

Patrón espacial de la variación molecular de *Apis mellifera* en Gran Canaria y La Gomera (Islas Canarias).

I. Muñoz¹, M. A. Pinto² y P. De La Rúa¹

¹Área de Biología Animal, Dpto. de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia (España).

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança (Portugal).

Abstract.

The Canary Islands have environmental conditions according to altitude, latitude and longitude, which influence in the distribution of organisms. Previous studies suggest the existence of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations on the Canary Islands that have evolved relatively isolated and, therefore adapted to particular environmental conditions. Canarian honeybees were included in the African sublineage with Atlantic distribution (A_{III}), in which honeybee populations from the Macaronesian archipelagos (Azores, Madeira, the Savage Islands, Canary Islands and Cape Verde) and Portugal, are also included. In this paper we present the results of the molecular variation at mitochondrial DNA level of honeybee populations from Gran Canaria and La Gomera (Canary Islands). This marker is suitable for estimating genetic diversity and patterns of spatial differentiation in connection with the existing environmental variety on the islands of Gran Canaria and La Gomera.

Introducción.

Los archipiélagos atlánticos de origen volcánico de Azores, Madeira, Salvajes, Canarias y Cabo Verde conforman la región biogeográfica de la Macaronesia. Su situación geográfica, la singularidad de sus diversas condiciones ecológicas y el aislamiento, han propiciado la existencia de especies y comunidades únicas en el mundo. Este hecho convierte a estos archipiélagos en uno de los centros de biodiversidad insular más importantes del Planeta, cuya tasa de endemismos es también la más alta de Europa (Gillespie y Clague 2009).

Las Islas Canarias constituyen uno de los archipiélagos de mayor tamaño de la Macaronesia y cubren una superficie total de 7.242 kilómetros cuadrados. Además, desde una perspectiva biológica, son las islas de mayor riqueza y diversidad de la región, con 3.672 especies exclusivas y la mayor proporción de endemismos (27,55%).

La abeja de la miel (*Apis mellifera* L.) posee una gran capacidad adaptativa a multitud de ecosistemas en su rango de distribución natural (África, Europa, Asia central y Asia occidental), existiendo unas 29 subespecies y numerosos

ecotipos descritos en función de su comportamiento, morfología y datos moleculares (Ruttner 1988; Sheppard et al. 1997; Sheppard y Meixner 2003). Las poblaciones de la *A. mellifera* de las Islas Canarias han sufrido procesos de adaptación al medio ambiente insular por lo que su protección es de gran valor para el mantenimiento de la flora endémica canaria. Estas poblaciones pertenecen a una rama del linaje evolutivo africano con distribución atlántica (A_{III}) y están caracterizadas por la presencia de haplotipos mitocondriales particulares (De la Rúa et al. 1998). Estos factores y el hecho de que se encuentren adaptadas a la flora endémica canaria hacen que su conservación sea de particular interés.

La geografía de las características del paisaje puede ejercer una fuerza estructuradora importante sobre la probabilidad de dispersión individual y la distribución de las especies (Avisé 2004). La estructura genética de las poblaciones puede ser el resultado tanto del paisaje como de las características biológicas de cada especie. En el caso de *A. mellifera*, desde principios del siglo XX, la introducción de reinas de otras razas ha sido una práctica muy utilizada en la apicultura moderna, y entre las principales consecuencias se encuentra el reemplazamiento, el aumento del flujo genético entre poblaciones de abejas nativas e introducidas (Jensen et al. 2005) y cambios en la distribución de las poblaciones locales.

En el estudio realizado por De la Rúa et al. (2001) se constató la existencia de introgresión genética en las abejas de las Islas Canarias, la cual provenía de abejas pertenecientes a otras razas europeas como *A. m. ligustica* o abeja italiana y *A. m. carnica* o abeja carniola. El nivel de introgresión genética fue acusado en Tenerife y El Hierro, se observó una intensidad media en Gran Canaria y La Gomera y era nulo en La Palma. La introducción de abejas reinas pertenecientes a otras razas puede alterar potencialmente la diversidad de las poblaciones locales mediante la hibridación de reinas locales con zánganos procedentes de las colmenas introducidas, por ello en 2001 el Gobierno de Canarias inició el plan de conservación y protección de la abeja negra canaria (BOC 49, 20/04/2001).

En este trabajo se pretende examinar los patrones espaciales de la variación genética de la población de *A. mellifera* de las islas de Gran Canaria y La Gomera, ya que la combinación de los factores del paisaje, la biología de la especie y la práctica de introducción de reinas foráneas podría estar alterando la distribución de los haplotipos mitocondriales y poniendo en riesgo a las poblaciones locales de abejas canarias.

Material y Métodos.

Muestreo.

Las muestras de abejas obreras adultas fueron recolectadas del interior de las colmenas en las islas de Gran Canaria y La Gomera en abril de 2010. Se muestrearon un total de 130 colmenas distribuidas en 9 apiarios de Gran Canaria y 5 de La Gomera (las localidades de muestreo se muestran en la

Tabla 1 y Figura 1). Las abejas se introdujeron directamente en etanol 100% y se conservaron en el laboratorio a -20 °C hasta su procesamiento.

Análisis molecular

El ADN total fue extraído de una abeja obrera adulta por colmena mediante una solución de Chelex® al 5% siguiendo un protocolo modificado a partir de Walsh *et al.* (1991). El análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se llevó a cabo según el método descrito por Garnery *et al.* (1992), el cual se basa en la amplificación de la región intergénica comprendida entre el ARN transferente de la leucina (ARNt^{leu}) y la subunidad II de la citocromo oxidasa (cox2), mediante los cebadores E2 (5'-GGCAGAATAAGTGACATTG-3') y H2 (5'-CAATATCATTGAT GAACC-3'). El tamaño de los fragmentos de amplificación se determinó tras examinar los productos de PCR en gel de agarosa al 1,5%, tinción con bromuro de etidio y visualización con UV. Posteriormente los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *DraI*, generando patrones de bandas identificables por sus diferencias de tamaño (RFLP), las cuales fueron separadas con gel de agarosa Nusieve al 4%. Los haplotipos fueron determinados de acuerdo a los patrones descritos por Garnery *et al.* (1993).

Análisis estadístico.

Las frecuencias haplotípicas y la diversidad genética por localidad e isla, fueron calculadas mediante el programa GenAlex (Peakall y Smouse, 2006). El análisis de la estructura genética fue realizado a través del cálculo del estadístico F_{ST} , de acuerdo con la metodología de Weir y Cockerham (1984), y del análisis de la varianza molecular (AMOVA) mediante el programa Arlequin (Excoffier *et al.* 2005).

Resultados y Discusión.

La amplificación de las muestras produjo fragmentos de cinco tamaños diferentes que se correspondieron con 9 patrones de RFLP diferentes (A1, A3, A9, A11, A14, A15, A_n, M7 y C). Las frecuencias haplotípicas y la distribución de los haplotipos en las islas de Gran Canaria y La Gomera puede observarse en la Figura 1. Los haplotipos más frecuentes en Gran Canaria fueron el A14 (31,1%), A11 (21,1%), A1 (20,0%) y A15 (17,8%), mientras que en La Gomera fueron los pertenecientes al linaje C de Europa del este (47,5%), A11 (22,5%) y A15 (17,5%). Se cuantificó la proporción de linajes y sublinajes, y se observó que el sublinaje africano de distribución atlántica (A_{III}) típico de las Islas Canarias presentó una proporción del 70% en Gran Canaria y del 50% en La Gomera, sin embargo también se observaron haplotipos de los linajes de Europa occidental (M7) y del este (C), indicando introgresión genética a nivel mitocondrial en las islas de Gran Canaria y La Gomera.

La diversidad haplotípica fue mayor en Gran Canaria (0,792) que en La Gomera (0,704), y en ambos casos fue superior a la detectada en el estudio realizado por De la Rúa *et al.* (2001). Los detalles por localidad se muestran en la Tabla 1. Estos cambios en la diversidad haplotípica pueden deberse a las fluctuaciones del censo apícola, debidas entre otras causas al aumento de la

incidencia de enfermedades (varroa, síndrome del colapso de las colmenas,...), y a la práctica apícola de introducir reinas foráneas.

Los valores de FST fueron de 0,49795 y 0,55536 para Gran Canaria y La Gomera respectivamente, lo cual indica que existe una estructuración de las poblaciones de abejas con un grado de significación superior al 0,1%. Se realizaron grupos en función de la situación geográfica de los apiarios y los resultados del test AMOVA indicaron que el 24,47 y el 45,41% de la variación genética se debían a la localización geográfica de los apiarios.

Conclusiones.

La identificación de la relación entre las características del paisaje y la estructura genética de las poblaciones de abejas de la miel es compleja debido a la multitud de factores que interactúan. Nuestros resultados muestran subdivisión poblacional, siendo más acusada en La Gomera que en Gran Canaria, posiblemente debidos a dos factores principales: la geografía del paisaje y el manejo apícola. Estos resultados podrían ser aplicados para diseñar, desarrollar y monitorizar a las poblaciones de abejas de las Islas Canarias en futuros programas de conservación en Gran Canaria y La Gomera.

Referencias.

- Avise J.C. (2004) Molecular markers, natural history and evolution, 2nd edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J. (1998) Mitochondrial variability of honeybees populations from the Canary Islands, Mol. Ecol. 7, 1543–1547.
- De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands, Mol. Ecol. 10, 1733–1742.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis, Evol. Bioinform. Online 1, 47–50.
- Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis, Mol. Ecol. 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.
- Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe, Mol. Ecol. 14, 93–106.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, Mol. Ecol. Notes 6, 288–295.

- Gillespie R.G., Clague D.A. (2009) *Encyclopedia of Islands*, Berkeley, CA and London, University of California Press, ISBN: 978-0-520-25649-1.
- Ruttner F. (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*, Springer Verlag, Berlin
- Sheppard W.S., Arias M.C., Grech A., Meixner M.D. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta, *Apidologie* 28, 287–293.
- Sheppard W.S., Meixner M.D. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, *Apidologie* 34, 367–375.
- 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.
- Weir B. S., Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution Int. J. Org. Evol.* 38, 1358–1370.

	Localidad (N)	Na	D_h	A1	A3	A9	A11	A14	A15	A_n	M7	C
1	San Lorenzo (10)	4	0,778	0,20		0,40		0,10	0,30			
2	Las Vegas (10)	1	0,000	1,00								
3	Tenteniguada (10)	4	0,644		0,10		0,20	0,10	0,60			
4	Bco de los Cernícalos (10)	3	0,689	0,50			0,30	0,20				
5	Cazadores (10)	5	0,844	0,10			0,30	0,20	0,30			0,10
6	El Espinillo (10)	1	0,000				1,00					
7	La Aldea (10)	5	0,844			0,10	0,10	0,30	0,30		0,20	
8	Cuermeja (10)	1	0,000					1,00				

Tabla 1a. Localidades de muestreo, número total de colmenas (N), número de haplotipos detectados (Na), diversidad haplotípica (D_h) y frecuencias haplotípicas por localidad e isla.

	Localidad (N)	Na	D_h	A1	A3	A9	A11	A14	A15	A_n	M7	C
9	Artejevez (10)	2	0,200					0,90	0,10			
10	El Moralito (10)	5	0,756	0,10			0,50	0,10	0,20	0,10		
11	Los Barranquillos (3)	1	0,000				1,00					
12	Las Casetas (10)	2	0,200						0,10			0,90
13	Los Tiles (7)	3	0,667				0,14	0,29	0,57			
14	Benchijigua (10)	1	0,000									1,00
15	Gran Canaria (90)	8	0,792	0,20	0,01	0,06	0,21	0,31	0,18		0,02	0,01
16	La Gomera (40)	6	0,704	0,03			0,23	0,08	0,18	0,03		0,48

Tabla 1a. Localidades de muestreo, número total de colmenas (N), número de haplotipos detectados (Na), diversidad haplotípica (D_h) y frecuencias haplotípicas por localidad e isla.

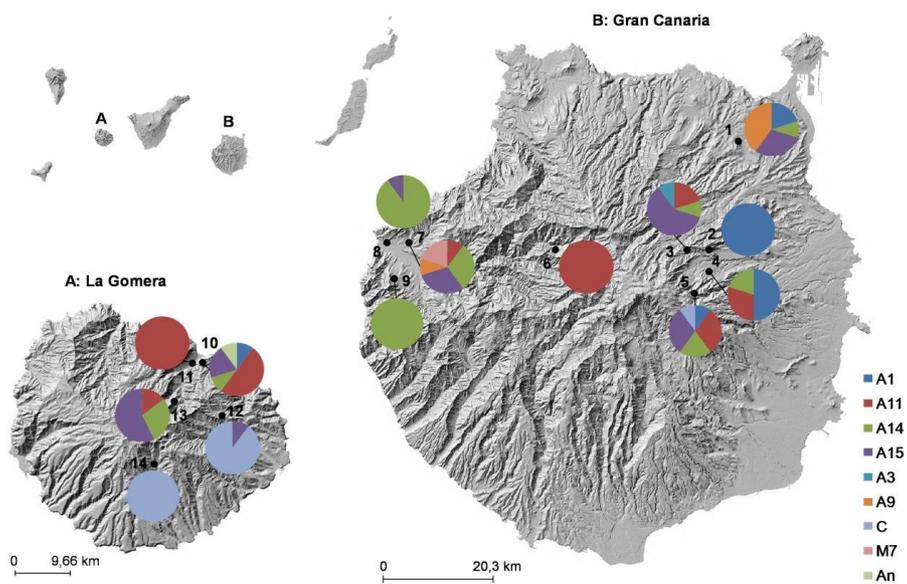


Figura 1. Distribución espacial de los haplotipos y frecuencias haplotípicas por localidad de muestreo en las islas de La Gomera (A) y Gran Canaria (B). Los números se corresponden con las descripciones de la Tabla 1.