

## VARIACION MORFOMETRICA, ALOSIMICA Y DE mtADN EN LAS POBLACIONES DE ABEJAS (*APIS MELLIFERA CYPRIA* POLLMANN, 1879) DEL NORTE DE CHIPRE

I. KANDEMIR<sup>1,2</sup>, Marina D. MEIXNER<sup>1,3</sup>, Ayca OZCAN<sup>2</sup>, S. W. SHEPPARD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Entomology, Washington State University, Pullman WA, EE.UU., E-mail: irfankandemir@hotmail.com

<sup>2</sup>Department of Biology, Zonguldak Karaelmas University, Zonguldak, TURQUIA

<sup>3</sup>Institut für Bienenkunde, 2 Karl von Frisch Weg, 614440 Oberursel, ALEMANIA

### Resumen

Se estudió la variabilidad morfométrica, alosímica y de mtADN de las poblaciones de *Apis mellifera cypria* del norte de Chipre. Se estudiaron seis poblaciones (40 colonias), siguiendo 39 caracteres morfométricos. Se analizaron las zonas Citocromo B y Carboxil oxidasa del mtADN, para los perfiles de los enzimas de restricción Bgl II e Hinf I y asimismo el polimorfismo de la longitud del segmento de restricción Dra I de la zona intergénica CO I - CO II. La región mitocondrial ND2 se secuenció y se comparó con secuencias publicadas de otras subespecies. Un número adicional de 55 colonias, muestreadas ulteriormente, provenientes de las mismas localidades, se estudiaron para la variación alosímica, empleando sistemas de seis enzimas. Se detectaron niveles muy bajos de la variación alosímica, con una heterogosis media de  $0,006 \pm 0,005$ . El estudio de todas las zonas mtADN confirmó el origen europeo de las poblaciones de abejas melíferas del norte de Chipre. Los perfiles digestivos identificados en el norte de Chipre fueron los mismos que para las abejas melíferas del este europeo. La zona intergénica CO I - CO II sólo posee la secuencia Q, y los perfiles de digestión corresponden al haplotipo Cl. No obstante, el estudio de los datos morfométricos sitúa a las abejas melíferas del norte de Chipre en la línea morfológica de Oriente, al lado de *A.m. anatoliaca*, *A.m. meda*, *A.m. syriaca* y *A.m. caucasica*. El árbol filogenético, construido sobre la base de la secuencia ND2, sitúa a las abejas de Chipre en la línea mitocondrial C, que abarca tanto la línea morfológica C como la Q.

**Palabras clave:** Chipre / variación genética / *Apis mellifera cypria*

### Introducción

La abeja melífera de Chipre (*A.m. cypria* Pollmann 1879) es otro ejemplo de subespecie insular, igual que *A.m. ruttneri*, en Malta, *A.m. adami*, en Creta, *A.m. sicula*, en Sicilia. Igual que otras subespecies insulares, las abejas de Chipre son más pequeñas, pero su aspecto exótico determinó su buena aceptación por parte de los apicultores, al principio (RUTTNER, 1988).

En sus estudios morfométricos, Ruttner (1992) situó las abejas melíferas de Chipre en la rama oriental, al lado de *A.m. anatoliaca*, *A.m. syriaca*, *A.m. meda* y *A.m. caucasica*. Como cabe esperar de su situación geográfica, *A.m. cypria* tiene el mismo aspecto que sus vecinas. Se hallan casi a la misma distancia de *A.m. anatoliaca* (74,6), *A.m. syriaca* (69,8) y *A.m. meda* (87,3). Comparadas con *A.m. anatoliaca*, las abejas chipriotas son más pequeñas. En cuanto al tamaño del cuerpo, tienen la lengua y las patas más largas, pero las alas las tienen más cortas. Dentro de la rama oriental, son las que poseen el abdomen más largo y más esbelto (índice St6 - 84,6). El índice cubital es particularmente alto en las abejas de Chipre (2,72). La característica más sobresaliente de las abejas chipriotas es la coloración de su abdomen. Las abejas de Chipre y Siria poseen el mismo patrón colorístico, considerado como cercano al de la abeja egipcia (*A.m. lamarkii*, ex *A.m. fasciata*) (Hermano Adán, 1983). En lo que respecta a las características conductuales, las abejas de Chipre son muy parecidas a *A.m. anatoliaca*, o sea, muy agresivas y muy propensas al enjambrar (Hermano Adán, 1983).

A pesar de ser una subespecie insular, se ha observado que *A.m. cypria* posee una elevada variación morfométrica (RUTTNER, 1988). La reciente introducción de abejas de Turquía al norte de Chipre puede haber determinado ciertas modificaciones de carácter morfométrico, y se puede plantear la pregunta de cuántas de estas introducciones de fecha reciente han afectado a las colonias de abejas del norte de Chipre. Tampoco existen estudios detallados sobre la variación alosímica y genética a nivel del ADN.

Con el propósito de seguir estudiando estos aspectos de la variación genética en *A.m. cypria* y su relación con el origen O, practicamos un muestreo minucioso. En el presente trabajo, comunicamos los resultados del estudio completo del mtADN, la morfometría y los alosimas en la abeja de Chipre, *A.m. cypria*.

### Materiales y métodos

Un total de 40 colonias se sometieron al muestreo, en 6 localizaciones del norte de Chipre. Las muestras se conservaron en etanol de 90°, para el análisis morfométrico y del mtADN. Muestras de otras 55 colonias se recogieron en la zona montañosa y se conservaron en congelación, con el fin de determinar la variación bioquímica en las poblaciones de abejas del norte de Chipre.

**Análisis morfométrico:** Un total de 18 colonias se sometieron al análisis morfométrico. De 11 a 15 obreras por muestra se disecaron y se midieron para 39 caracteres morfométricos, según RUTTNER et al. (1978). La mayoría de los caracteres se midieron con una cámara CCD, empleando un programa de medición morfométrica (MEIXNER y MEIXNER, 1994). La pigmentación y la vellosidad se midieron con ayuda de un microscopio de disección y un micrómetro ocular. El análisis estadístico se efectuó con muestras de referencia de la base de datos del Institut für Bienenkunde, Oberursel.

**Análisis de los alosimas:** Después de efectuado un análisis preliminar de un número adicional de 55 colonias procedentes de la zona de montaña, se tomaron muestras detalladas, con el fin de determinar la variación alosímica. Se utilizó la variabilidad en seis sistemas de enzimas (*Pgm-1* y *Pgm-2*, *Hk*, *Mdh*, *Est* y *Pgi*), como se describió más arriba (KANDEMIR y KENCE, 1995). La frecuencia de los genes, el sumario de los parámetros de la variación genética y las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se determinaron empleando el programa BIOSYS-1 (SWOFORD y SELANDER, 1981).

**Análisis del ADN:** Los ácidos nucleicos totales se extrajeron de 40 colonias, siguiendo los métodos descritos por SHEPPARD y McPHERON (1991). La extracción consistió en el protocolo de la extracción fenol-cloroformo, diseñado para una cantidad mayor de mtADN circular intacto. Los extractos de ADN se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el análisis mtADN, las regiones intergénicas *CO1*, *Cyt* y *CO I - COII* se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa y se digirieron con *Hinf-I*, *Bgl II* y, respectivamente, *Dra-I*, siguiendo las recomendaciones del productor (Tabla I). Fragmentos de gel para las digestiones con *Hinf-I* y *Bgl II* se separaron sobre un gel al 2,5 % de agar, compuesto por 1 % de agar standard BIO-RAD y 1,5 % de agar Nu-Sieve. Sin embargo, los fragmentos de digestión restrictiva *Dra-I* se separaron sobre geles de poliacrilamida al 10 % y 7,5 %. Ulteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron en luz UV, con fines de documentación.

Tabla I

Regiones mtADN, pares iniciales y enzimas de restricción empleados

Regiones	Pares iniciales	Enzima de restricción	Referencias
COI-F COI-R	5'-TTAAGATCCCCAGGATCATG-3' 5'-TGCAAATACTGCACCTATTG-3'	<i>Hinf-I</i>	Sheppard et al., 1994
Cyt B- F Cyt B- R	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'	<i>Bgl-II</i>	Sheppard et al., 1994
COI-COII- E2 COI-COII-H2	5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3' 5'-CAATATCATTGATGACC-3'	<i>Dra-I</i>	Garnerly et al., 1993
ND2-ILE ND2-L1	5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3' 5'-GAATCTAATTAATAAAAAA-3'		Arias and Sheppard, 1996

## Resultados

**Morfometría:** Los resultados preliminares mostraron que las abejas de Chipre formaban parte de la rama oriental. Todas las muestras de Chipre se agruparon al lado de las subespecies *anatoliaca*, *syriaca* y *caucasica*. *A.m. lamarckii* fue la subespecie más cercana a este cluster (Figura 1).

**Alosimas:** Entre los seis enzimas ensayados para la variación bioquímica, cuatro se evidenciaron como polimorfos en las poblaciones de abejas del norte de Chipre. Todos los sistemas enzimáticos se encontraban en el equilibrio Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ). La heterogosidad total para las abejas del norte de Chipre se calculó en  $0,006 \pm 0,005$ .

### mtADN:

**Región CO - I:** La restricción de la región *CO I* con el enzima restrictivo *Hinf I* no produjo ningún fragmento de restricción. Todas las colonias presentaban el mismo tipo de fragmento sin digerir sobre agar-gel, igual que la línea (origen) C del este mediterráneo.

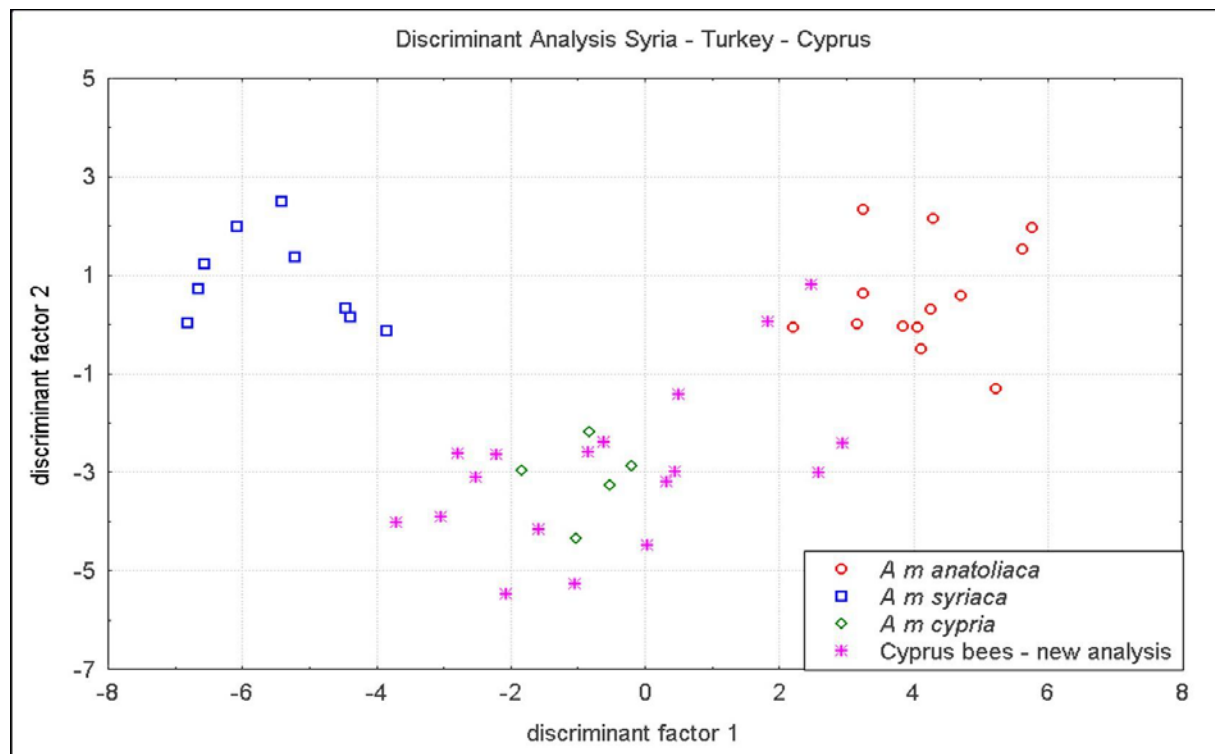


Figura 1 - Análisis factorial de *A.m. anatoliaca*, *A.m. syriaca*, *A.m. cypria* (muestras de referencia provenientes de Oberursel) y muestras del norte de Chipre. (arriba) Análisis discriminatorio Siria - Turquía - Chipre; (vertical) Factor discriminante 2; (abajo) Factor discriminante 1

**Región Cyt B:** La digestión de esta región dio lugar a dos fragmentos, lo que representa un sitio de diagnóstico para las abejas melíferas europeas. Todas las colonias de Chipre presentan este sitio, indicando, por tanto, su pertenencia a la línea C del mtADN.

**Región CO I - CO II:** En esta región no se encontró ninguna variación genética. El producto amplificado por PCR mostró que esta región sólo constaba de la secuencia Q, como quedó comprobado en todas las líneas C. La digestión con el enzima de restricción *Dra-I* no produjo ninguna variación. Todas ellas presentan el mismo tipo de perfiles de digestión restrictiva.

**Secuencialización ND2:** El gen ND2 del ADN mitocondrial fue secuenciado en ambos sentidos, empleando pares iniciales ILE y LI. Un total de 650 bp legibles se combinaron con otras secuencias ND2, depositadas en el banco de genes, y se emplearon en el análisis filogenético. Tres clusters principales se identificaron en el árbol filogenético que se construyó conjuntando los vecinos. Las líneas (orígenes) A, C y M se distinguieron claramente, y la línea O se insertó en la línea A. Dentro de estas líneas, las colonias de Chipre se situaron en la línea C (Figura 2).

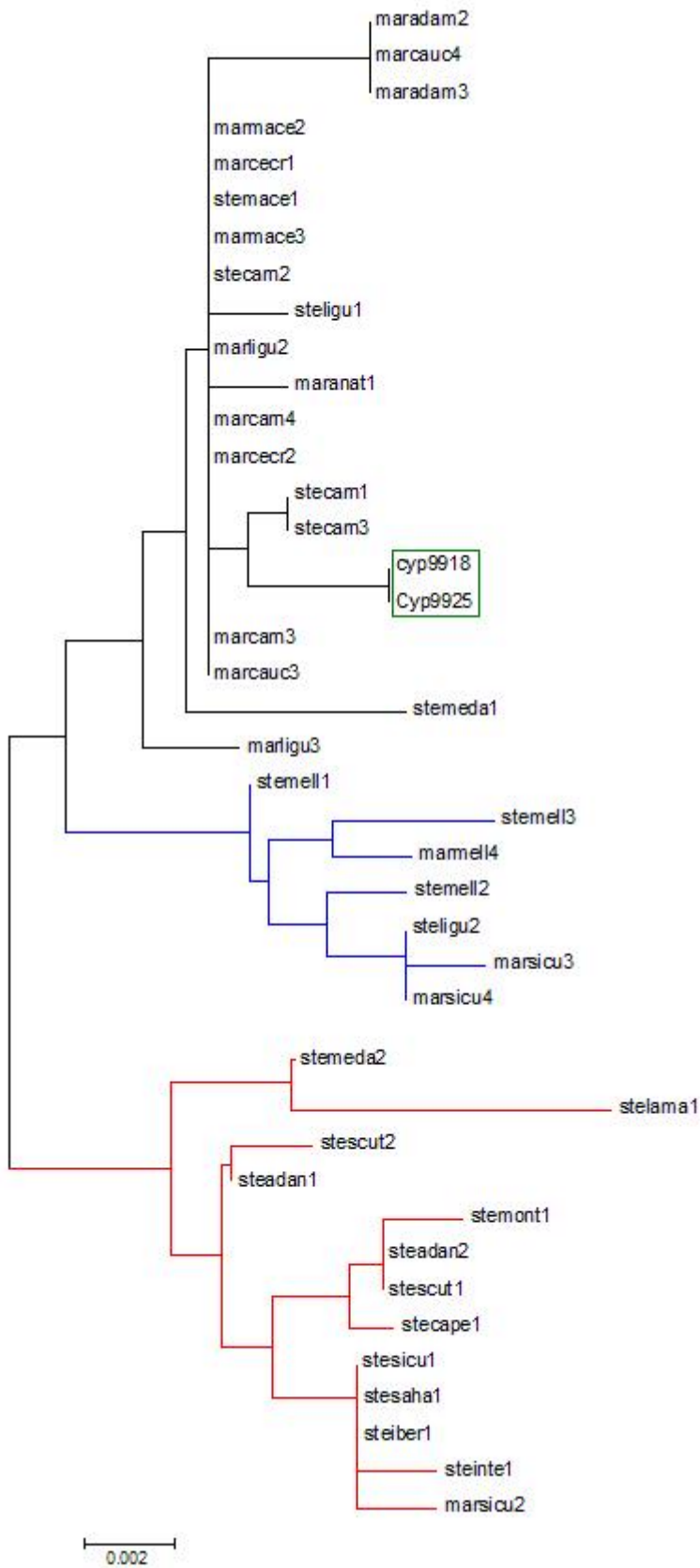


Figura 2 - Un árbol presuntamente NJ, que presenta la relación filogenética entre las abejas del norte de Chipre y otras subespecies de abejas melíferas, basado en 1000 replicaciones (en negro - línea C; en azul - línea M y en rojo - línea A).

## Discusiones

### Morfometría

En la mayoría de los casos, la clara asignación de las abejas del Chipre del norte a las muestras clasificadas como *A.m. cypria*, de la colección de referencia, resultó del análisis morfométrico (Figura 1). Las abejas del Chipre del norte se unieron en cluster con la subespecie de la línea O, como era previsible. Un nuevo par de abejas mostró que las abejas de Chipre aún conservaban su estructura morfométrica, anticipando el efecto de la reciente introducción, como se pudo comprobar por el análisis factorial (Figura 1). Entre las abejas recogidas en la parte occidental del Chipre del norte (en huertos de cítricos) hubo algunas colonias más cercanas a *A.m. anatoliaca*, hecho nada sorprendente. Sólo tres de las muestras - procedentes todas ellas de la apicultura moderna - fueron abordadas en el estudio como *A.m. anatoliaca*, atribuibles probablemente a las colonias importadas en el Chipre del norte desde el continente. Por consiguiente, por estos resultados se puede concluir que la población de abejas de la isla aún se encuentra, en buena medida, en su forma originaria. Del análisis se desprende además que *A.m. cypria* se parece más bien a *A.m. anatoliaca* que a *A.m. adami* y *A.m. meda*.

### Alosimas

El análisis morfométrico evidenció que la región occidental del Chipre del norte se resiente de las recientes introducciones. Razón por la cual los nuevos muestreos se efectuaron básicamente en la zona montañosa, para detectar la variación bioquímica en las abejas del Chipre del norte. No obstante, no hay una gran variabilidad en las abejas del Chipre del norte, como cabría esperarse de una especie insular. Además de que esta zona no está contaminada por un gen nuevamente introducido, esto podría ser otra causa de la escasa heterogénesidad en la zona montañosa. Al contrario, se evidenció una escasa diferenciación genética (el valor  $F_{st}$  es de 0,038) entre las poblaciones de la zona. En lo que respecta al sistema de enzimas *Hk* y *Est*, las poblaciones son heterogéneas. La presencia de unos escasos niveles de variabilidad podría ser un argumento más a favor de la morfometría, por lo que se refiere a la conservación de un estado originario de las abejas de Chipre.

### mtADN

Todas las muestras de Chipre presentaron el mismo perfil de mtADN, probando claramente su pertenencia a la línea mitocondrial C. Todos los tipos distintos de análisis mitocondrial (digestión con citocromo B de la región Bgl II, la digestión con carboxil oxidasa I de la región Hinf I, la digestión de la región CO I - CO II y Dra I) convergieron a esta conclusión. En la mayor parte de los análisis, las abejas de Chipre se parecen muchísimo a las subespecies vecinas de Siria y Turquía, mientras que las poblaciones de estos últimos países presentan una variabilidad mucho mayor. Asimismo, el resultado del análisis secuencial de la región ND2 evidenció que las muestras de *A.m. cypria* forman parte de la línea C, a pesar de que morfométricamente se sitúen en la línea O.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Prof. Dr. Inci Togan y al Prof. Dr. Zeki Kaya su ayuda en el laboratorio para llevar a cabo el análisis alosímico. El presente trabajo contó con fondos donados por el Dr. Sheppard y, en parte (de los fondos ZKU), por el Dr. Kandemir.

## BIBLIOGRAFIA

- Adam, B. (1983), In search of best strains of honeybees. 2<sup>nd</sup> Edition, Northern Bee Books, UK. 206p
- Arias M.C., Sheppard W.S. (1996), Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phyl. Evol.* 5, 557–566
- Garner 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
- Kandemir I., Kence A. (1995), Allozyme variability in the central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) populations, *Apidologie* 26, 503–510
- Meixner M.D., Meixner A. (1997), Bee morphometric. Version 1.02
- Ruttner F. (1988), Biogeography and Taxonomy of Honeybees, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. (1978), Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363–381

- Ruttner, F. (1988), Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Swofford D.L., Selander R.B. (1981). "BIOSYS-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics" *The Journal of Heredity*, 72, 281-283
- Sheppard W.S., Arias M.C., Shimanuki H. (1994), "Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)" *Bull. Entomol. Res.*, 84, 551-554