

Patrones de diversidad neutral y adaptativa de la abeja ibérica

Un proyecto de investigación en la península Ibérica que integra las más avanzadas tecnologías moleculares y analíticas

Textos:

MARÍA ALICE PINTO

Coordinadora Científica del Proyecto.

JOÃO CARLOS AZEVEDO

FILIPPE COSTA

JOHN C. PATTON

J. SPENCER JOHNSTON

PILAR DE LA RÚA

Centro de Investigação de Montanha (CIMO)

Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

Fotos:

M. A. PINTO

La península Ibérica es conocida como un importante foco (*hotspot*) de diversidad y endemismos de numerosas especies de plantas y animales, representando por ello una de las regiones prioritarias para la conservación en Europa. Varios factores geo-morfológicos y ambientales contribuyen a esta riqueza, concretamente: la localización geográfica en el extremo sudoeste de Europa, el aislamiento en relación al resto de Europa por la barrera geográfica de los Pirineos, la complejidad fisiográfica y la diversidad climática resultante de la heterogeneidad fisiográfica y de las distintas influencias del Atlántico y del Mediterráneo. Una conjugación de estos factores hacen de la península Ibérica no solo una cuna de diferenciación y especiación sino también un importante refugio que albergó durante varios periodos glaciales del Pleistoceno muchas de las especies de plantas y animales que hoy colonizan el Norte y el Centro de Europa (Hewitt, 1999).

La abeja negra (*Apis mellifera mellifera*), por ejemplo, es uno de esos organismos cuya historia está estrechamente ligada a la península Ibérica. Los estudios moleculares sugieren que esta subespecie de abeja melífera tiene su origen en un refugio glacial Ibérico a partir del cual se expandió (Miguel et al., 2007) hasta ocupar el área actual que va desde Francia hasta Escandinavia y desde las Islas Británicas hasta Ucrania.

A los factores mencionados anteriormente, se suma la proximidad al continente Africano, la cual posibilitó un intercambio de genes entre los organismos de los dos continentes habiendo contribuido consecuentemente a la notable diversidad y complejidad genética documentada en muchos organismos ibéricos (Gómez y Lunt, 2007), incluyendo a la abeja. De hecho, varios estudios de la abeja ibérica basados en el ADN mitocondrial atestiguan la co-existencia de los linajes Africano y Europeo formando un gradiente caracterizado por la predominancia de haplotipos (tipos de ADN mitocondrial) de origen africano (linaje A) en la parte sur/noroeste y de Europa (linaje M) en la parte norte/nordeste de la península Ibérica (Serrano et al., 2011). Es decir, la abeja ibérica (*A. m. iberiensis*) comparte haplotipos con subespecies africanas (por ejemplo *A. m. intermissa*, *A. m. scutellata*, *A. m. adansonii*) y con la abeja negra de Europa occidental.

Por otro lado, ciertos marcadores moleculares del ADN nuclear, como es el caso de los microsátélites, cuentan una historia diferente a la del ADN mitocondrial, ya que no diferencian a la abeja ibérica de la abeja negra y revelan niveles residuales de introgresión de genes de origen africano en la abeja ibérica (Franck et al., 1998). Para complicar aún más las cosas, estos resultados contrastan con otros marcadores genéticos nucleares como la morfología, feromonas y alozimas (ver referencias bibliográficas en De la Rúa et al., 2009), que como el ADN mitocondrial sugieren una relación de proximidad genética con las abejas del norte de África. Así, a pesar de los numerosos estudios realizados con la variedad de marcadores

FIG. 1 / Mapa con la localización de los apiarios muestreados. Cada punto representa un apiario. En cada apiario se tomaron muestras de tres colmenas.

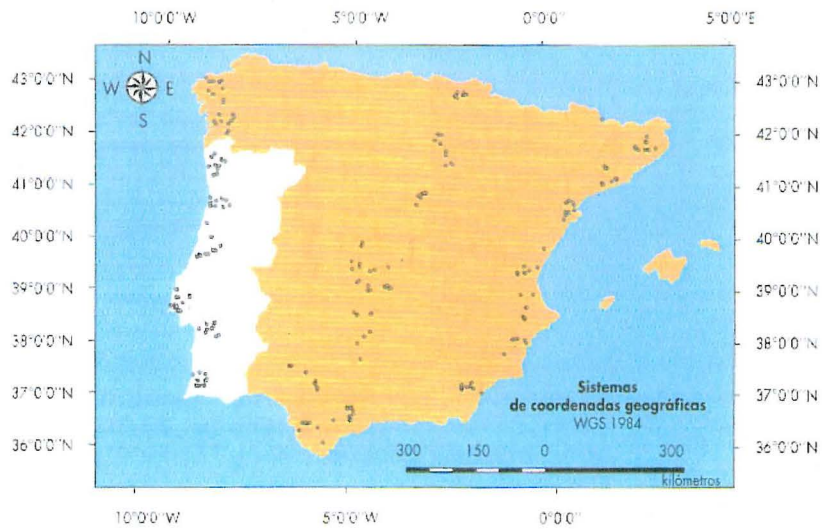


FIG. 2 / Detalles del muestreo de las abejas Ibéricas.



(a) Toma de zánganos de los cuadros.



(b) Preparación de las muestras inmediatamente después de su colecta de las colmenas.



(c) Localización del apiario con GPS y detalle de la ficha de campo.

genéticos mencionados anteriormente, los patrones de diversidad de la abeja ibérica y los procesos evolutivos que están en su génesis, están lejos de ser realmente identificados y comprendidos. Por tanto, la abeja ibérica se ha revelado como un verdadero desafío para los científicos, probablemente aún más difícil que otros organismos ibéricos por la complejidad añadida de los procesos contemporáneos realizados por los humanos (por ejemplo: el movimiento de colonias, introducción de reinas foráneas, selección de colonias, introducción accidental de nuevos parásitos y enfermedades).

Tras la secuenciación del genoma de la abeja melífera (Weinstock et al., 2006), se dispone actualmente de poderosas herramientas moleculares y analíticas para diseccionar la complejidad de los patrones de diversidad genética exhibidos por la abeja ibérica. En este contexto queremos dar a conocer un proyecto de investigación que recurre a las más avanzadas tecnologías moleculares y los recursos genómicos disponibles en la plataforma *BeeBase* [<http://hymenoptera-genome.org/beebase/>] para el estudio a gran escala de la abeja ibérica. Este proyecto está financiado por la Fundación para la Ciência e Tecnologia (PTDC/BIA-BEC/099640/2008) y está siendo realizado por un equipo internacional que integra a investiga-

dores de dos centros de investigación portugueses, el Centro de Investigación de Montanha do Instituto Politécnico de Bragança (María Alice Pinto e João Carlos Azevedo) y el Centro de Biología Molecular e Ambiental da Universidade do Minho (Filipe Costa), una Universidad española, la de Murcia (Pilar De la Rúa), y dos Universidades Americanas, la de Texas A&M (J. Spencer Johnston) y la de Purdue (John C. Patton).

El proyecto se inició en mayo de 2010 con la recogida de muestras en apiarios localizados en tres transectos dispuestos a lo largo de las costas Atlántica y Mediterránea y el centro de la península Ibérica (Fig. 1). La toma de muestras de los apiarios ibéricos (Fig. 2) terminó en julio de 2010 y fue posible gracias a la colaboración de numerosos apicultores y técnicos de las asociaciones, que pusieron a nuestra disposición su precioso tiempo para ayudar en esta ardua tarea, por otro lado muy enriquecedora gracias a lo que aprendimos tras el contacto con los apicultores. Se tomaron muestras de 711 colmenas representando 235 apiarios de 203 apicultores de Portugal y España. Paralelamente a la colección ibérica, se ha construido una importante colección de referencia (en total 145 colonias) de las subespecies *A. m. mellifera* (77), *A. m. intermissa* (31), *A. m. carnica* (20) y *A. m. ligustica* (17), provenientes de Francia, Dinamarca, Holanda, Suiza, Reino Unido, Noruega, Argelia, Marruecos, Croacia, Serbia e Italia. Esta tarea finalizó con éxito en Agosto de 2011 gracias a la inestimable colaboración de muchos colegas investigadores de Europa y el Norte de África.

El genotipado del ADN nuclear de los 856 individuos se terminó en octubre de 2011. Para este objetivo se recorrió a unos marcadores moleculares conocidos como "polimorfismo de nucleótido simple" o SNP por sus siglas en inglés (*single nucleotide polymorphism*). Los SNP son unos de los marcadores moleculares más interesantes y prometedores debido a su abundancia en el genoma y su elevada variabilidad, la co-dominancia y la calidad de los datos, y la posibilidad

Este proyecto tiene como objetivos: identificar, representar e interpretar los patrones de diversidad genética (neutra y bajo selección) de la abeja ibérica y desentrañar y comprender los diferentes procesos históricos y contemporáneos que han dado forma a la diversidad que encontramos hoy en día.

Se espera que este enfoque sirva para identificar regiones del genoma de la abeja ibérica moldeadas por la selección natural, y por ello importantes por la adaptación al medio, y eventualmente comprender, la base genética de la adaptación, lo que constituye uno de los objetivos fundamentales y más ambicioso de la biología evolutiva.

FIG.3/ Detalles del procedimiento analítico para la obtención de los SNPs.

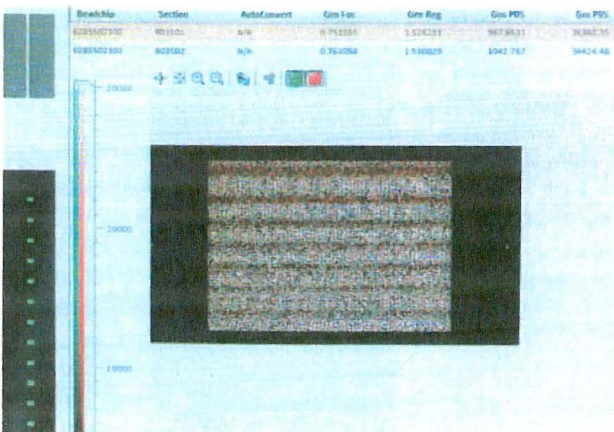


(a) Preparación del BeadChip.

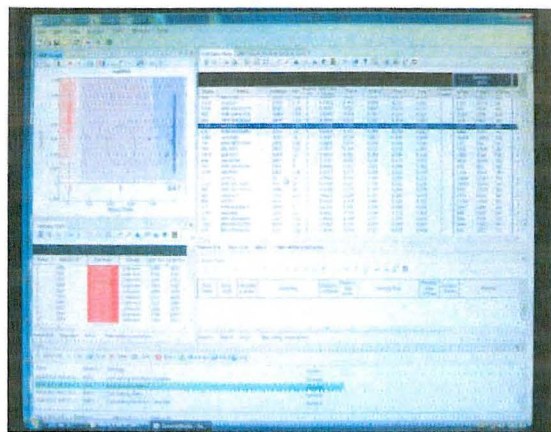


(b) iScanReader de Illumina se usa para analizar la señal de fluorescencia del BeadChip.

(c) Imagen de BeadChip producida por el iScanReader.



(d) Genotipado automático con el software Genome Studio de Illumina®.



de utilización a gran escala (nº de SNPs y de individuos) gracias a las nuevas tecnologías moleculares. Paralelamente al proyecto de secuenciación de la abeja, se ha desarrollado un chip para la plataforma Illumina®, que contempla 1536 SNPs dispersos por los 16 cromosomas de la abeja, lo que permite el análisis de todo el genoma. Así pues, recurriendo a la tecnología de Illumina®, disponible en la Universidad Texas A&M, el genoma de los 856 individuos fue analizado a través del genotipado de los 1536 SNPs usando el llamado *GoldenGate*

Genotyping Assay de Illumina® (Fig. 3) y un panel de oligonucleótidos diseñado por encargo (*custom oligo pool assay*) cuya utilización fue gentilmente autorizada por Danny Weaver. Los datos producidos para cada individuo genotipado consisten en una cadena de 1536 nucleótidos (por ejemplo: GAAGGCGCAAG...) correspondientes a 1536 posiciones dispersas por los 16 cromosomas. Actualmente, se están analizando los datos de los SNPs, habiéndose obtenido resultados preliminares bastante interesantes que serán oportunamente di-

vulgados (en conferencias y revistas científicas y técnicas) a las comunidades científica y apícola.

Además del componente nuclear, la composición materna del conjunto de las muestras será examinada a través de la secuenciación de la región intergénica del ADN mitocondrial situada entre los genes del ARN transferente de la leucina (*tARN^{leu}*) y el de la citocromo oxidasa II (*coxII*). Esta región mitocondrial también ha sido ampliamente utilizada en estudios de diversidad de la abeja en todo el mundo, y en especial de la península Ibérica

Nota de la autora

Aquellos apicultores que colaboraron con este proyecto y que estén interesados en conocer el tipo de ADN mitocondrial de sus colonias (si tienen origen africano o europeo occidental) pueden enviar un e-mail (con la identificación del apicultor y la localización del apiario) a la dirección apinto@ipb.pt para solicitar esa información. Dichos análisis estarán concluidos a mediados de 2012.

Agradecimientos

Han sido numerosas las personas que han contribuido a este proyecto, a las que estamos profundamente agradecidos. Un agradecimiento muy especial va dirigida a Antonio Gómez Pajuelo por facilitarnos el contacto con numerosos apicultores y técnicos de Asociaciones de Apicultores de España y por su disponibilidad para resolver todos los problemas con los que nos enfrentamos durante la toma de muestras. Agradecemos profundamente a todas las personas de la extensa lista que va a continuación (y también a aquellas que por error no intencionado no aparecen en la lista) su inestimable colaboración en la recogida de muestras en España y Portugal: Ana, Anabela Mendes, Antonieta Coeiro, Armada Nunes, Amílcar Fernandes, Adérito Serpa, Adalberto, Albano Barros, Alberto, Alberto Aguiar, Alfredo Silva, Antonio Sousa, António Hermenegildo, António Rosende, António Tavares, Afrindo Justino, Aminda Almeida, Aurora González Azeiteiro, Abel Dias Mateo, Aníbal Gilabert Cortes, Adolfo Ciano, Afonso Monto, Agostinho Simões Guenete, Albert Tort, Alael André, Eulália, Anaam, António, António, Campes, António, Domingo, António Malve, António Tereza, Apolónia Enll, Carapane, António Noron Salvo, Beatriz, Ivo Dambrós, Sularati, Bruna Mariana, Bruna Martins, Cláudia Guida, Carmen Fuxó, Genérico López, Celestino Anaya, Constança Barquero, Carlos Brilha, Carlos Mendes, Carlos Teixeira, Centro de Formação e Experimentação Agro-Forestal de São João, Cláudio Trigueiro, Cláudia, Cécilia, Cristina Pires, Cristina Pitadas, David Godinho, David Pereira, Diego Alberto, Diego Jiménez, Domingo Gama, Eládio Teixeira Rodrigues, Estrela Forestal Santa Coloma de Fomento, Esperanza Fernández, Ester, Esther Muñoz, Emilia Ramirez, Fernanda Oliveira, Francisco Iglesias, Francisco Ribeiro, Fernando Colasuyud, Florar, Jiménez, Francisco Jiménez, Francisco Martínez Azúris, Francisco Mira Yala, Francisco Saiz, Benito, Gabriel Morgada, German, Guillermo Rosell Carbonell, Gonzalo Calvo, Haroldo Davila, Enrique Simó, Ignacio Rodríguez, Idefonso Saler, Isabela Gareta, Ixel Espirito, Ismael Uribe, Inácia dos Santos, Mamel, Imaculada Segura Guimerá, Isidro, Jaime Cambra, Jaime Gutiérrez, João Esteves Manso, João Gonçalves Dias, Joaquim Gomes, Joaquim Marques, Joaquim Neves Alexandre, Joaquim Romão, Jorge Neves, José Afonso, José António Sequeira, José Augusto Alves, José Carneiro, José Coelho, José da Costa Silva, José Helena Ferreira, José Janeiro Lamas, José Lourenço, José Luis Pinho, José Luis Rei, José Maria Nasimento, José Duarte Silva, José Flores Serrano, José Ribeiro, Juan José Garrido, Jordi Guaspe, Jordi Muratò Balmes, Jordi Sacot, Jorge Bela Mora, José, José Antonio, José Antonio Almarino, José Francisco, José Gabriel González, José Garcia, José Gil, José González, José Luis Gonzalez, José Maria Oliva, José Mascarelle Sánchez, José Mas, José Navarro, José Pires, José Robledo, José Vicente, Joscarmen Martín, Juan, Juan Bautista, Juan José, Juan José Illeixa, Juan José Martínez, Juan José Nauboliver, Juan Pedro, Julia Gómez Zardoya, Julio Agra Blanco, Julio Jesus Jorge, Julio Rivas, Julian, Laura Garcia Peña, Lala Moreno, Luis Esperança Lourenço, Manuel Barbosa Rodrigues, Manuel Diacampo, Manuel Meira, Manuel Jardim, Manuel Marques, Manuel Terceiro, Manel Simon Vallemajor, Marco Pereira, Maria José, Marina López Loureiro, Melchior Silva Ferreira, Miguel Mendes Lopes, Maria Carmen, Maria José Ponce Corbajal, Manuel Gonzalez Melo, Manuel Robledo, Marilán Rico, Maria Teresa Sierra, Mariano, Maria Bebelo, Maria González Cano, Maria Esteves, Miguel Gil, Miguel Maja, Miguel Serrano Martínez, Nazario Fernandez, Nicolás Espina, Norbina Gomes da Mata, Nuno Lopes, Paulo Manuel Dias, Paulo Varela, Pascual Domingo, Pau Bars, Pedro Jorge Carneiro Barreiro, Pedro, Rafael Anton Palacios, Rafael Ribas, Ramon Ferré, Raúl Molina Rimenaz, Ricardo González Ricardo Pereira, Rita, Rogelio Rodríguez Álvarez, Rogme Lena Varela, Rui Vasco Martins Caetano, Rudolfo Mantelva Palau, Ruan Garcia, Ruan Rubio Asensi, Sadurni, Salvador López, Salvador Mallafré, Severiana Salgado, Sérgio Candeias, Simões Alegria, Simeó Parareda, Tiago Moreira, Telma Marreiras, Vicente Garcia Fernández, Vitorino Martin, Xavier, Xavier Colado, Xavier Llobet Guay, Xesus Raimondoz Rodriguez, e Xesus Asorey.

La obtención de la colección de referencia de las otras subespecies fue posible gracias a Andrew Abrahams, Björn Dahle, Gabriele Soland, Gilles Fert, Jevrosima Stevanovic, Leonard Piva, Lionel Garnery, Norman Carreck, Raffaele dall'Oliva, Ramee Van der Zee, Said Abovifaraj, Santiago Sáenz y Wahida Loucif. A Per Kryger le enviamos un agradecimiento especial por las muestras de Dinamarca y por haber facilitado los contactos con los colegas de otros países de Europa Occidental. La toma de muestras de los apiarios de la península ibérica fue posible gracias al empeño de las becarias del proyecto Andreia Brandão e Inês Moura, de la voluntaria Margarida Neto y finalmente de Irene Muñoz que, aparte de acompañarnos al muestreo de Galicia, hizo los contactos telefónicos con los apicultores de toda España. João Paulo Castro y Julio Chávez Galza aportaron una gran ayuda con los datos GPS y SIG. Un agradecimiento muy especial a Colette Abbey por el excelente trabajo en el laboratorio de extracción de ADN y genotipado de los SNPs, y a Danny Weaver (Genformat) por autorizar la utilización del OPA (Oligo Pool Assay). También agradecemos a la Federación Nacional de Apicultores Portugueses, y a todas las Asociaciones de Apicultores de España y Portugal que directa e indirectamente contribuyeron en el éxito del proyecto. Este proyecto está financiado por la Fundación para la Ciência e Tecnologia y por el programa COMPETE/QREN/EU a través del proyecto PTDC/BIA-BEC/099640/2008.

(ver Cánovas et al., 2008). A pesar de que la composición materna de la abeja ibérica es conocida a partir de estudios anteriores, el análisis del ADN mitocondrial complementará la interpretación y representación de los patrones de diversidad generados por los SNPs.

Este proyecto tiene como objetivos (1) identificar, representar e interpretar los patrones de diversidad genética (neutra y bajo selección) de la abeja ibérica y (2) desentrañar y comprender los diferentes procesos históricos y contemporáneos que han dado forma a la diversidad que encontramos hoy en día. Se espera que este enfoque sirva para identificar regiones del genoma de la abeja ibérica moldeadas por la selección natural, y por ello importantes por la adaptación al medio, y eventualmente comprender, la base genética de la adaptación, lo que constituye uno de los objetivos fundamentales y más ambicioso de la biología evolutiva.

La supervivencia a largo plazo de cualquier ser vivo depende de su diversidad genética, que será menor cuanto mayor sea la dificultad de adaptación al medio. En un contexto de cambios ambientales rápidos y profundos, los desafíos a los que se enfrentan las abejas van en aumento. Por tanto, es un imperativo preservar la destacable herencia genética que ha llegado hasta nuestros días, después de miles de años de evolución. La diversidad genética es la materia prima que permite a la abeja responder y adaptarse a un creciente número de invasores exóticos (enfermedades, parásitos, depredadores), la polución, los pesticidas, el cambio climático y las demandas de una apicultura cada vez más competitiva. Mediante la identificación de los patrones y los procesos de los componentes de la diversidad y la importancia adaptativa del genoma de la abeja ibérica, este proyecto proporcionará una información básica para los programas de mejora y de gestión a largo plazo y para la conservación de la abeja ibérica. Conservar la diversidad genética de la abeja ibérica es asegurar la materia prima de la apicultura y por lo tanto la sostenibilidad de la industria apícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANOVAS, F.; DE LA RUA, P.; SERRANO, J.; GALTÁN, J. (2008). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46:24-30.
- DE LA RUA, P.; JAFFÉ, R.; DALL'OLIO, R.; MUÑOZ, I.; SERRANO, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* 40: 263-284
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUTT, J.M. (1998). The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52:1119-1134.
- GÓMEZ, A.; LUNT, D.H. (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Springer*, Dordrecht.
- HEWITT, G.M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:87-112.
- MIGUEL, I.; IRIONDO, M.; GARNERY, L.; SHEPPARD, W.S.; ESTONBA, A. (2007). Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie* 38:141-155.
- SERRANO, J.; CANOVAS, F.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, R.; GALTÁN, J.; DE LA RUA, P. (2011). De África a Europa pasando por Iberia: Historia evolutiva de la abeja ibérica. En: *Actas del VI Congreso Nacional de Apicultura*, pp. 7-22. Don Folio, Córdoba (ISBN 978-84-15105-29-9).
- WEINSTOCK, G.M., G.E. ROBINSON, R.A. GIBBS, K.C. WORLEY, J.D. EVANS, R. MALESZKA, H.M. ROBERTSON, D.B. WEAVER, M. BEY, P. BORK, C.G. ELSIK, K. HARTFELDER, G.J. HUNT, E.M. ZDOBNOV, G.V. AMDAM, M.M.G. BITONDI, A.M. COLLINS, A.S. CRISTINO, H.M.G. LATIOREFF, C.H. LOBO, R.F.A. MÖRITZ, F.M.F. NUNES, R.E. PAGE, Z.L.P. SIMÕES, D. WHEELER, P. CARNINCI, S. FUKUDA, Y. HAYASHIZAKI, C. KAI, J. KAWAI, N. SAKAZUME, D. SASAKI, M. TAGAMI, S. ALBERT, G. BAGGERMAN, K.T. BEGGS, G. BLOCH, G. CAZZANALI, M. COHEN, M.D. DRAPEAU, D. EISENHARDT, C. EMORE, M.A. EWING, S.E. FAHRBACH, S. FORET, C.J.P. GRIMMELIKHUIZEN, F. HAUSER, A.B. HUMMON, J. HUYBRECHTS, A.K. JONES, T. KADOWAKI, N. KAPLAN, R. KUCHARSKI, G. LEBOULLE, M. LINTAL, J.T. LITTLETON, A.R. MERCER, T.A. RICHMOND, S.L. RODRIGUEZ-ZAS, E.B. RUBIN, D.B. SATTELE, D. SCHLIPF, L. SCHOOTS, Y. SHILMISH, J.V. SWFFEDLER, R. VLLARDE, P. VERLEYEN, E. VIERSTRAETE, M.R. WILLIAMSON, S.A. AMENI, S.J. BROWN, M. CORONA, P.K. DEARDEN, W.A. DUNN, M.M. ELEKONICH, T. FUJUYUKI, I. GATTERMEIER, T. GENPEL, M. HASSELMANN, E. KAGE, A. KAMIKOUCHI, T. KUDO, T. KUNEDA, M.D. LORENZEN, N.V. MILSHINA, M. MÖRIOKA, K. OHASHI, R. OVERBEK, C.A. ROSS, M. SCHIOETT, T. SHIPPY, H. TAKEUCHI, A.L. TOHH, J.H. WILLIS, M.J. WILSON, K.H.J. GORDON, I. LETUNIC, K. HACKETT, J. PETERSON, A. FELSENFELD, ET AL. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931-949.



BULEO  MIEL

SUMINISTROS APÍCOLAS:
miel, polen, cera y jalea real.

Sólo compramos mieles de calidad.



Buleo Miel, S.L.

P.I. Fres. de los Arrieros, Parc.4.

16260 Minglanilla (Cuenca), España.

Telf. 962 187 164. Fax: 962 187 596. Móvil: 606 408 908

e-mail: buleo@buleomiel.com

www.buleomiel.com