

## ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS ABEJAS DE LA ISLA DE CRETA (GRECIA)

P. HARIZANIS, Maria BOUGA

Laboratorio de sericultura – apicultura, Universidad agrícola de Atenas, 75, Iera Odos, 118 55, Atenas, GRECIA  
E-mail: mbouga@aua.gr

### Resumen

La estructura genética de las poblaciones de abejas melíferas de distintas regiones de la isla de Creta (Grecia), correspondientes a *Apis mellifera adami* (según el análisis morfométrico de RUTTNER, 1988) se estudió mediante el análisis RFLP de dos segmentos génicos de mtADN.

Se estudiaron sesenta muestras tomadas de distintas reinas. Se extrajo el ADN total y posteriormente los segmentos génicos 16s rADN (965 bp) y CO I (1028 bp) se amplificaron por PCR. Siete y, respectivamente, seis enzimas de restricción tuvieron al menos un sitio de reconocimiento en los segmentos génicos 16s rADN y, respectivamente, CO I.

La variación intrapoblacional se evidenció para el segmento génico CO I, digerido con el enzima de restricción BstU I.

Se comprobó que la estructura genética de estas poblaciones se ha modificado, posiblemente a causa de la apicultura pastoral y la cría comercial de abejas, en las dos últimas décadas. Al parecer, en la isla de Creta ya no existen poblaciones puras de *Apis m. adami*. Nuestros datos, contrastados con los aportados por investigaciones anteriores, muestran que la abeja melífera de Creta parece ser igual a las poblaciones de abejas melíferas de otras zonas de Grecia.

**Palabras clave:** *Apis mellifera adami* / abeja melífera / mtADN / estructura genética / Grecia

### Introducción

Tradicionalmente, la taxonomía intraespecífica de la abeja melífera, *Apis mellifera*, se ha basado en la morfología. En el presente, están reconocidas 26 subespecies de *A. mellifera*, teniendo en cuenta sus caracteres morfométricos (RUTTNER, 1988, 1992; SHEPPARD et al., 1997).

En fechas más recientes, los instrumentos genéticos, principalmente el análisis de la secuencia ADN y la electroforesis con alosima, se aplicaron al estudio de la diversidad de la abeja melífera. El ADN mitocondrial (mtADN) posee ciertas propiedades que le convierten en instrumento favorito en la sistemática y la biología de las poblaciones. En general, es heredado por vía materna, sin recombinación. Por tanto, permite detectar con precisión los haplotipos extraños dentro de las poblaciones. Sólo la herencia materna del mtADN quedó comprobada en las abejas melíferas (MEUSEL y MORITZ, 1993) y, así, todas las obreras y todos los zánganos de una colonia comparten con la reina el mismo mtADN. Pero hay que tener en cuenta algunas mejoras técnicas, de fecha más o menos reciente, en el manejo de la colmena, entre las cuales la importación de reinas y la práctica del pastoreo.

Mediante investigaciones morfométricas, las poblaciones de abejas melíferas de Creta (Mar Egeo del sur, Grecia) fueron descritas por Ruttner (1980) como *Apis mellifera adami*. Según Ruttner (1988), *Apis m. adami* presenta semejanzas morfológicas acusadas con las subespecies del Oriente Próximo. El análisis aloenzimático (BADINO et al., 1988) de las poblaciones de abejas melíferas de la Grecia continental (Tracia, Macedonia, Grecia Central y Peloponeso), y también de aquellas que habitan la isla de Creta, muestra que en Creta ha habido una raza pura.

En nuestra investigación, las poblaciones de abejas melíferas de distintas zonas de la isla de Creta, correspondientes a *Apis m. adami*, según el análisis morfométrico (RUTTNER, 1988), se estudiaron mediante el análisis RFLP de dos segmentos génicos mtADN.

Nuestro objetivo ha sido estudiar la estructura genética de estas poblaciones, con el propósito de comprobar si en Creta sigue habiendo una raza pura de poblaciones de abejas y, además, si existe alguna coincidencia con el análisis morfométrico de Ruttner (1988).

### Materiales y métodos

Se recogieron abejas de 60 colonias de distintas zonas de Creta (Chania, Rethymno, Heraklio y Lasithi). Los sitios de muestreo están presentados en la Figura 1. Las poblaciones de abejas melíferas de estas zonas corresponden a la raza *A.m. adami*, según el análisis morfométrico (RUTTNER, 1988).



Figura 1 - Sitios de muestreo de Creta: Chania, Rethymno, Heraklio, Lasithi.

Las muestras se llevaron vivas al laboratorio y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. El ADN total se extrajo de cada individuo, siguiendo el protocolo establecido por HUNT y PAGE (1992), operando algunas modificaciones menores (BOUGA et al., 2003).

La variación del ADN mitocondrial se analizó mediante RFLP, sobre productos amplificados por PCR. Dos juegos de iniciadores se utilizaron para amplificar los segmentos génicos 16s rADN y CO I. Los iniciadores empleados para el segmento 16s rADN fueron el par 5'-CAACATCGAGGTCGCAAACATC-3' y 3'-AGTTGGGACTATGTTTTCCATG-5' (NIELSEN et al., 1994), y para el segmento CO I el par 5'-GATTACTTCCTCCCTCATTA-3' y 3'-AATAAGCTGATAGGTCCTAA-5' (NIELSEN et al., 1999). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (SAIKI et al., 1988) se efectuó tal como está descrita por BOUGA et al. (2003), igual que las condiciones PCR. Los segmentos de mtADN amplificados fueron digeridos con enzimas de restricción. Los enzimas informativos de restricción empleados para el segmento génico 16 s rADN fueron Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I y Alu I, y para el segmento génico CO I fueron Sau3A I, Fok I, Bel I, Ssp I, BstU I y Xho I.

Ulteriormente, los segmentos digeridos se separaron electroforéticamente, sobre geles de agar al 2 %, en tampón de 0,5X TBE teñido con bromuro de etidio y visualizados en luz UV. Los tamaños de los fragmentos de ADN se compararon con el marcador PCR (Promega), aplicado sobre el mismo gel, y se calcularon empleando el programa DNAfrag 3.03 (NASH, 1991). Una letra, por orden de aparición, identificó los distintos modelos de restricción. Ulteriormente, se definieron genotipos compuestos para cada individuo de todos los modelos de restricción de los dos segmentos de mtADN.

## Resultados

Los tamaños encontrados para los segmentos de mtADN, amplificados por la técnica PCR, fueron de 964 bp y 1928 bp, para los segmentos génicos 16 s rADN y, respectivamente, CO I. Siete y seis enzimas de restricción tuvieron al menos un sitio de reconocimiento en los segmentos amplificados 16 s rADN y, respectivamente, CO I. Los modelos de fragmentación producidos por cada enzima de restricción para los dos segmentos de mtADSN están presentados en las tablas I y II.

Tabla I

**Evaluación del tamaño de los fragmentos (en pares básicos) de todos los modelos de fragmentación observados en los segmentos génicos de mtADN 16 s rADN, en la población estudiada**

16s rADN													
Sau3A I		Ssp I		Dra I		Hinc II		EcoR I		Pst I		Alu I	
	A		A		A		A		A		A		A
548	-	628	-	557	-	598	-	492	-	621	-	572	-
416	-	336	-	407	-	366	-	472	-	343	-	392	-

Tabla II

**Evaluación del tamaño de los fragmentos (en pares básicos) de todos los modelos de fragmentación en los segmentos génicos de mtADN CO I, en la población estudiada**

CO I											
Sau 3A I		Fok I		Bcl		Ssp I		BstU I		Xho I	
	A		A		A		A	A	B		A
371	-	476	-	465	-	487	-	1028	-	616	-
349	-	425	-	326	-	277	-	658	-	412	-
280	-	127	-	237	-	264	-	370	-		
28	-										

La variación intrapoblacional se relevó, para el segmento génico CO I, digerido con el enzima restrictivo BstU I, como se muestra en la Figura 2.

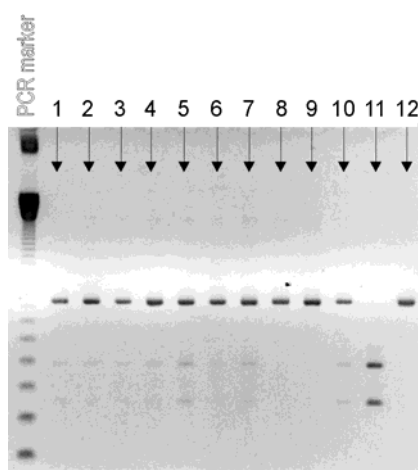


Figura 2 - Modelos de restricción de los fragmentos tras la digestión con el enzima BstU I, en las poblaciones de abejas melíferas de (1-3) Chania, (4-6) Rethymno, (7-9) Heraklio, (10-12) Lasithi. (vertical: marcador PCR)

Los dos haplotipos (genotipos compuestos) detectados en las poblaciones estudiadas (las letras, por orden, se corresponden con el mismo orden de los modelos de fragmentos presentados en las tablas I y II); la incidencia de los haplotipos y el tamaño de la muestra aparecen en la Tabla III.

Tabla III

**Genotipos compuestos (haplotipos), incidencia de los haplotipos y tamaño de la muestra (N) en todas las poblaciones estudiadas**

Haplotipo	Genotipo compuesto	Localidad de procedencia de la muestra			
		Chania	Rethymno	Heraklio	Lasithi
Tipo 1	AAAAAAAAAABA	1 000	1 000	1 000	0,933
Tipo 2	AAAAAAAAAAAA				0,067
N	15	15	15	15	15

## Discusiones

El estudio del mtADN presenta particular interés en las abejas melíferas, siendo el marcador idóneo para la colonia - todos los individuos de la colonia comparten el mismo haplotipo (salvo las mutaciones), de acuerdo con la herencia materna.

Los resultados del presente estudio, contrastados con los resultados de trabajos anteriores (BOUGA et al., 2003), evidencian que las abejas melíferas de la isla de Creta son iguales a las abejas de otras zonas de Grecia, tal vez producto de la importación de reinas de estas zonas. Los resultados del análisis morfométrico clásico (HARIZANIS et al., 2001) efectuado sobre las mismas muestras y la comparación con las abejas de Macedonia (norte de Grecia) mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre estas poblaciones. El estudio basado en el análisis morfométrico geométrico (HATJINA et al., 2002) indica que hay una escasa variabilidad en las abejas melíferas de Creta. Nuestros resultados evidencian que existe un único haplotipo en las abejas de Creta, de escasa incidencia. Parece ser que este haplotipo es producto de la importación de reinas extranjeras o de la existencia de la raza pura de *Apis m. adami*.

En general, es posible que la estructura genética de la población de abejas melíferas se haya modificado, a causa de la apicultura trashumante y la cría comercial de abejas, durante las dos últimas décadas, y nuestros datos parecen no coincidir con los del análisis morfométrico de RUTTNER (1988), en cuanto a la existencia de la raza *Apis m. adami*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio griego de agricultura y a la Unión Europea el apoyo financiero a esta investigación, en base a la decisión del Consejo Regulador (CE) no. 1221/97.

## BIBLIOGRAFIA

- Badino G., Celebrano G., Manino A., Ifantidis M.D. (1988), Allozyme variability in Greek Honeybees (*Apis Mellifera* L.), *Apidologie* 19 (4), 377-386
- Bouga M., Harizanis P.C., Kiliadis G., Alahiotis S. (2003), Genetic divergence and phylogenetic relationships of Honey Bee *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA Segments, Paper in Preparation
- Harizanis P.C., Garagani P., Bouga M. (2001), Morphometric Characters of Honey Bee of Macedonia (*Apis mellifera macedonica*), 9<sup>th</sup> National Entomological Meeting, Hellenic Entomological Society, Ioannina, 13-16 November 2001, Proceedings In Press
- Hatjina F., Baylac M., Haristos L., Garnery L., Arnold G., Tselios D. (2002), Wing differentiation among Greek populations of honey bees (*Apis mellifera*): a geometric morphometrics analysis, poster in 7<sup>th</sup> European Congress of Entomology, October 7-13, Thessaloniki 2002
- Hunt J.G., Page Jr.E.R. (1992), Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee, *Theor. Appl. Genet.* 85, 15-20
- Meusel M.S., Moritz R.F.A. (1993), Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs, *Current Genetics* 24 (6), 539-543
- Nash J.H.E. (1991), DNAfrag, program version 3.03, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada
- Nielsen D., Page Jr. R.E., Crosland M.W.J. (1994), Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations, *Experientia* 50, 867-871
- Nielsen D., Ebert P.R., Hunt J.G., Gusmán-Novoa E., Kinnee S. A., Page Jr. D.R.E. (1999), Identification of Africanized Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Incorporating Morphometrics and an Improved Polymerase Chain Reaction Mitotyping Procedure, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 92 (2), 167-175
- Ruttner, F. (1980), *Apis mellifera* Adami (nssp), Die Kretische Biene, *Apidologie* 11,385-400
- Ruttner, F. (1988), Biogeography and Taxonomy of Honeybees, Springer-Verlag, Berlin.
- Ruttner F. (1992), "Naturgeschichte der Honigbienen", Ehrenwirth Verlag, München, Germany
- Saiki R., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer - directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-491
- Sheppard W.S., Arias M.C., Greech A., Meixner M.D. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta, *Apidologie* 28, 287-293