

Estimación de la diversidad genética en *Apis mellifera* L. en el centro de crianza de abejas reinas de la provincia Mayabeque, Cuba

A. Pérez Hernández, N. Martínez Marrero¹, O. Uffo Reinoso,
B. Peteira Delgado, J. Demedio, D. Rodríguez

Universidad Agraria de la Habana. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba 22 Dirección postal:
Universidad Agraria de la Habana. Carretera Tapaste y Autopista Nacional, km 22 ½,
San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32700.

Recibido Agosto 21, 2013. Aceptado Septiembre 18, 2014.

Genetic diversity estimation in *Apis mellifera* L. in a queen bee breeding center of Mayabeque Province, Cuba

Abstract. Determining genetic diversity in bee populations using molecular markers is essential for the design of breeding programs and conservation. In Cuba there have been no studies of this type, so the aim of the present research was to estimate the genetic diversity of *Apis mellifera* L. in a queen bee breeding center of Mayabeque province, by use of RAPDs markers. Ten primers (OPA 3, 5, 7, 13, 16, 18 and OPB 1, 2, 9, 20) were tested, but only three of these (OPA-7, OPA-16 and OPB-20) were used for genotyping 45 workers. The assay detected a total of 32 clear and reproducible bands, 15 (46.9%) of which were polymorphic. The number of polymorphic bands amplified with each primer ranged between 4 (40%) to 6 (54.5%). Nei's average gene diversity was 0,299 and ranged from 0,200 to 0,500 between loci. The 0.87 similarity average value generated with the coefficient of Nei and Li (1979) reinforces previous morfo-biometric findings in this queen bee breeding center. The UPGMA cluster analysis allowed the formation of two groups ($r = 0.844$), the first grouped most individuals studied and the second included only three. These results demonstrated the usefulness of RAPDs for estimating genetic diversity in a population of *Apis mellifera* L. in Cuba. The low genetic diversity found may be due to improper handling in the selection of the hives.

Key words: *Apis mellifera* L., Cluster analysis, Genetic Diversity, RAPDs

Resumen. La determinación de la diversidad genética en poblaciones de abejas utilizando marcadores moleculares es fundamental para el diseño de programas de selección y conservación. En Cuba no se han realizado estudios de este tipo por lo que el objetivo del presente trabajo fue estimar la diversidad genética en *Apis mellifera* L. en el centro de crianza de reinas de la provincia Mayabeque, mediante marcadores tipo RAPDs. Fueron probados 10 cebadores (OPA 3, 5, 7, 13, 16, 18 y OPB 1, 2, 9, 20) pero solo tres de estos (OPA-7, OPA-16 y OPB -20) se utilizaron para el genotipaje de 45 obreras. El ensayo detectó un total de 32 bandas brillantes y reproducibles, 15 (46,9%) de ellas polimórficas, con una media por cebador de 10,6. La diversidad génica promedio de Nei fue de 0,299 y varió por loci entre 0,200 y 0,500. El valor medio de similitud de 0,87 generado con el coeficiente de Nei y Li (1979) refuerza los hallazgos morfo-biométricos en este apiario. El análisis de conglomerados UPGMA permitió la formación de dos grupos ($r = 0,844$), el primero unificó la mayoría de los individuos estudiados y el segundo solo incluyó a tres. Los resultados obtenidos demostraron la utilidad de los RAPDs para estimar la diversidad genética en una población de *Apis mellifera* L. en Cuba. La baja diversidad genética hallada en el centro de crianza de reinas puede deberse a un inadecuado manejo en la selección de las colmenas.

Palabras clave: Análisis de conglomerados, *Apis mellifera* L., Diversidad genética, RAPDs

¹Autor para la correspondencia, e-mail: nadia@censa.edu.cu

Introducción

La abeja es beneficiosa para la agricultura y el medio ambiente, no solo por la producción de miel, cera, polen, propóleos y jalea real sino por su importante papel en la polinización de especies silvestres y cultivadas (Morse y Calderone, 2000). En los últimos años a nivel mundial ha ocurrido un declive en las poblaciones de estos insectos afectándose su acción polinizadora y su biodiversidad (Ellis *et al.*, 2010; Neumann y Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010).

La diversidad genética en las colmenas de abejas incrementa su productividad (mayor almacenamiento de alimentos, rápida ganancia de peso) y adaptabilidad (sobrevivencia en invierno, resistencia a enfermedades) en los ecosistemas (Tarpay y Seeley, 2006; Mattila y Seeley, 2007; Danko *et al.*, 2011). En correspondencia a lo anterior, su evaluación en las poblaciones resulta fundamental para el diseño de programas de selección y conservación.

Múltiples investigaciones han mostrado la utilidad de la Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) para estimar la variabilidad e inferir las relaciones genéticas en

poblaciones de *Apis mellifera* L. (Tunca y Kence, 2011; Kamrani *et al.*, 2012; Shivashankar *et al.*, 2013). La información que aportan los estudios moleculares potencia la selección temprana y específica de reinas superiores, la introducción rápida de genes beneficiosos en una población particular y el mejoramiento genético basado en la selección de genes.

La apicultura cubana ha carecido de los recursos y acciones necesarios para monitorear la diversidad genética de su ganado apícola, en el contexto de un programa de selección que ha tenido como bases la obtención de colmenas altas productoras y tolerantes a las enfermedades (MINAG, 2002). El mantenimiento de la diversidad genética cobra mayor importancia en los Centros de Crianza de Abejas Reina (CCR), ya que éstos suministran cada año las reinas para cientos de colmenas de producción (MINAG, 2014). La presente investigación tuvo como objetivo estimar la diversidad genética en *Apis mellifera* L. en el CCR de la provincia Mayabeque, mediante marcadores tipo RAPDs.

Materiales y Métodos

Para estimar la diversidad genética se seleccionaron al azar tres abejas nodrizas del centro de la cámara de cría, de cada una de las colmenas (10 maternas y 5 paternas) presentes en el CCR de la provincia Mayabeque. Estas se conservaron en etanol absoluto a -20°C.

Se extrajo el ADN genómico a 45 obreras a través del procedimiento descrito por Doyle y Doyle (1987) y con las modificaciones reportadas por Cullings (1992). La integridad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% corrida a 100 V, durante 30 min en tampón TBE 0.5 X. Para su observación, el ADN se tiñó con Bromuro de Etidio (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y su concentración se estimó visualmente a partir de la banda más brillante (150 ng) de un patrón de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, WI, EE.UU).

Se probaron 10 cebadores (OPA 3, 5, 7, 13, 16, 18 y OPB 1, 2, 9, 20) de la firma comercial Operon Technologies (Alameda, CA, EE.UU), de los cuales el OPA-13 y el OPB-1 no mostraron polimorfismo. Para el análisis de los genotipos en estudio se seleccionaron tres (OPA-7, OPA-16 y OPB-20) de los cebadores que detectaron bandas polimórficas. La amplificación con cada cebador se realizó a través de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), bajo las siguientes condiciones:

0.6 μM de cebador, 200 μM de dNTPs, 2 mM de MgCl_2 , 0,3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, 1 U de GoTaq Polimerasa (Promega), 1 X de tampón de reacción para la enzima y aproximadamente 50 ng de ADN genómico, en unión de agua libre de nucleasas para un volumen final de 15 μL . La mezcla fue sometida a: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 36°C por 30 s, 72°C por 1 min y finalmente 72°C por 5 min.

Los productos de amplificación fueron separados y visualizados mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%, en tampón 0,5 X TBE a 100 V durante tres horas y se tiñeron con Bromuro de Etidio (1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se utilizó un patrón de peso molecular de 100 pb para estimar el tamaño de las bandas observadas (Promega).

Se evaluaron solo las bandas brillantes y reproducibles en los perfiles de RAPDs obtenidos. Utilizando el criterio de «1» para presencia de banda y «0» para ausencia, se elaboró una matriz de datos binarios para estimar la proporción de loci polimórficos, la diversidad genética promedio de Nei (He) (Nei, 1973) y la similitud genética entre los genotipos en estudio (Nei y Li, 1979). El análisis de agrupamiento de los genotipos se realizó por el método UPGMA (*Unweighted Pairwise Group Method with Arithmetic Averages*) mediante el programa NTSYS-pc version 2.11 (Exeter Software, Stauket, NY, EE.UU) y el

resultado fue presentado en un dendograma. Se determinó también el coeficiente de correlación

cofenética (Sokal y Rohlf, 1994).

Resultados y Discusión

Los marcadores tipo RAPDs permitieron el estudio de la variabilidad genética en poblaciones de *Apis mellifera* L. en diversas regiones del planeta. Hunt y Page (1995) utilizando este tipo de marcadores detectaron un alto grado de polimorfismo y lograron mapear múltiples loci en haplotipos de zánganos en colmenas procedentes de California. Otros autores como Suazo *et al.* (1998) detectaron marcadores de DNA nuclear útiles para distinguir abejas europeas de africanas en poblaciones procedentes de Europa, Estados Unidos, México, Honduras, Costa Rica y la región sur de África. Por su parte, Tunca y Kence (2011) utilizaron los RAPDs para evaluar la diversidad genética en *Apis mellifera* L. de Turquía y demostraron que estos fueron efectivos en la discriminación de sus poblaciones, al separar los linajes A y C. Kamrani *et al.* (2012) mostraron que el estudio de estos marcadores agrupó de manera confiable poblaciones de abejas de Irán, basado en su distribución geográfica y determinaron que existía un bajo nivel de variación genética. En sus investigaciones Shivashankar *et al.* (2013) demostraron la eficiencia de los RAPDs para estimar la diversidad genética en poblaciones de abejas localmente adaptadas de la India; las cuales fueron divididas en dos grupos de acuerdo a su origen.

Los presentes resultados constituyen el primer reporte de la utilización de los marcadores de tipo RAPDs al estudio de poblaciones de *Apis mellifera* L. en Cuba.

De las 45 muestras de ADN evaluadas con los tres cebadores seleccionados solo se obtuvieron productos de amplificación en 40. El fallo en la amplificación en las cinco restantes puede explicarse debido a que la PCR es una técnica extremadamente sensible y reproducible cuando se analizan muestras puras de ADN; sin embargo, la sensibilidad y la eficiencia de amplificación varían ampliamente debido a la presencia de inhibidores que interfieren en la actividad de la polimerasa o afectan los ácidos nucleicos. Estos inhibidores pueden afectar la sensibilidad del ensayo, incluso cuando están presentes en pequeñas cantidades (Rådström *et al.*, 2003), lo que resulta en la generación de resultados falsos negativos (van Doorn *et al.*, 2009). En el caso de estas muestras se pudieran considerar como posibles inhibidores los complejos moleculares de carbohidratos y proteínas presentes en la miel

(contenida en el buche) y el exoesqueleto de las abejas (White y Doner, 1980; Winston, 1991).

Tras evaluar los perfiles de RAPDs se registraron en total 32 bandas brillantes y reproducibles, de las cuales 15 (46,9%) fueron polimórficas. La media de bandas observadas por cebador fue de 10,6. El número de bandas polimórficas amplificadas con cada cebador y el porcentaje de polimorfismo fue:

OPA	7	4	40%
OPA	16	6	54,5%
OPB	20	5	45,5%

La Figura 1 muestra los perfiles de RAPDs de 16 abejas de diferentes colmenas, obtenidos tras la amplificación con el OPB 20, y que se escogieron para ilustrar el polimorfismo presente en las obreras estudiadas.

El porcentaje de polimorfismo detectado en esta investigación se halla por encima de los valores informados por Hunt y Page (1992) y Shivashankar *et al.* (2013), de 20,8% y 5,64%, respectivamente, con medias por cebador en el primer caso de 6,3 bandas totales y 1,3 bandas polimórficas. Este valor se encuentra próximo al 40,0% detectado por Hunt y Page (1995) con una media de 7,7 bandas totales por cebador; y al valor mínimo reportado por Tunca y Kence (2011) de 37,14%. Un porcentaje superior al encontrado en el presente estudio, fue obtenido por Kamrani *et al.* (2012), quienes reportan un 72,6% de polimorfismo y una media de 8,6 bandas totales por cebador.

Aunque la mayoría de los marcadores tipo RAPDs presentan una expresión dominante, que no permiten distinguir a los heterocigotos (Williams *et al.*, 1990), es posible estimar la diversidad génica promedio de Nei (He). En nuestro estudio el He fue de 0,299 y varió por loci entre 0,200 y 0,500. En las poblaciones analizadas por Tunca y Kence (2011) las He estuvieron entre 0.035 y 0.175 mientras Kamrani *et al.* (2012) encontraron para las poblaciones que estudiaron, He entre 0.298 y 0.37.

El valor medio en la matriz de similitud generada con el coeficiente de Nei y Li (1979) fue de 0.87 con un máximo de 1 y un mínimo de 0.62. En el análisis de conglomerados UPGMA la línea de corte se estableció en el valor 0,81, lo que permitió la formación de dos grupos (Figura 2). El primer grupo, unificó a casi la totalidad de los individuos provenientes tanto de colmenas maternas como de

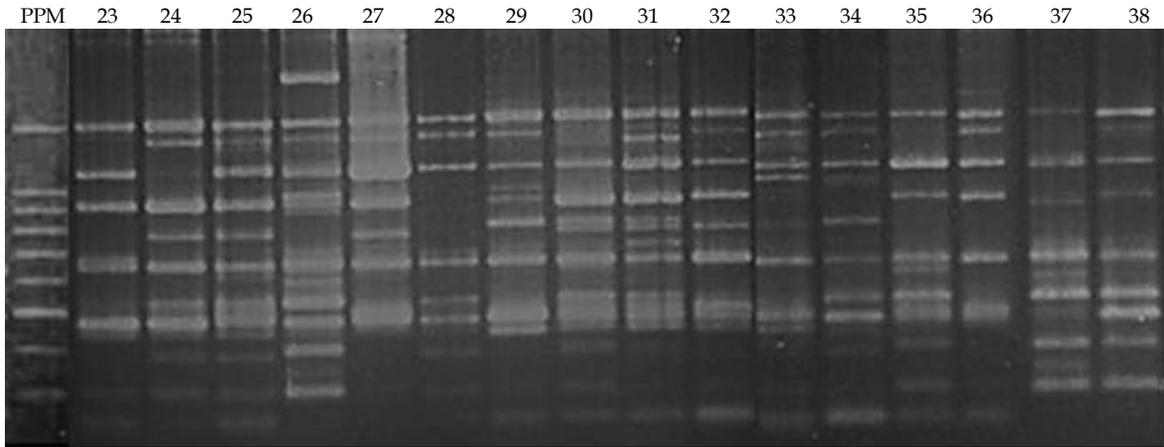


Figura 1. Patrón de amplificación del ADN de genotipos de abeja obtenidos con el cebador OPB-20. (PPM: patrón de peso molecular).

paternas y el segundo, solo a tres genotipos, uno proveniente de una colmena materna (A12) y dos de paternas (A23 y A27). El valor del coeficiente de correlación cofenética estimado ($r=0,844$) demuestra que en el dendrograma las distancias en la matriz original no presentaron distorsión debida al método de agrupamiento. Estos resultados indican que la distancia genética entre individuos es baja, lo que refuerza las similitudes apreciadas a partir de determinaciones morfobiométricas anteriores en este mismo CCR (Pérez y Rodríguez, 2012).

En conjunto, estos resultados demuestran la baja diversidad genética presente en el CCR de la provincia Mayabeque, y que pudiera explicarse debido a un inadecuado manejo en la selección de las

colmenas. Para establecer el CCR se seleccionaron reinas de colmenas maternas procedentes de apiarios situados a más de 40 km de este y de paternas de la zona de emplazamiento. Las reposiciones se realizaron con reinas obtenidas de apiarios de producción, que a su vez, se nutren de los pies de cría de este mismo CCR. En adición, parece haberse manifestado algún efecto de deriva (Guzmán-Novoa, 2012), conducente a una reducción de la heterocigosidad, a causa del muy reducido número de colmenas reproductoras, lo cual no ha tenido un efecto negativo mayor gracias a la intrusión de zánganos silvestres.

El mantenimiento de una adecuada diversidad genética intrapoblacional en las colmenas resulta

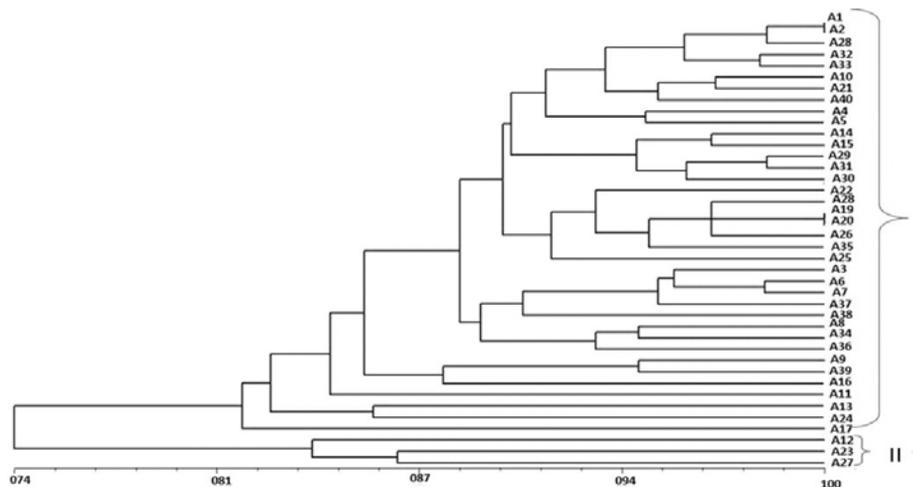


Figura 2. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA, a partir de la matriz de similitud generada con el coeficiente de Nei y Lee, 1979.

imprescindible para que no se comprometan sus posibilidades adaptativas frente a los actuales y futuros desafíos que imponen los cambios ambientales y la actividad humana. Este trabajo constituye una evaluación inicial de la diversidad genética de *Apis mellifera* L. existente en un CCR de Cuba. Sin embargo, los resultados obtenidos se corresponden con reportes morfológicos anteriores en este apiario (Pérez y Rodríguez, 2012) y mostraron la

necesidad de incrementar la diversidad genética intrapoblacional. Una estrategia a seguir debe ser la obtención de reinas a partir de colmenas maternas situadas en apiarios de selección distantes, y paternas de la misma área. Estudios futuros deberán realizarse teniendo en cuenta un mayor número de muestras y explorando marcadores que permitan detectar un mayor polimorfismo

Literatura Citada

- Cullings K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol. Ecol.* 1:233.
- Danka R. G., J. W. Harris, and J. D. Villa. 2011. Expression of Varroa sensitive hygiene (VSH) in commercial VSH honey bees (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Econ. Entomol.* 104 (3): 745-49.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoc. Bull.* 19:11.
- Ellis J., J. Evans, J. Vans, and J. Pettis. 2010. Colony losses, managed colony population decline and colony collapse disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49, 134-136.
- Guzmán-Novoa E. 2012. Manual para la cría de abejas reinas. Programa Nacional de Apicultura del INIFAP, SAGARPA, 1-18.
- Hunt G. J. and R. E. Page. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honeybee. *Theor. Appl. Genet.* 85: 15.
- Hunt G. J. and R. E. Page. 1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, Based on RAPD Markers. *Genetics* 39 (1):1371.
- Kamrani B., N. Pirany, A. Hashemi, and M. Kamrani. 2012. Genetic characterization of honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) populations from northwest of Iran using RAPD markers. *Tech. J. Engin. App. Sci.* 2 (12): 430.
- Mattila H. R. and T. D. Seeley. 2007. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science* 317: 362.
- Ministerio de la Agricultura de Cuba (MINAG). 2002. Programa de mejoramiento genético de la abeja *Apis mellifera* L. con abejas localmente adaptadas al ácaro Varroa destructor. EEAPI. Cuba.
- Ministerio de la Agricultura de Cuba (MINAG). 2014. Programa de mejoramiento genético de la abeja *Apis mellifera* con abejas localmente adaptadas al ácaro Varroa destructor. CIAPI, Cuba.
- Morse R. A. and N. W. Calderone. 2000. The value of honey bee pollination the United States. *Bee Culture* 128.
- Nei M. and W. Li. 1979. Mathematical-model for studying genetic-variation in terms of restriction endonu-cleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:5269.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., USA*, 70: 3321.
- Neumann P. and N. Carreck. 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1-6.
- Pérez A. y Y. Rodríguez. 2012. Relación de las características morfo-biométricas con los índices de infestación en abejas *Apis mellifera* L. en un apiario de la Provincia Mayabeque. Memorias III Encuentro Ibero-Latinoamericano de Apicultura y IV Congreso Cubano de Apicultura. Palacio de las Conversiones, La Habana, Cuba.
- Potts S. G., S. P. Roberts, R. Dean, G. Marris, M. A. Brown, R. Jones, P. Neumann, and J. Settele. 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15- 22.
- Rådström P., R. Knutsson, P. Wolffs, M. Dahlenborg, and C. Löfström. (2003). Pre-PCR Processing of Samples. En: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. *Methods Molec. Bio.* 216.
- Shivashankar M., N. M. Guruprasad, and N. Chandan. 2013. Heterogeneity in honey bees populations of India revealed by RAPD analysis. *J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec.* 3(2):1155.
- Sokal R. and J. Rohlf. 1994. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research* (3rd Ed.). Freeman and Co., New York.
- Suazo A., R. McTiernan, and H.G. Hall. 1998. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera*) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Hered* 89: 32.
- Tarpy D. R. and T. D. Seeley. 2006. Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens. *Naturwissen-schaften*, 93:195.
- Tunca R. I. and M. Kence. 2011. Genetic diversity of honey bee (*Apis mellifera* L.: *Hymenoptera: Apidae*) populations in Turkey revealed by RAPD markers *Afr. J. Agric. Res* 6 (29):6217.
- Van Doorn R., M. M. Klerks, M.P. Van Gent-Pelzer, A. G. Speksnijder, G. A. Kowalchuk, and C. D. Schoen. 2009. Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using Biotrove Open Arrays. *Appl. Environ. Microbio.* 75. (22):7253-60.
- Williams J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531.
- White J. R. and L. W. Doner. 1980. *Honey Composition and Properties Beekeeping in the United States Agriculture Handbook.* (335): 82 - 91.
- Winston M. 1991. *The Biology of the honey bee.* Ed Harvard University Press. ISBN: 0674074092,9780674074095. Pp. 281.