

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BIODIVERSIDAD DE LA CABAÑA APÍCOLA DE LA PROVINCIA DE ALBACETE

Por

Pilar DE LA RÚA TARÍN,
José Antonio ACOSTA MARTÍNEZ,
Obdulia SÁNCHEZ DOMINGO,
Irene MUÑOZ GABALDÓN

Recibido: 24-enero-2011

Aprobado: 14-mayo-2012

Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria. Campus de Excelencia Internacional Regional “Campus Mare Nostrum”. Universidad de Murcia. 30071 Murcia (España)

Tlfno: 868 884908

Correo electrónico: pdelarua@um.es, pepeacosta1@gmail.com, osd@um.es, irenemg@um.es

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la biodiversidad molecular de colmenas de la abeja de la miel (*Apis mellifera iberiensis*) situadas en la provincia de Albacete. Para ello se tomaron muestras de abejas obreras de colmenas distribuidas por toda la provincia. Estas muestras fueron caracterizadas mediante el análisis de un fragmento de la molécula del ADN mitocondrial (ADNmt) que permite determinar el linaje evolutivo al que pertenecen las colmenas y el tipo de ADNmt o haplotipo que portan. Como resultado se ha obtenido que las abejas de Albacete pertenecen en su mayoría al linaje evolutivo con herencia africana (80%) y que presentan, con una gran frecuencia, el haplotipo más abundante en las abejas del sur peninsular (A2, 63%). Por otro lado, se ha detectado una colmena con un haplotipo (C1) correspondiente a otras subespecies europeas. Este hecho indica que se están introduciendo reinas de otras procedencias aunque con una frecuencia muy reducida. Estos datos han servido para completar el mapa peninsular de distribución de los linajes evolutivos y haplotipos en las abejas ibéricas.

Palabras clave: abejas, Albacete, caracterización molecular, ADN mitocondrial, linajes evolutivos.

ABSTRACT

In this work we have studied the molecular biodiversity of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies located in the province of Albacete. For this purpose, samples of honey bee workers were taken from colonies located throughout the province. These samples were characterized by analyzing a fragment of the mitochondrial DNA molecule (mtDNA). Such analysis allows to distinguish the evolutionary lineage that the colonies belong to and the type of mtDNA or haplotype bear by them. The results demonstrated that honey bees from Albacete belong mostly to the African evolutionary lineage (80%). These samples presented a high frequency of a particular type of mitochondrial molecule (or haplotype) most abundant in southern peninsular bees (A2, 63%). On the other hand, it has been detected a colony with a haplotype (C1) corresponding to European subspecies. This suggests that honey bee queens are being introduced from other sources but with a very low frequency. These data were used to complete the distribution map of peninsular evolutionary lineages and haplotypes in the Iberian honey bees.

Key words: honey bee, Albacete, molecular characterization, mitochondrial DNA, evolutionary lineages.

0. INTRODUCCIÓN

La abeja de la miel, *Apis mellifera*, es el insecto más beneficioso del mundo no solo por la producción de miel y polen entre otros productos, sino, sobre todo, por su actividad polinizadora valorada en millones de euros al año (Gallai y cols. 2009). Fue descrita por Linneo en 1758 y debido a su notable variación geográfica, se han descrito numerosas entidades taxonómicas reconocidas como subespecies. En el último catálogo publicado sobre la taxonomía del género se detallan un total de 29 subespecies (Engel 1999) cuya distribución natural abarca África, Europa y Asia.

Su historia evolutiva está influida tanto por factores naturales como antrópicos. Existen diversas teorías sobre su origen: los primeros estudios basados en la morfometría (Ruttner 1988) sitúan su origen en Asia y proponen una posterior expansión a finales del Plioceno o comienzos del Pleistoceno hacia África y Europa. Tras la obtención de los primeros datos moleculares (basados en el ADNmt) esta hipótesis se modificó para situar el origen de *A. mellifera* en Oriente Medio (Garnery y cols. 1992). Otros datos moleculares más recientes proponen que se originó en África (Whitfield y cols. 2006), y desde allí se dispersó por Europa y el Oriente Medio tras sucesivas colonizaciones que generaron hasta cinco linajes evolutivos denominados A, M, C, O, e Y. Hacia Eurasia ocurrieron al menos dos expansiones: una de ellas colonizó Europa occidental (linaje M) a través de las penínsulas Ibérica e Italiana y otras, en dirección Este, habrían colonizado Asia y Europa del Este (linajes O y C respectivamente). El linaje denominado Y ha sido identificado en el noreste de África (Etiopia, Franck y cols. 2001). Estos linajes evolutivos han sido caracterizados mediante estudios fisiológicos, etológicos, ecológicos, morfométricos y moleculares (De la Rúa y cols. 2009). Cuatro de ellos se encuentran de forma natural en la cuenca mediterránea: el linaje africano (A), el linaje de Europa occidental y del norte (M), el linaje de Europa oriental (C) y el linaje de Oriente Medio (O).

La subespecie que habita la península Ibérica es *A. m. iberiensis* Engel 1999 anteriormente conocida como *A. m. iberica* Goetze 1964. Los primeros estudios basados en la morfometría y el comportamiento (Ruttner 1988), constataron que las abejas del norte peninsular son más parecidas a las europeas septentrionales y las del sur a las africanas. Se propuso entonces la existencia de un gradiente de distribución de las colonias de abejas ibéricas con dirección norte-sur. Estudios posteriores basados en la variabilidad de marcadores moleculares como las enzimas (Smith y Glenn 1995), las feromonas (Hepburn y Radloff 1996), la molécula del ADN mitocondrial (Smith y cols. 1991) y los microsátélites (Franck y cols. 1998), apoyan la hipótesis

de que las abejas ibéricas son el resultado de una amplia intergradación entre abejas del linaje M que sobrevivieron al último máximo glacial (hace aproximadamente unos 20.000 años), y abejas norteafricanas del linaje A que recolonizaron el suroeste europeo. La hibridación entre abejas de ambos linajes habría dado lugar a la distribución clinal de poblaciones de los linajes A y M, la cual es gradual en el Este peninsular y más abrupta en el Noroeste. En cualquier caso, en la revisión más reciente del género *Apis* (Engel 1999) basada en caracteres morfométricos, y según los resultados de análisis moleculares basados en caracteres nucleares (Withfield y cols. 2006), se considera que las poblaciones de abeja ibérica corresponden a una única subespecie.

La historia evolutiva de *A. mellifera* en la península Ibérica ha estado probablemente influida en épocas recientes por las técnicas apícolas. En este sentido la práctica intensiva de la trashumancia en las últimas décadas (afecta ya al 80% de las colonias), la pérdida masiva de colmenas por varroosis y otras patologías, y la compraventa de colmenas a escala trans-regional, están cambiando de forma acelerada la citada distribución clinal. Otras influencias humanas, como la introducción de otras subespecies, han tenido posiblemente poca influencia sobre las poblaciones ibéricas actuales (Cánovas y cols. 2010).

Uno de los marcadores moleculares más ampliamente usado en estudios sobre la biogeografía de las poblaciones y subespecies de *A. mellifera* es el cromosoma mitocondrial (ADNmt). Esta molécula tiene herencia materna y, en el caso de la abeja de la miel, todos los miembros de una colmena (obreras y zánganos) comparten el mismo ADNmt heredado de la reina, de forma que estudiando sólo un individuo se obtiene información al nivel de colmena. Además, su análisis proporciona información sobre eventos evolutivos del pasado. La molécula de ADNmt presenta cambios en su secuencia o mutaciones que, según el momento en el que se produjeron, determinan los linajes evolutivos (si son mutaciones antiguas dieron lugar a diferentes combinaciones de unas secuencias denominadas P₀, P y Q que se encuentran en una región intergénica situada entre los genes ARNt^{leu} y *cox2*) o los haplotipos (si son mutaciones más recientes que originaron cambios en las secuencias diana de las enzimas de restricción, entre ellas la denominada *DraI*) presentes en las colonias de abejas. Mediante el análisis de la variación de esta región, se ha visto que las abejas pertenecientes a los linajes A e Y poseen una secuencia de tipo P₀, las del linaje M del tipo P y las de los linajes C y O no incluyen ninguna secuencia de tipo P y tan solo una del tipo Q. La secuencia Q puede aparecer repetida hasta cuatro veces en los linajes A, M, Y y O (De la Rúa y cols. 2009).

Utilizando este marcador, Cánovas y cols. (2008) realizaron un análisis de la distribución de los haplotipos mitocondriales de *A. m. iberiensis* en la península Ibérica con respecto a una nueva división del linaje evolutivo africano en “sublinajes”, anteriormente desarrollada en trabajos realizados por Franck y cols. (2001). En dicho trabajo se establecieron tres sublinajes africanos según la distribución y frecuencia que presentan diferentes haplotipos distribuidos por los continentes africano y europeo. De esta forma el sublinaje denominado A_I se distribuye mayoritariamente en la península Ibérica y está caracterizado por la presencia con una alta frecuencia de los haplotipos A1 y A2, el sublinaje A_{II} presente en el Norte de África, principalmente en Marruecos, presenta una mayoría de haplotipos como A8, A9 y A10, mientras que el sublinaje A_{III} tiene distribución atlántica, comprendiendo la región macaronésica y la costa atlántica de la península Ibérica, y se caracteriza por la presencia de haplotipos como A11, A14, A15 y A16.

El extenso muestreo realizado en el trabajo de Cánovas y cols. (2008) permitió corroborar hipótesis previas acerca de la variación clinal de los linajes evolutivos africano (A) y europeo occidental (M). En las 1021 colonias muestreadas se observaron un total de 22 haplotipos (12 del linaje M y 10 del linaje A), cuya frecuencia demuestra que los haplotipos A disminuyen siguiendo una tendencia SO-NE mientras que los haplotipos M aumentan. Los resultados apoyan la hipótesis de un origen africano de *A. mellifera* y una colonización temprana de Europa occidental aprovechando los periodos interglaciares más cálidos del Pleistoceno. Posteriormente hubo una diferenciación regional, ocurrida posiblemente en refugios durante los periodos más fríos. La distribución de los haplotipos parece, por tanto, estar influida al nivel regional por la adaptación a condiciones climáticas locales y por prácticas apícolas, tal y como ya se ha mencionado. En el trabajo mencionado quedaron algunas provincias por incorporar muestras, entre ellas Albacete.

Los últimos datos obtenidos de la Subdirección General de Productos Ganaderos del Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino (<http://www.mapa.es/app/Miel/documentos/INDICADORES%20ECON%20C3%93MICOS%20SECTOR%20DE%20LA%20MIEL%202009.pdf>) indican que en la comunidad autónoma de Castilla-La Mancha, a la que pertenece la provincia de Albacete, se encuentran el 6,8% del total de explotaciones apícolas de España, de las cuales el 53% (1.647) son estantes, es decir, no mueven las colmenas durante el año para aprovechar otras floraciones, frente al 47% que sí que lo hacen. En cuanto a la producción, 1.569 explotaciones se dedican principalmente a la producción de productos apícolas, 8 a la polinización, 63 tienen una actividad mixta y 7 quedaron sin clasificar. Tanto el nº de explotaciones como el de colmenas se han mantenido estables en los últimos tres años.

En cuanto al nº de colmenas presente en Castilla-La Mancha con fecha de 01/07/10 había 168.319 (6,8% del total de colmenas españolas), las cuales producen unas 2.211 toneladas de miel y 124 de cera.

En Albacete según los datos aportados por la Asociación Provincial de Apicultores de Albacete (ASAPA), existen 28.572 colmenas en manos de unos 160 apicultores. Estos datos sitúan cerca del 17% de las colmenas de Castilla-La Mancha en la provincia albaceteña. La distribución del censo de apicultores y colmenas por comarcas es la siguiente:

CAMPO DE HELLIN: 12 apicultores (2.036 colmenas)

LA MANCHA DEL JUCAR-CENTRO: 37 apicultores (6.284 colmenas)

LA MANCHUELA: 17 apicultores (2.737 colmenas)

MONTE IBERICO-CORREDOR DE ALMANSA: 3 apicultores (1.210 colmenas)

SIERRA DE ALCARAZ Y CAMPO DE MONTIEL: 14 apicultores (4.253 colmenas)

SIERRA DEL SEGURA: 77 apicultores (12.085 colmenas)

La situación de la apicultura en Albacete, al igual que en el resto de España está influida por diferentes aspectos como son la presencia de enfermedades (varroosis, ascosferosis, etc.) y el llamado Síndrome del Colapso de las Colmenas (o *colony collapse disorder* CCD en inglés), que está provocando pérdidas de hasta el 100% de las colmenas en explotaciones pequeñas de unas 20-25 colmenas.

El objetivo general de este trabajo es estimar la biodiversidad de la población de abejas de la provincia de Albacete mediante el análisis de la distribución de los linajes evolutivos y de haplotipos. En concreto se pretende:

1. Determinar los linajes evolutivos a los que pertenecen las colmenas localizadas en las comarcas de la provincia de Albacete
2. Determinar el haplotipo mitocondrial presente en dichas colmenas
3. Completar el mapa peninsular de distribución de haplotipos

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. ÁREA DE ESTUDIO

Para realizar el muestreo se contó con la ayuda de Beatriz Ferrando García, veterinaria de la Asociación Provincial de Apicultores de Albacete (ASAPA), la cual confeccionó un listado de teléfonos de contacto de entre 3 y 6 apicultores por comarca, sumando un total de 32 apicultores.

Se realizó un patrón de recolección que siguió, dentro de lo posible, la distribución comarcal de la provincia de Albacete, habiéndose planificado la obtención de muestras de al menos un apicultor por comarca. Finalmente se concertaron citas con los apicultores de cada comarca dispuestos a participar en el proyecto. Se acudió con cada uno de ellos a visitar sus apiarios de los que se tomaron muestras.

La toma de muestras consistió en extraer un cuadro de cada colmena, de los que se capturaron de 15 a 35 abejas obreras en viales de 50 ml, muestreándose entre 5 y 12 colmenas por apiario. Las muestras fueron inmediatamente fijadas con etanol absoluto, y los tubos fueron debidamente identificados con etiquetas escritas a lápiz (Fig. 1).



Fig. 1.- Toma de muestras de abejas obreras de los panales de las colmenas. Los viales se desplazan de arriba hacia abajo del panal, procurando que no se encuentre la reina en dicho panal. (Fotografía: J.A. Acosta).

A cada apicultor se le preguntó por los datos específicos del apiario y de las colmenas, de las enfermedades observadas, así como características de producción, agresividad y enjambrazón.

1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN total se extrajo de una abeja por colmena usando el método de Chelex® (Walsh y cols. 1991). Para ello se seccionaron las tres patas del lado izquierdo de cada abeja obrera y se introdujeron en un pocillo de una placa que posteriormente se calentó a 37 °C durante 10 minutos para evaporar el etanol. Se añadieron 100 µl de Chelex® al 5 % y 5 µl de la enzima proteinasa

K (10 mg/ml) a cada pocillo de la placa. La placa sellada se introdujo en un termociclador con el siguiente programa de extracción:

- incubación de la placa durante 90 minutos a 55 °C;
- inactivación de la enzima proteinasa K durante 15 minutos a 99 °C,
- mantenimiento de la placa un minuto a 37 °C,
- desnaturalización durante 15 minutos a 99 °C
- pausa de 15 °C.

Tras la extracción, la placa se agitó utilizando un vórtex durante unos 10 segundos y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos manteniendo la temperatura a 20 °C. De esta disolución se tomaron 4 µl del sobrenadante para la reacción de amplificación por PCR.

1.3. ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL (ADN_{mt})

La amplificación y el análisis del ADN_{mt} se llevaron a cabo según el método descrito por Garnery y cols. (1993), el cual se basa en la amplificación de la región intergénica ARN^{t_{leu}}-cox2 mediante los cebadores E2 (5'-GGCAGAATAAGTGACATTG- 3') y H2 (5'- CAATATCATTGATGAACC -3') localizados en el ARN^{t_{leu}} y en la subunidad II de la citocromo oxidasa respectivamente. Dicha región está formada por secuencias de tamaño y composición conocidas. Se utilizaron PCR *beads* de GE Healthcare con un volumen final de 25 µl y una concentración 0,2 µM de cada cebador más 4 µl de ADN. Estos *beads* contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación por PCR excepto los cebadores y el ADN diana.

El programa de amplificación consistió en:

- desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos
- 36 ciclos de 45 segundos a 95 °C (desnaturalización), 1 minuto a 47 °C (anillado), 1 minuto y 30 segundos a 72 °C (extensión)
- extensión final durante 10 minutos a 72 °C

Los fragmentos amplificados se examinaron en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. Para ello se separaron alícuotas de 2,5 µl mediante electroforesis durante 30-45 minutos y se determinaron el tamaño y la composición de la región intergénica mediante comparación con estándares de tamaño conocido.

Posteriormente se realizó un test basado en la técnica de RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción), consistente en una restricción con una endonucleasa (*DraI*) del producto de PCR, la cual genera patrones de bandas identificables por sus diferencias de tamaño. Las digestiones se prepararon usando alícuotas de 20 µl de los fragmentos amplificados y 6 unidades de la enzima *DraI* para cada muestra. Estas digestiones se realiza-

ron en un termociclador a 37 °C durante 22 horas. Los fragmentos resultantes se visualizaron con luz ultravioleta en geles de agarosa Nusieve® al 4 % teñidos con bromuro de etidio.

La determinación del haplotipo presente en cada muestra se basa en la combinación de los dos tipos de secuencias presentes en la región intergénica (P o P_0 , diferente número de Q) y la posición variable de las secuencias dianas de la enzima *DraI*.

1.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Mediante el uso de hojas Excel® se han realizado estimaciones de las frecuencias de cada linaje evolutivo y de cada haplotipo por localidades de muestreo. Para obtener los valores de diversidad génica (heterocigosidad esperada) y de la varianza molecular se usó el programa GenAlex 6 (Peakall y Smouse 2006).

Los datos se han incorporado a los ya existentes para completar el mapa de distribución de linajes y haplotipos en las poblaciones de abejas de la península Ibérica.

2. RESULTADOS

Tras realizar los contactos con los apicultores se tomaron muestras de un total de nueve localidades distribuidas por toda la provincia, pero principalmente en el extremo sur, donde la concentración de colmenas es mayor según los datos aportados por la técnico de la Asociación de Apicultores. De Munera se tomaron muestras de dos apiarios distintos (Fig. 2).



Fig. 2.- Localización geográfica de los apiarios muestreados en la provincia de Albacete. Mapa obtenido de Google Earth®.

2.1. FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES Y SUBLINAJES EVOLUTIVOS

La amplificación de la región intergénica ARN^{t_{leu}}-cox2 ha permitido identificar fragmentos de ADNmt con cinco tamaños diferentes que se corresponden con diferentes combinaciones de las secuencias P₀, P y Q (Fig. 3 y Tabla 1). Según la composición de la región intergénica amplificada se identificaron tres linajes evolutivos en las abejas de Albacete: los europeos oriental C (con una sola secuencia Q) y occidental M (con una secuencia de tipo P) y el africano A (con una secuencia de tipo P₀), siendo este último el más frecuente (0,8) (Fig. 4). Tal y como se observa en la Figura 4, en todas las localidades muestreadas se encuentra presente el linaje A, siendo el único hallado en El Salobral, Hellín, Elche de la Sierra, Molinicos y Munera-2. Sin embargo tanto en Fuente Álamo como en Fuentealbilla el linaje M corresponde al 0,6 y al 0,5 de las colmenas muestreadas respectivamente. Este linaje también se ha observado en Ayna, Yeste y Munera-1 pero con una frecuencia menor (0,2 y 0,1). Tan solo en Fuente Álamo se han encontrado muestras pertenecientes a los tres linajes evolutivos, incluyendo una muestra perteneciente al linaje C.

A su vez el linaje africano se divide en tres sublinajes, de los cuales se han encontrado el sublinaje A_I (muestras que presentan los haplotipos A1, A2, A3 y A4, ver apartado siguiente y Tabla 1) en un 92,5% de las colmenas con origen africano y el A_{II} en el 7,5% (muestras con el haplotipo A8). El tercer linaje A_{III} con distribución atlántica no se ha encontrado. El sublinaje A_I se ha encontrado en todas las localidades muestreadas, sin embargo el A_{II} se ha encontrado en El Salobral (20%), Fuentealbilla (17%) y Munera-1 (11%) (Fig. 5).

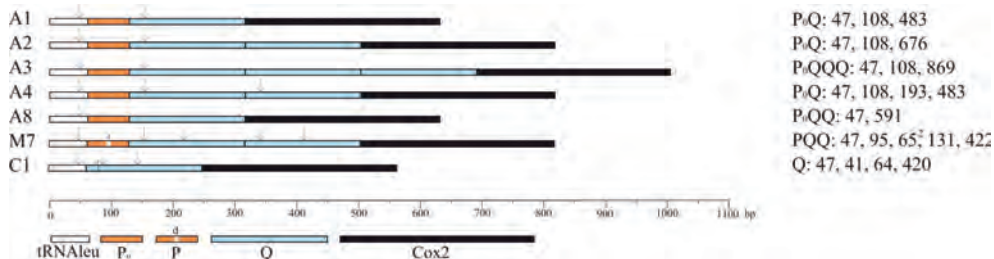


Fig. 3.- Esquema representativo de los haplotipos encontrados en las abejas de Albacete. La región intergénica ARN^{t_{leu}}-cox2 puede contener alguno de los dos tipos de secuencias P y P₀ o ninguno y un número variable de secuencias de tipo Q. Los puntos de restricción se han marcado con flechas.

Tabla 1. Distribución detallada de los linajes y sublinajes evolutivos y haplotipos encontrados en cada una de las muestras de abejas de Albacete analizadas.

Muestra	Asentamiento	Municipio	Linaje	Sublinaje	Haplotipo
CR-1	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _{II}	A8
CR-2	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-3	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-4	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-5	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-6	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-7	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-8	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-9	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-10	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
CR-11	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _{II}	A8
CR-12	El Cuarto Ramito	El Salobral	A	A _I	A2
MAJ-1	Los Majales	Fuentealbilla	M		M7
MAJ-2	Los Majales	Fuentealbilla	A	A _I	A2
MAJ-3	Los Majales	Fuentealbilla	M		M7
MAJ-4	Los Majales	Fuentealbilla	M		M7
MAJ-5	Los Majales	Fuentealbilla	A	A _I	A2
MAJ-6	Los Majales	Fuentealbilla	A	A _{II}	A8
MAJ-7	Los Majales	Fuentealbilla	M		M7
MAJ-8	Los Majales	Fuentealbilla	A	A _I	A2
MAJ-9	Los Majales	Fuentealbilla	M		M7
MAJ-10	Los Majales	Fuentealbilla	A	A _I	A2
MAJ-11	Los Majales	Fuentealbilla	A	A _{II}	A8
MAJ-12	Los Majales	Fuentealbilla	M		M7
M-85-1	Monte 87	Ayna	A	A _I	A2
M-85-2	Monte 87	Ayna	A	A _I	A2
M-85-3	Monte 87	Ayna	A	A _I	A2
M-85-4	Monte 87	Ayna	A	A _I	A3
M-85-5	Monte 87	Ayna	M		M7
M-85-6	Monte 87	Ayna	M		M7
M-85-7	Monte 87	Ayna	A	A _I	A2
M-85-8	Monte 87	Ayna	A	A _I	A2
M-85-9	Monte 87	Ayna	A	A _I	A2
M-85-10	Monte 87	Ayna	A	A _I	A3
MUN-1	Villa Manuela	Munera	A	A _I	A2
MUN-2	Villa Manuela	Munera	A	A _I	A2
MUN-3	Villa Manuela	Munera	A	A _{II}	A8
MUN-4	Villa Manuela	Munera	A	A _I	A2
MUN-5	Villa Manuela	Munera	A	A _I	A2
MUN-6	Villa Manuela	Munera	M		M7
MUN-7	Villa Manuela	Munera	A	A _I	A2
MUN-8	Villa Manuela	Munera	A	A _I	A2

MUN-9	Villa Manuela	Munera	A	A ₁	A2
HEL-1	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-2	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-3	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-4	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A4
HEL-5	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-6	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-7	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-8	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-9	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-10	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
HEL-11	Rincón del Moro	Hellín	A	A ₁	A2
FAL-1		Fuente Álamo	M		M7
FAL-2		Fuente Álamo	M		M7
FAL-3		Fuente Álamo	A	A ₁	A2
FAL-4		Fuente Álamo	A		M7
FAL-5		Fuente Álamo	A	A ₁	A2
FAL-6		Fuente Álamo	C		C1
FAL-7		Fuente Álamo	M		M7
FAL-8		Fuente Álamo	M		M7
FAL-9		Fuente Álamo	M		M7
FAL-10		Fuente Álamo	A	A ₁	A1
PA-10-767-1		Yeste	M		M7
PA-10-767-2		Yeste	A	A ₁	A2
PA-10-767-3		Yeste	A	A ₁	A2
PA-10-767-4		Yeste	A	A ₁	A2
PA-10-767-5		Yeste	A	A ₁	A2
PA-10-791-1		Elche de la Sierra	A	A ₁	A4
PA-10-791-2		Elche de la Sierra	A	A ₁	A4
PA-10-791-3		Elche de la Sierra	A	A ₁	A4
PA-10-791-4		Elche de la Sierra	A	A ₁	A4
PA-10-791-5		Elche de la Sierra	A	A ₁	A4
PA-10-794-1		Molinicos	A	A ₁	A2
PA-10-794-2		Molinicos	A	A ₁	A2
PA-10-794-3		Molinicos	A	A ₁	A2
PA-10-794-4		Molinicos	A	A ₁	A2
PA-10-794-5		Molinicos	A	A ₁	A2
PA-10-900-1		Munera	A	A ₁	A2
PA-10-900-2		Munera	A	A ₁	A2
PA-10-900-3		Munera	A	A ₁	A2
PA-10-900-4		Munera	A	A ₁	A2
PA-10-900-5		Munera	A	A ₁	A2

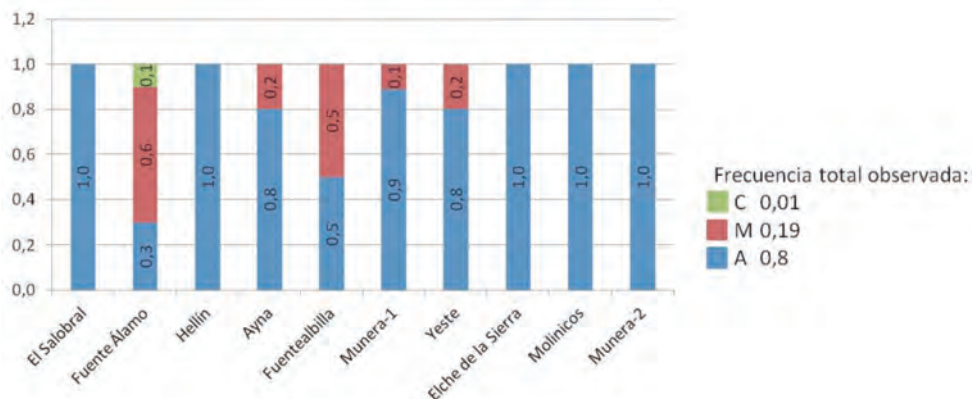


Fig. 4.- Histograma de frecuencias de los linajes evolutivos encontrados en las localidades muestreadas de Albacete. También se indica la frecuencia total observada.

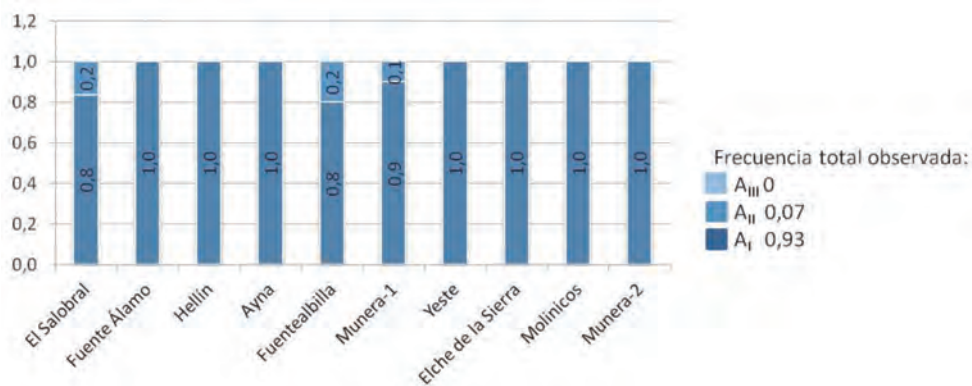


Fig. 5.- Histograma de frecuencias de los sublinajes evolutivos africanos encontrados en las localidades muestreadas de Albacete. También se indica la frecuencia total observada.

Estos datos obtenidos son similares a los observados en otras provincias limítrofes como Murcia y Alicante, en provincias andaluzas como Almería, Cádiz, Córdoba y Sevilla, pero también en provincias de la zona norte peninsular como Salamanca y Zamora (Cánovas y cols. 2008; De la Rúa y cols. 2009).

2.2. CARACTERIZACIÓN, FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES

Los resultados obtenidos se muestran de forma individualizada en la Tabla 1, en la cual se indica el haplotipo ARNt^{leu}-cox2 correspondiente. Tras la digestión con la enzima *Dra*I se determinaron siete haplotipos diferentes, cinco de ellos africanos: A1, A2, A3, A4 y A8, uno europeo occidental: M7 y por último otro del linaje europeo oriental: C1 (Fig. 6).

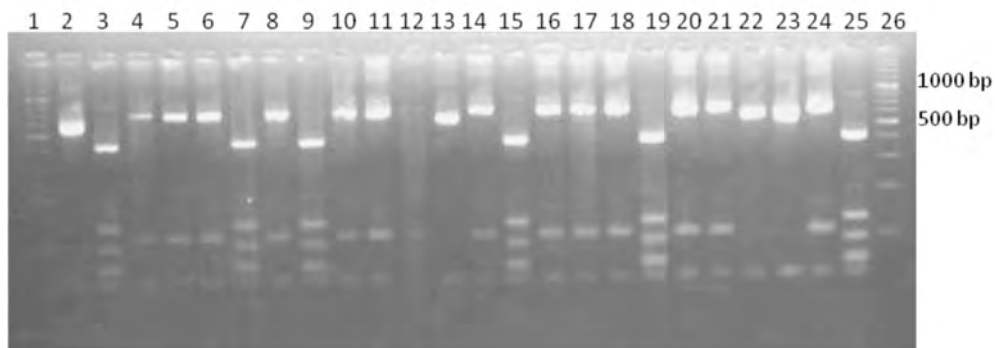


Fig. 6.- Fotografía de un gel de electroforesis en el que se observan los patrones de bandas tras la digestión de la región intergénica ARNt^{leu}-cox2 con la enzima *Dra*I. En las calles 1 y 26 se encuentra el marcador de tamaño de 100 pares de bases (las bandas de 500 y 1000 pb se ven más intensas). Las calles 2, 13, 22 y 23 muestran el patrón de bandas correspondiente al haplotipo A8, las calles 3, 7, 9, 15, 19, 25 al haplotipo M7 y las calles 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 20, 21 y 24 al hapotipo A2. En la calle 12 se observan fragmentos muy tenues que corresponden al patrón del haplotipo A2.

El haplotipo más frecuente fue el A2 (0,63), seguido del haplotipo M7 (0,19), el resto de los haplotipos presentó una frecuencia menor del 0,10, en concreto A4 apareció en el 0,07 de las colmenas, A8 en el 0,06 y A3 en el 0,03, mientras que los haplotipos A1 y C1 aparecieron ambos en el 0,01 de las colmenas (en una colmena en cada caso). El haplotipo C1 se incluye en el linaje C de Europa del este, lo cual indica un porcentaje de abejas con haplotipos foráneos muy reducido (Fig. 7). En esta Figura se puede observar la comparación de la frecuencia de haplotipos entre las localidades muestreadas en Albacete. Los resultados obtenidos en Yeste, Elche de la Sierra, Molinicos y Munera-2 son de cinco colmenas por apiario, por lo que los resultados obtenidos hay que examinarlos con cautela. Todas las localidades excepto Elche de la Sierra, presentaron el haplotipo característico de la abeja negra ibérica (A2), siendo el único presente en Molinicos y Munera-2. En El Salobral, Hellín, Munera-1 y Yeste este haplotipo se encuentra en más del 0,80

de las colmenas muestreadas. Sin embargo tanto en Fuentealbilla como en Fuente Álamo la frecuencia de este haplotipo es menor del 0,30. El siguiente haplotipo con mayor distribución es el M7, el cual se ha observado en Fuente Álamo y Fuentealbilla en más del 0,50 de las colmenas, en Yeste y Ayna en el 0,20 y en Munera-1 en el 0,10 de las colmenas muestreadas. El haplotipo A8 se ha encontrado en El Salobral y Fuentealbilla en el 0,20 de las colmenas y en el 0,10 de Munera-1. El haplotipo A4 ha sido exclusivamente encontrado en todas las muestras de Elche de la Sierra y en una colmena de Hellín; por último los haplotipos A1 y C1 se han encontrado en Fuente Álamo, y el A3 únicamente en Ayna.

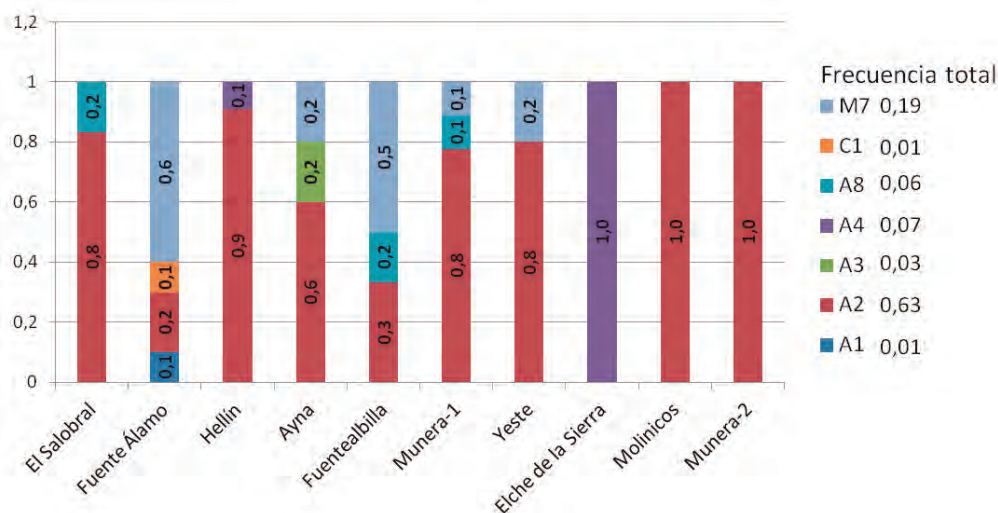


Fig. 7.- Histograma de frecuencias de los haplotipos encontrados en las localidades muestreadas de Albacete. También se indica la frecuencia total observada.

La diversidad haplotípica puede estimarse mediante la medida de la heterocigosidad esperada (H_e , Tabla 2). Se puede observar que existen valores mayores de 0,5 en las localidades de Fuente Álamo, Ayna y Fuentealbilla, mientras que en Yeste, El Salobral y Hellín los valores de diversidad varían entre 0,370 y 0,165. En las localidades de Elche de la Sierra, Molinicos y Munera-2 el valor es 0 debido a la presencia de un único haplotipo en todas las colmenas muestreadas en cada localidad. El valor de diversidad total encontrado en la provincia de Albacete ($0,288 \pm 0,077$) se encuentra al mismo nivel que el encontrado en las provincias de Cádiz ($0,286 \pm 0,069$) y Teruel ($0,273 \pm 0,083$) (Cánovas y cols. 2008), siendo de los más bajos que se han observado en la península.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) mide cómo está distribuida la diversidad génica a diferentes niveles, en este caso particular entre localidades de una provincia. El nivel jerárquico que se ha usado es entre localidades y dentro de ellas. Se ha hallado un porcentaje significativamente mayor de diversidad genética dentro (67 %) de las localidades que entre ellas (33 %).

Tabla 2. Diversidad haplotípica y desviación estándar (d. e.) en las localidades muestreadas en Albacete.

Localidad	He	d. e.
El Salobral	0,278	0,303
Fuente Álamo	0,580	0,644
Hellín	0,165	0,182
Ayna	0,560	0,622
Fuentealbilla	0,611	0,667
Munera-1	0,370	0,417
Yeste	0,320	0,400
Elche de la Sierra	0,000	0,000
Molinicos	0,000	0,000
Munera-2	0,000	0,000
Total	0,288	0,077

2.3. MAPA PENINSULAR DE DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES

Los datos obtenidos en este estudio se han incluido en el mapa de distribución de linajes y sublinajes publicado por De la Rúa y cols. (2009) que incluye también los datos publicados por Cánovas y cols. (2008) y Miguel y cols. (2007) (Fig. 8). Se observa que la distribución de los linajes evolutivos en las muestras de Albacete es muy similar a la de otras provincias del sur peninsular coincidiendo con la cline con dirección NO-SE descrita. Dicha cline aparece como resultado del reemplazamiento del linaje europeo occidental por el africano, de forma gradual en la costa mediterránea y más abrupta en el noroeste. Igualmente se observa que el sublinaje A_I es el más abundante, seguido del A_{II} y estando el A_{III} ausente.



Fig 8.- Distribución de los linajes evolutivos A, M y C y de los sublinajes africanos en la península Ibérica. Los datos de Albacete se han incorporado remarcándose su diagrama correspondiente.

3. DISCUSIÓN

Desde los primeros estudios realizados en abejas de las Islas Canarias (De la Rúa y cols. 1998) se ha ido completando el mapa de distribución de los linajes evolutivos de la abeja ibérica. Sin embargo, se carecía de muestras de Albacete a pesar de la cercanía geográfica con Murcia donde se encuentra el grupo de investigación que ha desarrollado este trabajo.

Los datos obtenidos en este trabajo confirman el gradiente de distribución de haplotipos con dirección SO-NE que se tenía a escala peninsular. Según éste, en la provincia de Albacete se debería observar una mayoría de haplotipos pertenecientes al linaje africano, y así ha sido observado. Es más, el sublinaje más frecuente observado ha sido el A_p , lo cual es coincidente con los datos de las provincias próximas de Alicante, Murcia y Almería. Según nuestra hipótesis, la colonización de la península por parte de abejas provenientes del norte del continente africano, se produjo en diferentes oleadas, siendo las primeras en llegar las del sublinaje A_p . Este sublinaje está caracterizado por la presencia de haplotipos como el A1, A2, A3 y A4. En concreto, el haplotipo A2 es característico de las abejas ibéricas ya que se ha encontrado casi exclusivamente en dichas poblaciones y en casos muy raros en poblaciones de algunas islas mediterráneas y de la costa mediterránea del norte de África (Chabar y cols. remitido).

Se ha encontrado mayor número de haplotipos en las comarcas en donde la actividad apícola es más intensa, sobretodo en la comarca de las Sierras

de Alcaraz y Segura. Esto puede deberse al manejo de los apicultores ya que puede que realicen actividades de compra o de caza de enjambres que pueden tener orígenes diversos. Para este estudio se tomaron muestras de apicultores que realizan pocos movimientos de trashumancia, es decir, desplazan nada o muy poco sus colmenas, si acaso dentro de la provincia. La práctica de la trashumancia es uno de los factores que más está influyendo en la distribución de los linajes evolutivos. Esta práctica la realiza actualmente cerca del 80% de las colmenas censadas en España (alrededor de dos millones y medio de colmenas) y puede dar lugar a la pérdida de reinas debido al intenso manejo al que son sometidas. Los apicultores trashumantes recuperan su ganado comprando reinas de las zonas donde trashuman o cazando enjambres en las zonas donde realizan la trashumancia. Sin embargo, aquellos apicultores que aunque no realizan trashumancia, tengan colmenas trashumantes cerca de sus asentamientos, podrían incorporar enjambres procedentes de dichas colmenas con diversos orígenes.

Se ha detectado una colmena con haplotipo C1 perteneciente al linaje evolutivo europeo oriental al que pertenecen subespecies como la abeja italiana (*A. m. ligustica*) o la abeja carniola (*A. m. carnica*). Los apicultores consideran estas subespecies más productivas y mansas por lo que las compran con el fin de mejorar la producción. Sin embargo, según sus propias observaciones son difíciles de adaptar a las condiciones climatológicas de la península Ibérica, aunque hibridan con las poblaciones locales dejando su impronta en marcadores como el que aquí se ha usado (ADN mitocondrial heredado de la reina).

Enfermedades como la varroosis y otras virosis pueden estar relacionadas con el síndrome de colapso de las colmenas, que está originando un descenso del número de colmenas, aunque más acusado en otras provincias que en Albacete. La presencia de estas enfermedades también podría tener un efecto negativo en la diversidad genética que se vería reducida, tal y como se ha visto en otros himenópteros como los abejorros (Whitehorn y cols. 2010), pero esta hipótesis ha de ser estudiada adecuadamente. Estudios recientes han demostrado que organismos patógenos como *Nosema ceranae* y parásitos como *Varroa destructor* infectan por igual a abejas de los dos linajes evolutivos presentes en la península Ibérica (Jara y cols. 2012).

Como conclusión final se puede decir que las muestras de Albacete presentan una composición genética, en cuanto a la molécula del ADN mitocondrial se refiere, coincidente con el gradiente de distribución observado en el resto de la península Ibérica y, por tanto, parece estar poco alterada por factores exógenos como la trashumancia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer al Instituto de Estudios Albacences Infante D. Juan Manuel la financiación aportada para la realización de este estudio. También queremos agradecer a Beatriz Ferrando García, veterinaria de la Asociación Provincial de Apicultores de Albacete (ASAPA) su colaboración e interés, y a los apicultores Juan Miguel Martínez Martínez, Manuel Castillo Sánchez, Manuel Atencia Arena, José Manuel Ródenas y Vicente Córcoles Raolid que amablemente nos permitieron tomar muestras de sus colmenas.

BIBLIOGRAFÍA

- Cánovas, F., De la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (2008). Geographic patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46:24-30.
- Cánovas, F., De la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (2011). Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie*, 42:235-251
- De la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (1998). Mitochondrial DNA variability in the Canary Island honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology*, 7:1543-1548.
- De la Rúa, P., Muñoz, I., Piñero, A., Hernández-García, R., Cánovas, F., Galián, J., Serrano, J. (2009). Historia evolutiva de la abeja ibérica. En H. Dopazo y A. Navarro (ed.): *Evolución y Adaptación. 150 años después del Origen de las Especies*, pp. 162-169. Obrapropia, Valencia. 507pp.
- Engel, M.S. (1999). The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *Journal of Hymenoptera Research*, 8:165-196.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (1998). The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52: 1119-1134.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Hepburn, H.R., Solignac, M., Cornuet J.M. (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86:420-430.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economy*, 68: 810–821.

- Garnery, L., Cornuet, J.-M., Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 1:145-154.
- Garnery, 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.
- Hepburn, H.R., Radloff, S.E. (1996). Morphometric and pheromonal analyses of *Apis mellifera* L. along a transect from the Sahara to the Pyrenees. *Apidologie* 28:243–258.
- Jara, L., Cepero, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Higes, M., De la Rúa, P. (2012). Linking evolutionary lineage with the parasite prevalence in the Iberian honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 110:8–13
- 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.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- Ruttner, F. (1988). *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin. 284pp.
- Smith, D.R., Palopoli, M.F., Taylor, B.R., Garnery, L., Cornuet, J.-M., Solignac, M., Brown, W.M. (1991). Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity* 82, 96–100.
- Smith, D.R., Glenn, T.C. (1995). Allozyme polymorphism in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity* 82:96–100.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). ChelexR 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10:506-513.
- Whitehorn, P.R., Tinsley M.C., Brown M.J.F., Darvill B., Goulson, D. (2010) Genetic diversity, parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B*278:1195-1202.
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A.V., Weaver, D., Tsutsui, N.D. (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee *Apis mellifera*. *Science*, 314:642-645.