

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

FILIPE 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.

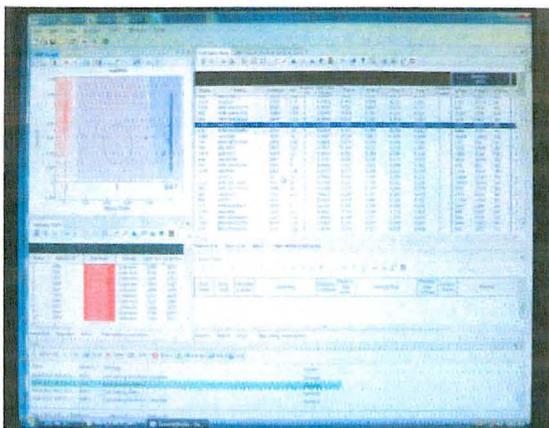


(b) iScanReader de Illumina se usa para analizar la señal de fluorescencia del BeadChip.

(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

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. BEYR, 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