Apis mellifera* (Linneo 1758) (Hymenoptera: Apidae)**", ha sido realizado bajo mi dirección por D^a. Pilar de la Rúa Tarín.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Murcia, a 15 de marzo de 1999.

Fdo.: D. José Galián Albaladejo



Agradecimientos

Son muy numerosas las personas a las que hay algo que agradecer cuando se realiza un trabajo como este a lo largo de tantos años. Quisiera no olvidarme de ninguna, así que, de antemano, aquí van mis gracias a todas las personas relacionadas con mi vida tanto al nivel personal como laboral. A todos muchísimas gracias.

Quisiera agradecer al Profesor Dr. J. Serrano todo su empeño, apoyo y ayuda en todo momento y sobretodo su amistad.

Al Dr. J. Galián parte fundamental de todo esto, le agradezco su esperanza en que algún día lo conseguiría. Solo él sabe de todas las desventuras por las que se pasa cuando se está fuera de casa. Gracias por tu hombro.

Al Profesor Dr. R. F. A. Moritz le agradezco su desinteresada ayuda en la realización de la última parte de esta tesis.

A todos los apicultores que han aportado su granito de arena en forma de abejas para realizar este trabajo, especialmente a Antonio Franco, Francisco González y a Elias González. Gracias por compartir conmigo algo más que la Apicultura.

Al Profesor G. M. Hewitt y a su grupo ("Population Biology Sector") de la Universidad de East Anglia, les quiero agradecer su ayuda y agradable acogida durante el verano de 1996.

A mis amigos y compañeros de Murcia ("la familia", Fermín, Finuqui, Fernando...), de Berlín ("Stullengruppe") y de Halle (Petra, Sussane, Ingwild,

Martin, Andreas, Peter...) les quiero agradecer su ayuda, amistad y apoyo durante estos dos últimos años.

Sin duda quién más me ha soportado durante estos meses finales y a quién van dirigidas unas gracias muy especiales es a mi amiga y compañera Ute (Dr. U) porque ella también sabe de alegrías y penas en esta vida tan rara que llevamos. Die zweifellos größte Unterstützung habe mich in den letzten Monaten von meiner Freundin und Mitstreiterin Ute (Dr. U) erhalten. Ihr möchte ich deshalb meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Wir haben so viel Freud und Leid dieses seltsamen Forscherdaseins geteilt. Vielen Dank!. Und für Uli auch!.

A la familia Acosta Martínez les agradezco infinitamente su algo más que apoyo, su cariño y amistad a lo largo de todos estos años.

A mi familia, padres y hermanos, les debo todo este esfuerzo, por saber apoyarme desde la distancia y por soportar mis ausencias y mis continuas idas y venidas.

A Pepe, creo que no tengo palabras gracias por todo lo que me das.

Índice general

Introducción.	1
1. Posición taxonómica y filogenia de <i>Apis mellifera</i> .	1
2. Análisis del ADN mitocondrial y filogenia del género <i>Apis</i> .	5
2. 1. La región intergénica ARNt ^{leu} -COII del ADN mitocondrial.	9
3. Filogenia de <i>A. mellifera</i> basada en marcadores nucleares.	12
3. 1. Microsatélites.	13
4. Organismo objeto de estudio: <i>Apis mellifera iberica</i> (Goetze 1964).	17
5. Objetivos de esta tesis.	21
6. Objetivos.	23
Material y Métodos.	25
1. Material.	25
2. Extracción de ADN.	26
3. Análisis del ADN mitocondrial (ADNmt).	27
3. 1. Amplificación del ADN mitocondrial.	27
3. 2. Análisis de restricción.	28
3. 3. Secuenciación automática y análisis de las secuencias del ADN mitocondrial.	29
3. 4. Análisis filogenéticos.	29
4. Análisis de los marcadores microsatélites.	31
4. 1. Amplificación de los microsatélites.	31
4. 2. Análisis de los microsatélites.	33

4. 2. 1. Heterocigosidad observada y esperada (diversidad de genes). Número medio de alelos observado.	33
4. 2. 2. Equilibrio Hardy-Weinberg.	34
4. 2. 3. Diferenciación poblacional.	35
4. 2. 4. Desequilibrio genético.	36
4. 2. 5. Estadísticos F de Wright.	36
4. 2. 6. Concordancia con los modelos de mutación (I.A.M.y S.M.M.)	37
4. 3. Análisis filogenéticos.	38
Resultados.	39
1. Análisis del ADNmt.	39
1. 1. Las abejas de Murcia.	39
1. 2. Las abejas de las Islas Canarias.	43
1. 3. Las abejas de Tetuán.	50
1. 4. Análisis filogenético de las poblaciones de <i>Apis mellifera</i> de las tres regiones basado en el ADNmt.	51
2. Análisis de los microsatélites.	59
2. 1. Las abejas de Murcia.	59
2. 2. Las abejas de las Islas Canarias.	65
2. 3. Las abejas de Tetuán.	85
2. 4. Análisis filogenético de las poblaciones de <i>Apis mellifera</i> de las tres regiones basado en los loci de microsatélites.	87
Discusión.	97
1. Análisis del ADNmt.	97

2. Análisis de los microsátélites.	106
Resumen y Conclusiones.	117
Summary and Conclusions.	123
Bibliografía.	129

Introducción

1. Posición taxonómica y filogenia de *Apis mellifera*.

Las abejas del género *Apis* están incluidas en el orden Hymenoptera, familia Apidae, tribu Apini. La nomenclatura y la sistemática de este género son complejas y han sido objetos de revisión en numerosas ocasiones. Maa (1953) dividió la tribu Apini en tres géneros: *Micrapis*, con dos especies, *Megapis*, con cuatro especies y *Apis*, con dos subgéneros, 11 especies y numerosas subespecies. Trabajos posteriores ignoraron esta clasificación, que actualmente está siendo revisada.

La abeja doméstica o abeja de la miel fue descrita por Linneo en 1758. Otras especies del género *Apis* descritas posteriormente son *Apis florea* (Fabricius 1787) o abeja enana, *Apis dorsata* (Fabricius 1793) o abeja gigante, *Apis cerana* (Fabricius 1796) o abeja oriental con colmenas en cavidades, *Apis adreniformis* (Smith 1858) y *Apis koschevnikovi* (Buttd-Reepen 1906). La diversidad dentro del género *Apis* se refleja en la morfología, el comportamiento y la distribución geográfica de cada especie (revisión en Ruttner, 1988).

Las especies del género *Apis* han sido estudiadas usando métodos morfológicos (Smith 1991), biogeográficos (Smith 1991) y moleculares (Smith 1991, Garnery *et al.* 1991, Willis *et al.* 1992). La filogenia más aceptada sitúa a *A. dorsata* en la posición más ancestral, dando lugar a dos clados, uno formado por *A. mellifera* y *A. cerana* y otro formado por *A. florea*, *A. adreniformis* y *A. koschevnikovi* (fig. 1).

Tradicionalmente, la taxonomía intraespecífica de *A. mellifera* se ha basado en la morfología. Ruttner (1988), basándose en el análisis morfométrico de 36 caracteres, discriminó 24 grupos taxonómicos o subespecies distintas de *A. mellifera*, restringidas a regiones geográficas (o ecológicas) distintas. Estas razas

geográficas se encuentran en lugares muy diversos, lo que da una idea de la notable capacidad de adaptación de la abeja *A. mellifera* a distintos ambientes y climas.

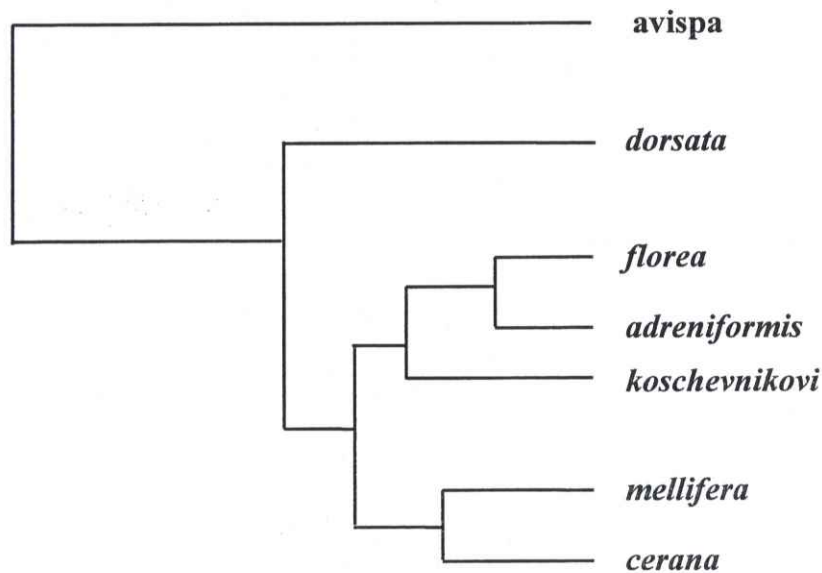


Figura 1. Filogenia de las especies del género *Apis* obtenida usando el método de máxima parsimonia y datos moleculares (Phylip 3.4; Felsenstein 1990). Tomado de Willis et al. (1992).

Basándose en evidencias filogeográficas y morfométricas, Ruttner *et al.* (1978) propusieron tres grupos principales de subespecies:

1. El grupo o linaje A, el cual incluye a las subespecies de Africa, *A. m. lamarckii*, *A. m. yemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor* y *A. m. capensis*.

2. El grupo o linaje M, en el que están incluidas las subespecies de Europa del norte (*A. m. mellifera*), de España y Portugal (*A. m. iberica*) y del norte de África (*A. m. intermissa*, *A. m. sabariensis* y *A. m. major*).
3. El grupo C en el que se incluyen las subespecies del sudeste europeo (*A. m. ligustica*, *A. m. sicula*, *A. m. carnica*, *A. m. macedonica* y *A. m. cecropia*), y del Oriente Próximo (*A. m. anatoliaca*, *A. m. adami*, *A. m. cypria*, *A. m. syriaca*, *A. m. meda*, *A. m. caucasia* y *A. m. armeniaca*). Posteriormente, Ruttner (1988, 1992) dividió esta última rama en dos grupos, el grupo C de razas del sudeste europeo y el grupo O de las de Oriente Próximo.

Según Ruttner *et al.* (1978) estas numerosas subespecies aparecieron como resultado de procesos de aislamiento de las poblaciones de abejas en refugios geográficos durante las últimas glaciaciones del Pleistoceno. Los mecanismos de especiación (adaptativos y estocásticos) causaron la acumulación de diferencias genéticas en estas poblaciones aisladas, dando lugar a la aparición de las subespecies.

Ruttner *et al.* (1978) sitúan el origen de estas subespecies en el sudeste del continente africano. Basándose en datos biogeográficos, postulan que el linaje A se dispersó hacia el sur y el centro de África, el linaje M se extendió hacia Europa a través del norte de África y de la Península Ibérica y que dos ramas evolutivas ocuparon el este de Europa y el Próximo Oriente (linajes C y O). De entre las subespecies europeas, *A. m. mellifera* se extendió desde la Península Ibérica, *A. m. ligustica* desde los Apeninos y *A. m. carnica* desde el sur de los Balcanes (Ruttner 1988) (fig. 2).

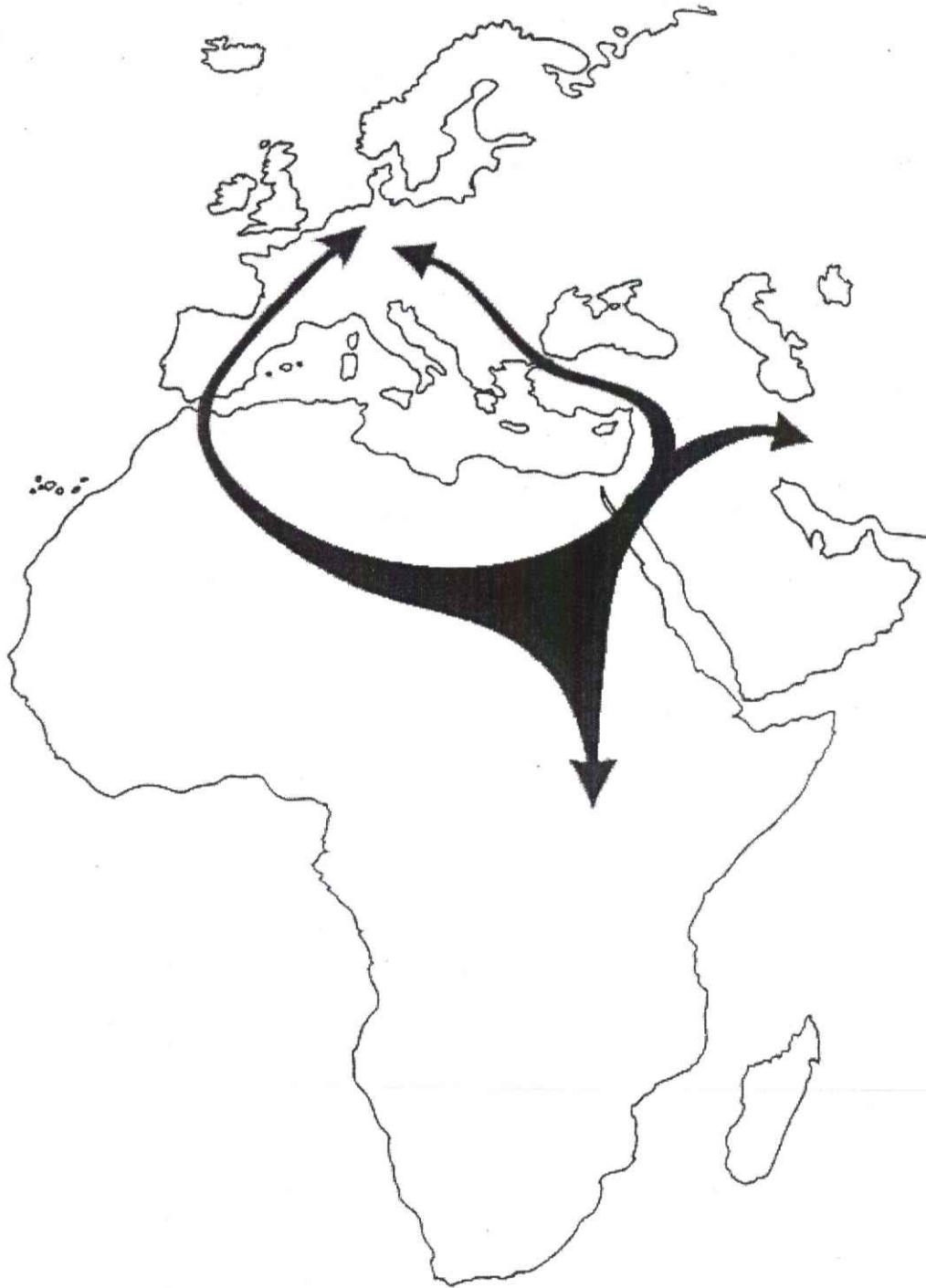


Figura 2. Mapa con los tres linajes principales de evolución morfogenética de las razas de *A. mellifera* (basado en Ruttner *et al.* 1978).

2. Análisis del ADN mitocondrial y filogenia del género *Apis*.

El ADN mitocondrial (en adelante ADNmt) se ha convertido en un importante instrumento para los estudios taxonómicos y filogenéticos debido principalmente a que es una molécula pequeña circular (Crozier *et al.* 1989), que no varía por recombinación y que permite reconstruir relaciones antecesor-descendente 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 aquí que toda la descendencia de una misma reina comparta su ADNmt, el cual pasa sin alteración a obreras y a zánganos, salvo que haya mutaciones puntuales.

Una consecuencia de lo anterior es que con solo estudiar el ADNmt de una obrera se puede, en principio, caracterizar a la colmena entera (Cornuet y Garnery 1991). De aquí que el ADNmt pueda ser usado como un marcador molecular al nivel de colmena, siendo extremadamente útil en estudios sobre las especies y subespecies o razas geográficas de la abeja.

El cromosoma mitocondrial contiene relativamente pocos genes (13 genes codificantes de proteínas, dos genes ribosomales, 22 ARN transferentes y una región rica en A+T) y es conservativo en cuanto a la posición de los mismos. Ambas características son estables en términos evolutivos, ya que son compartidas por los organismos eucarióticos más diversos. Sin embargo, existen pequeñas diferencias de unos a otros, como las detectadas entre *A. mellifera* y *Drosophila melanogaster* (Crozier y Crozier 1993). La secuencia completa de la molécula de ADNmt de *A. mellifera* ha sido determinada por Crozier y Crozier (1993). La longitud total varía entre 16000 y 17000 nucleótidos debido al diferente tamaño de algunas secuencias no codificantes (fig. 3).

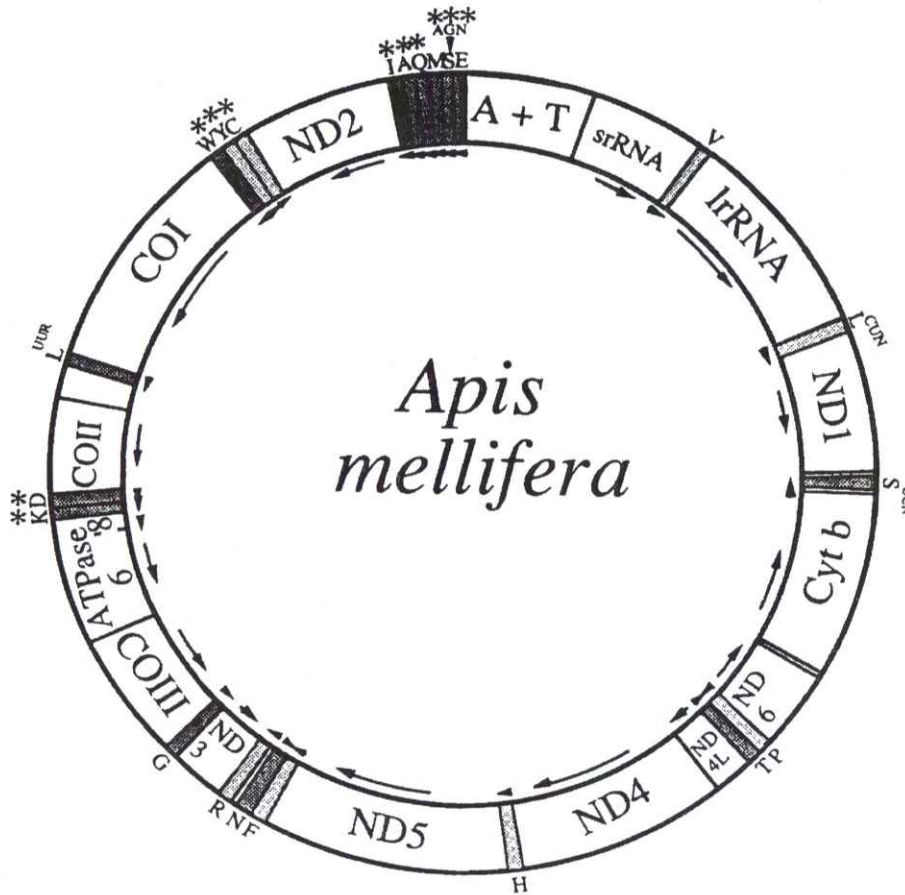


Figura 3. Mapa del ADNmt de *A. m. ligustica* que muestra su composición y distribución genética (tomado de Crozier y Crozier 1993).

Cada variante del ADNmt debida al polimorfismo que presentan estas regiones se denomina haplotipo. La variabilidad de las regiones no codificantes es tan notable, que puede ser usada para analizar el grado de parentesco de especies, subespecies e incluso poblaciones del género *Apis*. Se supone, como hipótesis inicial, que a un grado mayor de divergencia genética entre poblaciones, le corresponde un número mayor de diferencias en la secuencia de bases del cromosoma mitocondrial. De ahí que esta variabilidad esté siendo ampliamente usada en el análisis filogeográfico de las especies del género *Apis* (Garnery *et al.* 1991, Smith 1991, Willis *et al.* 1992) y de las subespecies de *A.*

mellifera (Moritz *et al.* 1986, Smith y Brown 1988, Smith *et al.* 1989, Smith *et al.* 1991, Meusel y Moritz 1992, Garnery *et al.* 1992).

Los primeros estudios moleculares basados en la secuencia del gen de las dos subunidades de la enzima citocromo-oxidasa (COI y COII; Cornuet y Garnery 1991, Garnery *et al.* 1992, 1993), así como los basados en el análisis de los mapas de restricción de la molécula completa de ADNmt (Smith *et al.* 1989, 1991), confirmaron claramente la existencia de tres linajes principales de ADNmt, que en parte concuerdan con los grupos de subespecies caracterizados morfológicamente por Ruttner (1978). Una de las diferencias que resultan del estudio del ADNmt se refiere a la composición de los linajes evolutivos: las subespecies del norte de África (*A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis* y *A. m. major*) están más relacionadas con las del sur y, por tanto, están incluidas en el linaje A de subespecies africanas. La existencia de la rama O de subespecies del Oriente Próximo no fue confirmada con la secuencia de estos genes, pero posteriormente, Arias y Sheppard (1996), usando la secuencia de los genes de la subunidad II de la NADH deshidrogenasa y del ARNt^{leu}, y con un muestreo más amplio de subespecies, confirmaron su existencia aunque con una composición de subespecies diferente.

La hipótesis sobre el origen y la evolución de las poblaciones de *A. mellifera* basada en el ADNmt, sitúa el centro de dispersión de las subespecies de *A. mellifera* en el Oriente Próximo (Garnery *et al.* 1992; fig. 4). Las subespecies que forman el linaje de evolución M colonizaron Europa pero no a través de Africa, sino de Europa oriental. Las poblaciones que forman los linajes A y C divergieron al llegar al Mediterráneo, yendo hacia el sur las que colonizaron Africa y hacia el norte las que ocuparon el Mediterráneo oriental y Europa del Este.

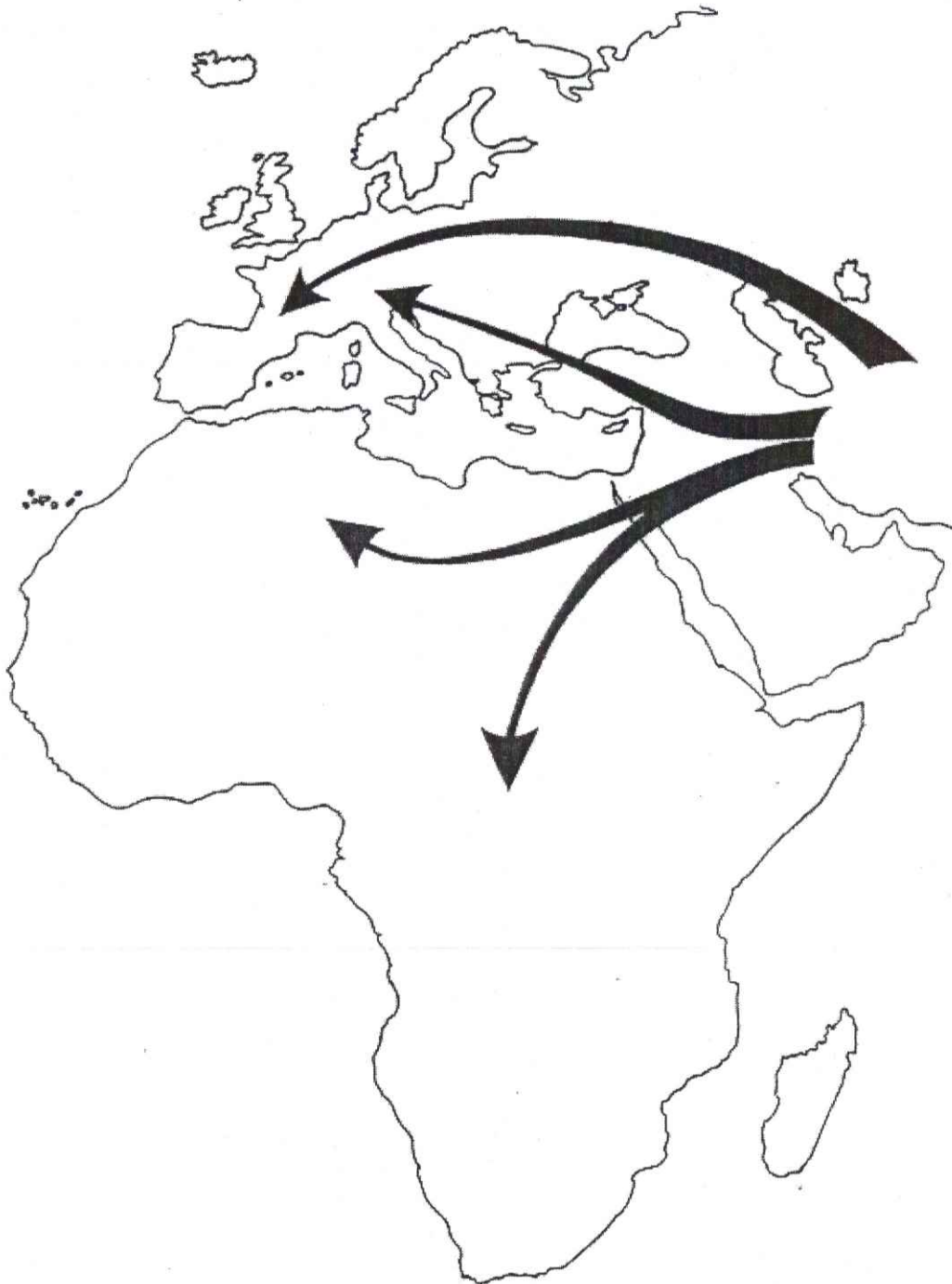


Figura 4. Hipótesis sobre el origen y evolución de las poblaciones actuales de *A. mellifera* basado en las relaciones entre la localización geográfica de las subespecies y su posición en árboles filogenéticos (según Garnery *et al.* 1992).

Cada uno de estos linajes tiene polimorfismos propios relativos a la longitud y a secuencias intergénicas únicas. Así, el linaje de subespecies africanas (A) se caracteriza por tener haplotipos que comparten la secuencia P_0 (ver más adelante), mientras que el linaje M de abejas de Europa occidental se caracteriza porque los haplotipos tienen la secuencia P, y finalmente, el linaje de abejas de Europa oriental (C) presenta un único haplotipo que carece de cualquiera de dichas secuencias, P_0 o P.

2.1. La región intergénica ARNt^{leu}-COII del ADN mitocondrial.

De entre las seis regiones del ADNmt de *A. mellifera* que se han encontrado con longitud variable (Smith y Brown 1990), la más ampliamente estudiada es la situada entre los genes que codifican la subunidad dos de la citocromo oxidasa (COII) y el ARN transferente del aminoácido leucina (ARNt^{leu}).

En esta región se han descrito dos tipos de secuencias (Cornuet *et al.* 1991): la secuencia P y la secuencia Q. La secuencia P está compuesta sólo de adenina y timina, y puede faltar enteramente (linaje C de Europa del Este). Tiene una longitud de 54 pares de bases (Cornuet y Garnery 1991) en unos casos, mientras que en otros se halla bajo la forma P_0 con 67 pares de bases. La secuencia Q está presente en todas las subespecies y tiene una longitud de 194-196 pares de bases, con un 7'3% de guanina y citosina en su composición. Esta secuencia está dividida, a su vez, en tres subunidades según su similitud con regiones adyacentes del ADNmt: Q_1 es similar al extremo 3' del gen COI, Q_2 es similar al gen del ARNt^{leu} y Q_3 es muy parecida a la secuencia P (Cornuet *et al.* 1991). La función de esta región intergénica está probablemente relacionada con un posible origen de replicación del ADN.

La variación en el tamaño observada en esta región del ADNmt resulta de la presencia o ausencia de las secuencias P o P_0 y de la presencia de un número



variable de repeticiones en tándem de la secuencia Q (Garnery *et al.* 1992). Al menos nueve variaciones de longitud han sido observadas en esta región no codificante, que pueden ser explicadas por la combinación de las secuencias antes mencionadas: PQ, PQQ, PQQQ, PQQQQ, P₀Q, P₀QQ, P₀QQQ, P₀QQQQ y Q. Como se indicó anteriormente, los cuatro primeros haplotipos se encuentran sólo en las subespecies europeas (linaje M), los cuatros segundos en las africanas (linaje A) y el último sólo en las de Europa Oriental (linaje C).

El alto contenido de A+T de esta región intergénica permite el análisis de la secuencia mediante restricción con la enzima *DraI* (Garnery *et al.* 1993). La localización de la secuencia diana de esta enzima (TTT↓AAA) varía debido a la existencia de mutaciones, lo que hace que al someterla al tratamiento con *DraI*, se halle un polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción. Este polimorfismo, fácilmente detectable si el tratamiento con *DraI* se aplica a la secuencia intergénica amplificada mediante PCR, se añade a los descritos anteriormente, resultando así una cantidad notable de caracteres variables sobre los que realizar análisis filogenéticos.

Hasta ahora se han encontrado al menos 30 haplotipos distintos, algunos de ellos restringidos a diferentes poblaciones e incluso razas de abeja (Garnery *et al.* 1993, Moritz *et al.* 1994, Franck *et al.* 1998a). Se conoce su distribución en Europa, en algunas islas del Mediterráneo y en el norte y el sur de Africa (fig. 5).

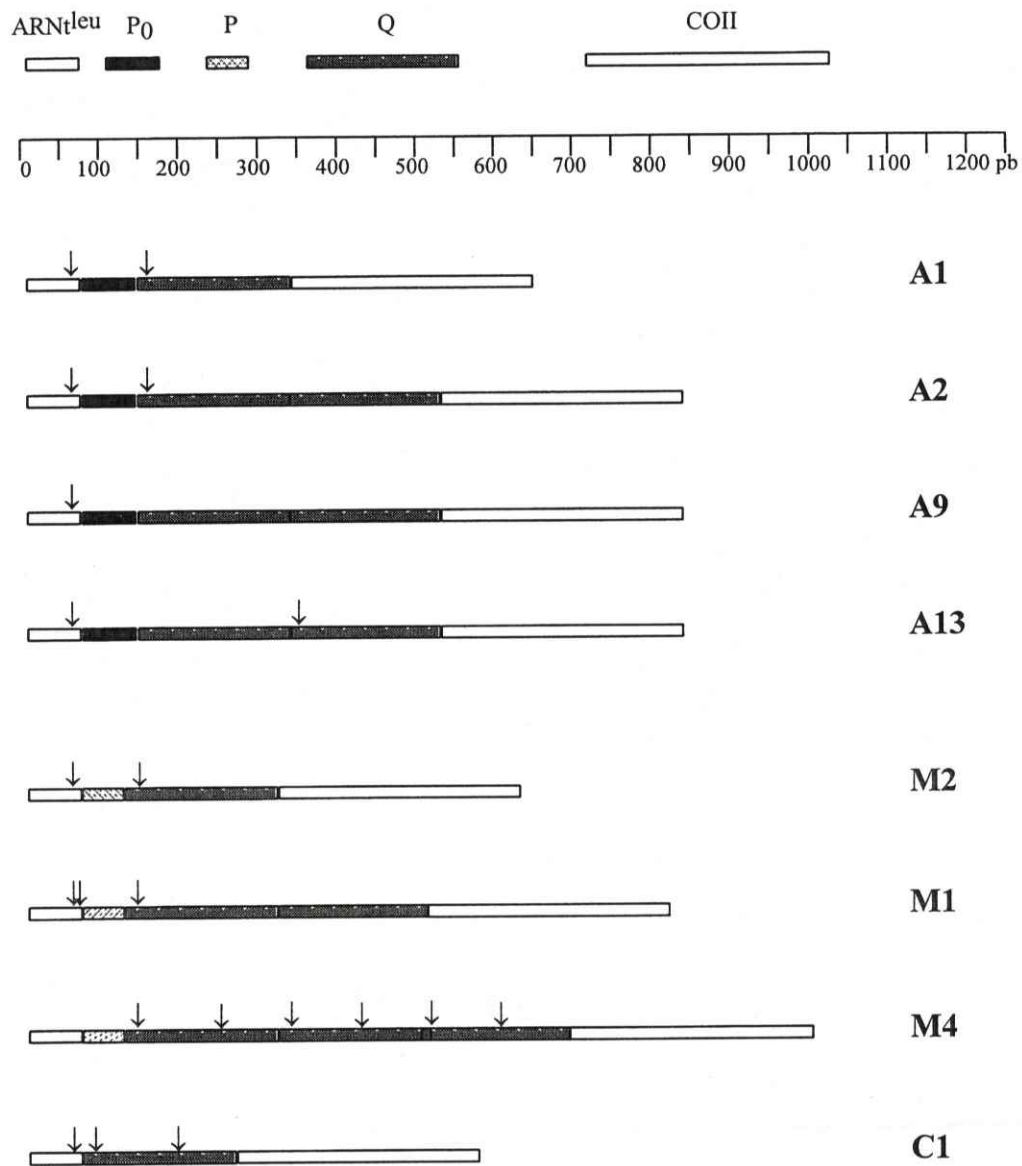


Figura 5. Representación de diferentes haplotipos del ADNmt según la composición de la región intergénica *ARNt^{leu}*-*COII* y su patrón de restricción con la enzima *DraI*. Los puntos de restricción están señalados con flechas (según Garnery *et al.* 1995).

3. Filogenia de *A. mellifera* basada en marcadores nucleares: los microsátélites.

La discriminación electroforética de aloenzimas es una fuente habitual de marcadores moleculares para analizar las relaciones filogenéticas entre organismos, desde el nivel poblacional hasta el de las categorías taxonómicas superiores. En el caso de la abeja melífera, el análisis de la distribución geográfica de las frecuencias alélicas de diferentes marcadores aloenzimáticos (Badino *et al.* 1984, Cornuet 1982, 1983), confirmó la hipótesis sobre la evolución de las subespecies de *A. mellifera* basada en caracteres morfológicos. Estos marcadores presentan un escaso nivel de polimorfismo en las especies del género *Apis*, incluyendo a las subespecies de *A. mellifera*, lo cual es considerado un resultado del sistema genético haplodiploide (machos haploides y hembras diploides) predominante en el orden Hymenoptera (Pamilo *et al.* 1978, Pamilo y Crozier 1981).

Otros marcadores nucleares usados en los estudios genéticos de las poblaciones de *A. mellifera*, han sido los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (siglas en inglés: RFLPs), detectados con la enzima *AluI* (Tares *et al.* 1993). La secuencia repetitiva obtenida con esta enzima es polimórfica en las subespecies de *A. mellifera* y se puede usar como sonda en la técnica de la huella genética ("fingerprinting"). La filogenia basada en este RFLP es compatible con la obtenida previamente con los datos del ADNmt. Tras la digestión del ADN con las enzimas *MspI* y *DdeI*, se ha detectado otro locus nuclear altamente polimórfico con la sonda genómica pB178 (MacMichael y Hall 1996). El análisis de las distancias genéticas obtenidas a partir de la frecuencia y distribución de 85 alelos en diferentes subespecies de abejas, concuerda con los estudios filogeográficos previos basados en marcadores mitocondriales y nucleares y apoyan en buena parte la historia

evolutiva de la abeja melífera postulada por Ruttner (1978) a partir de datos morfológicos.

Los marcadores genéticos nucleares generados con la técnica denominada RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), distinguen las razas europeas de abejas de las africanas, según han demostrado Suazo *et al.* (1998) en su estudio sobre la expansión de abejas de razas africanas en Sudamérica. Estos marcadores han sido usados más frecuentemente en estudios sobre mapeo genético de loci que determinan caracteres cuantitativos o QTL (Hunt y Page 1994) y para determinar la estructura de las colonias de abejas (Fondrk *et al.* 1993). Este último aspecto también ha sido estudiado con los marcadores RFLPs ("fingerprinting"), usando como sonda el fago M13 (Blanchetot 1991, Corley *et al.* 1993), o distintos oligonucleótidos (Moritz *et al.* 1991).

3.1. Microsatélites.

Los microsatélites son otro tipo de marcadores nucleares que están siendo ampliamente usados en especies con poca variabilidad aloenzimática (Hughes y Queller 1993). Estos marcadores son fragmentos de ADN compuestos de pequeñas secuencias de 1 a 5 pares de bases repetidas en tándem (fig. 6) y que pueden aparecer en cualquier parte del genoma, especialmente en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas (Wong *et al.* 1990).

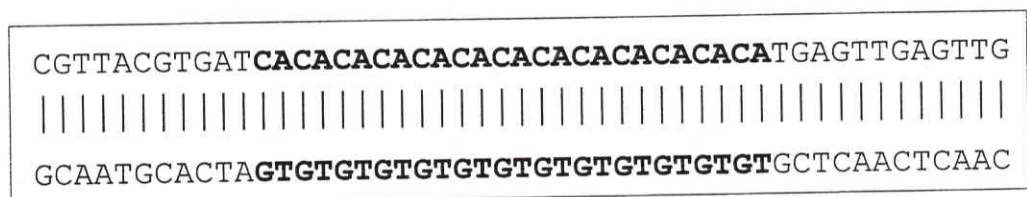


Figura 6. Estructura de un locus de microsatélite mostrando una secuencia de repetición (CA)₂₆ resaltada en negrilla y las secuencias adyacentes.

Los microsátelites se pueden clasificar en tres categorías (Weber 1990):

1. Perfectos: si no hay interrupción en la sucesión de unidades de secuencias repetidas en tándem.
2. Imperfectos: con una o más interrupciones entre la sucesión de unidades repetidas.
3. Compuestos: formados por una sucesión perfecta o imperfecta seguida de una sucesión de repeticiones de una secuencia sencilla.

Gracias a su alta tasa de mutación (entre 10^{-5} y 10^{-2} mutaciones por generación, Forbes *et al.* 1995), estos loci tienen un gran número de alelos, y al ser codominantes son particularmente idóneos para estudios de genética de poblaciones. La hipótesis más aceptada para explicar el proceso físico por el cual se producen estas mutaciones, se basa en el error de la maquinaria de replicación que se produce durante la síntesis de las cadenas de ADN ("polymerase slippage", Levison y Gutman 1987).

Se han propuesto dos modelos para explicar la evolución de las familias de microsátelites:

1. El modelo de infinitos alelos ("Infinite Allele Model" o I.A.M., Kimura y Crow 1964), según el cual cada mutación ocurrida al nivel de la composición de nucleótidos de un alelo, da lugar a un nuevo alelo hasta ese momento no presente en la población. Cada nuevo mutante tiene la misma probabilidad de aparecer independientemente de cómo sea el alelo original; de esta forma, el número de alelos que pueden encontrarse en un locus dado es enorme.
2. El modelo de la mutación paso a paso ("Stepwise Mutation Model" o S.M.M., Ohta y Kimura 1973), que asume que los alelos tienen un cierta

tendencia a mutar mediante la ganancia o pérdida de una unidad de repetición en pasos discretos.

Ambos modelos asumen que la generación de nuevos alelos es compensada por la pérdida de alelos por deriva génica, bajo la asunción de neutralidad y equilibrio, es decir, si la mutación y la deriva son las únicas fuerzas que determinan la distribución de la frecuencia de alelos de un locus dado. En ese caso los números mínimo y máximo de alelos esperados para un gen se pueden predecir por ambos modelos, S.M.M. y I.A.M..

En una familia determinada de microsatélites, los diferentes alelos de cada locus se caracterizan por la longitud variable en pares de bases cuando son amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En *A. mellifera* estos marcadores son abundantes y han sido caracterizados en varias subespecies y especies del género *Apis* (Estoup *et al.* 1993, Rowe *et al.* 1997) (tabla 1).

La mayor parte de las investigaciones realizadas con microsatélites ha sido enfocada hacia la determinación y análisis de las relaciones entre los individuos de una colmena (Estoup *et al.* 1994, Neumann 1998, Simon 1998), así como para determinar la frecuencia de apareamiento de las abejas reinas de diferentes especies del género *Apis* (Moritz *et al.* 1995, Oldroyd *et al.* 1995). En otros insectos, el análisis de estos marcadores también está siendo útil para establecer relaciones genéticas entre grupos de subpoblaciones y poblaciones, así como en estudios sobre la diferenciación de las poblaciones y su evolución (revisión en Goldstein y Pollock, 1997, Irvin *et al.* 1998).



Tabla 1. Loci de microsatélites estudiados en este trabajo. No se tiene información detallada acerca de la secuencia central del locus A8. Los números de las referencias son de los artículos que se indican a continuación.

Locus	Secuencia central	Tipo	Ref.
B124	(CT) ₈ TCCTCTTC...(CT) ₁₄ CCTC(GC) ₃ ...(GGCT) ₈	compuesto	1
A113	(TC) ₂ C(TC) ₂ TT(TC) ₅ TT(TC) ₈ TT(TC) ₅	imperfecto	3
A7	(CT) ₃ (T) ₇ CCTTCG(CT) ₂₄	compuesto	1
A35	(GT) ₁₄	perfecto	1
A28	(CCT) ₃ GCT(CCT) ₆ (CT) ₅ TT(CT) ₄	compuesto	1
A24	(CT) ₁₁	perfecto	2
A88	(CT) ₁₀ TC(CCTT) ₂ (CTTT) ₃ ...(GGA) ₇	compuesto	2

1. Estoup *et al.* 1994, 2. Estoup *et al.* 1995a, 3. Estoup *et al.* 1995b.

En el caso de *A. mellifera*, el hecho de que las muestras tomadas de unas cuantas colmenas sean representativas de la población a la que pertenecen (Estoup *et al.* 1994) y la relativa facilidad de detección de los diferentes alelos (una vez conocida la secuencia de las regiones adyacentes a los locus de microsatélites, para poder diseñar los cebadores usados en la reacción de PCR), están favoreciendo el análisis genético de numerosas poblaciones de *A. mellifera*. Los primeros resultados basados en la variación de los microsatélites en *A. mellifera* (Estoup *et al.* 1995a y 1995b), han confirmado los linajes evolutivos de subespecies de abejas previamente propuestos con datos morfológicos y del ADNmt. Recientemente, Franck *et al.* (1998a, 1998b) han realizado estudios en poblaciones de abejas italianas (*A. m. ligustica* y *A. m. sicula*) y de abejas ibéricas (*A. m. iberica*, ver más adelante) usando marcadores de microsatélites y sus resultados corroboran la posición taxonómica de dichas subespecies definida anteriormente con caracteres morfológicos.

4. La abeja ibérica, *Apis mellifera iberica* (Goetze 1964).

La raza geográfica de abeja que habita en la Península Ibérica es *A. m. iberica* Goetze, 1964. Difiere morfológicamente de las subespecies colindantes geográficamente *A. m. mellifera* (presente en Francia) y *A. m. intermissa* y *A. m. major* (presentes en el norte de Marruecos), pero en algunos aspectos de su comportamiento es muy parecida a las abejas africanas (Ruttner 1988).

La primera hipótesis sobre el origen de la *A. m. iberica* fue propuesta por Ruttner en 1978, quién sugirió que la raza ibérica de abejas forma parte de una cline geográfica de subespecies que se extiende desde el norte de África a Europa occidental, pasando por la Península Ibérica. Esta cline la forman las subespecies *sahariensis*, *intermissa*, *iberica* y *mellifera*. En el esquema de Ruttner, las subespecies *intermissa*, *iberica* y *mellifera* están asociadas formando el linaje evolutivo M de subespecies del Mediterráneo occidental de *A. mellifera* y se les supone un origen gradual a partir del nordeste del continente africano. Según esta hipótesis, la subespecie *iberica* se habría diferenciado antes que la subespecie *mellifera*.

Estudios posteriores sobre la distribución de caracteres morfológicos en las poblaciones de abejas ibéricas, proporcionan la base para plantear una segunda hipótesis sobre el origen de *A. m. iberica*. Según esta hipótesis, esta subespecie es el resultado del contacto secundario entre dos subespecies originadas alopatricamente, *A. m. intermissa* en Marruecos y *A. m. mellifera* en algún lugar de Europa occidental. Al encontrarse ambas subespecies en la Península Ibérica se habría formado una nueva raza híbrida (Serrano-Castejón 1987). Los datos de Cornuet y Fresnaye (1989) corroboran la presencia de una zona de hibridación entre las razas africanas y las europeas occidentales de *A. mellifera* a lo largo de la Península, ya que se observa un gradiente norte-sur de caracteres

morfológicos, siendo las abejas del norte peninsular más parecidas a la subespecie *mellifera* de Europa occidental, mientras que las del sur se asemejan a la subespecie *intermissa* que habita en Marruecos. De aquí que se denominen en ocasiones a las abejas peninsulares como *A. m. iberica* parecida a *mellifera* y *A. m. iberica* parecida a *intermissa*.

Otros estudios biométricos de la abeja ibérica han dado lugar a la descripción de grupos morfológicos menores, relacionados con las diferentes características ecológicas y climáticas presentes en la Península Ibérica. Sepúlveda (1984a, 1984b, 1984c) encontró diferencias entre abejas procedentes de distintos puntos de Andalucía; Izquierdo *et al.* (1985) diferenciaron morfométricamente poblaciones de abejas de Asturias, y Santiago *et al.* (1986) describieron dos ecotipos de abejas separados por la cordillera Cantábrica. Más recientemente, Orantes-Bermejo y García-Fernández (1995) demostraron mediante análisis discriminante de siete características morfométricas, la existencia de tres grupos biométricos de *A. m. iberica* en diferentes apiarios del sur peninsular. Grupos semejantes han sido también identificados por Hepburn y Radloff (1996), quienes analizaron características morfológicas de poblaciones de abejas distribuidas a lo largo de un transecto entre los Pirineos y el Sahara, mediante estadísticos multivariados.

Los estudios moleculares basados en la secuencia de diferentes genes del ADNmt (Cornuet y Garnery 1991, Garnery *et al.* 1992) y en los mapas de restricción de la molécula completa del ADNmt (Smith *et al.* 1991, Sheppard *et al.* 1996), indican que la Península Ibérica es, efectivamente, una zona de hibridación entre las subespecies *intermissa* y *mellifera*, ya que las abejas del sur tienen haplotipos mitocondriales africanos (linaje A), mientras que las del norte tienen haplotipos típicos de la subespecie europea occidental (linaje M). Garnery *et al.* (1995) subrayan que esta distribución de haplotipos

mitocondriales puede haber surgido como resultado de un contacto secundario entre poblaciones de ambos linajes. Esto supone el rechazo de la hipótesis de Ruttner (1978) referente a una cline geográfica gradual desde la raza *intermissa* hasta la *mellifera*, y el apoyo al origen híbrido de las abejas peninsulares (fig. 6).

La frecuencia de distribución de los alelos de la aloenzima malato deshidrogenasa (Mdh; Smith y Glenn 1995) también apoya la hipótesis del origen híbrido de la subespecie *iberica* basada en el ADNmt, aunque la fosfoglucomutasa (Pgm) no muestra un reparto diferencial de alelos entre el norte y el sur peninsular, sino uno más homogéneo y sin patrón geográfico concreto.

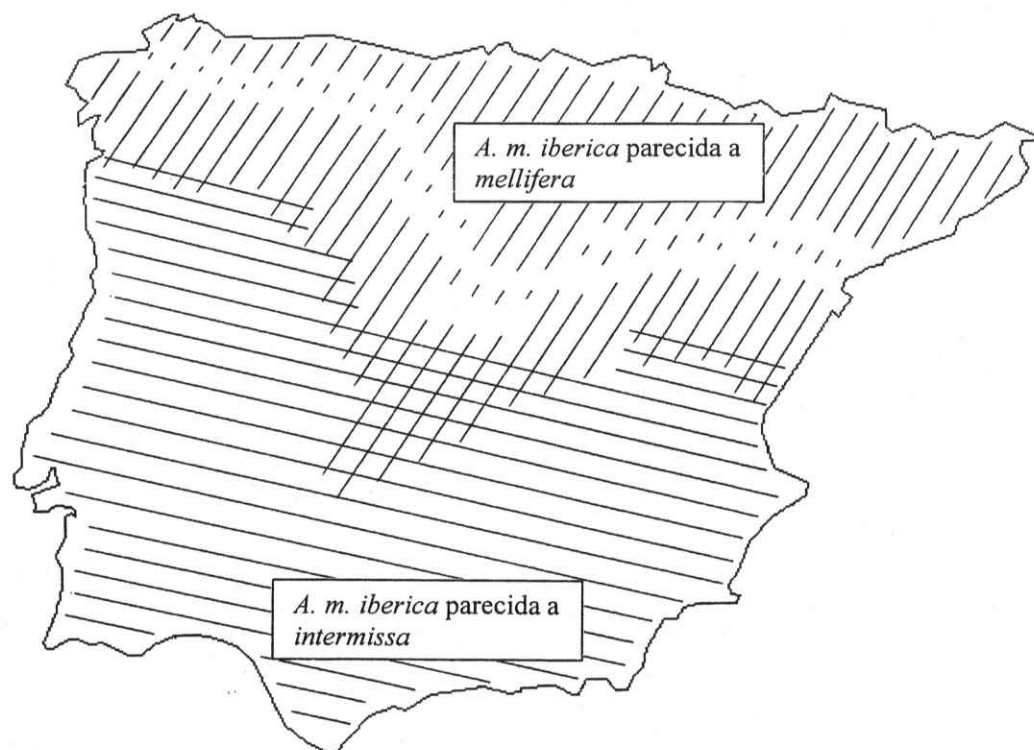


Figura 6. Mapa de la Península Ibérica mostrando la distribución aproximada de los diferentes tipos de *A. m. iberica*.

Garnery *et al.* (1995) estudiaron la distribución de haplotipos mitocondriales basados en la región intergénica ARNt^{leu}-COII de poblaciones peninsulares pertenecientes a *A. m. mellifera* y *A. m. iberica*, y también de las tres subespecies presentes en Marruecos, *A. m. intermissa*, *A. m. major* y *A. m. sahariensis*. Encontraron que el haplotipo más frecuente en las poblaciones del sur peninsular está ausente en las de Marruecos y viceversa. También confirmaron con sus resultados que la Península Ibérica es una zona de hibridación secundaria entre las subespecies *A. m. mellifera* y *A. m. intermissa*. Franck *et al.* (1998a), ampliaron este estudio con datos de poblaciones francesas de *A. m. mellifera*. La diversidad de haplotipos más alta se encontró en las poblaciones de abejas ibéricas, en donde aparecen haplotipos de origen africano y europeo.

A pesar de la concordancia de estudios diversos basados en el ADNmt, la hipótesis sobre el origen híbrido de las poblaciones de abejas ibéricas a partir del linaje A de razas africanas y del M de razas europeas occidentales, ha sido rechazada por Franck *et al.* (1998a) basándose en datos sobre la variación de los microsatélites. Si la hipótesis de una intergradación primaria sobre el origen de las poblaciones de abejas ibéricas fuera cierta, la variabilidad de los microsatélites en estas poblaciones debería mostrar una modificación gradual de las frecuencias de los distintos alelos en el eje norte-sur peninsular. Por otro lado, si la hipótesis que supone un contacto secundario fuera la correcta, debería haber un gradiente de frecuencias alélicas similar al encontrado en la variación de los haplotipos del ADNmt o de los alelos de la aloenzima Mdh. Sin embargo, el análisis de los datos de los microsatélites no apoya ninguna de las dos hipótesis, por lo que estos autores sugieren una tercera que postula un origen múltiple de las poblaciones de abejas *A. m. iberica* parecida a *intermissa*, como resultado de sucesivas introducciones de abejas desde Marruecos durante los ocho siglos de presencia musulmana en la Península Ibérica.

5. Objetivos de esta tesis.

Las características medioambientales de la región de Murcia permiten una prolongada actividad apícola a lo largo de todo el año. Tan solo durante el verano se producen movimientos (trashumancia) de las colmenas hacia el interior peninsular, donde las temperaturas son más frescas, con lo que la actividad de las colmenas se mantiene prácticamente ininterrumpida. Debido al número elevado de colmenas censadas en la región (más de 85.000; A. Franco com. pers.) y a lo extendido de la trashumancia, la variabilidad genética de los apiarios de Murcia ofrece amplias posibilidades para realizar estudios de índole diversa. Este trabajo tiene como objetivo determinar la variabilidad genética de colmenas fijas de la Región de Murcia y la posible introgresión de genes provenientes de abejas de regiones adyacentes o de colmenares trashumantes. Igualmente se pretende evaluar el efecto que supone la importación de reinas de otras poblaciones europeas con fines productivos, sobre la composición génica de las abejas que habitan la Región de Murcia.

Un segundo objetivo se refiere a las poblaciones apícolas de las Islas Canarias. Se trata de un archipiélago de siete islas situado en el Océano Atlántico, y cuyas islas más orientales, Lanzarote y Fuerteventura, se hallan a unos 110 km de la costa oeste africana. Estas islas tienen origen volcánico y es probable que no hayan estado nunca conectadas con el continente. La edad de las islas se reduce conforme éstas se alejan del continente, siendo la más vieja Fuerteventura (20 millones de años) y la más joven la isla de El Hierro (1 millón de años; Anguita y Hernan 1975).

La especial situación geográfica del archipiélago canario ha propiciado el aislamiento de las poblaciones de seres vivos, tanto animales como vegetales (Juan *et al.* 1996, Thorpe *et al.* 1993, 1994), lo que convierte a cada isla en un

ecosistema único, con especies y subespecies endémicas que han evolucionado a partir de antepasados procedentes, probablemente, de la Península Ibérica o del noroeste de Africa (Oromí *et al.* 1991).

Se tienen datos de la existencia de poblaciones naturales de abejas en cinco de las siete islas de la Comunidad Canaria excepto en Lanzarote y Fuerteventura, en donde el árido clima no permite el desarrollo de actividades apícolas (F. González, com. pers.). Actualmente, los apicultores tradicionales canarios se basan en el aspecto externo para afirmar la existencia de una raza particular de abeja canaria, que sería diferente a la europea a simple vista por tener un color más oscuro. Ruttner (1975), en su trabajo sobre las poblaciones de abejas africanas, incluyó muestras de Tenerife y Gran Canaria y concluyó que su origen estaba probablemente en la Península Ibérica. Entre otros detalles, indicó que el tipo de colmena que se usa en las islas es vertical, arquetipo ampliamente usado por los apicultores de la Península. De aquí que la hipótesis de Ruttner vaya en contra de una raza autóctona originada en las propias islas a partir de ancestros desconocidos.

La hipótesis de partida en el caso de las abejas canarias, es que como consecuencia del aislamiento de las Islas Canarias, las poblaciones de abejas pueden haber sufrido procesos de divergencia genética que hayan dado lugar a una raza autóctona. Además las poblaciones insulares están adaptadas a su medio ambiente particular y albergan un patrimonio genético y ecológico muy valioso. Ambos hechos determinan la importancia del estudio de las poblaciones de abejas canarias para su caracterización molecular. Para tratar de corroborar esta hipótesis hay que tener en cuenta las probables introducciones de abejas peninsulares a partir del siglo XVI, que pueden dificultar el análisis de la variabilidad genética de las poblaciones actuales.

6. Objectives.

Climate conditions in the region of Murcia, Southeastern Spain, allow a long-term beekeeping season along the year. Only during summer hives are moved towards the inner regions from the Iberian Peninsula where temperatures are milder. For this reason, colonies are kept working through the whole year. Due to these migratory movements and the high amount of hives existing this region (more than 85,000; A. Franco pers. comm.), it is expected a high level of genetic variability in the apiaries from Murcia. This work has as a main objective to determine the genetic variability of some permanent hives in the Region of Murcia, and to study gene introgression from other close honeybee populations. We also intend to evaluate the effect of queen importation from other European populations in the genetic composition of the honeybees from Murcia.

The second objective is related with honeybee populations from the Canary Islands. These islands are a chain of seven islands located in the Atlantic Ocean in front of South Morocco. The closest ones to Africa are Lanzarote and Fuerteventura, 110 km off the West African coast. This archipelago has a volcanic origin and has probably never been in contact with the mainland. The age of these islands decreases from east to west as they separate from the mainland, being the oldest Fuerteventura (20 My) and the youngest El Hierro (1 My; Anguita and Hernan 1975).

The special geographic situation of the Canarian archipelago has allowed the isolation of different flora and fauna populations (Juan *et al.* 1996, Thorpe *et al.* 1993, 1994), thus making each island an unique ecosystem with endemic species and subspecies that have evolved from nearby Africa or from Iberia via the Northeast trade winds (Oromí *et al.* 1991).



In the Canary Islands, natural honeybee populations exist in every island except in Lanzarote and Fuerteventura where the dry and windy weather do not allow the honeybee live (F. González, pers. comm.). Based on morphological and behavioural criteria, traditional Canarian beekeepers suggest the existence of a particular race of *A. mellifera* in these islands. Ruttner (1975) in his work about African honeybee populations included some samples from Tenerife and Gran Canaria, and pointed out that there was no difference between populations from the Iberian Peninsula and from the Canaries. Therefore, he suggested a possible origin of these honeybees from Southern Spain. His hypothesis relied on similarities of the hives that are used by beekeepers from the Canaries and the Iberian Peninsula.

Our hypothesis is that due to the geographic isolation of the Canary Islands, honeybee populations may have undergone genetic divergence processes and become an endemic race. These island populations are expected to be genetically adapted to particular environments, and they are worthy to be protected because of faunistic and economic interest. These facts determine the importance of the molecular characterisation of Canarian honeybees.

To corroborate this hypothesis it should be taken into account the honeybee introductions from the Iberian Peninsula from the XVI century onwards, a fact that may complicate the analysis of the genetic variability of present-day honeybee populations.

Material y Métodos

1. Material.

En la tabla 2 se detalla el número de colmenas de las diferentes localidades muestreadas en este estudio.

Tabla 2. Número de colmenas muestreadas en cada localidad.

Murcia 45				
Abanilla 9	Águilas 3	Bullas 1	Espinardo 5	Llano de Brujas 1
Murcia 4	Santomera 10	La Unión 10	Cieza 2	
Gran Canaria 24				
Casa del Gallo 2	Lomo Lucas 2	La Abejarilla 5	El Gamonal 3	Dragonal Alto 5
Ingenio Blanco 2	El Línculo 3	Los Ribanzos 1	Las Rosas 1	
Tenerife 81				
El Helecho 6	Arriba 3	El Cercado 5	La Quinta 2	Taco 7
Polegre 4	Valle S. Lorenzo 2	Tincer Bajo 4	S. Andrés 19	Hoyo de la Tierra 1
Las Arquillas 9	Valle Guerra 3	Monte Tegueste 4	Los Ancones 6	Taller Apícola 5
La Orotava 1				
La Gomera 57				
La Poyata 15	El Tabaibal 18	La Caleta 9	"Manolo" 5	Lomo 4
Piedra Gorda 2	El Palmar 3	La Castellana 1		
La Palma 42				
La Montaña 2	Monte Breña 2	El Pueblo 2	Malpais 1	El Molino 35
El Hierro 17				
Betenama 1	Tajase 5	Los Valles 1	La Hoya 1	Regonzález 4
Tijimiraque 5				
Tetuán 15				

Los colmenares muestreados en las Islas Canarias han sido aquellos de los que se tiene constancia de que no ha habido introducción reciente de abejas foráneas; así mismo, los colmenares muestreados en la Región de Murcia son de los denominados permanentes, puesto que no han sufrido movimientos de trashumancia durante largos periodos de tiempo. Para realizar análisis comparativos se han tomado como referencia muestras de un colmenar de Tetuán en Marruecos que contiene las razas *A. m. major* y *A. m. intermissa*, propias del Norte de Africa.

2. Extracción de ADN.

De cada colmena fueron recogidas entre 10-30 abejas obreras adultas y guardadas en alcohol absoluto a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Antes de proceder a la extracción, las abejas se lavaron con un tampón con NaCl 128 mM, CaCl₂ 1'5 mM, KCl 5 mM, con pH 7'4, a temperatura ambiente durante una hora (Garnery *et al.* 1993). El ADN se extrajo de la cabeza y el tórax siguiendo diferentes métodos:

1. Extracción típica con fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989).
2. Kit "DNA Clean-up System" de PROMEGA, que se usó siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones.
3. Extracción salina (Sunnuks y Hales 1996), que fundamentalmente 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 proteinasa K (10 mgr/ml). Pasada 1 h, se añade NaCl 5M y se centrifuga 30 min a 13500 r.p.m. El ADN se precipita con etanol absoluto y se resuspende en 100 µl de TE pH 7'6.

4. Extracción con Chelex (Walsh *et al.* 1991): los músculos del tórax son resecados y metidos en tubos Eppendorf. Se añaden 200 μ l de tampón Wilson (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) y 10 μ l de proteinasa K y se incuban las muestras a 55 °C durante dos horas. 10 μ l de cada homogeneizado se mezclan con 200 μ l de Chelex al 5 % y se incuban a 56 °C durante 30 min. Esta mezcla se agita intensamente en un vortex durante 5-10 seg. La proteinasa K de los homogeneizados se inactiva colocando las muestras a 95 °C durante 8 min. Las muestras se agitan de nuevo y se centrifugan a 13000 r.p.m. De esta mezcla se toma 1 μ l del sobrenadante para la reacción de PCR.

3. Análisis del ADN mitocondrial (ADNmt).

3.1. Amplificación del ADNmt.

La región intergénica ARNt^{leu}-COII se amplificó en un termociclador Perkin Elmer Cetus 480 mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Los cebadores utilizados son de la casa Pharmacia Biotech y se corresponden con secuencias conocidas del ADNmt de *A. mellifera* (Garnery *et al.* 1992): E2 (5'GGCAGAATAAGTGCAT'TG3') situado en el extremo 5' del gen ARNt^{leu}, y H2 (5'CAATATCATTGATGACC3') situado cerca del extremo 5' del gen COII (fig. 8).

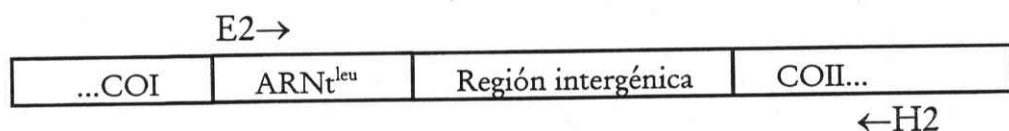


Figura 8. Localización de los cebadores en el ADNmt.

Una mezcla de reacción típica de PCR contiene en un volumen final de 100 μ l:

- el tampón apropiado para la enzima (1X),
- 1'5 mM de Cl_2Mg ,
- 0'2 mM de dNTPs,
- 0'15 μ M de cada cebador,
- 1 μ l de la dilución apropiada de ADN en dH_2O y
- 3 unidades de polimerasa (Promega o Biotaq),

El programa para la amplificación es el siguiente:

5 min a 96 °C (desnaturalización inicial)

30 ciclos { 30 seg a 96 °C (desnaturalización)
1 min 30 seg a 50 °C (temperatura de anillado)
1 min 30 seg a 72 °C (elongación)

10 min a 72 °C (extensión final).

Los productos de la amplificación se visualizaron tras la separación electroforética en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X teñidos con bromuro de etidio. Estos geles se fotografiaron con película Polaroid bajo luz ultravioleta o usando el programa Eagle en un ordenador personal.

3.2. Análisis de restricción.

Tras la amplificación por PCR de la región intergénica del ADN mitocondrial, las digestiones se preparan usando alícuotas de 10 μ l del producto de PCR y 5 unidades de la enzima *Dra*I de Pharmacia Biotech o Gibco BRL, con su correspondiente tampón. Estas digestiones son mantenidas en un baño a 37 °C durante 4-12 h y los fragmentos resultantes se visualizan en geles de acrilamida al 5% y al 10% o al 8%. Tras la tinción con bromuro de etidio se fotografían usando el programa Eagle o la película Polaroid.

3.3. Secuenciación automática y análisis de las secuencias del ADN mitocondrial.

El kit usado fue el de secuenciación cíclica con cebadores marcados con fluoresceína de Amersham Life Science, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cebadores se eligieron y diseñaron de tal forma que la doble cadena de ADN de los diferentes insertos se pudiera secuenciar en ambos sentidos. Las reacciones de secuenciación se separaron electroforéticamente en un secuenciador automático ALF (Pharmacia) a una temperatura de 48 °C.

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

3.4. Análisis filogenético.

Se ha usado el paquete PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, versión 3.1; Swofford 1993) para establecer las relaciones filogenéticas de los haplotipos mitocondriales hallados en las poblaciones estudiadas. La presencia o ausencia de los puntos de restricción y de pequeñas deleciones o inserciones en la región intergénica, ha sido codificada como valores 1/0. El tipo de secuencia P y el número de secuencias Q presentes en cada región se han tomado como caracteres ausentes en el caso de los haplotipos con diferente composición en la región intergénica. En total, este análisis se ha realizado con 6 caracteres y con un valor de bootstrap de 2000 resplicaciones. El método de búsqueda usado ha sido el exhaustivo, proceso por el cual se busca el árbol más parsimonioso de entre todos los posibles.

Las relaciones entre poblaciones de abejas de diferente procedencia se han establecido usando dos métodos: uno basado en la presencia/ausencia de



caracteres y otro basado en la frecuencia de cada haplotipo en cada población (paquete PHYLIP, versión 3.5; Felsenstein 1993):

- El método de máxima parsimonia de Wagner, los alelos y los haplotipos han sido codificados como caracteres discretos de presencia o ausencia (1/0) en cada población. Con este método el estado ancestral de los caracteres no es conocido (programa MIX).

- El método de máxima probabilidad, el carácter usado ha sido la frecuencia de cada haplotipo en las poblaciones muestreadas. Este método filogenético busca aquellos árboles que mejor explican los datos observados y de ahí construye el cladograma (programa CONTML).

En ambos casos se ha usado un valor de bootstrap de 2000 (Hedges 1992) con el programa BOOTSTRAP del paquete PHYLIP. Los árboles consenso de cada método han sido obtenidos con el programa CONSENSE incluido también en dicho paquete.

Para establecer la filogenia entre estas poblaciones se han eliminado del análisis aquellas muestras cuyo haplotipo se corresponde con el típico de abejas del linaje C, ya que se supone que su presencia en las poblaciones de abejas de Murcia y de las Islas Canarias es debida a su introducción por parte de los apicultores. Por tanto, se trata de una presencia no natural.

Como el número y la frecuencia de haplotipos dependen del tamaño muestral, éste se ha reducido a 15 individuos. En aquellas muestras con más de 15 individuos, se han tomado los datos de 15 de ellos escogidos al azar.

4. Análisis de los marcadores microsatélites.

4.1. Amplificación de los microsatélites.

Se han amplificado ocho loci distintos de microsatélites: B124, A113, A7, A35, A24, A28, A88 y A8 (Estoup *et al.* 1994, 1995a; Franck *et al.* 1998a) en un amplificador Perkin Elmer Cetus 9600. En la tabla 3 se detalla la secuencia de los cebadores así como la referencia y la temperatura de anillado en cada caso.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores, temperatura de anillado y referencia de cada locus de microsatélite.

Locus	Cebadores	T ^a de anillado	Ref.
B124	5'GCAACAGGTCGGGTTAGAG3' 5'CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG3'	54 °C	1
A113	5'CTCGAATCGTGGCGTCC3' 5'CCTGTATTTTGCAACCTCGC3'	58 °C	2
A7	5'GTTAGTGCCCTCCTCTTGC3' 5'CCCTTCCTCTTTCATCTTCC3'	58 °C	1
A35	5'GTACACGGTTGCACGGTTG3' 5'CTTCGATGGTCGTTGTACCC5'	58 °C	1
A28	5'GAAGAGCGTTGGTTGCAGG3' 5'GCCGTTTCATGGTTACCACG3'	54 °C	1
A24	5'CACAAGTTCCAACAATGC3' 5'CACATTGAGGATGAGCG3'	55 °C	2
A88	5'CGAATTAACCGATTTGTCG3' 5'GATCGCAATTATTGAAGGAG3'	55 °C	2
A8	5'CGAAGGTAAGGTAATGGAAC3' 5'GGCGGTAAAGTTGTGG3'	55 °C	3

1. Estoup *et al.* 1994; 2. Estoup *et al.* 1995a; 3. Franck *et al.* 1998a.

La temperatura de anillado varía según las condiciones requeridas para la separación electroforética de los productos amplificados en el secuenciador automático (ABI 310). Cuando la temperatura de anillado de los cebadores es la misma se pueden realizar reacciones de PCR múltiples, usando dos o tres pares de cebadores en la misma reacción, tal y como se indica en la tabla 3.

El volumen total de estas reacciones es 10 μ l y contiene:

- 50 mM KCl,
- 10 mM Tris HCl (pH 8'3),
- 1'5 mM Cl_2Mg ,
- 200 μ M de cada dNTP,
- 333 nM de cada uno de los cebadores
- 1 μ l de la dilución apropiada de ADN en dH_2O , y
- 0'5 μ l de Golden Taq polimerasa (Perkin Elmer).

De cada par de cebadores, uno está marcado con una sustancia fluorescente en su extremo 5' (6-FAM, HEX y TET, Perkin Elmer).

El programa de amplificación de los loci de microsatélites usado es el siguiente:

- 10 min a 95 °C (desnaturalización inicial)
- 30 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ seg a } 94 \text{ °C (desnaturalización)} \\ 30 \text{ seg a la temperatura de anillado correspondiente} \\ 1 \text{ min a } 72 \text{ °C (elongación)} \end{array} \right.$
- 20 min a 72 °C (extensión final).

Después de las reacciones múltiples los productos de PCR se mezclan. Se añaden 10 μ l de formamida conteniendo 0'3 μ l de marcador standard (TAMRA 500 de Perkin Elmer) a 2 μ l de esta mezcla. Las muestras se desnaturalizan

durante 5 min a 95 °C y se separan electroforéticamente en un secuenciador automático (ABI 310) con el polímero POP4 y un capilar con un diámetro de 50 μm y 47 cm de longitud. El tiempo de inyección fue de 5 seg y el total de electroforesis de 21 min para cada muestra.

4.2. Análisis de los microsátélites.

El tamaño de los alelos fue determinado por comparación de la longitud de los productos de PCR con el marcador standard (TAMRA de Perkin-Elmer) añadido en cada reacción de separación electroforética.

4.2.1. Heterocigosidad observada y esperada (diversidad de genes).

Número medio de alelos observado.

La heterocigosidad observada (H_o) es la proporción de heterocigotos observada en cada locus en cada muestra poblacional. En el capítulo de resultados se indica la H_o de cada locus en cada apiario y en la población total. La H_o media de los ocho loci por población también ha sido calculada.

La heterocigosidad esperada (H_e) es el número de heterocigotos que se espera encontrar en una población en equilibrio Hardy-Weinberg. El concepto de H_e es similar al de diversidad de genes según Nei (1973). Ambos términos se usan indiferentemente a lo largo de este trabajo. Como en el caso de la H_o , se ha calculado para cada locus en cada apiario y en la población total, así como para el total de los ocho loci por población.

El número medio de alelos observado en cada locus y en cada apiario o población es un buen indicador de la variabilidad genética debida a la diversidad alélica, siempre que las muestras estén en equilibrio mutación-deriva y que el tamaño muestral sea más o menos el mismo. El número medio de alelos del total de los ocho loci ha sido calculado por apiario y por población.



El número efectivo de alelos es, desde un punto de vista biológico, el número de alelos con la misma frecuencia que se necesitaría en una población ideal para producir el mismo valor de homocigosidad que en el de la población estudiada. Según Kimura y Crow (1964), el número efectivo de alelos es un valor recíproco a la homocigosidad observada.

El test de Wilcoxon de calificación con signos (“sign-rank test”) ha sido realizado para comparar los datos del número de alelos por locus y de heterocigosidad (H_o y H_e) entre cada par de poblaciones. Este test no es paramétrico y computa la probabilidad de que estos datos sean diferentes en las poblaciones analizadas. Como se han realizado comparaciones múltiples, la probabilidad se ha ajustado con la corrección de Bonferroni.

El programa POPGEN ha sido usado para estimar estos parámetros poblacionales, así como la frecuencia de cada alelo por locus y por población. Las estimaciones imparciales y desviaciones estándar de la heterocigosidad esperada, como medida de diversidad de genes son calculadas en este programa siguiendo el método de Nei (1973).

4.2.2. Equilibrio Hardy-Weinberg.

Una población está en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) si los alelos de cada locus están distribuidos al azar en la población y si no hay asociación entre los alelos que cada individuo recibe de sus parentales. Las desviaciones de este equilibrio se pueden deber a diversos factores:

- apareamientos no al azar,
- subdivisión poblacional,
- muestreo de especies gemelas,
- procesos de selección,

- movimientos migratorios o flujo génico desde poblaciones externas,
- diferencias en las frecuencias alélicas debidas a la herencia asociada al sexo,
- presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente.

Si las proporciones genotípicas en un locus dado no están en EHW en varias poblaciones, se puede sospechar que esto es debido a procesos de selección o a la presencia de alelos nulos (Callen *et al.* 1993). Una población que se desvía significativamente del EHW en varios loci independientemente, puede estar dividida en varios grupos o sufrir migración de fuente externa o quizás no se está reproduciendo al azar.

El método estadístico usado en esta tesis para analizar el EHW ha sido el test de probabilidad o test exacto de Fischer (Louis y Dempster 1987). Este test se basa en el análisis de todas las posibles matrices de frecuencias genotípicas generadas a partir de la matriz observada y en rechazar la hipótesis de EHW si las frecuencias genotípicas observadas son inusuales. El paquete GENEPOP (versión 1.2; Raymond y Rousset 1995) se ha usado para analizar el EHW. Si en la población se encuentran presentes más de cuatro alelos por locus, este programa realiza una estimación no sesgada de la probabilidad exacta de EHW siguiendo el método de la cadena Markov con 50.000 iteraciones (Guo y Thompson 1992).

4.2.3. Diferenciación poblacional.

Para comprobar si los apiarios muestreados forman una sola población o si, por el contrario, existe diferenciación poblacional entre ellos, se ha realizado un test exacto según a Raymond y Rousset (1995). Este test estadístico se basa también en el análisis de las tablas de contingencia mediante el procedimiento de la cadena de Markov con 50.000 iteraciones. De esta forma se obtiene una estimación no sesgada de la probabilidad exacta de error si se rechaza la



hipótesis nula H_0 : la composición alélica es independiente de la asignación de población, es decir, no hay diferenciación. La estimación de dicha probabilidad y el error estándar asociado han sido calculados con el programa GENEPOP (Raymond y Rousset 1995).

4.2.4. Desequilibrio genotípico.

El desequilibrio genotípico se debe a la asociación no al azar de los alelos de diferentes loci (Weir 1991). Este desequilibrio puede deberse a varios factores, entre ellos, la unión física de los alelos, la selección epistática, la deriva genética al azar en poblaciones finitas y los factores demográficos como migración, ancestros comunes y mezcla de poblaciones (Lewontin 1988).

El desequilibrio genotípico ha sido analizado para todas las combinaciones posibles de pares de loci en cada población. La información de cada tabla de contingencia de cada par de loci, se ha analizado usando de nuevo el método de la cadena de Markov tras 50.000 iteraciones con el programa GENEPOP (Raymond y Rousset 1995). De esta manera se obtiene la probabilidad exacta de error sin sesgo alguno si se rechaza la hipótesis nula H_0 , la cual asume que no hay asociación alélica.

4.2.5. Estadísticos F de Wright.

Los parámetros estadísticos F de Wright (1969) han sido estimados con el programa FSTAT (Goudet 1997). Con ellos se ha analizado la variación genética, en el sentido de déficit de heterocigotos de los microsátelites a diferentes niveles:

1. F_{IS} : dentro de las poblaciones. El índice F_{IS} una medida de la correlación de genes dentro de un individuo, que da idea también del nivel de desviación del EHW. Este valor da una idea sobre el nivel de endogamia entre individuos.

2. F_{ST} : entre las poblaciones. Este valor mide la reducción de heterocigotos en una población debida a la deriva génica al azar y está relacionado con la endogamia entre las subpoblaciones. Con el valor F_{ST} de deficiencia de heterocigotos entre poblaciones, se ha generado una matriz de distancia genética entre cada par de poblaciones (Reynolds *et al.* 1983).

Estos valores se han hallado usando 1000 permutaciones de los datos de variación de los alelos en cada población muestreada.

El número de emigrantes entre cada par de poblaciones se ha estimado partiendo del valor F_{ST} mediante la relación

$$Nm = 1/4 F_{ST}^{-1} - 1/4.$$

4.2.6. Concordancia con los modelos de mutación (I.A.M. y S.M.M.).

Esta parte se ha analizado con el programa BOTTLENECK (Piry *et al.* 1996). Este programa calcula para cada población y para cada locus la distribución de la heterocigosidad esperada (H_e), a partir del número observado de alelos en una muestra de tamaño N , bajo la asunción de equilibrio mutación-deriva. Esta distribución se obtiene tras la simulación del proceso siguiendo los modelos de alelos infinitos (I.A.M.) o de la mutación paso a paso (S.M.M.); de esta forma, H_e se compara con H_o para ver si hay exceso o déficit de heterocigosis en un locus dado. Para determinar si una población exhibe un número significativo de loci con exceso de heterocigosidad, este programa realiza el test estadístico de Wilcoxon ("sign-rank test") y determina la probabilidad de que la frecuencia de alelos observada siga uno de los modelos de evolución señalados. Este test no es paramétrico, es decir, se usa cuando los datos no siguen una distribución normal, y es el más apropiado para el tamaño muestral y el número de loci analizados en este estudio.



Estos valores se han hallado usando 1000 permutaciones de los datos de variación de los alelos en cada población muestreada.

4.3. Análisis filogenético.

Las relaciones entre poblaciones de abejas de diferente procedencia se han establecido usando dos métodos basados en caracteres y un tercero basado en distancias (paquete PHYLIP, versión 3.5; Felsenstein 1993):

- El método de máxima parsimonia de Wagner, los alelos y los haplotipos han sido codificados como caracteres de presencia o ausencia (1/0) en cada población (programa MIX).

- El método de máxima probabilidad el carácter usado ha sido la frecuencia de cada alelo de microsatélite y de cada haplotipo en las poblaciones muestreadas (programa CONTML).

- El método basado en las distancias genéticas ha sido el "neighbour joining" (programa NEIGHBOR). Este método está basado en el principio de evolución mínima (Saitou y Nei 1987). El programa BOOTSTRAP del paquete PHYLIP se usó para generar 2000 iteraciones (Hedges 1992) de la matriz de datos de frecuencia de los alelos de cada población. La distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) para los microsatélites ha sido usada para medir la distancia genética entre poblaciones (programa DNADIST). Este parámetro es bastante adecuado para comparar poblaciones que han divergido recientemente como es el caso de las poblaciones de *A. mellifera*.

Como en el caso del análisis filogenético basado en la variación del ADNmt, en el estudio de los microsatélites también han sido eliminadas aquellas muestras cuyo haplotipo mitocondrial se corresponde con el típico de abejas del linaje C y el tamaño muestral ha sido reducido a 15 individuos por población, tomados al azar.

Resultados

1. Variabilidad del ADNmt.

1.1. Las abejas de Murcia.

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 longitud 815, 619 y 573 pares de bases, y que se corresponden con tres combinaciones diferentes de las secuencias P₀ y Q (tabla 4).

Tras la digestión con la enzima *Dra*I de la región del espaciador intergénico amplificada se han encontrado tres haplotipos que difieren en el patrón de restricción de la región intergénica ARNt^{leu}-COII (fig. 9).

Tabla 4. Tamaño de los fragmentos de la región ARNt^{leu}-COII amplificados por PCR y de los fragmentos resultantes de su digestión con la enzima *Dra*I, y tipos de secuencias y haplotipos correspondientes.

Tamaño del fragmento de PCR (pares de bases)	Tipo de secuencia	Tamaño de los fragmentos de restricción (pares de bases)	Haplotipo
832	P ₀ QQ	47-109-676	A2
619	P ₀ Q	47-109-463	A1
563	Q	41-47-65-420	C1

Los haplotipos A1 y A2 pertenecen al linaje A de subespecies y razas africanas al incluir una secuencia de tipo P₀ y difieren entre si por el número de secuencias Q que contiene la región intergénica amplificada, una en el caso de A1 (P₀Q) y dos en el A2 (P₀QQ). El tercer haplotipo encontrado carece de secuencia P y tiene una sola secuencia Q, por lo que corresponde al linaje C procedente del este europeo e Italia. No se ha encontrado ningún haplotipo



correspondiente a la línea M de razas de abejas de Europa Occidental.

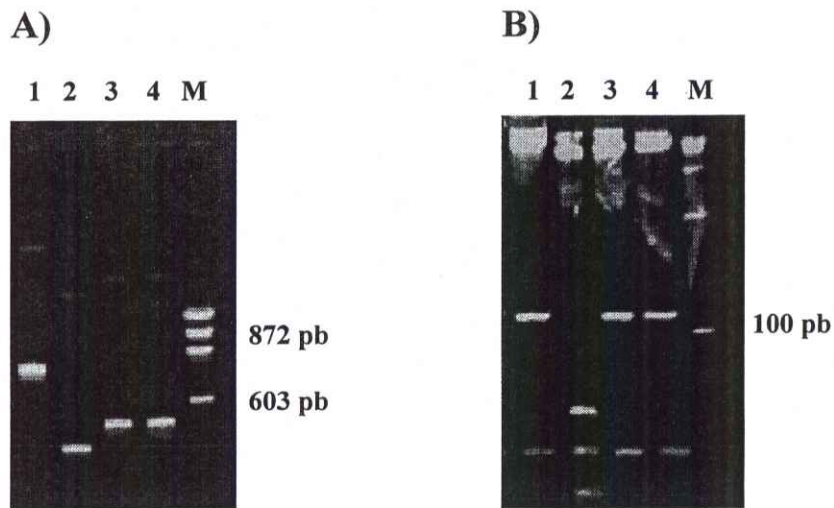


Figura 9. Patrones de restricción de la región intergénica ARNt^{leu}-COII del ADNmt de muestras de abejas de Murcia. (A) Gel de acrilamida al 5% que muestra los fragmentos grandes tras la digestión con *Dra*I. (B) Gel de acrilamida al 10% que muestra los fragmentos pequeños. La calle 1 corresponde al 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 pares de bases.

El haplotipo A2 es el más abundante en la muestra de abejas de Murcia, tiene una frecuencia de 0'888 en el total de colonias estudiadas y en seis localidades de las nueve estudiadas es el único haplotipo encontrado. El haplotipo A1 tiene una frecuencia de 0'088 y se ha encontrado en tres localidades. El haplotipo C1 se ha hallado en una sola colmena, por lo que su frecuencia es 0'022 en esta población (tabla 5).

Tabla 5. Distribución geográfica de los haplotipos de ADNmt en las distintas localidades muestreadas en Murcia, hallados mediante el test de *Dra* I (Garnery *et al.* 1993).

Localidad	Nº de colmenas	Haplotipos		
		A2	A1	C1
Abanilla (AB)	9	8	1	
Águilas (AG)	3	3		
Bullas (BU)	1	1		
Espinardo (ESP)	5	5		
Llano de Brujas (LL)	1	1		
Murcia (MU)	4	2	1	1
Santomera (SANT)	10	8	2	
La Unión (LU)	10	10		
Cieza (CI)	2	2		
Total	45	40 (88'8%)	4 (8'8%)	1 (2'2%)

Como se puede observar en la figura 10 la secuencia de los haplotipos A1 y A2 tiene la inserción de 17 pares de bases en la zona central de la secuencia P₀ al igual que *A. m. intermissa*. Por tanto, la población de abejas de Murcia muestreada se incluye en la raza *A. m. iberica* parecida a *intermissa*. Además hay otras 15 posiciones de la secuencia que son variables, nueve de las cuales son idénticas entre A1, A2 y *A. m. intermissa* y otras cuatro son iguales entre estos haplotipos y *A. m. mellifera*; en la posición 236, el haplotipo A1 tiene la misma base que *A. m. mellifera* y el A2 la misma que *A. m. intermissa*. Este último haplotipo presenta además una delección de una base que no aparece en ninguno de los otros tres casos.

		P/Po→				
(P)	A.m.mell.	TTAATAAATT	AATATAAAAA	ATAAAA	-----	-TATATTTAT
(Po)	A.m.inter.-	CAA	ATATAACAGA A.....
(Po)	A1-	CAA	ATATAACAAA A.....
(Po)	A2-	CAA	ATATAACAAA A.....
		Q→				
	A.m.mell.	TAAAAATTTA	ATTTATTAAA	ATTT-CCCAC	TTAATTCATA	TTAATTTAAA
	A.m.inter.A...A..C.....TG
	A1A..C.....
	A2A..C.....
	A.m.mell.	AATAAATTAA	ATAACAATTT	TTAATAAAAT	AAATAATTAA	TTTTATTTTT
	A.m.inter.	-.....-
	A1	-.....-
	A2	-.....-
	A.m.mell.	ATATTGAATT	TTAAATTCAA	TCTTAAAGAT	TTAATCTTTT	TATTAAAATT
	A.m.inter.T.....
	A1T.....
	A2T.....
	A.m.mell.	AATAAATTAA	TATAAAAAAT	AAAACAAAAT	ATAACAAAAT	ATATTTATTA
	A.m.inter.--G...
	A1--A...
	A2--G...
	A.m.mell.	AAATTTAATT	TATTAAA			
	A.m.inter.	...A.....			
	A1			
	A2			

Figura 10. Secuencia de los nucleótidos de la región intergénica ARN^{t_{leu}}-COII del ADN^{mt} de las subespecies *A. mellifera intermissa* y *A. m. mellifera* (Garnery *et al.* 1992), y de los haplotipos A1 y A2 encontrados en la Región de Murcia. Esta secuencia incluye la secuencia de tipo P, en el caso de *A. m. mellifera*, y la de tipo P₀, en el caso de *A. m. intermissa* y los haplotipos A1 y A2. También figura una secuencia Q, que se repite dos veces en el haplotipo A2. Los puntos indican que los nucleótidos son los mismos que los de *A. m. intermissa*; el guión (-) indica la falta o pérdida de bases. La delección que diferencia las dos formas de secuencia P₀ y P está encuadrada. Los nucleótidos en negrilla son la diana de restricción de la endonucleasa *Dra*I.



1.2. Las abejas de las Islas Canarias.

Después de la amplificación por PCR de la región intergénica tRNA^{leu}-COII, se observaron seis productos de diferente tamaño (tabla 6 y fig. 11 A). Uno de los tamaños corresponde al haplotipo con una sola secuencia Q típico del linaje C de abejas de Europa del Este, los otros haplotipos se corresponden con haplotipos de los linajes M o A. La digestión con la enzima *DraI* de los seis productos amplificados da lugar a cinco patrones de restricción diferentes (fig. 11 B), ya que dos de los fragmentos amplificados muestran el mismo patrón de restricción a pesar de tener diferente tamaño.

Tabla 6. Tamaño de los fragmentos de la región ARNt^{leu}-COII amplificados por PCR y de los fragmentos resultantes de su digestión con la enzima *DraI*, y tipos de secuencias y haplotipos correspondientes encontrados en abejas de las Islas Canarias.

Tamaño del fragmento de PCR (pares de bases)	Tipo de secuencia	Tamaño de los fragmentos de restricción (pares de bases)	Haplotipo
986	P ₁ QQQ	47-92-192-463	A15
794	P ₁ QQ	47-92-192-463	A14
602	P ₁ Q	47-92-463	A11
832	P ₀ QQ	47-785	A9
619	P ₀ Q	47-109-463	A1
563	Q	41-47-65-420	C1

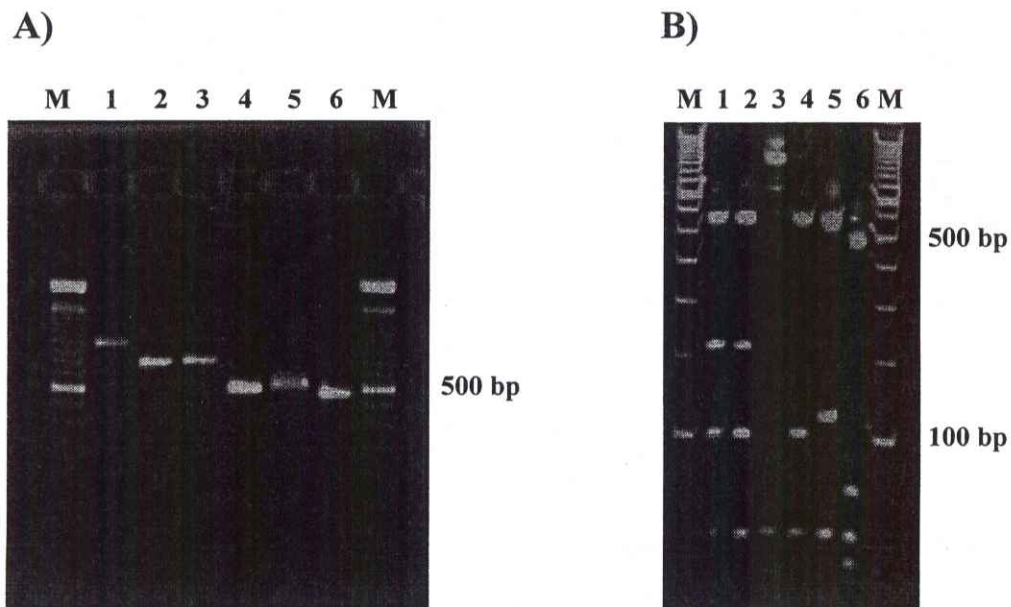


Figura 11. Análisis del ADNmt de abejas de las Islas Canarias. (A). Gel de agarosa al 2% mostrando los productos amplificados por PCR de la región intergénica ARNt^{leu}-COII. (B). Patrones de digestión de los productos amplificados tras la digestión con la enzima *DraI* separados en un gel de acrilamida al 8%. La calle 1 corresponde al haplotipo A15 (P₁QQQ), la 2 al haplotipo A14 (P₁QQ), la calle 3 es el haplotipo A9 (P₀QQ), la 4 es el patrón del haplotipo A11 (P₁Q), la 5 es el A1 (P₀Q) y la 6 el haplotipo C1 (Q). Las calles M en ambos gels corresponden al marcador de tamaño de 100 pares de bases.

Las muestras cuya región intergénica incluye una sola secuencia Q, corresponden al haplotipo C1 (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, etc). Tres de los haplotipos pertenecen al linaje A y han sido previamente descritos, son el A1, el A9 y el A11 (Garnery *et al.* 1993, 1995). Los otros dos son nuevos y han sido denominados A14 y A15. Estos nuevos haplotipos difieren entre si por el número de secuencias Q incluidas en su región intergénica, dos en el caso del A14 y tres en el A15, pero tienen el mismo patrón de restricción después del tratamiento con la enzima *DraI*.

El análisis de la secuencia de los nuevos haplotipos encontrados, indica que los haplotipos A11, A14 y A15 muestran una delección de 17 pares de bases en el extremo 3' de la secuencia P₀, por lo que este nuevo tipo de secuencia ha sido denominada P₁ (fig. 12). Otras catorce posiciones resultan ser variables entre los haplotipos secuenciados y las secuencias de *A. m. intermissa* y *mellifera*. De estas catorce posiciones, diez son como las de *A. m. intermissa*, tres como *A. m. mellifera* y una delección aparece en los haplotipos encontrados en las Islas Canarias y no en las otras dos secuencias.

De cada haplotipo encontrado se secuenciaron muestras procedentes de todas las islas sin que se hallara variación en la secuencia intergénica.

		P/P ₀ /P ₁ →				
(P)	A.m.mell.	TTAATAAATT	AATATAAAAA	ATAAAA	-----	TATATTTAT
(P ₀)	A.m.inter.-	CAA	ATATAACAGA A.....
(P ₁)	A15-	CAA	ATATAACAAA A.....
(P ₁)	A14-	CAA	ATATAACAAA A.....
(P ₁)	A11-	CAA	ATATAACAAA A.....
		Q→				
	A.m.mell.	TAAAAATTTA	ATTTATTAAA	ATTT-CCCAC	TTAATTCATA	TTAATTTAAA
	A.m.inter.A.....	A..C.....TG
	A15	A..C.....
	A14	A..C.....
	A11	A..C.....
	A.m.mell.	AATAAATTAA	ATAACAATTT	TTAATAAAAT	AAATAATTAA	TTTATTTTTT
	A.m.inter.	-.....-
	A15	-.....-
	A14	-.....-
	A11	-.....-
	A.m.mell.	ATATTGAATT	TTAAATTCAA	TCTTAAAGAT	TTAATCTTTT	TATTAAAATT
	A.m.inter.T.....
	A15T.....
	A14T.....
	A11T.....
	A.m.mell.	AATAAATTAA	TATAAAAAAT	AAAACAAAAT	ATAACAAAAT	ATATTTATTA
	A.m.inter.--G..
	A15--G..
	A14--G..
	A11--G..
	A.m.mell.	AAATTTAATT	TATTAAA			
	A.m.inter.	...A.....			
	A15			
	A14			
	A11			

Figura 12. Secuencia de los nucleótidos de la región intergénica ARNt^{leu}-COII del ADNmt de las subespecies *A. m. intermissa* y *A. m. mellifera* (Garnery *et al.* 1992) y de los haplotipos A11, A14 y A15, encontrados en abejas de las Islas Canarias. Esta secuencia incluye la secuencia de tipo P en el caso de *A. m. mellifera*, de tipo P₀ en el caso de *A. m. intermissa* y de tipo P₁ en el caso de los haplotipos A11, A14 y A15. También figura una sola secuencia Q, que se repite una vez en el haplotipo A11, dos en el haplotipo A14 y tres en el A15. Los puntos indican que los nucleótidos son los mismos que los de *A. m. intermissa*; el guión (-) indica la falta o pérdida de bases. Las deleciones que diferencian las tres formas de secuencia P₁, P₀ y P están encuadradas. Los nucleótidos en negrilla son la diana de restricción de la endonucleasa *Dra*I.



La distribución de haplotipos mitocondriales encontrados en las diferentes localidades e islas muestreadas se ha resumido en la tabla 7. El haplotipo A15 (P₁QQQ) es el más común de todos los haplotipos encontrados, tiene una frecuencia total de 0'472 y se ha detectado en todas las islas. La frecuencia de los otros haplotipos varía entre 0'009 y 0'254. Un 15'5% de las colmenas muestreadas, tienen el haplotipo C1 lo cual indica introducción de abejas del linaje C. Este resultado es especialmente importante en la isla de Tenerife, en donde un 35% de las colmenas muestreadas muestran este haplotipo.

Tabla 7. Número de colmenas (N) muestreadas y distribución de los haplotipos de ADNmt en las Islas Canarias.

Localidad	N	Haplotipos					
		A15	A14	A11	A9	A1	C1
Gran Canaria	24	10 (42%)	1 (4%)	3 (12'5%)	2 (8'25%)	6 (25%)	2 (8'25%)
Casa del Gallo	2			1		1	
Lomo Lucas	2		1	1			
La Abejarilla	5	1		1	1	1	1
El Gamonal	3				1	1	1
Dragonal Alto	5	5					
Ingenio Blanco	2	1				1	
El Línculo	3	2				1	
Los Ribanzos	1	1					
Las Rosas	1					1	
Tenerife	81	31 (38%)	9 (11%)			13 (16%)	28 (35%)

El Helecho	6				6
Arriba	3	1	1		1
El Cercado	5				5
La Quinta	2	2			
Taco	7	6			1
Polegre	4	4			
V. S. Lorenzo	2	2			
Tincer Bajo	4				4
S. Andrés	19	10	4		5
Los Ancones	6	4		2	
Las Arquillas	9			9	
V. Guerra	3	1	1		1
Monte	4		3	1	
Tegueste					
Hoyo de la Tierra	1	1			
Taller Apícola	4				4
La Orotava	1			1	
La Gomera	57	39	10	7	1
		(69%)	(16%)	(13%)	(2%)
La Poyata	15	10		5	
El Tabaibal	18	16	1		1
La Caleta	9	4	5		
"Manolo"	5	5			
Lomo	4	1	2	1	

Piedra Gorda	2	1				1	
El Palmar	3	1	2				
La Castellana	1	1					
La Palma	42	11	1			30	
		(26%)	(2%)			(72%)	
La Montaña	2	2					
Monte Breña	2	2					
El Pueblo	2	1				1	
Malpais	1					1	
El Molino	35	6	1			28	
El Hierro	17	14					3
		(82%)					(18%)
Betenama	1	1					
Tajase	5	4					1
Los Valles	1	1					
La Hoya	1						1
Regonzález	4	3					1
Tijimiraque	5	5					
total	220	105	20	3	2	56	34
		(47'7%)	(9'1%)	(1'4%)	(0'9%)	(25'4%)	(15'5%)

La diversidad más alta de haplotipos se encontró en Gran Canaria, en donde todos los haplotipos se encuentran presentes. Se ha observado un gradiente este-oeste de variabilidad de haplotipos, encontrándose mayor variabilidad en las islas orientales más próximas al continente africano. Los haplotipos A2 y A7, que fueron detectados en las poblaciones de abejas de estas islas en estudios anteriores (Garnery *et al.* 1993), no se encontraron en este caso. Sin embargo, el haplotipo A1 típico de poblaciones de abejas marroquíes, ha sido encontrado en un 25'4% de las colonias y los haplotipos A9 y A11 mostraron frecuencias similares a las que han sido descritas en poblaciones del sur peninsular (0'9% y 1'4% respectivamente, Garnery *et al.* 1993).

1.3. Las abejas de Tetuán.

La población de abejas muestreada en Tetuán (Marruecos) ha sido tomada como referencia para establecer las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de las Islas Canarias y la Península Ibérica. Se tomaron quince muestras de un colmenar correspondientes a las razas *A. m. major* y *A. m. intermissa*, que son propias del norte de Africa.

La amplificación de la región intergénica en estas muestras da lugar a dos productos de diferente tamaño y que corresponden a las combinaciones P_0QQ y P_0Q (tabla 8); en ambos casos el tipo de secuencia P_0 indica que esta población pertenece al linaje A de abejas africanas. La digestión con la enzima *DraI* da lugar a tres patrones distintos, dos de los cuales tienen el mismo tamaño y tipo de secuencia intergénica.

Tabla 8. Tamaño de los fragmentos de la región ARNt^{leu}-COII amplificados por PCR y de los fragmentos resultantes de su digestión con la enzima *Dra*I, y tipos de secuencias y haplotipos correspondientes. La frecuencia de cada haplotipo en la población de Tetuán se indica también.

Tamaño del fragmento de PCR (pares de bases)	Tipo de secuencia	Tamaño de los fragmentos de restricción (pares de bases)	Haplotipo	Frecuencia
832	P ₀ QQ	47-302-483	A13	15%
832	P ₀ QQ	47-785	A9	70%
639	P ₀ Q	47-109-483	A1	15%

El haplotipo más abundante es el A9 cuya frecuencia en la población es 0'7, la frecuencia de los haplotipos A1 y A13 es 0'15.

1.4. Análisis filogenético de las poblaciones de *Apis mellifera* de las tres regiones basado en el ADNmt.

En el total de las 280 colmenas muestreadas en Murcia, las Islas Canarias y Tetuán se han detectado seis haplotipos distintos correspondientes a las siguientes combinaciones de secuencias: P₁QQQ, P₁QQ, P₁Q, P₀QQ, P₀Q y Q. No se han hallado muestras con la secuencia de tipo P propia de las abejas del linaje M europeo occidental, ni tampoco se han detectado regiones en cuya secuencia hubieran más de tres copias de la secuencia Q. De los diferentes tipos de combinaciones de secuencias no se ha hallado ninguna que aparezca en las tres regiones muestreadas.

En la figura 13 se han representado los patrones de restricción de cada uno de los haplotipos analizados mediante la restricción con la enzima *Dra*I. La diferencia entre la secuencia P₁ y P₀ es la delección de 17 pares de bases situada

en el extremo 3' de este tipo de secuencia. Aquellas regiones intergénicas cuya longitud se corresponde a la combinación de secuencias P_0QQ , presentan secuencias de tipo Q cuya secuencia de nucleótidos difiere al menos en la presencia de un punto de restricción para la enzima *DraI*. En el caso de las regiones con secuencia de tipo P_1 , las dos o tres copias de la secuencia Q son iguales.

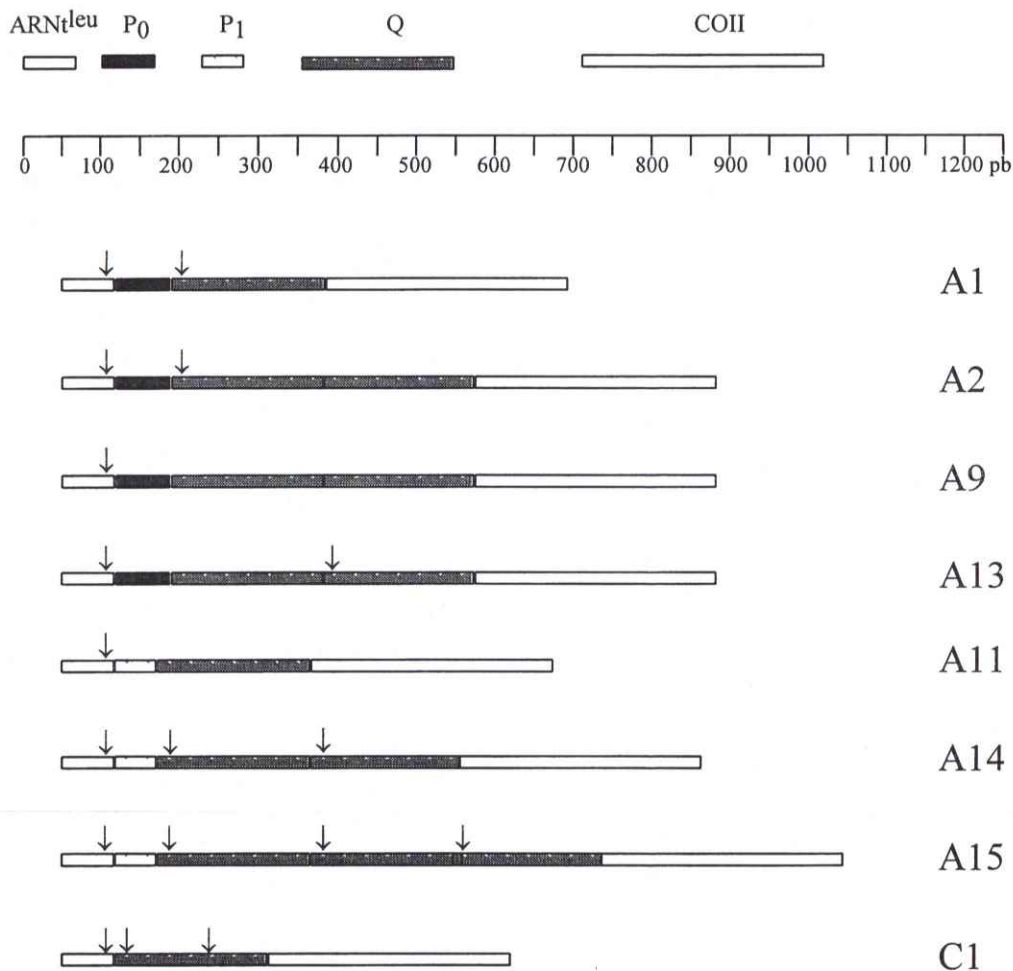


Figura 13. Representación de los diferentes haplotipos del ADNmt encontrados en las poblaciones de *A. mellifera* de Murcia, las Islas Canarias y Tetuán, según la composición de la región intergénica ARNt^{leu}-COII y su patrón de restricción con la enzima *DraI*. Los puntos de restricción están señalados con flechas.

La frecuencia de los haplotipos en cada una de las poblaciones estudiadas se ha recogido en la figura 14. Se han encontrado haplotipos de origen africano (A) en todas las poblaciones estudiadas. Los haplotipos con la secuencia de tipo P₁ se han encontrado exclusivamente en las poblaciones de las Islas Canarias, aunque la presencia del haplotipo A11 se ha descrito en poblaciones del sur y centro peninsular pero con una frecuencia muy baja (Garnery *et al.* 1995). El haplotipo de las razas de abejas de Europa oriental (C1) se ha detectado en todas las poblaciones excepto en la isla de La Palma y en la población de Tetuán. En Murcia su frecuencia es muy baja (2'2 %), pero, sin embargo, en Tenerife es casi tan abundante como el haplotipo A15 (A15: 38%, C1: 35%), que es el más común en el conjunto de todas las islas.

La figura 14 realizada siguiendo a Garnery *et al.* (1995) y Franck *et al.* (1998), ilustra la variación intrapoblacional. Dentro de cada población, cada haplotipo mitocondrial se ha representado como un círculo cuyo radio es proporcional a la frecuencia de dicho haplotipo en la población. Los haplotipos están relacionados entre si con líneas horizontales, lo cual indica que difieren en la posición de los puntos de restricción o en la presencia o ausencia de pequeñas deleciones o inserciones, y/o con líneas verticales, lo que indica que se diferencian por el número de secuencias de tipo Q que hay presentes en la región intergénica de cada haplotipo. Los haplotipos de diferentes linajes no están unidos, ya que son muy divergentes (divergencia mayor del 2% para la molécula completa de ADNmt, Garnery *et al.* 1993).

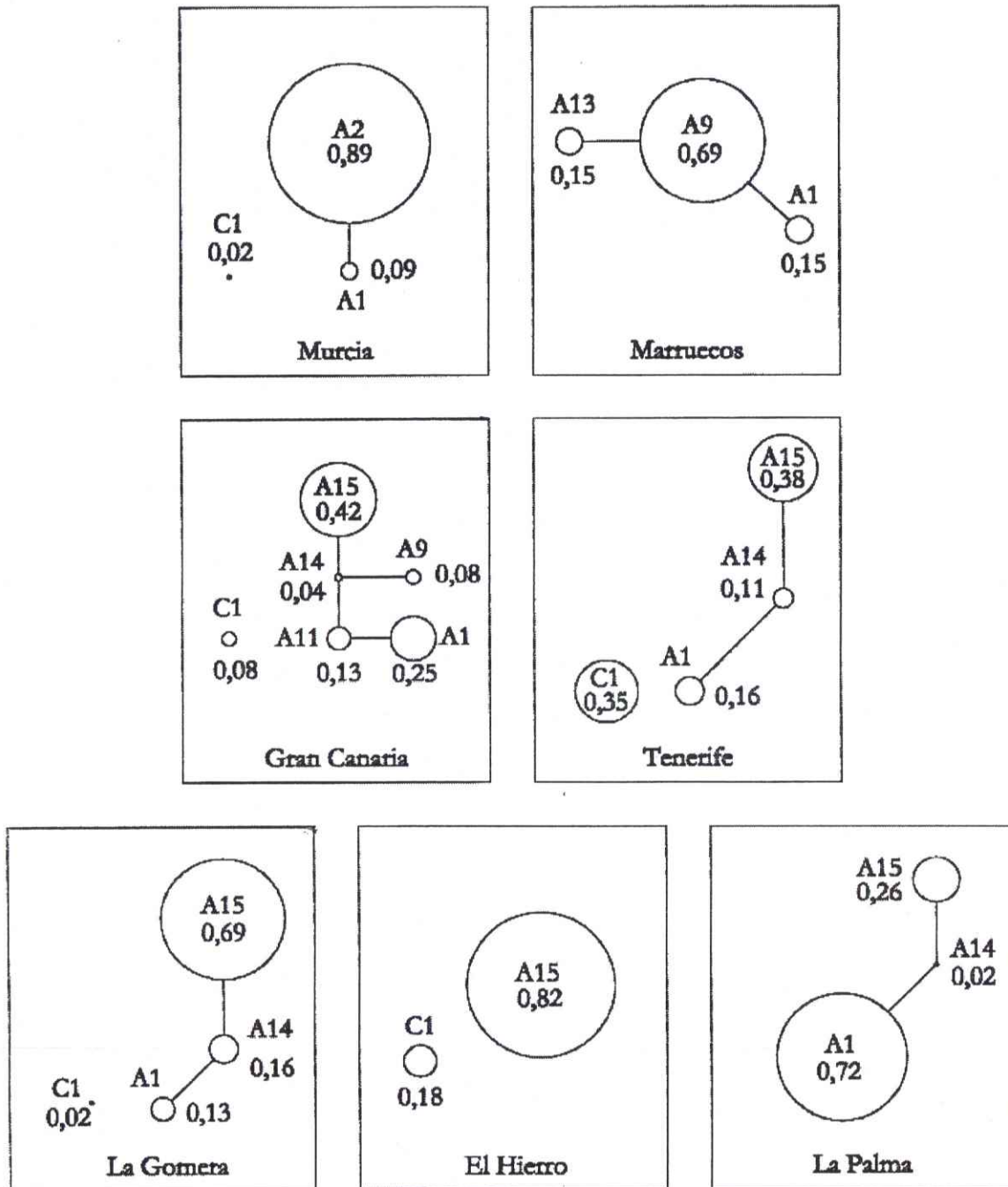


Figura 14. Relaciones de los haplotipos mitocondriales en las siete poblaciones estudiadas.

La relación establecida entre los haplotipos encontrados en Murcia es muy sencilla. Basicamente se trata de un haplotipo muy frecuente, el A2, relacionado con el A1, que se puede considerar raro por su baja frecuencia, por

un solo proceso mutacional que es la inserción de una secuencia de tipo Q ($A1=P_0Q$ y $A2= P_0QQ$).

En Marruecos esta relación tampoco es muy complicada ya que se trata de tres haplotipos, uno de ellos con una sola secuencia Q, relacionado con otros dos con dos secuencias Q y que difieren entre si por la posición de un punto de restricción.

Sin embargo, en las Islas Canarias las relaciones son más complejas. Cuanto más cerca se encuentra la isla al continente africano mayor es la diversidad de haplotipos, como ocurre en Gran Canaria, lo cual sugiere múltiples orígenes de los haplotipos allí encontrados (Garnery *et al.* 1995). Como contraste, en la isla de El Hierro se han encontrado sólo dos haplotipos pertenecientes a diferentes linajes de subespecies y con una frecuencia muy distinta (A15, 82% y C1, 18%), lo que sugiere unas relaciones más sencillas.

El haplotipo más frecuente en Murcia, el A2, está ausente en las otras regiones. Por su parte, las Islas Canarias no comparten con las otras regiones los haplotipos A15 (que es el más común en todas las islas excepto en La Palma), el A14 y el A11. El haplotipo A1 aparece en todas las poblaciones excepto en El Hierro y es el más abundante en La Palma (frecuencia de 72%). El haplotipo A9, más frecuente en la población de Tetuán, también se ha encontrado en Gran Canaria, aunque por su baja frecuencia puede ser considerado raro. El haplotipo A13 aparece únicamente en Tetuán.

La filogenia de los ocho haplotipos encontrados en el conjunto de las poblaciones muestreadas de las Islas Canarias, Murcia y Marruecos ha sido establecida mediante el método de máxima parsimonia con un valor de

bootstrap de 2000 iteraciones. La filogenia obtenida está basada en seis caracteres (5 puntos de restricción diferentes y la delección situada en el extremo 3' de la secuencia P).

El árbol consenso obtenido confirma la separación de aquellos haplotipos que contienen la secuencia de tipo P₁ (fig. 15), que aparecen formando un clado soportado por un valor de bootstrap de 100. El haplotipo A9, que es el más abundante en el norte de Marruecos, forma un clado con el haplotipo A13, cuya frecuencia es muy baja en Marruecos y no aparece en el sur peninsular. Este clado también aparece soportado por un alto valor de bootstrap de 100. La filogenia obtenida con este método no discierne la posición de los haplotipos A1 y A2 con respecto a los otros haplotipos, de forma que no se puede aclarar si los haplotipos con secuencia P₁ están más próximos, filogenéticamente, al haplotipo más común en el sur peninsular o al A1, más común en el norte de Marruecos.

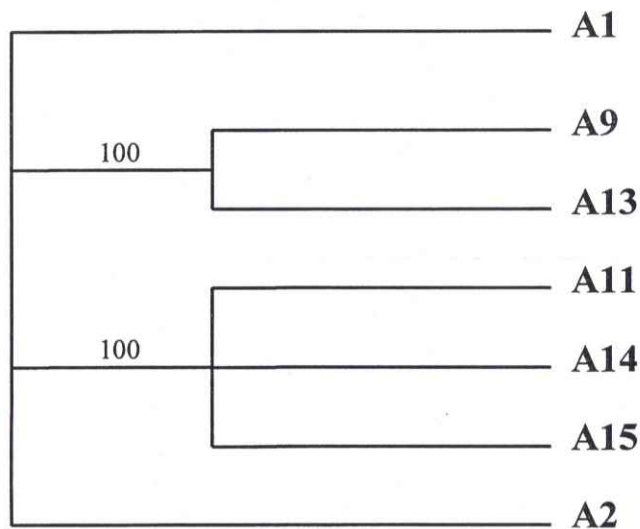


Figura 15. Árbol consenso de los haplotipos mitocondriales generado por el método de máxima parsimonia tras 2000 iteraciones.

Las relaciones filogenéticas basadas en el ADNmt, se han obtenido siguiendo los métodos filogenéticos de máxima parsimonia con datos de

presencia/ausencia de los haplotipos en cada población, y con el de máxima probabilidad con datos sobre la frecuencia de cada haplotipo. El tamaño de las muestras se ha reducido a 15 individuos tomados al azar en cada población. En la fig.16 se pueden observar los árboles consenso obtenidos tras 2000 iteraciones.

La topología de ambos árboles confirma la separación de las poblaciones insulares respecto de las continentales, tanto de la peninsular de Murcia como de la africana de Tetuán. Ello se refleja en los altos valores de bootstrap obtenidos en ambos árboles (60 en el más parsimonioso y 100 en el más probable). Se puede observar cierto grado de diferenciación genética entre las poblaciones de las Islas Canarias en función de las distancias geográficas entre ellas. Así, en el árbol generado con el método de máxima probabilidad (fig. 16 A), las islas que se hayan más cercanas como La Gomera y El Hierro, aparecen más próximas mientras que la población de La Palma se encuentra en una posición intermedia entre Gran Canaria y Tenerife. La población de Gran Canaria es la que aparece más alejada ocupando una posición más basal con respecto a las demás islas.

En el árbol más parsimonioso (fig. 16 B), es la isla de El Hierro la que aparece en una posición más alejada. La filogenia obtenida con el método de máxima probabilidad parece más interesante en este caso, puesto que se tiene en cuenta no solo la presencia o ausencia de los haplotipos, sino también su frecuencia en la población.

Estas poblaciones insulares aparecen más próximas a la población de *A. m. iberica* de Murcia que a la mezcla de *A. m. intermissa* y *A. m. major* de Tetuán, tomada como representativa de las poblaciones de Africa.

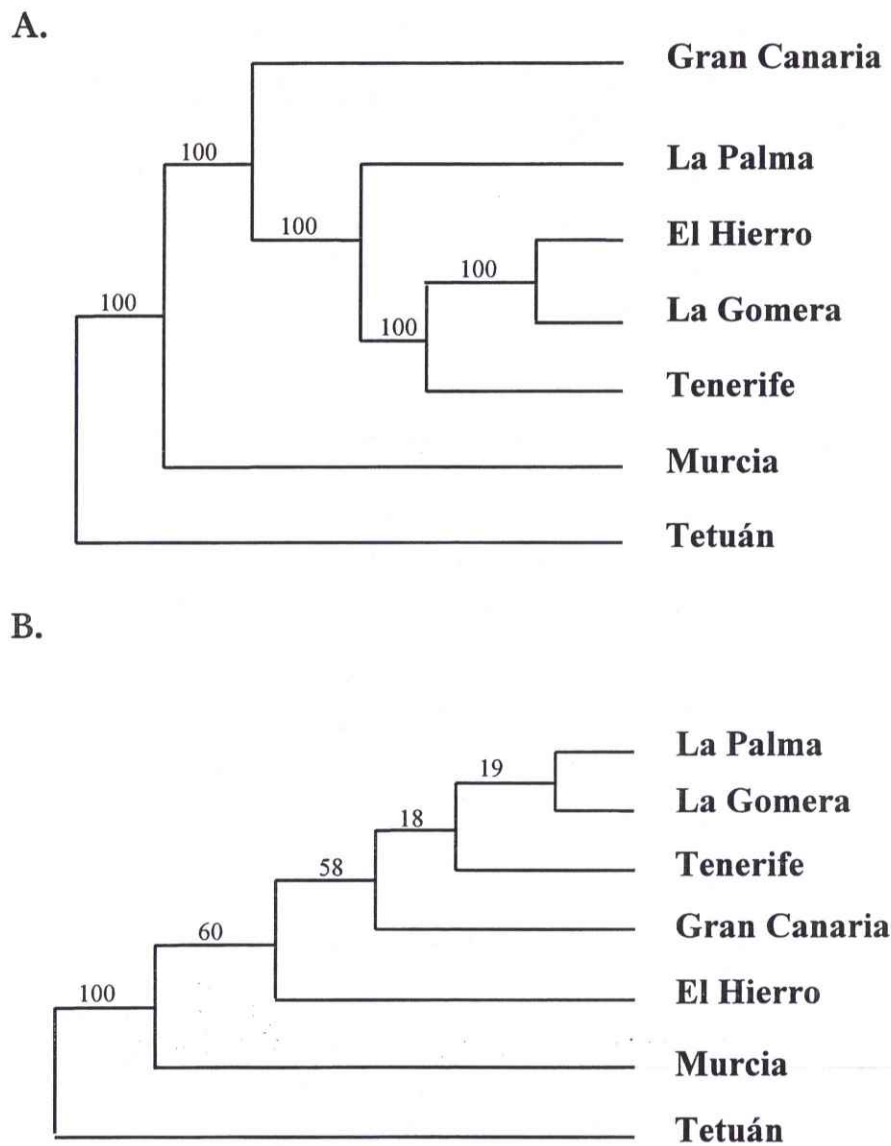


Figura 16. Análisis filogenético de las poblaciones de abejas de las Islas Canarias, Murcia y Tetuán basado en el ADNmt. (A). Árbol generado mediante el método de máxima probabilidad. (B). Árbol generado mediante el método de máxima parsimonia. Los valores de “bootstrap” han sido calculados con 2000 iteraciones.

2. Variabilidad de los microsátélites.

2.1. Las abejas de Murcia.

Los resultados del estudio realizado sobre los loci de microsátélites, se resumen en la tabla 9. La localidad de Bullas ha sido excluida de este análisis, ya que sólo se consiguió una muestra que no amplificó bien algunos de los loci estudiados; así mismo, la muestra de Murcia que presentó un haplotipo mitocondrial típico de abejas del este de Europa, también ha sido excluida.

En la tabla 9 se especifica el número de individuos analizados ya que algunas muestras no amplificaron algunos de los microsátélites estudiados.

Tabla 9. Variabilidad de microsátélites en poblaciones de *A. mellifera iberica* de Murcia. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (H_o) y esperada (H_e) por locus y por localidad. El número de individuos (n) analizados por localidad se indica entre paréntesis. Las siglas usadas se especifican en la tabla 5 (pb significa pares de bases).

Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
B124	(pb)	(n=10)	(n=3)	(n=10)	(n=4)	(n=3)	(n=2)	(n=7)	(n=2)	(n=41)
	218	0'100		0'100						0'049
	220	0'350	0'167	0'400		0'500	0'250	0'357	0'250	0'317
	222	0'200	0'333	0'200	0'500	0'333		0'214	0'500	0'256
	224	0'100	0'167	0'050				0'286	0'250	0'110
	226	0'050	0'167	0'050	0'375		0'250			0'085
	228	0'100		0'100		0'167	0'500	0'071		0'098
	230	0'100		0'050				0'071		0'049
	232		0'167		0'125					0'024
	234			0'050						0'012
H_o		0'700	1'000	0'800	0'750	0'333	1'000	0'857	1'000	0'785
H_e		0'836	0'933	0'811	0'678	0'733	0'833	0'791	0'833	0'809

Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A113	(pb)	(n=10)	(n=3)	(n=20)	(n=8)	(n=6)	(n=4)	(n=12)	(n=4)	(n=40)
	200			0'250				0'083		0'075
	206					0'167				0'013
	218	0'650	0'833	0'300	0'750	0'167	0'500	0'500	0'250	0'500
	220			0'200		0'333	0'250	0'167	0'250	0'125
	222	0'300	0'167	0'200	0'125			0'083	0'250	0'175
	224	0'050				0'167			0'250	0'038
	226						0'250	0'167		0'038
	232					0'167				0'013
	234			0'050						0'013
	236				0'125					0'013
Ho		0'300	0'333	0'500	0'500	0'667	1'000	0'667	1'000	0'525
He		0'511	0'333	0'805	0'464	0'933	0'833	0'742	1'000	0'704
Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A7	(pb)	(n=9)	(n=3)	(n=18)	(n=8)	(n=4)	(n=6)	(n=14)	(n=4)	(n=39)
	100	0'111						0'071		0'038
	102	0'167		0'167		0'250				0'090
	106	0'500	1'000	0'778	0'875	0'750	0'667	0'786	1'000	0'744
	108	0'167		0'056				0'071		0'064
	109	0'056						0'071		0'026
	110				0'125					0'013
	116						0'333			0'026
Ho		0'667	0'000	0'222	0'250	0'500	0'000	0'428	0'000	0'333
He		0'719	0'000	0'386	0'250	0'500	0'533	0'395	0'000	0'438
Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A35	(pb)	(n=10)	(n=3)	(n=20)	(n=10)	(n=6)	(n=6)	(n=18)	(n=4)	(n=45)
	96	0'100								0'022
	104	0'050								0'011
	108				0'100					0'056
	110			0'150	0'100			0'056		0'322
	112	0'350	0'667	0'250	0'400	0'333	0'333	0'222	0'250	0'022



	114			0'100						0'200
	116	0'200	0'167	0'150	0'200		0'500	0'222	0'250	0'156
	118	0'100	0'167	0'250		0'167	0'167	0'167	0'250	0'122
	120	0'100		0'100	0'100	0'333		0'222		0'078
	122	0'100			0'100	0'167		0'111	0'250	0'011
Ho		0'900	0'667	1'000	1'000	1'000	0'667	0'667	1'000	0'867
He		0'837	0'600	0'853	0'844	0'867	0'733	0'856	1'000	0'816
Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A28	(pb)	(n=10)	(n=3)	(n=20)	(n=10)	(n=6)	(n=6)	(n=18)	(n=4)	(n=45)
	127						0'167	0'056		0'022
	128	0'950	1'000	0'950	1'000	0'833	0'833	0'944	1'000	0'944
	131					0'167				0'011
	140	0'050		0'050						0'022
Ho		0'100	0'000	0'100	0'000	0'333	0'333	0'111	0'000	0'111
He		0'100	0'000	0'100	0'000	0'333	0'333	0'111	0'000	0'108
Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A24	(pb)	(n=10)	(n=3)	(n=20)	(n=10)	(n=6)	(n=6)	(n=18)	(n=4)	(n=45)
	98	0'800	0'833	0'700	0'800	0'833	1'000	0'833	0'250	0'778
	100			0'100						0'022
	102			0'050						0'011
	104				0'100			0'056	0'250	0'033
	106	0'100						0'111	0'500	0'067
	108	0'100	0'167	0'100		0'167				0'067
	118			0'050	0'100					0'022
Ho		0'300	0'333	0'400	0'400	0'333	0'000	0'222	1'000	0'333
He		0'358	0'333	0'511	0'378	0'333	0'000	0'307	0'833	0'388
Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A88	(pb)	(n=10)	(n=3)	(n=20)	(n=10)	(n=6)	(n=6)	(n=18)	(n=4)	(n=45)
	134	0'050								0'011
	136				0'100					0'011
	138	0'900	1'000	0'950	0'900	0'667	1'000	1'000	1'000	0'933
	140	0'050				0'333				0'033



	144			0'050						0'011
Ho		0'100	0'000	0'100	0'200	0'000	0'000	0'000	0'000	0'067
He		0'195	0'000	0'100	0'200	0'533	0'000	0'000	0'000	0'129
Locus	Alelo	LU	MUR	SANT	ESP	AG	LL	AB	CI	Pobl.
A8	(pb)	(n=9)	(n=3)	(n=20)	(n=10)	(n=6)	(n=6)	(n=18)	(n=4)	(n=44)
	163	0'833	0'833	1'000	1'000	0'500	1'000	0'889	1'000	0'898
	165							0'111		0'023
	171	0'056	0'167			0'500				0'057
	178	0'111								0'023
Ho		0'111	0'333	0'000	0'000	0'333	0'000	0'000	0'000	0'068
He		0'307	0'333	0'000	0'000	0'600	0'000	0'209	0'000	0'192

En todos los loci estudiados se han encontrado alelos de diferente tamaño, aunque algunos de ellos son monomórficos en algunas localidades. Los loci A113 y A35 con 10 alelos, y B124 con 9, mostraron un alto nivel de polimorfismo; siete alelos de diferente tamaño fueron detectados en los loci A7 y A24, 5 en los loci A88 y A28 y 4 en el A8, siendo el número medio observado de alelos en toda la población $7 \pm 2'507$. Por localidades, es en El Llano de Brujas en donde este valor es el más bajo ($2 \pm 0'926$) y en La Unión en donde se ha encontrado el valor máximo de número medio de alelos observado ($4'125 \pm 1'959$) (fig. 17 A).

En la población completa de Murcia, el número efectivo medio de alelos es $2'539 \pm 1'715$ para la población completa. Este valor es $1'707 \pm 1'177$ en la localidad de Murcia y $2'574 \pm 1'748$ en Santomera.

La frecuencia de alelos de microsatélites no mostró alejamiento del equilibrio Hardy-Weinberg en ningún locus ($0'06 < p < 0'99$), ni en ninguna localidad muestreada ($0'07 < p < 1$), siendo 0'69 el valor exacto de la probabilidad de

error cuando se rechaza la hipótesis nula que postula la unión al azar de los gametos, para toda la población y todos los loci.

La probabilidad de que las colonias de abejas de cada localidad formaran una población diferente de abejas, fue estimada usando el test exacto de Fischer para la diferenciación de poblaciones, y dio únicamente un resultado significativo en el locus A113 ($p = 0'008$).

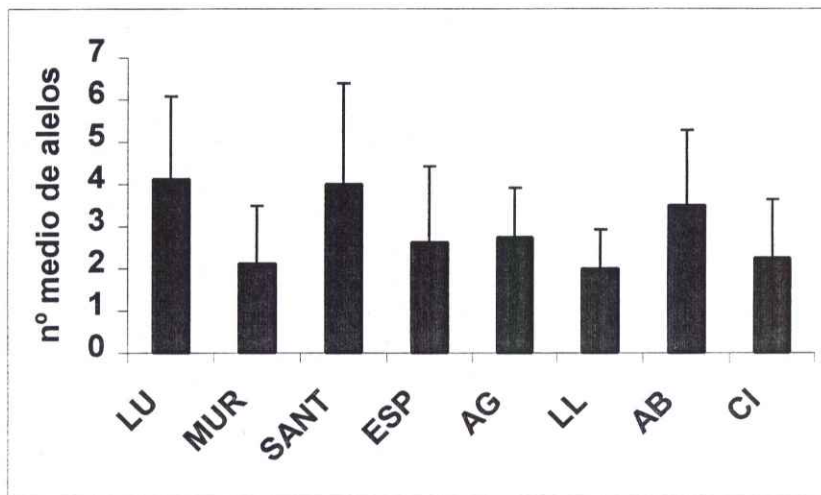
El desequilibrio genotípico entre cada par de loci fue analizado mediante el test exacto en cada población y dió 93 valores posibles de los cuales dos son significativos ($p < 0'06$). Con un valor de error del 5%, se esperarían 5 valores significativos, por lo que este resultado entra dentro de lo esperado. El valor exacto de probabilidad para cada par de loci en toda la población no dio ningún resultado significativo ($p > 0'33$), en ninguna de las 28 combinaciones posibles.

El patrón de variabilidad de los diferentes alelos es similar en cada localidad estudiada; el alelo de 138 pares de bases del locus A88 está fijado en las poblaciones de Murcia, Llano de Brujas, Abanilla y Cieza y es el más frecuente en las demás localidades (frecuencia $> 0'667$); en los alelos de 128 pb del locus A28, de 106 del locus A7 y de 163 del locus A8, el patrón es muy similar al descrito anteriormente.

De 64 combinaciones posibles (locus por localidad), 10 mostraron una proporción de heterocigotos de 1, lo cual indica que en cada cromosoma muestreado en una localidad dada, se encontró un alelo distinto en ese locus. En 17 combinaciones la proporción de heterocigotos fue 0, es decir, se encontró el mismo alelo en cada cromosoma. Este resultado es especialmente frecuente en los loci A88, A8 y A28. La proporción media de heterocigotos

observada no es muy diferente de la esperada salvo en el caso de Águilas (fig. 17 B). La heterocigosidad observada es $0'385 \pm 0'314$ para toda la población y varía entre $0'333 \pm 0'356$ (Murcia) y $0'5 \pm 0'535$ (Cieza). La heterocigosidad media esperada como medida de diversidad de genes es $0'448 \pm 0'297$ en la población total y varía entre $0'317 \pm 0'33$ que aparece en Murcia y $0'604 \pm 0'226$ que se ha encontrado en Águilas.

A.



B.

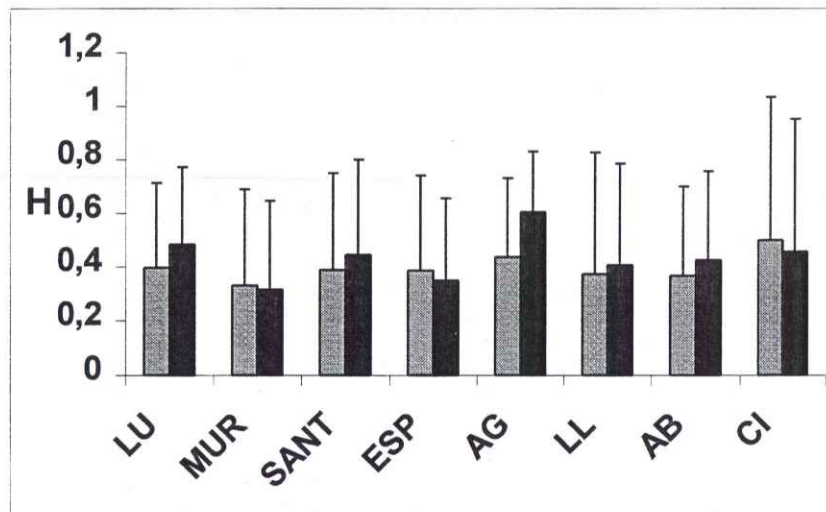


Figura 17. Variación de los microsatélites de la población de *A. m. iberica* de Murcia. (A). Número medio observado de alelos por localidad. (B). Heterocigosidad observada (gris) y esperada (negro) en cada apiario muestreado.

2.2. Las abejas de las Islas Canarias.

Los resultados de la variación de los microsátélites de las localidades muestreadas en las Islas Canarias se recogen en las tablas 10-15. Aquellas muestras cuyo haplotipo mitocondrial corresponde al de las razas de abejas de Europa oriental han sido excluidas, para realizar un análisis restringido únicamente a las poblaciones de abejas en las que se supone que no ha habido introducción reciente o importación de abejas de otras razas.

El número máximo de alelos encontrado en un locus individualmente es 11 para en el locus B124 en la isla de La Gomera y el mínimo es uno en el locus A28 en la isla de La Palma. El número medio de alelos para todos los loci es $8'75 \pm 2'816$ en la muestra completa de las cinco islas, por islas este valor es mínimo en El Hierro ($3'5 \pm 1'604$) y es en La Gomera en donde se ha encontrado el valor más alto del número medio de alelos en los ocho loci ($5'875 \pm 3'182$) (fig. 18 A). El número medio efectivo de alelos como valor de homocigosidad observada es, para todas las poblaciones canarias, $2'487 \pm 1'339$ y varía entre $1'760 \pm 0'764$ que se ha encontrado en El Hierro y $2'556 \pm 1'402$ en La Gomera.

Tabla 10. Variabilidad de microsatélites de *A. mellifera* de Gran Canaria. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (Ho) y esperada (He) por locus y por localidad. El número de individuos analizados por localidad se indica entre paréntesis.

Locus	Alelo	Casa (n=2)	Lomo (n=2)	Abejarilla (n=2)	Gamonal (n=2)	Dragonal (n=3)	Ingenio (n=2)	Línculo (n=1)	Ríbanzos (n=1)	Rosas (n=0)	Pobl. (n=15)
B124	(pb)										
	212	0'500	0'250			0'167					0'133
	220	0'500	0'250		0'250	0'167			0'500		0'200
	224			0'500	0'500	0'333	0'500	0'500			0'300
	226			0'500							0'067
	228		0'500					0'500	0'500		0'167
	230					0'167	0'250				0'033
	232				0'250	0'167	0'250				0'100
Ho		1'000	0'500	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	-	0'867
He		0'667	0'833	0'667	0'833	0'933	0'833	1'000	1'000	-	0'837
Locus	Alelo	Casa (n=0)	Lomo (n=0)	Abejarilla (n=4)	Gamonal (n=2)	Dragonal (n=4)	Ingenio (n=2)	Línculo (n=3)	Ríbanzos (n=1)	Rosas (n=0)	Pobl. (n=16)
A113	(bp)										
	200							0'167			0'031
	208					0'125					0'031
	212					0'125					0'031
	218			0'500	0'750	0'375	0'500	0'500	1'000		0'531

222				0'250	0'375	0'500	0'167			0'250	
224				0'250	0'250		0'167			0'125	
Ho	-	-	1'000	0'500	1'000	0'000	1'000	0'000	0'000	-	0'750
He	-	-	0'714	0'500	0'786	0'667	0'800	0'000	0'000	-	0'657
Locus	Alelo	Casa	Lomo	Abejarilla	Gamonal	Dragonal	Ingenio	Línculo	Ribanzos	Rosas	Pobl.
A7	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=1)	(n=19)
100							0'250				0'026
102			0'500	0'375		0'500	0'500	0'167	0'500	0'500	0'342
106		1'000	0'500	0'625	1'000	0'500	0'250	0'833	0'500	0'500	0'631
Ho	0'000	0'000	1'000	0'750	0'000	0'500	1'000	0'333	1'000	1'000	0'579
He	0'000	0'000	1'000	0'536	0'000	0'571	0'833	0'333	1'000	1'000	0'496
Locus	Alelo	Casa	Lomo	Abejarilla	Gamonal	Dragonal	Ingenio	Línculo	Ribanzos	Rosas	Pobl.
A35	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=4)	(n=2)	(n=4)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=1)	(n=19)
96				0'125	0'750		0'750	0'750			0'263
100						0'125					0'026
112							0'250				0'053
116		0'500	1'000	0'625		0'625		0'250	0'500	0'500	0'474
118					0'250				0'500	0'500	0'026
120		0'500				0'125					0'079

122		0'250	0'125							0'079	
Ho		0'000	0'500	0'500	0'500	0'500	0'500	1'000	1'000	0'474	
He		0'667	0'607	0'643	0'500	0'500	0'500	1'000	1'000	0'708	
Locus	Alelo	Casa	Lomo	Abejarilla	Gamonal	Dragonal	Ingenio	Linculo	Ribanzos	Rosas	Pobl.
A28	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=4)	(n=2)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=1)	(n=21)
128		1'000	0'750	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	0'976
131			0'250								0'024
Ho		0'000	0'500	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'047
He		0'000	0'500	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'047
Locus	Alelo	Casa	Lomo	Abejarilla	Gamonal	Dragonal	Ingenio	Linculo	Ribanzos	Rosas	Pobl.
A24	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=4)	(n=2)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=1)	(n=20)
98		1'000	0'500	0'750	0'750	0'875	0'750	0'667	1'000	0'500	0'775
100								0'333			0'050
106			0'500	0'250	0'250	0'125	0'250			0'500	0'175
Ho		0'000	1'000	0'500	0'500	0'250	0'500	0'000	0'000	1'000	0'350
He		0'000	1'000	0'429	0'500	0'250	0'500	0'533	0'000	1'000	0'376
Locus	Alelo	Casa	Lomo	Abejarilla	Gamonal	Dragonal	Ingenio	Linculo	Ribanzos	Rosas	Pobl.
A88	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=4)	(n=2)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=1)	(n=21)
135							0'500				0'047

138	1'000	1'000	1'000	1'000	0'750	0'500	1'000	1'000	1'000	0'905	
144					0'125					0'047	
H _o	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	
H _e	0'000	0'000	0'000	0'000	0'428	0'667	0'000	0'000	0'000	0'181	
Locus	Alelo	Casa	Lomo	Abejarilla	Gamonal	Dragonal	Ingenio	Línculo	Ribanzos	Rosas	Pobl.
A ₈	(n=0)	(n=0)	(n=0)	(n=3)	(n=2)	(n=4)	(n=1)	(n=1)	(n=0)	(n=1)	(n=12)
163				0'667	1'000	0'750	0'500	0'500	1'000	0'750	
170						0'125				0'042	
171				0'333		0'125		0'500		0'167	
173							0'500			0'042	
H _o	-	-	-	0'000	0'000	0'500	1'000	1'000	-	0'000	0'333
H _e	-	-	-	0'533	0'000	0'464	1'000	1'000	-	0'000	0'424

Tabla 11. Variabilidad de microsatélites en *A. mellifera* de Tenerife. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (Ho) y esperada (He) por locus y por localidad. El número de individuos analizados por localidad se indica entre paréntesis.

Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	S. Andrés	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
B124	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=6)	(n=2)	(n=1)	(n=13)	(n=3)	(n=6)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=38)
	218			0'083									0'013
	220	0'250	0'250	0'250			0'231		0'250	0'500	0'500	0'500	0'211
	222						0'038						0'013
	224	0'500	0'500	0'500	1'000	0'500	0'115	0'667	0'500	0'500		0'500	0'368
	226						0'308		0'083	0'250			0'132
	228						0'077						0'026
	230					0'500		0'167		0'250			0'039
	232	1'000		0'083			0'231	0'167	0'167	0'500			0'171
	234		0'250	0'083									0'026
Ho		0'000	1'000	0'833	0'000	1'000	1'000	0'333	0'833	1'000	0'500	1'000	0'789
He		0'000	0'833	0'727	0'000	1'000	0'800	0'600	0'712	1'000	0'833	1'000	0'771
Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	S. Andrés	Ancones	Arquilla	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
A113	(bp)	(n=1)	(n=1)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=13)	(n=5)	(n=8)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=45)
	212						0'038						0'011
	214							0'100					0'011

218	0'500	0'500	0'583	0'250	0'500	0'538	0'600	0'563	0'500	0'500	1'000	0'544	
220			0'083		0'250	0'077						0'044	
222	0'250	0'250	0'250	0'500	0'231	0'313	0'500	0'167	0'233				
224	0'250	0'500	0'083	0'250	0'077	0'063	0'300	0'333	0'133				
226						0'063			0'011				
230					0'038				0'011				
Ho	0'000	1'000	0'667	1'000	0'500	0'769	0'600	0'750	1'000	0'667	0'000	0'733	
He	0'000	1'000	0'636	0'833	0'833	0'689	0'600	0'617	0'667	0'733	0'000	0'643	
Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	Andres	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
A7	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=14)	(n=5)	(n=9)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=47)
102			0'167	0'250	0'071	0'100	0'167						0'096
104		0'500	0'083		0'107	0'200							0'074
106	0'750	0'500	0'750	0'750	1'000	0'821	0'700	0'833	1'000	1'000	1'000	0'819	
110	0'250												0'011
Ho	1'000	1'000	0'500	0'500	0'000	0'428	0'600	0'333	0'000	0'000	0'000	0'383	
He	0'833	1'000	0'439	0'500	0'000	0'370	0'511	0'284	0'000	0'000	0'000	0'333	
Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	Andres	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
A35	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=13)	(n=3)	(n=9)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=44)
92		0'250											0'012

96									0'056															0'012
100											0'042													0'012
110												0'250												0'012
112											0'083													0'081
114											0'083													0'047
116											0'500													1'000
118											0'167													0'233
120											0'125													0'070
122																								0'023
Ho											0'769													0'000
He											0'726													0'000
	Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	Andres	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.										
A28	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=14)	(n=6)	(n=9)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=49)										
128		1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	0'893	1'000	0'944	1'000	1'000	1'000	0'959										
135								0'107		0'056				0'041										
Ho								0'143		0'111				0'061										
He								0'138		0'111				0'060										

Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	Andres	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
A24	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=14)	(n=6)	(n=9)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=49)
	98	0'500	1'000	0'500	0'500	0'750	0'393		0'111	1'000	0'333	1'000	0'388
	100	0'500		0'333	0'500		0'571	1'000	0'889		0'333		0'551
	106			0'167		0'250	0'036				0'167		0'051
	108										0'167		0'010
Ho		0'000	0'000	0'333	0'000	0'500	0'071	0'000	0'000	0'000	0'333	0'000	0'102
He		0'667	0'000	0'667	0'667	0'500	0'553	0'000	0'209	0'000	0'867	0'000	0'555
Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	Andres	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
A88	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=12)	(n=5)	(n=9)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=46)
	135		0'250										0'011
	138	1'000	0'750	1'000	1'000	1'000	0'667		0'111	1'000	1'000	1'000	0'620
	140						0'125	0'400	0'667				0'207
	141						0'125						0'033
	144							0'200					0'022
	148						0'042	0'200	0'222				0'076
	150						0'042						0'011
	152							0'200					0'022
Ho		0'000	0'500	0'000	0'000	0'000	0'083	0'000	0'444	0'000	0'000	0'000	0'130

He	0'000	0'500	0'000	0'000	0'000	0'431	0'800	0'523	0'000	0'000	0'000	0'549	
Locus	Alelo	Arriba	Quinta	Taco	Polegre	Lorenzo	Andres	Ancones	Arquillas	Guerra	Tegueste	Teide	Pobl.
A8	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=14)	(n=6)	(n=9)	(n=1)	(n=3)	(n=1)	(n=48)
163	0'750	0'750	0'667	0'500	1'000	0'893	0'750	0'778	1'000	0'500	0'802		
171	0'250	0'250	0'250	0'250	0'036	0'167	0'222			0'500	0'135		
173		0'250	0'071								0'031		
175			0'083				0'083				0'021		
177				0'250							0'010		
Ho	0'500	0'500	0'333	0'500	0'000	0'143	0'500	0'444	0'000	0'000	0'313		
He	0'500	0'500	0'530	0'833	0'000	0'140	0'439	0'366	0'000	0'000	0'324		



Tabla 12. Variabilidad de microsatélites en *A. mellifera* de La Gomera. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (Ho) y esperada (He) por locus y por localidad. El número de individuos analizados por localidad se indica entre paréntesis.

Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
B124	(bp)	(n=15)	(n=11)	(n=8)	(n=6)	(n=1)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=47)
	214		0'046	0'063	0'167					0'046
	218	0'033		0'063		0'500				0'032
	220	0'033		0'063	0'083				0'500	0'043
	222		0'091		0'083			0'167		0'043
	224	0'433	0'409	0'313	0'417	0'500	0'250	0'167		0'372
	226	0'067							0'500	0'032
	228	0'267	0'091	0'125			0'250			0'138
	230						0'250	0'167		0'021
	232	0'167	0'227	0'313	0'167		0'250	0'500		0'223
	234		0'091	0'063	0'083					0'043
	240		0'046							0'010
Ho		0'467	0'727	0'750	0'833	1'000	1'000	1'000	1'000	0'702
He		0'731	0'788	0'825	0'818	1'000	1'000	0'800	1'000	0'790
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A113	(bp)	(n=13)	(n=12)	(n=9)	(n=7)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=51)
	200	0'077	0'083	0'167		0'500		0'167		0'117
	218	0'269	0'375	0'444	0'143	0'375	0'250	0'667	0'500	0'343
	220	0'192	0'042				0'250			0'068
	222	0'346	0'375	0'278	0'500		0'250	0'167	0'500	0'323
	224	0'115	0'125	0'111	0'357	0'125	0'250			0'147
Ho		0'769	0'750	0'778	0'714	1'000	1'000	0'667	1'000	0'784
He		0'782	0'725	0'525	0'648	0'679	1'000	0'600	1'000	0'745
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A7	(bp)	(n=15)	(n=18)	(n=8)	(n=6)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=57)
	100	0'067	0'138		0'083	0'250		0'167		0'096
	102	0'300	0'333	0'438	0'250	0'375	0'250	0'333		0'325

	104		0'028		0'083	0'125				0'026
	106	0'533	0'500	0'563	0'583	0'250	0'750	0'167	1'000	0'509
	108	0'100						0'167		0'035
	110							0'167		0'009
Ho		0'200	0'778	0'375	0'833	1'000	0'500	1'000	0'000	0'579
He		0'632	0'637	0'525	0'636	0'821	0'500	0'933	0'000	0'630
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A35	(bp)	(n=14)	(n=17)	(n=9)	(n=7)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=57)
	92	0'036								0'009
	96	0'143	0'206	0'278	0'286	0'125	0'250	0'167		0'202
	98		0'029	0'056						0'017
	110		0'029		0'143	0'125				0'035
	112	0'107	0'147	0'111	0'071	0'250	0'000	0'167		0'123
	114					0'125				0'009
	116	0'143	0'147	0'111	0'071	0'250			0'500	0'132
	118	0'500	0'353	0'389	0'429	0'125	0'750	0'667	0'500	0'421
	120	0'071	0'088							0'044
	122			0'056						0'009
Ho		0'786	0'824	0'889	0'857	0'750	0'500	0'667	1'000	0'807
He		0'717	0'804	0'784	0'758	0'928	0'500	0'600	1'000	0'753
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A28	(bp)	(n=15)	(n=18)	(n=9)	(n=7)	(n=3)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=58)
	128	0'933	0'972	0'889	1'000	0'833	1'000	1'000	1'000	0'948
	134	0'067	0'028	0'111		0'167				0'052
Ho		0'133	0'056	0'222	0'000	0'333	0'000	0'000	0'000	0'103
He		0'128	0'056	0'209	0'000	0'333	0'000	0'000	0'000	0'099
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A24	(bp)	(n=13)	(n=18)	(n=8)	(n=7)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=56)
	94					0'250				0'018
	98	0'769	0'722	0'563	0'786	0'750	0'750	0'167	1'000	0'696
	100	0'038						0'333		0'027
	104							0'167		0'009



Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
	106	0'154	0'194	0'438	0'214		0'250	0'333		0'214
	108	0'038	0'083							0'036
Ho		0'231	0'444	0'375	0'143	0'000	0'500	0'667	0'000	0'321
He		0'397	0'446	0'525	0'363	0'429	0'500	0'867	0'000	0'471
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A88	(bp)	(n=13)	(n=18)	(n=8)	(n=7)	(n=4)	(n=2)	(n=3)	(n=1)	(n=56)
	136	0'038	0'083							0'036
	138	0'923	0'889	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	0'946
	140		0'028							0'009
	147	0'038								0'009
Ho		0'154	0'222	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'107
He		0'151	0'208	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'104
Locus	Alelo	Poyata	Tabaib.	Caleta	Manolo	Lomo	Agulo	Palmar	Castel.	Pobl.
A8	(bp)	(n=6)	(n=11)	(n=7)	(n=3)	(n=0)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=31)
	163	0'917	0'773	1'000	0'833		1'000	1'000		0'855
	164		0'091							0'032
	171	0'083	0'136		0'167				1'000	0'113
Ho		0'167	0'091	0'000	0'333	-	0'000	0'000	0'000	0'097
He		0'167	0'394	0'000	0'333	-	0'000	0'000	0'000	0'259

Tabla 13. Variabilidad de microsatélites en *A. mellifera* de La Palma. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (Ho) y esperada (He) por locus y por localidad. El número de cromosomas analizados por localidad se indica entre paréntesis.

Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
B124	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=33)	(n=38)
	214					0'015	0'013
	220			0'500		0'152	0'145
	224	0'750	0'500	0'500	0'500	0'530	0'539
	226				0'500	0'030	0'039
	228					0'015	0'013

	230					0'015	0'013
	232	0'250	0'500			0'227	0'224
	234					0'015	0'013
Ho		0'500	1'000	1'000	1'000	0'727	0'737
He		0'500	1'000	1'000	1'000	0'652	0'644
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A113	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=1)	(n=34)	(n=40)
	218		0'500		0'500	0'294	0'288
	220	0'250	0'250			0'103	0'113
	222	0'750	0'250	1'000	0'500	0'382	0'413
	224					0'191	0'163
	228					0'029	0'025
Ho		0'500	0'500	0'000	1'000	0'912	0'850
He		0'500	0'833	0'000	1'000	0'730	0'716
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A7	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=33)	(n=40)
	102			0'250		0'197	0'175
	106	1'000	1'000	0'500	1'000	0'712	0'738
	108					0'015	0'013
	109					0'015	0'013
	110			0'250		0'061	0'063
Ho		0'000	0'000	1'000	0'000	0'455	0'425
He		0'000	0'000	0'833	0'000	0'457	0'427
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A35	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=34)	(n=40)
	98					0'015	0'013
	112	0'500			0'500	0'132	0'150
	116	0'500		0'250	0'500	0'338	0'338
	118		1'000	0'500		0'338	0'338
	120			0'250		0'162	0'150
	122					0'015	0'013

Ho		1'000	0'000	1'000	1'000	0'853	0'850
He		0'667	0'000	0'833	1'000	0'738	0'726
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A28	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=34)	(n=41)
	128	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000	1'000
Ho		0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000
He		0'000	0'000	0'000	0'000	0'000	0'000
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A24	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=32)	(n=39)
	98	1'000	0'500	1'000	1'000	0'969	0'949
	100		0'500				0'026
	106					0'031	0'026
Ho		0'000	0'000	0'000	0'000	0'063	0'051
He		0'000	0'667	0'000	0'000	0'062	0'099
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A88	(bp)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=1)	(n=32)	(n=39)
	138	1'000	1'000	1'000	1'000	0'953	0'962
	140					0'016	0'013
	147					0'031	0'026
Ho		0'000	0'000	0'000	0'000	0'094	0'077
He		0'000	0'000	0'000	0'000	0'092	0'076
Locus	Alelo	La Montaña	Monte Breña	El Pueblo	Malpais	El Molino	Pobl.
A8	(bp)	(n=2)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=25)	(n=30)
	162					0'040	0'033
	163	0'250	1'000	0'500	1'000	0'640	0'633
	170					0'040	0'033
	171	0'750		0'500		0'280	0'300
Ho		0'500	0'000	1'000	0'000	0'480	0'467
He		0'500	0'000	1'000	0'000	0'519	0'515

Tabla 14. Variabilidad de microsatélites en *A. mellifera* de El Hierro. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (Ho) y esperada (He) por locus y por localidad. El número de individuos analizados por localidad se indica entre paréntesis.

Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
B124	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=0)	(n=0)	(n=1)	(n=5)	(n=11)
	218						0'100	0'045
	220	1'000	0'625			1'000	0'500	0'636
	224		0'125				0'200	0'136
	226		0'125				0'200	0'136
	232		0'125					0'045
Ho		0'000	0'500	-	-	0'000	0'400	0'363
He		0'000	0'643	-	-	0'000	0'733	0'580
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A113	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=5)	(n=14)
	218		0'625		0'250	1'000	0'300	0'393
	222	0'500	0'125	0'500			0'400	0'250
	224	0'500	0'250	0'500	0'500		0'300	0'321
	228				0'250			0'036
Ho		1'000	0'750	1'000	1'000	0'000	0'800	0'786
He		1'000	0'607	1'000	0'833	0'000	0'733	0'704
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A7	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=5)	(n=14)
	102					0'500		0'036
	106	1'000	1'000	1'000	1'000	0'500	1'000	0'964
Ho		0'000	0'000	0'000	0'000	1'000	0'000	0'071
He		0'000	0'000	0'000	0'000	1'000	0'000	0'071
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A35	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=5)	(n=14)
	92		0'125					0'036
	110				0'250			0'036
	112	0'500			0'250			0'071
	116		0'625	1'000	0'250	1'000	0'600	0'571

	118	0'500	0'250				0'400	0'250
	120				0'250			0'036
Ho		1'000	0'500	0'000	1'000	0'000	0'400	0'500
He		1'000	0'607	0'000	1'000	0'000	0'533	0'624
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A28	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=5)	(n=14)
	128	1'000	0'875	1'000	0'750	0'500	1'000	0'893
	135		0'125		0'250	0'500		0'107
Ho		0'000	0'250	0'000	0'500	1'000	0'000	0'214
He		0'000	0'250	0'000	0'500	1'000	0'000	0'198
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A24	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=5)	(n=14)
	98	1'000	0'625	1'000	0'750	1'000	0'900	0'821
	100		0'125					0'036
	106		0'125		0'250			0'071
	108		0'125				0'100	0'071
Ho		0'000	0'500	0'000	0'500	0'000	0'200	0'286
He		0'000	0'643	0'000	0'500	0'000	0'200	0'325
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A88	(bp)	(n=1)	(n=4)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=5)	(n=14)
	136	0'500						0'036
	138	0'500	0'875	0'500	1'000	1'000	1'000	0'893
	147	0'000	0'125	0'500				0'071
Ho		1'000	0'200	1'000	0'000	0'000	0'000	0'214
He		1'000	0'200	1'000	0'000	0'000	0'000	0'204
Locus	Alelo	Beten.	Tajase	Los Valles	Regonz.	Guaraz.	Tijimira.	Pobl.
A8	(bp)	(n=1)	(n=2)	(n=1)	(n=0)	(n=1)	(n=5)	(n=10)
	162						0'100	0'050
	163	1'000	1'000	1'000		1'000	0'700	0'850
	172						0'200	0'100
Ho		0'000	0'000	0'000	-	0'000	0'400	0'200
He		0'000	0'000	0'000	-	0'000	0'511	0'279

En cada isla, se ha comprobado si las localidades muestreadas forman una población única o si por el contrario, existe una diferenciación poblacional y la composición alélica de estas muestras varía según su procedencia dentro de cada isla. Las probabilidades del test exacto realizado con las colonias de cada isla, permiten rechazar la suposición de diferenciación en todos los casos ($0'18 < p < 0'69$) excepto en Tenerife, en donde la probabilidad de error cuando se rechaza la hipótesis nula de ausencia de diferenciación poblacional es significativa ($p = 0'0005$). Paralelamente, se ha detectado un alejamiento del equilibrio Hardy-Weinberg en la isla de Tenerife cuando cada isla fue analizada como una población individual ($p = 0'04$), pero no en las otras cuatro islas ($0'12 < p < 0'98$). Cuando los apiarios de cada localidad de la isla de Tenerife fueron analizados individualmente, sólo en uno de ellos (S. Andrés), se encontró un alejamiento significativo del equilibrio Hardy-Weinberg ($p = 0'0012$).

El test exacto de Fischer para comprobar la diferenciación génica y genotípica se ha usado considerando todos los apiarios muestreados en cada isla como una población individual, para comprobar si cada isla forma una población distinta de abejas, o si no hay diferencia entre ellas y todas las poblaciones de abejas de las Islas Canarias forman una población única. Ambos tests dieron resultados significativos ($p < 0'006$), confirmando que las abejas de estas islas forman poblaciones distintas según la isla de la que se trata.

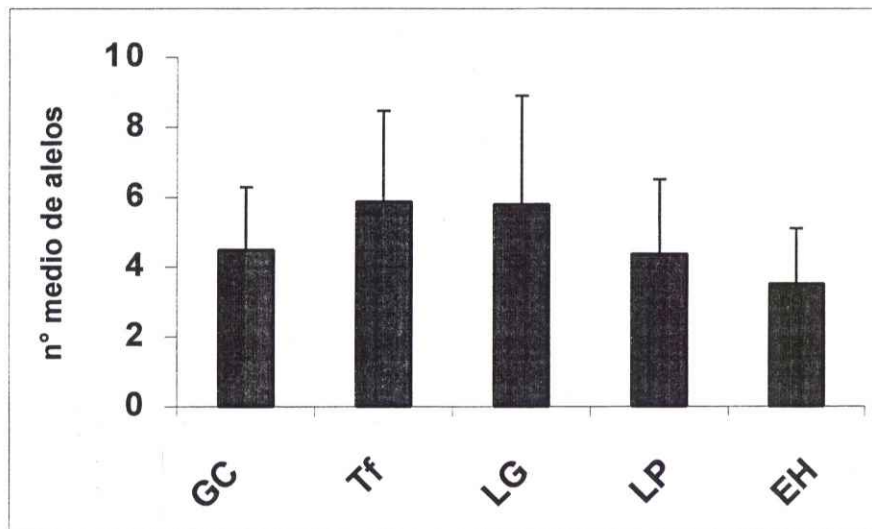
El desequilibrio genotípico fue analizado para cada par de loci en cada población y dio como resultado 5 valores significativos ($p < 0'04$) de un total de 140 comparaciones posibles. Cuatro de estos valores significativos se detectaron en Tenerife y uno en La Gomera. Este resultado entra dentro de lo esperado considerando un error del 5%. El test múltiple de probabilidad

realizado entre cada par de loci en el conjunto de todas las poblaciones, detectó desequilibrio genotípico entre los loci A7 y A35 ($p = 0'001$).

El patrón de variabilidad en cada locus es diferente para cada loci pero muy similar entre todas las poblaciones de estas islas. El alelo de 128 pares de bases de longitud encontrado en el locus A28, está fijado para la población de La Palma, es decir, su nivel de heterocigosidad en este caso es cero, ya que aparece monomórfico en cada cromosoma analizado. En el resto de las islas este alelo aparece casi fijo con un nivel de variabilidad observado muy bajo. Este resultado es muy similar en los alelos de tamaños 106, 98, 138 y 163 pares de bases de los loci A7, A24, A88 y A8. Los loci B124, A113 y A35 muestran un patrón diferente observándose un mayor número de alelos variables en estas poblaciones.

El número observado de heterocigotos o heterocigosidad observada varía entre $0'312 \pm 0'242$, que se ha encontrado en El Hierro y $0'437 \pm 0'316$, que se ha registrado en La Gomera, siendo $0'416 \pm 0'291$ la media para todas las poblaciones (fig.18 B). La heterocigosidad esperada por locus puede ser considerada una medida de la diversidad de genes y tiene un valor medio de $0'487 \pm 0'255$ para todas las poblaciones de abejas de las Islas Canarias muestreadas, variando entre $0'357 \pm 0'253$ (El Hierro) y $0'489 \pm 0'237$ (Tenerife). Comparando las islas entre sí, la variabilidad menor se ha encontrado en la isla de El Hierro, en donde la heterocigosidad media esperada oscila entre $0'25 \pm 0'463$ y $0'375 \pm 0'517$ por localidades. El valor más alto de heterocigosidad media esperada se ha encontrado en Tenerife, en donde la variabilidad en cada apiario varía entre $0'25 \pm 0'463$ y $0'604 \pm 0'427$.

A.



B.

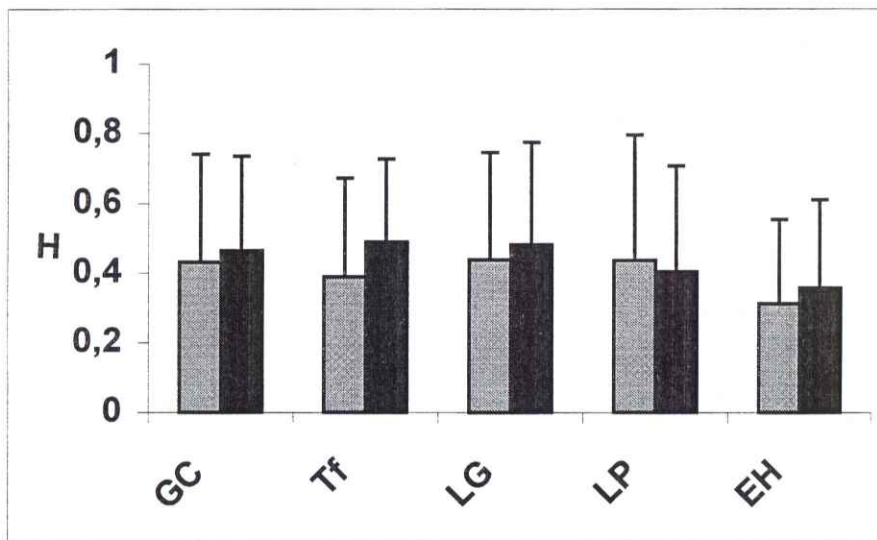


Figura 18. Variación de los microsatélites de las poblaciones de abejas de las Islas Canarias. (A). Número observado de alelos por localidad. (B). Heterocigosidad observada (gris) y esperada (negro) en cada isla muestreada.

2.3. Las abejas de Tetuán.

Los mismos ocho loci de microsatélites que se han analizado en las poblaciones de las Islas Canarias y de Murcia, han sido estudiados en la población de abejas de Marruecos. El resultado de este estudio se resume en la tabla 15.

Tabla 15. Frecuencias alélicas, proporción de heterocigotos observada (H_o) y esperada (H_e) por locus y por localidad para la población de Tetuán (Marruecos). El número de individuos analizados se indica entre paréntesis.

Locus B124	n= 15	$H_o = 0'867$					$H_e = 0'800$		
alelo (pb)	214	218	220	222	224	232	234	240	
Frecuencia	0'167	0'400	0'133	0'100	0'067	0'033	0'067	0'033	
Locus A113	n= 15	$H_o = 0'800$					$H_e = 0'731$		
alelo (pb)	202	204	212	214	218	226			
Frecuencia	0'433	0'033	0'267	0'033	0'167	0'067			
Locus A7	n= 15	$H_o = 0'231$					$H_e = 0'677$		
alelo (pb)	100	102	104	106	108				
Frecuencia	0'346	0'115	0'038	0'462	0'038				
Locus A35	n= 15	$H_o = 0'857$					$H_e = 0'775$		
alelo (pb)	92	96	102	114	116	118	124		
Frecuencia	0'393	0'036	0'143	0'036	0'107	0'250	0'036		
Locus A28	n= 15	$H_o = 0'800$					$H_e = 0'641$		
alelo (pb)	123	125	128	129	130	131	135		
Frecuencia	0'033	0'033	0'533	0'033	0'300	0'033	0'033		
Locus A24	n= 15	$H_o = 0'800$					$H_e = 0'846$		
alelo (pb)	98	100	102	104	106	108	126	128	
Frecuencia	0'167	0'100	0'300	0'067	0'200	0'067	0'033	0'067	
Locus A88	n= 15	$H_o = 0'067$					$H_e = 0'743$		
alelo (pb)	136	138	140	141	143	149			
Frecuencia	0'467	0'133	0'100	0'067	0'167	0'067			

Locus A8	n = 15	Ho = 0'400				He = 0'692	
alelo (pb)	162	164	166	168	170	172	
Frecuencia	0'067	0'100	0'533	0'133	0'067	0'100	

Se han encontrado diferentes alelos en todos los loci estudiados. El número de alelos por locus varía entre 5 que se han detectado en el locus A7 y 8 en los loci B124 y A24, siendo el valor medio para todos los loci de $6'625 \pm 1'06$.

El equilibrio Hardy-Weinberg ha sido comprobado realizando un test exacto y se ha detectado un alejamiento en esta población (probabilidad altamente significativa). Analizando cada locus individualmente, son los loci A7, A88 y A8 los que provocan este alejamiento ($p < 0'003$); el locus B124 es el más variable en cuanto al número de alelos que se han detectado y es el que acerca la población hacia el equilibrio ($p = 0'994$).

El desequilibrio genotípico ha resultado en 28 comparaciones entre pares de loci y no se ha detectado ningún valor significativo ($p > 0'1$).

El patrón de variabilidad de los loci en esta población difiere de los observados en las poblaciones de las Islas Canarias y de Murcia, en que no se ha detectado ningún alelo fijo y en que la frecuencia de los diferentes alelos no es mayor de 0'53 en ningún caso.

La heterocigosidad media observada es $0'603 \pm 0'323$ y la esperada $0'738 \pm 0'068$, lo cual concuerda con los resultados previos obtenidos por Estoup *et al.* (1995a) y Franck *et al.* (1998a), en los que se observaron unos valores de heterocigosidad en general más altos en poblaciones de abejas de razas africanas que en la europeas.

El número efectivo medio de alelos es $3'666\pm 0'939$ para todos los loci, variando entre 5'488 que se ha encontrado para el locus A24 y 2'632 que se ha encontrado en el locus A7.

2.4. Análisis conjunto y filogenia basada en los microsatélites.

La variación genética de los microsatélites es mayor en la población de Tetuán (Marruecos) ($H_e = 0'738\pm 0'303$) que en las otras poblaciones analizadas (tabla 16), ($p < 0'01$ en el test de Wilcoxon, pero no significativa después del ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples), siendo casi el doble que en algunas poblaciones de las Islas Canarias como El Hierro ($H_e = 0'357\pm 0'253$). El valor de variación genética en la población de Murcia ($H_e = 0'448\pm 0'314$) es muy similar al esperado en las poblaciones canarias.

El número medio de alelos observado por locus en cada población es un buen indicador de la variabilidad genética debida a la diversidad alélica, si las poblaciones están en equilibrio mutación-deriva y el tamaño muestral es más o meno el mismo. Ewens (1972) ha demostrado que la diversidad de alelos depende del tamaño muestral, pero que esta dependencia sólo es problemática si los valores del parámetro poblacional $4N_e v$ son altos (N_e es el tamaño efectivo poblacional y v es la tasa de mutación que en el caso de los microsatélites es aproximadamente 10^{-4}). Según Nei (1987) el número esperado de alelos no varía significativamente para un tamaño muestral de 20 a 60 individuos, incluso si los valores de $4N_e v$ son altos. Todas estas consideraciones llevan a la conclusión de que el patrón de variabilidad observado en las poblaciones de Murcia, las Islas Canarias y Tetuán, en cuanto al número de alelos por locus de microsatélite, refleja procesos evolutivos distintos y no debe ser considerado un efecto del muestreo.

El número de individuos muestreado en cada población varía entre $n=45'75\pm3'62$ en la muestra de Tenerife y $n=13'13\pm1'64$ en El Hierro. En general, se observa que el número medio de alelos es menor en las poblaciones de abejas canarias que en las poblaciones de Murcia y Marruecos ($N=7\pm2'5$ y $N=6'6\pm1'1$ en Murcia y Marruecos respectivamente y $N < 5'8\pm3'1$ en las Islas Canarias). Resultados previos en poblaciones de abejas africanas demuestran que las muestras de África exhiben una mayor diversidad genética que las europeas (Estoup *et al.* 1995b, Franck *et al.* 1998a), dato que también se confirma en este caso.

Tabla 16. Resumen de la variación de los loci de microsatélites analizados en las Islas Canarias, Murcia y Marruecos. El número medio de individuos analizados por locus se ha indicado como n y el número medio de alelos por locus en cada población se ha indicado como N . Los valores de heterocigosidad son los valores medios obtenidos en cada población para el conjunto de los ocho loci analizados.

Población	n	N	H_o	H_e
Murcia	$43\pm2'56$	$7\pm2'5$	$0'385\pm0'314$	$0'448\pm0'314$
Gran Canaria	$17'87\pm3'23$	$4'5\pm1'8$	$0'431\pm0'309$	$0'464\pm0'270$
Tenerife	$45'75\pm3'62$	$5'8\pm2'6$	$0'389\pm0'283$	$0'489\pm0'237$
La Gomera	$27'3\pm0'76$	$5'8\pm3'1$	$0'438\pm0'307$	$0'481\pm0'293$
La Palma	$38'37\pm3'51$	$4\pm2'1$	$0'436\pm0'359$	$0'403\pm0'303$
El Hierro	$13'13\pm1'64$	$3'5\pm1'6$	$0'312\pm0'242$	$0'357\pm0'253$
Tetuán	$14'63\pm0'75$	$6.6\pm1'1$	$0'603\pm0'323$	$0'738\pm0'303$

En las poblaciones que han experimentado una reciente reducción de tamaño efectivo, la diversidad de alelos se reduce más rápidamente que la

heterocigosidad y los valores de heterocigosidad observada son mayores que los de la esperada (Piry *et al.* 1996). Esto ha sido demostrado para loci que evolucionan siguiendo el modelo de infinitos alelos (I.A.M., Maruyama y Fuerst 1985). Muy pocos loci siguen el modelo de evolución paso a paso (S.M.M.), y en el caso de aquellos locus que evolucionan siguiendo este modelo, puede haber situaciones en las que no se observe un posible exceso de heterocigosidad debido a un cuello de botella (Cornuet y Luikart 1996).

Según los dos modelos posibles de evolución de microsatélites (tabla 17) el valor de heterocigosidad esperado es siempre mayor que el observado en todas las islas; la diferencia es especialmente notable según el S.M.M.

En la población de Murcia se ha observado un mayor número de loci con exceso de heterocigotos según ambos modelos (6 loci según el I.A.M. y 8 según el S.M.M. del total de los 8 loci analizados). De las 39 combinaciones locus polimórfico/población canaria (el locus A28 es monomórfico en la isla de La Palma y no aporta información en este caso), se ha detectado un exceso en el número de heterocigotos en 24 loci según el I.A.M y en 27 loci según el S.M.M.. Según el I.A.M., en Tenerife y en El Hierro hay un exceso en el número de heterocigotos en 6 y en 7 loci respectivamente; según el S.M.M. este exceso se observa en todas las islas excepto en Gran Canaria, donde se da el caso contrario, ya que se observan 7 loci con déficit de heterocigotos. En Tetuán se ha observado un locus con exceso de heterocigosidad y 7 con déficit según el I.A.M.. La situación contraria ocurre con el S.M.M. ya que según éste se han observado 7 loci con exceso y uno con déficit.

La probabilidad de que la frecuencia alélica de los microsatélites en estas poblaciones siga uno de los modelos propuestos sobre la evolución de los microsatélites, también se halla recogida en la tabla 17. El programa



BOTTLENECK realiza el test estadístico de Wilcoxon de calificación con signos para verificar cada modelo de evolución. La probabilidad de que la frecuencia de alelos de microsatélites siga el modelo de alelos infinitos es únicamente significativa en el caso de la población de Murcia ($p = 0'027$); sin embargo en estas poblaciones no se sigue en ningún caso el modelo de evolución paso a paso ($p < 0'039$).

Tabla 17. Variabilidad de microsatélites de *A. mellifera* en Murcia, las Islas Canarias y Tetuán. Se indica el número de loci esperado y observado con exceso (Ne Hexc. y No Hexc.) y déficit (No Hdef.) de heterocigotos. Los valores de heterocigosidad son los promedio de los 8 loci analizados según I.A.M. y S.M.M. (He). La probabilidad obtenida mediante el test de Wilcoxon de que los loci de microsatélite sigan uno de los modelos de evolución se indica a la derecha de la tabla.

	Ne Hexc.	No Hexc.	No Hdef.	Ho	He	p
			I.A.M.			
Murcia	4'73	6	2	0'385±0'314	0'620±0'129	0'027
Gran Canaria	4'36	4	4	0'431±0'309	0'501±0'138	0'843
Tenerife	4'49	6	2	0'388±0'283	0'530±0'144	0'461
La Gomera	4'5	4	4	0'437±0'315	0'513±0'188	0'769
La Palma	3'98	4	3	0'436±0'359	0'499±0'157	0'578
El Hierro	3'97	7	1	0'312±0'242	0'509±0'134	0'054
Tetuán	4'8	1	7	0'603±0'323	0'719±0'092	0'195
			S.M.M.			
Murcia	4'73	8	0	0'385±0'314	0'735±0'069	0'003
Gran Canaria	4'66	1	7	0'431±0'309	0'588±0'101	0'012
Tenerife	4'58	8	0	0'388±0'283	0'641±0'091	0'004
La Gomera	4'62	7	1	0'437±0'315	0'637±0'086	0'012
La Palma	4'16	5	2	0'436±0'359	0'602±0'108	0'039
El Hierro	4'12	6	2	0'312±0'242	0'572±0'111	0'016
Tetuán	4'82	7	1	0'603±0'323	0'785±0'055	0'008

Los valores estadísticos F de Wright han sido estimados dentro de cada población y entre ellas. En la tabla 18 se ha recogido una matriz de comparación de los valores F_{ST} entre las poblaciones de cada isla, Murcia y Tetuán. El valor F_{ST} de Wright es un índice de fijación alélica que da idea del nivel de divergencia genética entre poblaciones. Para el promedio de los loci el valor más alto de diferenciación genética se ha encontrado entre las poblaciones de El Hierro y La Gomera ($F_{ST}= 0'121$) y el valor más bajo entre La Gomera y Gran Canaria ($F_{ST}= 0'04$). Se ha observado una tendencia general de mayor divergencia genética entre cada isla individual y las islas de El Hierro y Tenerife, mientras que los valores más bajos aparecen entre Gran Canaria y las otras islas a pesar de la distancia geográfica entre ellas.

Tabla 18. Matriz de comparación del valor F_{ST} (debajo de la diagonal) y del número estimado de emigrantes Nm (encima de la diagonal) entre cada par de poblaciones de *A. mellifera* de Murcia, las Islas Canarias y Tetuán. A la derecha de la tabla se indica el valor F_{IS} obtenido como media de los 8 loci en cada población.

	Murcia	Gran Canaria	Tenerife	La Gomera	La Palma	El Hierro	Tetuán	F_{IS}
Murcia		5'254	2'246	3'712	2'491	3'743	0'569	0'137
Gran Canaria	0'045		3'118	5'999	4'298	4'057	0'648	0'064
Tenerife	0'100	0'074		2'209	1'959	2'321	0'656	0'220
La Gomera	0'063	0'040	0'101		4'719	1'821	0'612	0'078
La Palma	0'091	0'055	0'113	0'050		2'066	0'488	-0'089
El Hierro	0'063	0'058	0'097	0'121	0'108		0'560	0'114
Tetuán	0'305	0'278	0'276	0'290	0'338	0'308		0'184

Los valores más altos de F_{ST} se han obtenido en la comparación entre las poblaciones de las Islas Canarias y Murcia con respecto a la población de Tetuán. Por el momento no es posible precisar si la distancia genética entre las poblaciones de las Islas Canarias y Tetuán aumenta proporcionalmente con la distancia geográfica de éstas respecto al continente africano, ya que el valor más alto se encuentra entre La Palma y Tetuán ($F_{ST}= 0'338$), mientras que el más bajo es el de Tenerife y Tetuán ($F_{ST}= 0'276$).

Por otra parte, los valores de distancia entre la Península y las distintas islas, podría indicar hasta cierto punto, la intensidad de importación de colmenas peninsulares desde el siglo XVI. Según esta hipótesis la menor afinidad se da entre Murcia y Tenerife ($F_{ST}= 0'100$), mientras que la menor distancia (o mayor afinidad) se da entre Murcia y Gran Canaria. En general, los valores de distancia genética son menores entre las poblaciones canarias y las de Murcia, en concordancia con los resultados previos de Franck *et al.* (1998a) sobre una gran variabilidad genética de las poblaciones africanas en cuanto a los microsatélites, variabilidad que es superior a la de las poblaciones europeas. De aquí que los datos apoyen una mayor afinidad de las poblaciones canarias con las de la P. Ibérica.

El número estimado de emigrantes es también bajo entre todas las poblaciones canarias y Tetuán ($Nm < 0'656$), lo cual sugiere un flujo reducido entre las poblaciones del continente y la de las islas, a pesar de la proximidad geográfica. Este valor vuelve a ser alto entre las poblaciones insulares y Murcia ($Nm > 2'246$).

En cuanto a las diferencias entre islas, la de Gran Canaria parece jugar un papel central con respecto a las demás, ya que es la que muestra los valores menores de distancia genética. Las más diferentes son las de Gomera y

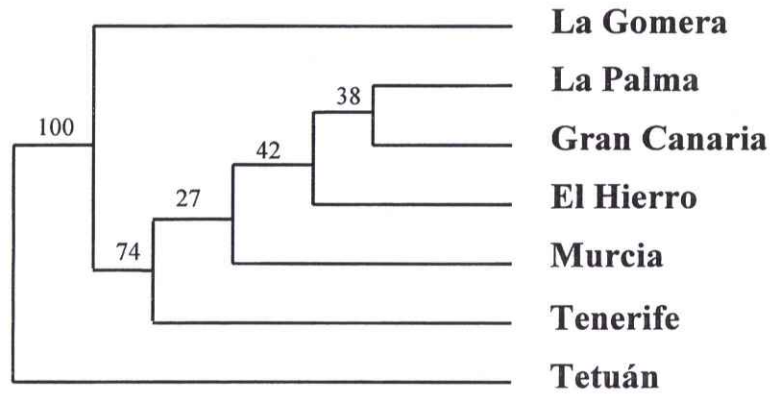
Tenerife. El flujo estimado más alto se encuentra entre Gomera y Gran Canaria ($Nm = 5'999$) y el más bajo entre Gomera y El Hierro ($Nm = 1'821$).

El valor F_{IS} es indicativo del déficit o exceso de heterocigotos en la población y del nivel de endogamia dentro de la misma. Este valor es positivo en todas las poblaciones excepto en La Palma (-0'089) en la que se ha hallado un exceso de heterocigotos. En Tenerife y en Tetuán se han encontrado los valores más altos de F_{IS} (0'220 y 0'196, respectivamente), lo cual indica que en estas poblaciones hay un déficit de heterocigotos y que se está produciendo cruzamientos selectivos entre los individuos de un mismo apiario, es decir, el nivel de endogamia es elevado en los diferentes apiarios analizados en estas poblaciones. Este aspecto está relacionado con la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg que se ha observado en Tenerife y Tetuán y con la composición de dichas poblaciones, ya que en ambos casos se ha observado la presencia de diferentes subespecies en los apiarios muestreados en ambas poblaciones.

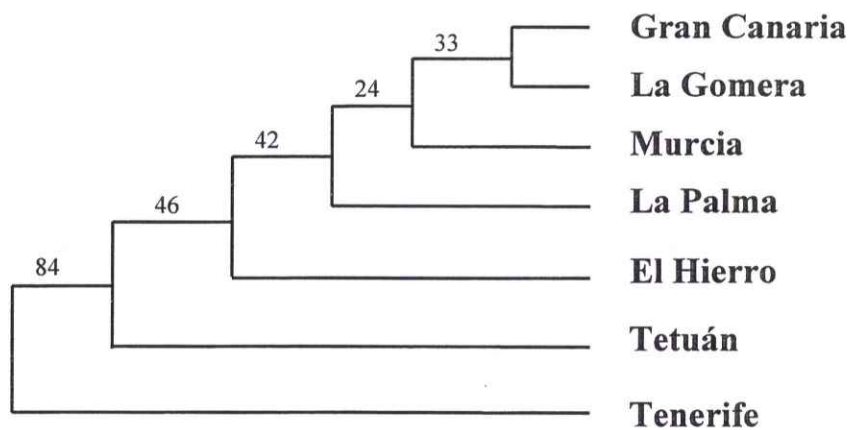
Los árboles basados en la variación de los microsatélites se han obtenido siguiendo distintos métodos filogenéticos. El de máxima parsimonia se basa en los datos de presencia/ausencia de los alelos en cada población, mientras que el de máxima probabilidad se basa en los datos sobre la frecuencia de cada alelo; con las distancias obtenidas de estas frecuencias se calcula el árbol siguiendo el método del "neighbour-joining". En la figura 19 se pueden observar dos árboles ya que los árboles obtenidos con los dos últimos métodos (máxima probabilidad y "neighbour-joining") muestran la misma topología. El tamaño de las muestras se ha reducido a 15 individuos tomados al azar en cada población. En la figura 19 se observan los árboles consenso obtenidos tras 2000 iteraciones.

Figura 19. Análisis filogenético de las poblaciones de abejas de las Islas Canarias, Murcia y Marruecos basado en los datos de la variación de los microsatélites. (A). Árbol generado mediante el método de máxima parsimonia. (B). Árbol generado por los métodos de "neighbour-joining" y por el de máxima probabilidad. Los valores de "bootstrap" han sido calculados con 2000 iteraciones.

A.



B.



Ambos árboles muestran una topología distinta. Esto se puede explicar por los caracteres que se usan en ambos casos, ya que el árbol obtenido con los métodos de máxima probabilidad y "neighbour-joining" está basado en la frecuencia de los alelos, no sólo en la presencia o ausencia de los mismos. Aunque las diferencias entre ellos son notables, algunas características comunes son destacables. En primer lugar, las poblaciones de las Islas Canarias no se encuentran agrupadas formando un clado diferenciado con respecto a Murcia y Tetuán. En segundo lugar, en ambos árboles la población de Murcia aparece muy relacionada con las poblaciones insulares, aunque con valores de bootstrap muy bajos (27 en el árbol más parsimonioso y 24 en el más probable y en el "neighbour-joining"). Tercero, la población de Tetuán aparece alejada de las insulares, dato que coincide con la filogenia basada en el ADNmt.

La población de Tetuán aparece en una posición basal más alejada de las poblaciones insulares y de Murcia en el árbol más parsimonioso (bootstrap 100). Sin embargo, en el otro árbol esta posición más alejada es ocupada por la población de Tenerife. Esta situación sugiere que la dotación genética de las abejas muestreadas en esta isla es diferente de la de las abejas de otras islas, lo cual se explica en parte por la frecuencia notable de abejas importadas que pueden estar introduciendo alelos raros en las poblaciones insulares a través de la aportación genética de los zánganos.

Discusión

1. Análisis del ADNmt.

El predominio de abejas con haplotipos del linaje africano (A1 y A2) en la región de Murcia, concuerda con los datos previos de Garnery *et al.* (1993, 1995). El haplotipo A2 es el más común con una frecuencia de 0'888, como ocurre en el sur de la península (tabla 19) y en algunas islas del Mediterráneo (Garnery *et al.* 1993). El porcentaje de este haplotipo varía siguiendo un gradiente norte-sur, gradiente que también se ha observado al estudiar aloenzimas (Cornuet 1983, Smith y Glenn 1995), mapas de restricción del ADNmt completo (Smith *et al.* 1991) y caracteres morfológicos mediante análisis morfométrico (Cornuet y Fresnaye 1989).

Tabla 19. Número de haplotipos mitocondriales obtenidos mediante el test de *DraI* en distintas provincias de España y frecuencia del haplotipo A2 en cada caso. Aquellas colmenas cuyos haplotipos corresponden al linaje C de Europa del este han sido eliminadas.

Provincia	Nº colmenas	Nº de haplotipos	Frecuencia de A2	Referencia
San Sebastián	35	4	-	Garnery <i>et al.</i> (1995)
Huesca	36	4	-	"
Segovia	26	7	0'23	"
Toledo	16	6	0'50	"
Sevilla	59	11	0'66	"
Murcia	45	2	0'91	Presente trabajo
Islas Canarias	188	5	-	"

La escasa variabilidad que presentan las poblaciones de abejas de Murcia con respecto al ADNmt, es inferior a la de otras provincias. Así, por ejemplo, en Sevilla se han encontrado tres haplotipos del linaje M, y ocho haplotipos del linaje A (Garnery *et al.* 1995), y en Murcia no se ha detectado ninguna muestra con haplotipos correspondientes al linaje M, aunque sí del linaje C de razas europeas



orientales (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, etc.). 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. m. 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.

El análisis de la región intergénica ARN^{t_{leu}}-COII de las poblaciones de abejas de las Islas Canarias ha dado lugar al hallazgo de seis haplotipos. En comparación con los resultados obtenidos con el mismo tipo de análisis mitocondrial en otras poblaciones de abejas por Garnery *et al.* (1995), las poblaciones de estas islas coinciden con las de Marruecos en la falta de haplotipos del linaje M, y con otras poblaciones de la Península Ibérica en la presencia del haplotipo A11, que no ha sido encontrado en Marruecos.

Dos de los haplotipos encontrados en las Islas Canarias, A14 y A15, han sido descritos por primera vez. El haplotipo A15 es el más frecuente y extendido en todas las islas, hecho que sugiere que este tipo de región intergénica puede tener un valor diagnóstico para caracterizar las poblaciones de Canarias. Este dato merece ser corroborado en estudios posteriores.

Estos dos haplotipos están relacionados con el haplotipo A11, ya que comparten una delección de 17 pares de bases en el extremo 3' de la secuencia P₀. Esta delección había sido previamente descrita por Garnery *et al.* (1995) en el haplotipo A11, aunque no le pusieron un nombre nuevo. Dado que su presencia en tres haplotipos no puede considerarse un hecho aislado, la he denominado secuencia P₁. Estos tres haplotipos se diferencian entre sí por el número de secuencias de tipo Q presente en la región intergénica: una en el A11, dos en el A14 y tres en el A15. La presencia de esta secuencia P₁, sugiere que las poblaciones de abejas que presentan estos haplotipos pueden ser un sublinaje de las subespecies de la línea africana.

La secuencia P₁ de los haplotipos A11, A14 y A15 está relacionada con la secuencia P₀ que caracteriza al linaje de subespecies africanas. Este nuevo tipo de secuencia P podría haber aparecido tras producirse una delección en el extremo 3' de la secuencia P₀ (fig. 20), dando lugar al haplotipo A11, el cual mediante duplicaciones posteriores de la secuencia Q pudo dar lugar a los haplotipos A14 y A15.

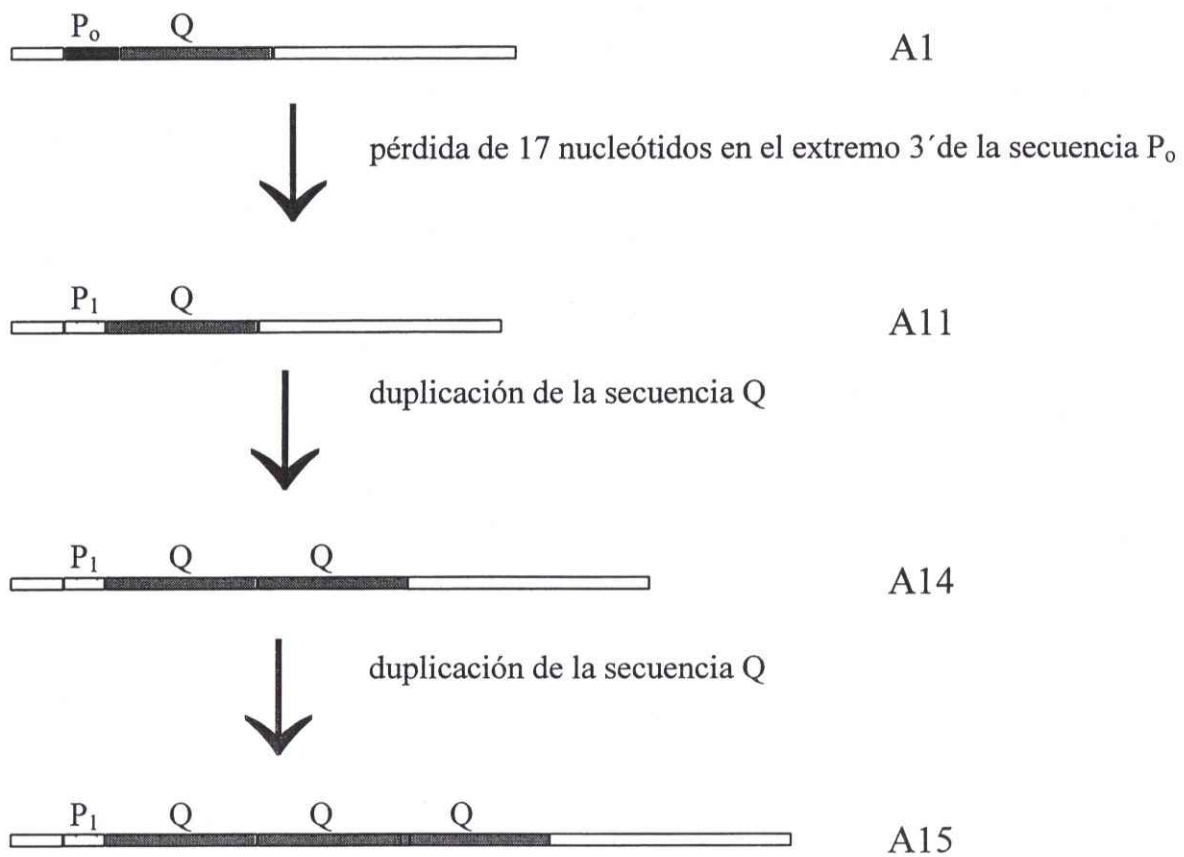


Figura 20. Hipótesis sobre la aparición de los haplotipos A11, A14 y A15 típicos de las poblaciones de abejas de las Islas Canarias, a partir del haplotipo A1 típico de las poblaciones de abejas de África del Norte.

De acuerdo con esta hipótesis el haplotipo A11 es el ancestro del A14 y del A15. Cabe la posibilidad de que el proceso evolutivo que va desde el A11 hasta el A15 ocurriera en poblaciones isleñas a partir de ancestros provenientes del continente africano. En contra de dicha posibilidad está el que el haplotipo A11 no se ha encontrado todavía en Marruecos, aunque es cierto que no se dispone aún de un mapa detallado sobre la distribución de haplotipos en este país. Igualmente, no se puede descartar la presencia del haplotipo A11 en Marruecos en el pasado, seguida de una extinción posterior.

Por otra parte, también se podría situar el origen de estos haplotipos en el sur peninsular, ya que el haplotipo A11 ha sido descrito en varias colmenas de Sevilla y

Toledo (Garnery *et al.* 1995). Mediante movimientos de colmenas e importaciones de reinas se pudieron trasladar abejas con este haplotipo a las Islas Canarias, y allí pudieron ocurrir los procesos de duplicación de la secuencia Q que dieron lugar a los haplotipos A14 y A15.

La reconstrucción de los hechos evolutivos que acaecieron en estas islas durante el pasado, indica que son muy numerosos los factores que han influido en el origen de los organismos endémicos que albergan. Ancochea *et al.* (1990) concluyen que en Tenerife han habido refugios a los que no llegaron ríos de lava y que no sufrieron los efectos de erupciones volcánicas tan comunes en estas islas. Machado (1976), Cobolli- Sbodorni *et al.* (1991) y Juan *et al.* (1996) sugieren que estos posibles refugios se hallan en las islas más grandes y antiguas (Gran Canaria 14-16 millones de años, Tenerife 11'6 millones de años). Ancochea *et al.* (1990) señalan que deben de haber ocurrido olas sucesivas de aparición y desaparición de especies endémicas, debido a los ciclos de actividad y reposo de los volcanes y a la supervivencia de poblaciones reducidas y aisladas. De esta forma, la distribución y frecuencia de los haplotipos A14 y A15 pueden ser el resultado del efecto fundadores y de la deriva génica que suelen ir asociados a la reducción del tamaño efectivo poblacional en las islas oceánicas.

La presencia en las islas de haplotipos que también se han descrito en Marruecos y en la Península Ibérica (A1 y A9), indica que la inmigración desde África y Europa a las Islas Canarias todavía está ocurriendo. Este hecho también explicaría, en parte, la mayor diversidad de haplotipos que hay en las islas orientales más cercanas a África (Gran Canaria) con respecto a las occidentales situadas más distantes (La Palma y El Hierro).

El haplotipo A1 tiene una frecuencia cercana al 25%, siendo su presencia especialmente importante en La Palma (72%). Esta peculiaridad puede deberse al problema que se sufrió en esta isla hace unos años, cuando se produjo un descenso considerable de las poblaciones de abejas por el ataque del ácaro traqueal *Acarapis*



woodi (E. González, com. pers.), lo cual dio lugar a una reducción temporal del tamaño poblacional y a un posterior cuello de botella. Es posible que las abejas que sobrevivieron tuvieran este haplotipo mitocondrial y que a partir de ellas se recuperan buena parte de las colmenas actuales, resultando así una homogeneidad notoria en cuanto al ADNmt.

Otro factor que aumenta la variabilidad de haplotipos es la importación de abejas de la línea C de Europa del este, preferiblemente las "abejas italianas", *A. m. ligustica*, hecho que ha sido demostrado al encontrar el haplotipo C1 característico de este linaje en todas las islas muestreadas excepto en La Palma, en donde la importación de abejas no está permitida (E. González, com. pers.). La aclimatación de razas importadas a las especiales condiciones medioambientales de las Islas Canarias, es un aspecto de gran interés para ser analizado en futuros estudios. Algunos apicultores canarios han observado que estas abejas desaparecen con el tiempo (E. González, com. pers.), hecho que concuerda con los hallazgos de Garnery *et al.* (1995), quienes no encontraron ningún haplotipo de origen europeo en las poblaciones que estudiaron en Marruecos y Túnez, a pesar de haber constancia de repetidas introducciones de este linaje durante la época de dominación francesa.

Como ya se ha indicado anteriormente, otras importaciones desde la Península Ibérica pueden haber ocurrido en épocas históricas a partir del siglo XVI. Ello explicaría la presencia del haplotipo A11 en las Islas Canarias y en la Península Ibérica, pero no en Marruecos. No obstante, la posibilidad de que queden algunas poblaciones relictas en África con este haplotipo no puede ser descartada.

En la población de abejas de Tetuán se han encontrado tres haplotipos, siendo el A9 el más frecuente de todos ellos (0'69), dato que coincide con los resultados obtenidos por Garnery *et al.* (1995) y Franck *et al.* (1998a) en poblaciones situadas al norte del Rif. Esta composición de haplotipos es singular en tanto que permite distinguir a esta región de las otras dos. No se han detectado haplotipos procedentes de los linajes M y C, ni tampoco el haplotipo más común del sur peninsular (A2) ni

los haplotipos más comunes de las Islas Canarias (A14 y A15). Por el contrario, el haplotipo A13 detectado en Tetuán no se ha encontrado en las otras dos regiones.

Las relaciones entre los haplotipos mitocondriales son relativamente sencillas en las poblaciones continentales (Murcia y Tetuán) y en aquellas islas del archipiélago canario más alejadas del continente. En estos casos se puede postular que el ADNmt tiene un origen único o que, alternativamente, los procesos de selección y deriva producen una homogeneidad de haplotipos manifiesta. Por el contrario, en poblaciones como la de Gran Canaria, en donde las relaciones basadas en la diversidad y frecuencia de haplotipos son más complejas, se propone que ha habido más de una oleada de colonización y mezcla de haplotipos. El origen geográfico más cercano y evidente de dichas oleadas es el continente africano, aunque la influencia del hombre a través de la actividad apícola también es un factor a tener en cuenta, ya que los movimientos de colmenas tienen gran importancia, sobre todo en las islas de mayor tamaño como Gran Canaria y Tenerife.

El árbol más parsimonioso obtenido con los caracteres de los haplotipos, muestra que aquellos haplotipos que contienen en su región intergénica la secuencia de tipo P₁, forman un clado separado de los otros haplotipos que tienen la secuencia de tipo P₀. Este resultado confirma en parte la hipótesis de que aquellas poblaciones de abejas canarias que portan ese tipo de secuencia en su ADNmt, forman un linaje secundario derivado del linaje africano de subespecies de *A. mellifera*. En el caso del abejorro, se han hallado dos haplotipos mitocondriales que son endémicos de las poblaciones de *Bombus canariensis* (Erladsson, 1979) de estas islas (Widmer *et al.* 1998). Estos mismos autores sugieren que el origen de dichas poblaciones es probablemente el norte de África, aunque se necesitan nuevos datos moleculares de *B. terrestris africanus* para comprender los procesos de divergencia y colonización de las poblaciones canarias de abejorros.

Los haplotipos A14 y A15 son por el momento endémicos de las poblaciones de Canarias, aunque no se descarta que el tipo de secuencia P₁ pueda aparecer en



haplotipos de poblaciones de *A. mellifera iberica* de la Península Ibérica y más concretamente en Portugal, donde los resultados de Franck *et al.* (1998a) sugieren esta posibilidad basada en los patrones de restricción, pero no en datos de la secuencia.

La filogenia obtenida por los métodos de máxima parsimonia y de máxima probabilidad apoyan la separación de las poblaciones insulares de *A. mellifera*, lo cual es especialmente destacable en el árbol más parsimonioso, ya que estas poblaciones forman un clado cuyo valor de bootstrap es 100. En los dos árboles la población de abejas de Tetuán ocupa la posición ancestral, lo cual sugiere que tanto las poblaciones canarias como la peninsular derivan del linaje de subespecies A, o por lo menos son más parecidas a estas subespecies, como indica la denominación del tipo de raza presente en el sur peninsular, *A. m. iberica* parecida a *intemissa*. Por la proximidad geográfica es más probable que las poblaciones de abejas canarias se derivaran de ancestros provenientes del continente africano, siendo las islas de Fuerteventura y Lanzarote el puente de paso en los procesos de colonización, aunque actualmente no hay presencia de colonias de abejas en estas islas, posiblemente debido a las condiciones ambientales (vegetación y clima) poco favorables.

La posición de la población de Murcia con respecto a las poblaciones de las Islas Canarias, sugiere una relación cercana entre estas poblaciones, hecho que ha sido observado previamente con datos morfológicos (Ruttner 1975). Esta afinidad podría explicarse por introducciones de abejas desde la Península Ibérica en tiempos históricos. Si fuera así deberían haberse encontrado abejas con el haplotipo más común peninsular (A2), cosa que no ha ocurrido en este estudio. Sin embargo, Garnery *et al.* (1993) detectaron este haplotipo al estudiar la distribución de haplotipos generados mediante el test con la enzima *DraI*, en distintas poblaciones canarias de *A. mellifera*. Dichos autores sugieren que las poblaciones de abejas de las Islas Canarias podrían provenir de antecesores del sur peninsular.



La filogenia obtenida con los métodos de máxima parsimonia y máxima probabilidad está en acuerdo con la edad de las islas, excepto en el caso de El Hierro (árbol más parsimonioso) y de La Palma (árbol más probable), ya que éstas islas ocupan posiciones que no se corresponden con su historia geológica. Esto puede deberse en El Hierro a que sólo se ha detectado el haplotipo A15 (si exceptuamos el C1 que es considerado como resultado de la introducción de abejas de otras razas). Por su parte, en La Palma dicho haplotipo aparece con una frecuencia baja comparada con las otras islas (26'8%). Como ya se ha comentado previamente, hay datos que permiten explicar el predominio del haplotipo A1 (71%) en esta isla.

En los estudios realizados en otros organismos también se ha observado que hay una ruta de colonización desde el este hacia el oeste, que guarda relación con la edad de las islas. Tal es el caso de los abejorros (Widmer *et al.* 1998) y de los coleópteros tenebriónidos del género *Pimelia* (Juan *et al.* 1995).

Los procesos de diferenciación que pueden haber sufrido las poblaciones insulares de *A. mellifera* no han llegado a culminar en un proceso de especiación intransular, como ha ocurrido en otros organismos. En estos últimos se puede explicar la existencia de haplotipos endémicos en cada isla, como ocurre con *Pimelia* (Juan *et al.* 1995, 1996) o los lagartos (Thorpe *et al.* 1994). No obstante, se observa cierto grado de diferenciación genética entre las poblaciones insulares de *Apis mellifera*, como se infiere de los altos valores de bootstrap del árbol más probable.

Finalmente, y en cuanto al grado evolutivo de divergencia de las abejas de Canarias, no hay por el momento datos suficientes como para tomar una decisión acerca de su clasificación como una subespecie o raza nueva. Los datos morfológicos aún no publicados de Padilla y Hernández. (1998), no se pronuncian por la existencia de una nueva subespecie propia de las Canarias, y lo que concluyen es que las poblaciones de las islas se asemejan a las del sur peninsular. Es necesario profundizar en el estudio de los caracteres morfológicos y moleculares para llegar a conclusiones más definitivas. Así ha ocurrido en el caso de *Bombus canariensis*, especie



que resulta estar bien definida no solo por las peculiaridades morfológicas, sino por los datos de los microsátélites y de la secuencia del gen mitocondrial del citocromo b (Widmer *et al.* 1998).

2. Análisis de la variación de los microsátélites.

Los resultados del análisis de los microsátélites en las poblaciones de abejas muestreadas en este estudio, han demostrado la utilidad de dichos marcadores para estudiar aspectos como el flujo génico y la introgresión entre poblaciones y entre subespecies de linajes distintos. Los ocho loci estudiados han mostrado diferente nivel de polimorfismo en cuanto al número de alelos presentes en estas poblaciones, siendo el máximo 17 alelos en el locus A113 y el mínimo 8 en el locus A7, en el conjunto de las siete poblaciones.

El análisis de la variabilidad genética de *A. m. iberica* de Murcia ha mostrado un valor de diversidad genética ($H_e=0'448\pm 0'314$) y un número medio de alelos observado por locus en esta población ($7\pm 2'5$), similares a los que aparecen en otras poblaciones de abejas del linaje europeo de *A. mellifera*, (Estoup *et al.* 1995a). Estos autores sugieren que este nivel de variación genética puede indicar que las poblaciones han sufrido un reciente cuello de botella, o que están sufriendo introgresión génica debida a las actividades apícolas. Esta última explicación no es aplicable a la población analizada en este estudio, ya que las colonias fueron muestreadas teniendo en cuenta su aislamiento no solo geográfico sino también en cuanto al nivel de introducción de abejas de otras razas. Por otro lado, el escaso nivel de variabilidad mitocondrial (se han encontrado tres haplotipos, uno de ellos, A2 con una frecuencia del 88'8% y otro, C1, correspondiente a abejas introducidas del linaje de razas europeas orientales) observado en estas colonias, corrobora la hipótesis de que esta población puede haber sufrido una reducción reciente del tamaño efectivo poblacional (cuello de botella), como ha ocurrido en otras poblaciones de *A. mellifera* de Europa occidental (Estoup *et al.* 1995a).

La frecuencia genotípica de los microsatélites observada en las abejas de los apiarios de esta población, no ha mostrado alejamiento del equilibrio Hardy-Weinberg. Este hecho sugiere que no ha ocurrido diferenciación local entre ellas. Esta observación se ve confirmada con la probabilidad obtenida en el test de diferenciación poblacional, que permite considerar a todas las colonias estudiadas como una sola población única de abejas, lo cual es útil en la comparación con otras poblaciones dispersas en la geografía peninsular.

Algunos alelos de los loci A113, A28, A7 y A8 con tamaños de 218, 128, 106 y 163 pares de bases, muestran en esta población una frecuencia muy alta no observada previamente (0'5, 0'94, 0'74 y 0'89 respectivamente), por lo que podrían tener carácter diagnóstico para abejas procedentes de esta población. El patrón de variabilidad y la frecuencia de los alelos de los loci A28 y A8 son muy similares a los que presentan las poblaciones de abejas de subespecies africanas, lo cual corrobora la contribución del acervo de genes africanos al origen de las abejas del sudeste español. Por otro lado, el locus A113 esta población muestra algunos alelos presentes en poblaciones de *A. m. mellifera* de Francia, hecho que reafirma la situación de las poblaciones de *A. m. iberica* como intermedias entre las poblaciones de *A. m. mellifera* y *A. m. intermissa*.

Frank *et al.* (1998a) han estudiado la distribución de los alelos de siete de los ocho loci estudiados en este trabajo, a lo largo de diferentes poblaciones desde Francia hasta Guinea, incluyendo varias poblaciones de Andalucía, Castilla, el País Vasco y el norte de Portugal. Sus resultados no apoyan las hipótesis propuestas sobre la situación de las poblaciones de *A. m. iberica*, ya que no aparece una modificación gradual de la frecuencia de los alelos, como se esperaría en el caso de que hubiera una transición unidireccional de la subespecie *A. m. intermissa* a *A. m. mellifera* a lo largo de la Península, ni se ha observado una cline de alelos comparable a la observada en el ADNmt, lo cual apoyaría la segunda hipótesis de intergradación secundaria entre las subespecies *intermissa* y *mellifera*. Los patrones de variabilidad de los microsatélites en estas cuatro poblaciones peninsulares son muy similares a los



que aparecen en poblaciones francesas, es decir, no muestran ningún nivel de africanización.

Como contraste, en la población de Murcia se han encontrado alelos frecuentes en poblaciones africanas, lo cual indica la posibilidad de introgresión de genes de subespecies africanas en esta población. En principio, los resultados en esta población del sudeste peninsular sí que apoyan la hipótesis de que existe una intergradación entre las subespecies europea y africana a lo largo de la Península Ibérica. Es necesario realizar un estudio más amplio para confirmar si esta situación aparece como resultado de introducciones históricas durante la época de dominación musulmana, o es debida a un posible flujo génico natural entre las subespecies *mellifera* e *intemissa* a lo largo de la Península Ibérica.

Las poblaciones de abejas de las Islas Canarias están caracterizadas por una variabilidad baja en cuanto al número de alelos por locus de microsatélite y la heterocigosidad esperada. Es en El Hierro en donde se han encontrado menos alelos por locus (3.5 ± 1.6), y en La Gomera donde se han hallado más (6 ± 3.1). Los valores de heterocigosidad esperada son similares entre las islas y también son parecidos a los de la población de Murcia, pero son inferiores a los de la población de Tetuán. La variabilidad genética de las poblaciones insulares es ligeramente más baja que la de otras poblaciones continentales europeas (Estoup *et al.* 1995a) y peninsulares (Frank *et al.* 1998a). Una situación similar se ha observado en poblaciones canarias de abejorros (*Bombus canariensis*), comparadas con poblaciones continentales y de islas del Mediterráneo de *B. terrestris* (Widmer *et al.* 1998), lo que coincide con el patrón observado en otros varios organismos endémicos de islas. Según Frankham (1997), las poblaciones insulares tienen habitualmente un nivel de variación genética mucho menor que las correspondientes poblaciones continentales. Igualmente, las poblaciones endémicas insulares muestran una reducción general de la variación genética frente a las no endémicas. Esta variabilidad menor puede ser explicada en función de los efectos fundador y de

deriva génica, que pueden haber tenido lugar durante periodos de reducción del tamaño efectivo poblacional.

La escasa diferenciación génica de los distintos apiarios en cada isla permite considerar a todas las colmenas sitas en una isla como una sola población. Todas las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg excepto la de Tenerife. Uno de los efectos que provoca desviación de dicho equilibrio, es el producido por los movimientos migratorios y el flujo génico de poblaciones o razas externas a la población muestreada. Esta puede ser, pues, la razón por la que se ha detectado esta desviación en Tenerife, ya que en esta isla se están produciendo importaciones de abejas de otras razas y las actividades apícolas han permitido que en un mismo colmenar se hallen juntas abejas de diferentes subespecies. Esta posible mezcla se confirma con el análisis del ADNmt, puesto que se han encontrado haplotipos del linaje C1 de abejas de Europa oriental. Así, en los apiarios de El Helecho, El Cercado y Tincer Bajo todas las colonias muestreadas pertenecen a este linaje y en el apiario de S. Andrés, que es donde se produce una desviación mayor del equilibrio Hardy-Weinberg, un tercio de las abejas muestra el haplotipo mitocondrial del linaje de abejas europeas del este, entre las que se encuentra *A. m. ligustica*, que es la raza de abeja que los apicultores importan en mayor cantidad.

Debido a las actividades apícolas que tienen lugar en las Islas Canarias, podría plantearse que todas las poblaciones de abejas de estas islas forman una sola población, genéticamente homogeneizada por el hombre desde el siglo XVI. Sin embargo, los resultados de los tests sobre diferenciación genética y génica de estas poblaciones, indican que cada isla tiene un proceso singular de diferenciación genética, lo que hace que cada una de ellas pueda ser considerada como una entidad genéticamente distinta. Por tanto, no puede hablarse de una población única de abejas para las Islas Canarias.

Esta conclusión se basa en los estadísticos F_{ST} que, además, indican que las poblaciones canarias se diferencian de las poblaciones continentales ibérica y



norteafricana. Como ocurre en el caso de las poblaciones de abejorros canarios (Widmer *et al.* 1998), las poblaciones de *Apis mellifera* de Canarias no han llegado a sufrir procesos de especiación, en contraste con otros organismos de los que se han descrito endemismos intrainsulares (*Pimelia*, Juan *et al.* 1995; *Hegeter*, Juan *et al.* 1998; *Gallotia*, Thorpe *et al.* 1994; *Chalcides*, Brown y Pestano 1998). Estas diferencias en los procesos de especiación aparecen como resultado de los distintos mecanismos de dispersión que desarrolla cada organismo estudiado. Además, en el caso de las abejas, la influencia de la actividad humana determina en parte el flujo génico entre las poblaciones de colmenas en las islas, ya que se producen movimientos estacionales dentro de cada isla, lo que determina la homogeneidad respecto a la dotación genética que presentan las poblaciones.

La frecuencia alélica de algunos loci es elevada en alguna de las poblaciones canarias, como ocurre con el alelo de 138 pares de bases del locus A88, cuya frecuencia es 86%. En estos casos el alelo frecuente podría tener un cierto valor diagnóstico, al no haberse observado dicha frecuencia en otras poblaciones de abejas continentales. Un caso diferente es el del alelo de 128 pares de bases del locus A28, cuya frecuencia es de 96'7% y es incluso monomórfico en La Palma. Este dato no es llamativo, dado que la frecuencia de este alelo también es muy alta en la población de Murcia (94%) y en la de Tetuán (53%). Igual ocurre con el alelo de 163 pares de bases del locus A8 (77% en las Islas Canarias y 89% en Murcia) y el alelo de 106 pares de bases del locus A7 (69% en las Islas Canarias, 74% en Murcia y 46% en Tetuán).

En el conjunto de la población de abejas canarias se ha detectado un desequilibrio genotípico significativo entre los loci A7 y A35. Se pueden postular cuatro hipótesis para explicar este resultado (Estoup *et al.* 1996): (1) una reducción reciente o permanente del tamaño efectivo poblacional, (2) una mezcla reciente de poblaciones genéticamente diferenciadas, (3) selección de una cierta combinación genotípica y (4) un error debido al muestreo de grupos de abejas obreras procedentes de la misma colonia. La primera hipótesis es verosímil, ya que la

reducción del tamaño efectivo poblacional es una característica asociada a los efectos de insularidad que sufren estas poblaciones. En Tenerife, en donde se han hallado más valores significativos de desequilibrio genético, se está produciendo importaciones de abejas de otras razas, por lo que la segunda hipótesis también explicaría en parte este resultado. En cuanto a la tercera hipótesis, parece poco probable ya que no se ha observado desequilibrio en las otras poblaciones de Murcia y Tetuán, lo que sería de esperar si estos dos loci estuvieran bajo selección por estar asociados a otras características genéticas. La cuarta hipótesis sobre el muestreo sesgado de muestras próximas es posible, aunque se ha intentado evitar realizando los muestreos en zonas alejadas entre si extendidas dentro de cada isla.

La población de Tetuán ha mostrado una alta variabilidad en cuanto al número de alelos por locus y la heterocigosidad de los alelos. Este resultado coincide con los datos observados previamente en poblaciones de *A. m. intermissa*, *A. m. major* y *A. m. sahariensis* (Estoup *et al.* 1995a). Entre las razones de esta variabilidad, estos autores citan la densidad elevada de las poblaciones africanas, el pronunciado comportamiento migratorio y la estabilidad del ambiente, lo que determina que estas poblaciones tengan un tamaño efectivo poblacional mayor que las poblaciones europeas.

La población africana analizada en este estudio está compuesta por dos de las razas típicas del norte de África, *A. m. major* y *A. m. intermissa*. Por ello, el equilibrio Hardy-Weinberg no se alcanza en esta muestra, ya que en este caso la distribución de los alelos está determinada por los dos grupos de subespecies.

Estudios teóricos y experimentales con poblaciones que han sufrido una reducción temporal de su tamaño efectivo poblacional, coinciden en demostrar que estas poblaciones presentan un descenso del número medio de alelos observado por locus, lo cual influye en los valores de heterocigosidad presentes en dichas poblaciones. Maruyama y Fuerst (1985) predicen que una población que ha pasado por un episodio poblacional de un cuello de botella, tendrá una aparente reducción

en el número de alelos comparado con su heterocigosidad. Otros autores, como Leberg (1992), subrayan que una reducción del número de alelos por locus es un indicador más sensible que la heterocigosidad para detectar cuellos de botella. Este déficit en el número de alelos es debido, principalmente, a la falta de alelos que se espera que aparezcan en la muestra una o dos veces y se puede formular como un exceso de heterocigosidad, dado el número de alelos observado en los loci analizados (Luikart *et al.* 1998).

Sin embargo, si la población que ha pasado por una reducción temporal de su tamaño efectivo poblacional tiene un crecimiento rápido, se puede observar un exceso en el número de alelos o falta de heterocigosidad, ya que el número medio de alelos por locus aumenta más rápidamente que la heterocigosidad, cuando dicho tamaño se repone (Nei *et al.* 1975).

Para investigar si se han producido eventos de cuello de botella en las poblaciones analizadas en este estudio, se ha usado el programa BOTTLENECK (Cornuet y Luikart 1996, Piry *et al.* 1996). Este programa realiza varios tests estadísticos, entre ellos el test de Wilcoxon que es el más apropiado para analizar la muestra estudiada por su tamaño muestral (de 20 a 60 individuos) y el número de loci usados (8). Este test comprueba si hay un exceso de heterocigosidad con el número de alelos observados, o lo que es lo mismo, analiza la deficiencia de alelos observados dada la heterocigosidad esperada a partir de la frecuencia de alelos de microsatélites en la población, según los modelos de evolución de los infinitos alelos (I.A.M.) o de la mutación paso a paso (S.M.M.) de los microsatélites.

Los resultados de este test en estas poblaciones son consistentes con una reducción del tamaño efectivo poblacional en Murcia, Tenerife y El Hierro según el I.A.M. y en todas las poblaciones estudiadas excepto en Gran Canaria, según el S.M.M. Este resultado ha sido también observado en las poblaciones europeas orientales, en donde se ha descrito una reducción general de la diversidad génica (Franck *et al.* 1998a). La alta tasa de mutación de los microsatélites los hace

susceptibles de recuperar su variabilidad rápidamente (Weber y Wong 1993, Gypay *et al.* 1994), por lo cual este episodio poblacional puede haber ocurrido recientemente.

Según las probabilidades observadas, se puede concluir que los microsatélites de estas poblaciones siguen el modelo de evolución de los infinitos alelos (I.A.M.). Las desviaciones hacia este modelo han sido anteriormente observadas en otras poblaciones de *A. mellifera* de diferentes linajes y de *Bombus terrestris* (Estoup *et al.* 1995a, 1995b). Según el modelo de los infinitos alelos, cada alelo que aparece en la población por un hecho mutacional es diferente de aquellos presentes anteriormente en dicha especie. Este hecho mutacional es, según el modelo de la mutación paso a paso, la pérdida o ganancia de una unidad de repetición. De los ocho loci estudiados en este trabajo, cinco son compuestos o imperfectos. Ambos tipos de loci son menos variables que los perfectos, ya que las interrupciones en la secuencia central de los microsatélites tienden a estabilizar la secuencia de unidades de repetición y provocan mutaciones que abarcan largos trozos de ADN, más que unidades discretas. De ahí que, dependiendo del tamaño de la unidad de repetición y del tipo de microsatélite, éstos se aproximen más hacia uno de los dos modelos de evolución propuestos (Shriver *et al.* 1993), y en este caso sigan con probabilidad mayor el de los alelos infinitos.

Si las poblaciones de las Islas Canarias derivaran de un reducido número de colonias fundadoras, este cuello de botella podría haber introducido una sobreestimación de las distancias genéticas. Aún en este caso, las distancias entre estas poblaciones respecto a la africana son altas y el número de emigrantes como medida del flujo génico entre ellas, es reducido. La distancia genética entre las poblaciones insulares y las continentales es mayor entre las islas pequeñas y más alejadas del continente p. ej. entre El Hierro y La Palma y Tetuán. Sin embargo la reducida distancia genética entre estas poblaciones canarias y Murcia (especialmente entre El Hierro y Gran Canaria y Murcia), indica que estas poblaciones insulares podrían derivar de poblaciones peninsulares y que la baja variabilidad de las



poblaciones canarias podría ser un resultado de un suceso de fundadores, a partir de antecesores provenientes de poblaciones europeas.

La situación de la población de Murcia en los árboles filogenéticos concuerda con esta última hipótesis sobre el origen de las poblaciones de abejas canarias. El análisis del ADNmt permite llegar a conclusiones parecidas en el caso de las poblaciones de abejas, a pesar de las historias evolutivas de otros organismos endémicos canarios (*Pimelia*, *Gallotia*; etc.), que tienen su origen en el cercano continente africano.

En el análisis de la variación de los microsatélites no se observa un patrón geográfico claro, como ocurre en el caso de los árboles basados en la variación del ADNmt. Esta situación contrasta con los resultados de la distancia genética entre estas islas, los cuales apoyan la existencia de cierta diferenciación genética interinsular. El flujo genético que probablemente existe entre las islas ayudaría a reducir dicha diferenciación. Igual ocurriría con la introducción de otras razas, ya que las reinas foráneas pueden ocultar la expansión demográfica de las poblaciones locales que se observa en ocasiones después de un cuello de botella.

La filogenia que se puede inferir de los árboles definidos por los métodos filogenéticos de máxima parsimonia, máxima probabilidad y "neighbour-joining", muestra la influencia de la introgresión de genes de otras razas por medio de los zánganos. Este resultado es especialmente importante en el caso de la isla de Tenerife, en donde la introducción de reinas de otras razas, especialmente de *A. m. ligustica*, se está produciendo de manera intensa desde hace tiempo. El efecto de esta polución genética se puede observar en los valores de distancia genética y en el número de emigrantes naturales, los cuales indican que no hay un aislamiento notorio entre las poblaciones de subespecies distintas de una misma isla.

La discrepancia entre las filogenias basadas en datos del ADNmt y de variación de los microsatélites puede reflejar, además, el diferente nivel de introgresión de los genomas nucleares y mitocondriales. Los genes nucleares (entre ellos los

microsatélites) se transmiten a través de los zánganos a colonias no relacionadas entre sí. Sin embargo, la molécula de ADNmt se transmite sin recombinación a partir de la reina a toda su descendencia. Estudios en poblaciones de abejas de Argentina (Sheppard *et al.* 1991), Yucatán (Rinderer *et al.* 1991) y Tasmania (Oldroyd *et al.* 1994), han demostrado que cuando dos linajes de razas de abejas entran en contacto, la distribución de los marcadores nucleares y mitocondriales puede no coincidir. Esto se ha puesto de manifiesto en este estudio en el caso de la población de la isla de Tenerife, en donde se está produciendo contacto entre abejas del linaje europeo oriental y abejas de origen autóctono o peninsular.

Los resultados hallados en esta tesis, corroboran que los microsatélites son marcadores adecuados para investigar hechos recientes en la historia evolutiva poblacional de organismos como *A. mellifera*. Factores como la introgresión de genes y la diferenciación poblacional pueden ser explorados con estos marcadores. En la reconstrucción demográfica e histórica de las poblaciones, la característica de tener un valor selectivo neutro es una de las primeras que deben tener los marcadores moleculares. Aunque los microsatélites como marcadores tienen otros límites, su alto nivel de variabilidad y su neutralidad selectiva los hacen especialmente idóneos para este tipo de estudios. No obstante, el estudio de un único tipo de marcador genético puede llevar a conclusiones erróneas por las propias limitaciones del mismo. En el caso de los microsatélites, su evolución unidireccional (Rubinstzein *et al.* 1995) y su alto nivel de homoplasia (Estoup *et al.* 1995b), aconsejan el estudio de otros marcadores como el ADNmt, para intentar comprender en su conjunto la evolución poblacional de *A. mellifera*.

Resumen y Conclusiones

Resumen.

El objetivo principal del trabajo es caracterizar al nivel molecular la variabilidad poblacional de la abeja doméstica, *Apis mellifera* Linneo, 1758, corroborando de esta manera varias hipótesis de trabajo. Una de ellas se refiere a la estructura poblacional de las abejas en la Región de Murcia y al efecto racial que se deriva de la importación de reinas y del proceso de la trashumancia de las colmenas.

Otra hipótesis se refiere a la singularidad de las abejas de las Islas Canarias, cuyos antecesores se sitúan en el norte de África (poblamiento antiguo de las islas por causas naturales) o en la Península Ibérica (poblamiento antrópico a partir del siglo XVI). Se trata de determinar si existe una raza peculiar de estas islas y sus posibles ancestros.

Como población de referencia a efectos comparativos se incluye en el estudio una de Tetuán, que presenta las características propias de las razas norteafricanas.

El planteamiento del trabajo comprende el estudio de los haplotipos del ADNmt, mediante secuenciación de la región intergénica entre el gen del ARNt^{leu} y el de la citocromo oxidasa II (COII). También se estudia el polimorfismo de dicha región intergénica, puesto de manifiesto al tratarla con la enzima de restricción *DraI*.

Otra aproximación consiste en estudiar la variabilidad de los numerosos alelos que presentan ocho loci de microsatélites del genoma nuclear, ya que proporcionan una detallada información sobre la estructura poblacional.

Estas poblaciones han mostrado distintos niveles de variabilidad genética en el ADNmt. En total se han encontrado 7 haplotipos, algunos de ellos restringidos a una de las regiones muestreadas. Un alto porcentaje de las muestras de Murcia pertenece al linaje de subespecies y razas africanas (linaje A: haplotipos A2, 88'8% y A1, 8'8%) y un tercer haplotipo pertenece al linaje de abejas de Europa del Este (linaje C, que incluye a *A. m. ligustica*, haplotipo C1, 2'2%) lo que indica que ha habido introgresión de genes de otras razas debido a la importación de reinas. Estas colmenas son bastante homogéneas a pesar de la existencia de colonias cercanas trashumantes y de otras en las que se han introducido reinas italianas. Entre las posibles explicaciones de estos resultados figuran una menor adaptabilidad de las reinas importadas y la baja tasa de las importaciones.

En las Islas Canarias se han encontrado 5 haplotipos diferentes, dos de ellos pertenecen al linaje de subespecies africanas (linaje A: haplotipos A1, 25'4% y A9, 0'9%), otro pertenece al linaje de Europa del este (haplotipo C1, 15'5%) y otros tres haplotipos podrían formar parte de un segundo linaje africano (haplotipos A11, 1'4%, A14, 9'1% y A15, 47'7%). Los haplotipos A14 y A15 han sido descritos por primera vez. Estos haplotipos y el A11, tienen una nueva secuencia P en su región intergénica llamada P₁. La alta frecuencia de distribución del haplotipo A15 y el hecho de que junto con el A14 no se hayan descrito en otras regiones, sugiere que estos haplotipos pueden ser característicos del archipiélago canario. Diferentes olas de colonización desde África, la importación de reinas y la diversificación de hábitas son factores que pueden explicar la variabilidad del ADNmt de las abejas de las Islas Canarias.

El análisis filogenético de los datos de la variación del ADNmt indica que las poblaciones de las Islas Canarias han sufrido procesos de diversificación genética y que se encuentran más cercanas a la población peninsular que a la

africana. Este resultado concuerda con análisis morfológicos previos, que inciden en la estrecha relación de las poblaciones de abejas insulares y peninsulares españolas, hecho posiblemente debido a importaciones de reinas en tiempos históricos.

El nivel de variación genética de los microsatélites es distinto en las poblaciones muestreadas. Se han observado un total de 98 alelos de distinto tamaño en el conjunto de los 8 loci analizados en las 241 muestras. La heterocigosidad observada media es $0'385 \pm 0'314$ en la población de Murcia, $0'416 \pm 0'291$ en las Islas Canarias y $0'603 \pm 0'323$ en Tetuán. De entre todas las poblaciones, la de Tetuán es la que presenta mayor variación genética en términos de número medio de alelos por locus ($6'6 \pm 1'1$) y de heterocigosidad esperada ($0'738 \pm 0'068$). Algunos de los 8 loci muestran alelos con una alta frecuencia en algunas poblaciones que, sin embargo, están ausentes o son poco frecuentes en otras.

Los loci de microsatélites tienen algunos alelos en la población de Murcia cuya distribución y frecuencia relacionan esta población bien con poblaciones africanas bien con europeas, lo cual confirma el estatus de *A. m. iberica* como raza híbrida entre las subespecies *A. m. intermissa* y *A. m. mellifera*. El bajo nivel de variabilidad de los loci de microsatélite, junto con los datos mitocondriales, sugiere que esta población ha sufrido recientemente una reducción de su tamaño poblacional (efecto cuello de botella).

El análisis de la variación de los microsatélites en las poblaciones de abejas de las Islas Canarias, revela cierto grado de diferenciación poblacional, lo cual permite considerar a cada isla como una población diferente de abejas. En estas poblaciones insulares el nivel de diversidad genética es bajo, lo que coincide con datos previos sobre la variabilidad genética de poblaciones de organismos



aislados en islas. Este hecho puede deberse al efecto fundador de organismos provenientes de otras zonas, que en el caso de las Islas Canarias pueden ser el continente africano o el sur peninsular.

La distribución de los alelos de microsatélites en estas poblaciones sigue el modelo de evolución de los infinitos alelos (I.A.M.) en todos los casos, mientras que no se ajusta tan bien a las predicciones del modelo de la mutación paso a paso (S.M.M.). El análisis de los estadísticos F así como del número de emigrantes (Nm), indican que aparentemente no se están produciendo mecanismos de aislamiento por distancia entre las poblaciones canarias y el continente africano, y que aquellas poblaciones están más relacionadas con las del sudeste peninsular.

La introgresión de genes nucleares a partir de reinas y zánganos introducidos es evidente en la isla de Tenerife y provoca que esta población ocupe una posición separada respecto a las otras islas en el cladograma obtenido con el método "neighbour-joining". El análisis filogenético basado en la variación de los microsatélites apoya la hipótesis que describe una estrecha relación entre las poblaciones canarias y la población de Murcia, así como la posición ancestral que ocupa la población de Tetuán.

Conclusiones.

1. La población de abejas muestreada en Murcia es muy homogénea en cuanto al nivel del ADNmt. Un 97'2% de las abejas muestreadas pertenece a la subespecie *A. mellifera iberica* parecida a *A. mellifera intermissa*.
2. El análisis de la variación de los microsatélites en la población de Murcia apoya la situación de población híbrida entre las subespecies *intermissa* y *mellifera*. El bajo nivel de variabilidad de estos marcadores sugiere que en la población estudiada ha habido una reducción reciente del tamaño efectivo poblacional.
3. Las poblaciones de abejas de las Islas Canarias han sufrido procesos de diferenciación genética al nivel del ADNmt. Los haplotipos A15 y A14 son endémicos en estas poblaciones y aparecen con una frecuencia alta (47'7% y 9'1%, respectivamente).
4. El análisis del ADNmt y de los loci de microsatélites confirma la introducción de abejas de Europa del Este, especialmente en la isla de Tenerife, en donde un 35% de las abejas muestradas tienen el haplotipo mitocondrial típico de estas abejas europeas. Algunos alelos frecuentes de microsatélites en abejas de razas europeas se han detectado en colmenas de esta isla.
5. Los análisis filogenéticos basados en la variación del ADNmt y de los loci de microsatélites, indican que las poblaciones de abejas de las Islas Canarias son más afines a las poblaciones del sur de la Península Ibérica, que a las del norte de África, representadas por la población de Tetuán. Este dato sugiere que si bien pudo haber poblaciones naturales en las Canarias de origen africano, las abejas importadas desde la Península Ibérica a partir del siglo XVI se han vuelto predominantes e incluso, se han diferenciado recientemente y en cierta medida, de las poblaciones ibéricas, merced a las condiciones ambientales particulares de dichas islas.



Summary and Conclusions

Summary.

The main objective of this thesis is to characterise at the molecular level, the population variability of *Apis mellifera* Linné, 1758, and to corroborate in this way several hypotheses. One of them is related with the structure of the honeybee populations from Murcia and the racial effect derived from the queen importation and the migrating movements.

Other hypothesis to be corroborated is referred to Canarian honeybees, whose origin could be either Northern Africa (due to natural events) or the Iberian Peninsula (due to human activities from XVI century). The existence of an endemic honeybee race from the Canaries will be investigated.

A population from Tetuán (Morocco) including the subspecies *A. m. major* and *A. m. intermissa* (Morocco) has been sampled and included as a reference for the molecular characterisation of the *A. mellifera* samples from Spain.

These populations were assessed for genetic variation at the mitochondrial level using the *Dra*I restriction test and the sequence of the tARN^{Leu}-COII intergenic region.

The approach at the nuclear level is aimed to detect the genetic variation of eight different polymorphic microsatellite loci. The allele variability at these markers gives a detailed information about the population structure of these honeybees.

Different degrees of genetic variation were observed in the mtDNA. In total seven different haplotypes have been found some of them restricted to on particular region. In Murcia, a high percentage of the samples belong to the



African lineage of subspecies and races (lineage A: haplotypes A2, 88.8% and A1, 8.8%), and a third haplotype belongs to the lineage of bees coming from Eastern Europe (lineage C that includes *A. m. ligustica*; haplotype C1, 2.2%). This fact indicates that queen importation has occurred. These colonies are rather homogenous in spite of being close to colonies that are moved across different Spanish regions and in which foreign queens have been introduced. Possible explanations for these findings are a lower adaptation of these queens to local conditions and a low rate of queen importation.

In the Canary Islands five haplotypes were found, two of them belonging to the African lineage of subspecies (lineage A; haplotypes A1, 25% and A9, 0.9%), one to the East European lineage (haplotype C1, 15.7%), and the other three (haplotypes A11, 1.4%, A14, 9.7% and A15, 47.2%) belonging to a particular subset of the A lineage. The haplotypes A14 and A15 are described for the first time. These haplotypes and the haplotype A11 have a new P sequence in the intergenic region named P₁. The wide distribution and high frequency of haplotypes A15 and A14 suggest that they are characteristic to the Canarian Archipelago. Sources of variability of honeybee mtDNA in the Canary Islands (waves of colonisation from Africa, queen importation, habitat diversification) are discussed.

Phylogenetic analyses of the mitochondrial data indicate that the *A. mellifera* populations from the Canary Island have undergone genetic diversification and that they are more closely related to the Iberian than to the African population. This is in agreement with previous analyses of morphological variation that provide evidence of a relationship with these Spanish honeybee populations due to historic queen importation.

Different levels of genetic variation at the eight microsatellite loci were observed in these populations. In total, 98 individual length variant alleles were observed in 241 samples. The observed heterozygosity over all loci averages 0.385 ± 0.314 in the population from Murcia, 0.416 ± 0.291 in all populations from the Canary Islands and 0.603 ± 0.323 in the population from Tetuán. The African population displays the highest genetic variation, in terms of average number of alleles at each locus (6.6 ± 1.1) and expected heterozygosity (0.738 ± 0.068). Some of the eight loci display discrete alleles that were detected at high frequency in some populations and were either absent or present at low frequency in the others.

In the population from Murcia some microsatellite alleles show a distribution and frequency that relate this population either with the European or the African populations, thus confirming the hybrid status of *A. mellifera iberica* between *A. mellifera mellifera* and *A. mellifera intermissa*. The low variability at microsatellite loci in combination with the mitochondrial data, suggests that this population may have undergone a recent bottleneck. Such a population event is also inferred in the Canarian populations, as they show a general reduced genetic variability at these microsatellite loci.

Honeybee population from each of the Canary Islands shows a level of genetic differentiation in microsatellite loci that allows to consider each island as an individual honeybee population. Within each island there is a low level of genetic variation, as it is expected for isolated island populations. This could be due to founder effects by organisms coming either from Africa or from Iberia.

The allele distribution at these microsatellite loci in these populations fits the infinite allele model of evolution (I.A.M.) better than the stepwise



mutation model (S.M.M.). Both, the F statistics and the analysis of the number of emigrants, suggest that no clear isolation by distance mechanisms have caused significant differentiation among the Canarian and the close mainland populations from Africa. In fact, Canarian populations display a closer relationship with Iberia.

The introgression of nuclear genes from foreign queens and drones is evident in the island of Tenerife, and it drives this population to cluster in a separated position from the other islands in the cladogram obtained with the neighbour-joining method. Phylogenetic analyses based on microsatellite variation support the close relationship between the Canarian and the south-eastern Iberian population from Murcia, and the ancestral position of the sample from Tetuán.

Conclusions.

1. The honeybee population from Murcia (Southeastern Spain) is quite homogeneous at the mitochondrial level. A high percentage, 97.2% of the colonies, belongs to the subspecies *A. mellifera iberica intermissa*-like, showing one haplotype with a high frequency (A2, 88.8%).
2. The microsatellite variation analysis in the population from Murcia confirms the hybrid status of *A. mellifera iberica* between the subspecies *A. mellifera mellifera* and *A. mellifera intermissa*. The low level of genetic variation suggests that the studied samples have undergone a reduction in the effective population size in the recent past.
3. Canarian honeybee populations have undergone a genetic differentiation process at the mitochondrial level. The haplotype A15 may be considered endemic for these populations as it shows a high frequency (47.7%). The haplotype A14 may be also endemic to the islands.
4. The microsatellite and mitochondrial analyses confirm the introduction of East-European honeybees (lineage C), especially in Tenerife where 35% of the sampled colonies do show the typical haplotype from this lineage (C1).
5. Phylogenetic analyses based on mtDNA and microsatellite variation support a closer relationship between the Canarian and the Iberian populations in spite of the geographical proximity of the islands to the African continent. This conclusion, in turn, suggests that importation of honeybees from Iberia since historical times (XVI century), have displaced in a great extent, the hypothesised natural populations close to the African mainland, and that there has been a recent differentiation of Canarian honeybee populations, in response to the particular environmental conditions of the islands.



Bibliografía



- ANCOECHEA E., FUSTER J.M., IBAROLA J.M., CENDRERO A., COELLO J., HERNÁN F., CANTAGREL J.M., JAMOND C. 1990. Volcanic evolution of the island of Tenerife (Canary Islands) in the light of new K-Ar data. **Journal of Volcanic and Geotherm Research** 44: 231-249.
- ANGUITA F., HERNÁN F. 1975. A propagating fracture model versus a hot spot origin of the Canary Islands. **Earth Planet Science Letters**. 27: 11-19.
- ARIAS M.C., SHEPPARD W.S. 1996. Molecular phylogenetic of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetic Evolution** 5: 557-566.
- BADINO A., CELEBRANO G., MANINO A. 1984. Population Genetics of Italian honeybee *Apis mellifera ligustica* Spin and its relationships with neighbouring subspecies. **Bulletin of the Museum of Science Natural of Torino** 2: 571-584.
- BLANCHETOT A. 1991. Genetic relatedness in honeybees as established by DNA fingerprinting . **Journal of Heredity** 82: 391-396.
- BROWN R.P., PESTANO J. 1998. Phylogeography of skinks (*Chalcides*) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Ecology** 7: 1183-1191.
- CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y., PHILLIPS H.A., RICHARDS R.I., MULLEY J.C., SUTHERLAND G.R. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics** 52: 922-927.
- CAVALLI-SFORZA L. L., EDWARDS A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **Evolution** 32: 550-557.
- COBOLLI-SBODORNI M., DE MATTHAEIS E., LA ROSA G., MATTOCIA M., VIGNA TAGLIANTI A. 1991. Biochemical differentiation and divergence time in the Canarian genus *Eutrichopus* (Coleoptera, Carabidae). En *Biogeographical aspects of insularity*. **Atti dei Convegni Lincei** 85: 233-243.



- CORLEY J., RABINOVICH M., SEIGELCHIFER M., ZORZOPULOS J., CORLEY E. 1993. Sperm utilization in honeybees as detected by M13 DNA fingerprints. En: *DNA Fingerprinting: State of the Science* (editado por S.D.J. Pena, R. Chakraborty, T.J. Epplen y A.J. Jeffreys), páginas 355-362. Birkhauser Verlag, Basel.
- CORNUET J.M. 1982. The MDH polymorphism in some West Mediterranean honeybee populations. Proceedings of the IX IUSSI Congress, Boulder.
- CORNUET J.M. 1982. Représentation graphique de populations multinormales par des ellipses de confiance. **Apidologie** 13: 15-20
- 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., SOLIGNAC M. 1991. Putative function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. **Genetics** 128: 393-403.
- CORNUET J.M., LUIKART G. 1996. Description and power analysis of two tests for inferring recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144: 2001-2014.
- 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.
- ERLANDSSON S. 1979. *Bombus canariensis* Pérez, 1895 n.stat.& *B. maderiensis* n. sp. from the Macronesian Islands. **Entomologica Scandinavica** 10: 1427-1431.



- ESTOUP A., SOLIGNAC M., HARRY M., CORNUET J.M. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species : *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acid Research** 21: 1427-1431.
- ESTOUP A., SOLIGNAC M., CORNUET J.M. 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. **Proceedings of the Royal Society of London Series B** 258: 1-7.
- ESTOUP A., GARNERY M., SOLIGNAC M., CORNUET J.M. 1995a. Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics** 140: 679-695.
- ESTOUP A., TAILLEZ C., CORNUET J.M., SOLIGNAC M. 1995b. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in Apidae species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Molecular Biology and Evolution** 12: 1074-1084.
- EWENS W.J. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. **Theoretical Population Biology** 3: 87-112.
- FELSENSTEIN J. 1990. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.4. Distribuido por el autor. Dpto. de Genética, Universidad de Washington, Seattle.
- FELSENSTEIN J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.5c. Distribuido por el autor. Dpto. de Genética, Universidad de Washington, Seattle.
- FONDRK MK., PAGE R.E., HUNT G.J. 1993. Paternity analysis of worker honeybees using random amplified polymorphic DNA. **Naturwissenschaften** 80: 226-231.
- FORBES S.H., HOGG J.T., BUCHANAN F.C., CRAWFORD A.M., ALLENDORF F.W. 1995. Microsatellite Evolution in congeneric mammals: Domestic and Bighorn sheep. **Molecular Biology and Evolution** 12: 1106-1113.



- FRANCK P., GARNERY L., SOLIGNAC M., CORNUET J.M. 1998a. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution** 52: 1119-1134.
- FRANCK P., CORNUET J.M., SOLIGNAC M., GARNERY L. 1998b. Honeybee phylogeography in Europe: new insights from the analysis of Italian honeybees with microsatellite and mitochondrial markers. Proceedings of the XIII IUSSI Congress, Adelaide.
- FRANKHAM R. 1997. Do islands populations have less genetic variation than mainland populations?. **Heredity** 3: 311- 327.
- GARNERY L., VAUTRIN D., CORNUET J.M., SOLIGNAC M. 1991. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. **Apidologie** 22: 87-92.
- 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.
- GOLDSTEIN D.B., POLLOCK D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity** 88: 335-342.
- GOETZE G.K.L. 1964. *Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese*. Paul Parey, Hamburg.
- GOUDET J. 1997. FSTAT (programa para PC IBM compatibles para calcular estimaciones de los estadísticos F de Weir and Cockerman 's (1984)), versión

- 1.2. Disponible por el autor. Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, CH-1015 Dorigny.
- GUO S.W., THOMPSON E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372
- GYAPAI G., MORISSETTE J., VIGNAL A., DIB C., FIZAMES C., MILLASEAU P., MARC S., BERNARDI G., LATHROP M., WEISSENBACH J. 1994. The 1993-94 Généthon human genetic linkage map. **Nature Genetics** 7: 246-339.
- HEDGES S.B. 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. **Molecular Biology and Evolution** 9: 366-369.
- HEPBURN H.R., RADLOFF S.E. 1996. Morphometric and pheromonal analyses of *Apis mellifera* L. along a transect from the Sahara to the Pyrenees. **Apidologie** 28: 243-258.
- HUGHES C.R., QUELLER D.C. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. **Molecular Ecology** 2: 131-137.
- HUNT G.J., PAGE R.E. 1994. A linkage map of the honeybee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. **Genetics** 139: 1371-1382.
- IRWIN S.D., WETTERSTRAND K.A., HUTTER C.M., AQUADRO C.F. 1998. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: evidence for founder effects in New World populations. **Genetics** 150: 777-790.
- IZQUIERDO J., DOMÍNGUEZ A., ALBORNOZ J., SANTIAGO E. 1985. Discriminación entre poblaciones de abejas (*Apis mellifera*) de Asturias y la Submeseta Norte. **Boletín de Ciencias Naturales. IDEA** 35: 87-101.
- JUAN C., OROMÍ P., HEWITT G.M. 1995. Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). **Proceedings of the Royal Society of London Series B** 261: 173-180.



- JUAN C., IBRAHIM K.M., OROMÍ P., HEWITT G.M. 1996. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of *Pimelia* darkling beetles on the island of Tenerife (Canary Islands). **Heredity** 77: 589-598.
- JUAN C., IBRAHIM K.M., OROMÍ P., HEWITT G.M. 1998. The phylogeography of the darkling beetle, *Hegeter politus*, in the eastern Canary Islands. **Proceedings of the Royal Society of London Series B** 265: 135-140.
- KIMURA M., CROW J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738.
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M. 1993. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versión 1.01. The Pennsylvania State University, University Park.
- LEVISON G., GUTMAN G.A. 1987. Slipped-strand misrepairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution** 4: 203-221.
- LOUIS E.J. DEMPSTER E.R. 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. **Biometrics** 43: 805-811.
- LEBERG P. L. 1992. Effects of a population bottleneck on genetic variation as measured by allozyme electrophoresis. **Evolution** 46: 477-494.
- LEWONTIN R.C. 1988. On measures of gametic disequilibrium. **Genetics** 120:849-852.
- LUKART G., ALLENDORF F. W., CORNUET J.M., SHERWIN W. B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity** 89: 238- 247.
- MAA T.C. 1953. An inquiry into systematic of the tribus Apidini or honeybees (Hymenoptera). **Treubia** 21: 525-640.
- MACHADO A. 1976. Introduction to a faunal study of the Canary Islands laurisilva with special reference to the ground beetles (Coleoptera, Caraboidea). En *Biogeography and Ecology in the Canary Islands* (editado por G. Kunkel), páginas 347-412. Dr. W. Junk: La Haya.

- MARUYAMA T., FUERST P.A. 1985. Populations bottlenecks and non equilibrium models in population Genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by recent bottleneck. **Genetics** 111: 675-689.
- MCMICHAEL M., HALL H.G. 1996. DNA RFLPs at a highly polymorphic locus distinguish European and African subspecies of the honeybee *Apis mellifera* L. and suggest geographical origins of New World honeybees. **Molecular Ecology** 5: 403-416.
- MEUSEL M.S., MORITZ R.F.A. 1992. Mitochondrial DNA length variation in the cytochrome oxidase region of honeybees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie** 23: 147-150.
- MEUSEL M.S., MORITZ R.F.A. 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. **Currents Genetic** 19: 55-60.
- MORITZ R.F.A., HAWKINS C.F., CROZIER R.H., MACKINLEY A.G. 1986. A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Experientia** 42: 323-324.
- MORITZ R.F.A., MEUSEL M.S., HABERL M. 1991. Oligonucleotide DNA fingerprinting discriminates super- and half- sisters in honeybees colonies (*Apis mellifera* L.). **Naturwissenschaften** 78: 422-424.
- MORITZ R.F.A. 1994. Molecular Biology of the honeybee. **Advances in Insect Physiology** 25, 105-149.
- MORITZ R.F.A., KRYGER P., KOENIGER G., KOENIGER N., ESTOUP A., TINGEK S. 1995. High degree of polyandry in *Apis dorsata* queens detected by DNA microsatellite variability. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 37: 357-363.
- NEUMAN P. 1998. *The impact of polyandry and drifting on the genotypic composition of honeybees (A. mellifera L.) colonies.* Tesis Doctoral. Universidad de Halle- Wittenberg.



- NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 70: 3321-3323.
- NEI M., MARUYAMA T., CHAKRABORTY R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution** 29: 1-10.
- NEI M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York.
- OHTA T., KIMURA M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetical Research** 22: 201-204.
- OLDROYD B.P., ROWE D., CORNUET J.M., RINDERER T.E., CROZIER H.R. 1994. Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. **Heredity** 74: 315-325.
- OLDROYD B.P., SMOLENSKI A.J., CORNUET J.M., WONGSIRI S., ESTOUP A., RINDERER T. E., CROZIER R.H. 1995. Levels of polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis florea*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 37: 329-335.
- ORANTES BERMEJO F.J., GARCÍA FERNÁNDEZ P. 1995. Morphological variability of *Apis mellifera iberica* in different apiaries of Southern Spain. **Journal of Apicultural Research** 34, 23-30.
- OROMÍ P., MARTÍN J.L., MEDINA A.L., IZQUIERDO I. 1991. The evolution of the hypogean fauna in the Canary Island. En: *The Unity of Evolutionary Biology*, (páginas 380-395) Dioscorides Press, Portland.
- PADILLA F., HERNÁNDEZ R. 1998. *Estudio morfológico de las abejas melíferas (Apis mellifera L.) del archipiélago canario*. Informe realizado para la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad Canaria.
- PAMILO P., VARVIO -AHO S.L., PEKKARINEN A. 1978. Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas** 88: 93-99.

- PAMILO P., CROZIER R.H. 1981. Genetic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics** 98: 190-214.
- PIRY S., LUIKART G., CORNUET J.M. 1996. BOTTLENECK (programa para detectar reducciones recientes del tamaño efectivo de población a partir de datos de frecuencias de alelos). Disponible por los autores. Laboratoire de Modélisation et de Biologie Evolutive. INRA-URLB. 488 rue de la Croix-Lavit, 34090 Montpellier Cedex.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. GENEPOP (versión 1.2): population genetics software for exact test and ecumenism. **Journal of Heredity** 86: 248-250.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. An exact test for population differentiation. **Evolution** 49: 1280-1283.
- REYNOLDS J., WEIR B.S., COCKERMAN C.C. 1983. Estimation of the ancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics** 105: 767-779.
- RINDERER T.E., STELZER J.A., OLDROYD B.P., BUCO S.M., RUBINK, W.L. 1991. Hybridization between European and Africanized honeybees in the neotropical Yucatan peninsula. **Science** 253: 309-311.
- ROWE D.J., RINDERER T.E., STELZER J.A., OLDROYD B.P., CROZIER R.H. 1997. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux** 44:85-93.
- RUBINSZTEIN D.C., AMOS W., LEGGO J., GOODBURN S., JAIN S., LI S. H., MARGOLIS R.L., ROSS C.A., FERGUSON-SMITH M.A. 1995. Microsatellite evolution: evidence for directionality and variation in rate between species. **Nature Genetics** 10: 337-343.
- RUTTNER F., TASSENCOURT L., LOUVEAUX J. 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. **Apidologie** 9: 363-381.
- RUTTNER F. 1975. Las razas de las abejas de Africa. XXV Congreso Internacional de Apicultura, Grenoble.



- RUTTNER F. 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer Verlag, Berlín.
- RUTTNER F. 1992. *Naturgeschichte der Honigbienen*. Ehrenwirth, München.
- SAITOU N., NEI M., 1987. The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4: 406-425.
- SAMBROK J., FRITSCH E., MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANTIAGO E., ALBORNOZ J., DOMINGUEZ A., IZQUIERDO J.I. 1986. Étude biométrique des populations d'abeilles (*Apis mellifera*) du Nord-Ouest de l'Espagne. **Apidologie** 17: 79-92.
- SEPÚLVEDA J.M. 1984a. Las abejas de Cataluña. II Congreso Nacional de Apicultura. Gijón.
- SEPÚLVEDA J.M. 1984b. Las abejas de Andalucía. II Congreso Nacional de Apicultura. Gijón.
- SEPÚLVEDA J.M. 1984c. La abeja ibérica. II Congreso Nacional de Apicultura. Gijón.
- SERRANO-CASTEJÓN I. 1987. *Caracterización enzimática y morfológica de poblaciones de Apis mellifera ibérica del sur de España*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- SHEPPARD W.S., RINDERER T.E., MAZZOLI J.A., STELZER J.A., SHIMANUKI H. 1991. Gene flow between African and European-derived populations in Argentina. **Nature** 349: 782-784.
- SHEPPARD W.S., RINDERER T.E., MEIXNER M.D., YOO H.R., STELZER J.A., SCHIFF N.M., KAMEL S.M., KRELL R. 1996. *Hinfl* variation in mitochondrial DNA of Old World honey bee subspecies. **Journal of Heredity** 87: 35-40.

- SHRIVER M.D., JIN L., CHAKRAVORTY R., BOERWINKLE E. 1993. VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model. *Genetics* 134: 983-993.
- SIMON U. E. 1998. *Regulation of reproductive dominance hierarchies in A. m. capensis workers*. Tesis Doctoral. Universidad de Halle-Wittenberg.
- SMITH D.R. 1991. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. En: *Diversity in the genus Apis*, (editado por D. R. Smith) páginas 131- 176, Westview, Boulder.
- 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., TAYLOR O.R., BROWN W.M. 1989. Neotropical African bees have African mitochondrial DNA. *Nature* 339: 213-215.
- 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. Allozyme polymorphism in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity* 86: 12-16.
- SUAZO A., MCTIERNAN R., HALL H.G. 1998. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Heredity* 89: 32-36.
- SUNNUCKS P., HALES D.F. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: aphidae). *Molecular Biology and Evolution* 13: 510-524.



- SWOFFORD D.L. 1993. PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony, versión 3.1.. Programa distribuido por Illinois Natural History Survey, Champaign.
- TARES S., CORNUET J.M., ABAD P. 1993. Characterization of an unusually conserved *AluI* highly reiterated DNA sequence family from the honeybee, *Apis mellifera*. **Genetics** 134: 1195-1204.
- THORPE R.S., MCGREGOR D.P., CUMMING A.M. 1993. Molecular phylogeny of the Canary Island lacertids (*Gallotia*): mitochondrial DNA restriction fragment divergence in relation to sequence divergence and geological time. **Journal of Evolutionary Biology** 6: 725-735.
- THORPE R.S., MCGREGOR D.P., CUMMING A.M., JORDAN W.C. 1994. DNA Evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA RFLP, Cytochrome B, Cytochrome Oxidase, 12S rRNA and nuclear RAPD analysis. **Evolution** 48: 230-240.
- WALSH P.S., METZGER D.A., HIGUCHI R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques** 10: 506-512.
- WEBER J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n, (dC-dT)_n polymorphisms. **Genomics** 7: 517- 524.
- WEBER J.L., WONG C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics** 2: 1123-1128.
- WEIR B.S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland.
- WIDMER A., SHMID-HEMPEL P., ESTOUP A., SCHOLL A. 1998. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. **Heredity** 81: 563-572.
- WILLIS L.G., WINSTON M.L., HONDA B.M. 1992. Phylogenetic relationships in the honeybee (genus *Apis*) as determined by the sequence of the

cytochrome oxidase II region of mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 1: 169-178.

WONG A.K.C., YEE H.A., VAN DE SANDE J.H., RATTNER J.B. 1990. Distribution of CT-rich tracts is conserved in vertebrate chromosomes. **Chromosoma (Berl.)** 99: 344-351.

WRIGHT S. 1969. *Evolution and the genetics of populations. Vol. 2: The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.