

Análisis de la introgresión en *Apis mellifera iberiensis* y *Apis mellifera mellifera* usando polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs)

Julio Chávez-Galarza^{1,2}, Dora Henriques^{1,2}, J. Spencer Johnston³, José Rufino¹, M. Alice Pinto¹

¹ Centro de Investigación de Montaña, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal (jchavez@ipb.pt)
² CBMA, Centro de Biología Molecular y Ambiental, Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal
³ Department of Entomology, Texas A&M University, College Station, Texas 77843-2475, USA



Introducción

Apis mellifera L. es una especie que ocurre en África, Europa y Medio Oriente. En este amplio rango de clima y hábitats, esta especie ha evolucionado en 4 linajes evolutivos (Ruttner 1988), cuyas designaciones coinciden con su rango de distribución geográfica: A – Africano, O – Medio Oriente, C – Europa Oriental, y M – Europa Occidental. Una gran parte de la diversidad de *A. mellifera* está presente en las subespecies de dos linajes evolucionarios M y C que corresponde a Europa. Mientras muchas subespecies aparecen en Europa Central y Oriental, el amplio territorio de Europa Occidental es ocupado por dos subespecies: *A. m. iberiensis* y *A. m. mellifera*. El área natural de las subespecies europeas ha cambiado dramáticamente en los últimos años debido a efectos del clima, especies exóticas, patógenos y acción del hombre. Los apicultores han introducido a las subespecies *A. m. ligustica* y *A. m. carnica*, pertenecientes al linaje C, en el área de distribución natural del linaje M, lo cual ha conducido a la sustitución de poblaciones locales en muchas partes de Europa (Jensen *et al.* 2005). De ahí, el objetivo de este trabajo es determinar los niveles de introgresión de "abeja de la miel" del linaje C en las subespecies pertenecientes al linaje M: *A. m. iberiensis* y *A. m. mellifera*.

Muestreo

Un total de 824 zánganos (cada uno representando una simple colonia) fue colectado como sigue: 711 *A. m. iberiensis*, 77 *A. m. mellifera* (Francia, Holanda, Suiza, Inglaterra, Escocia, Dinamarca, Noruega), 17 *A. m. ligustica* (Italia) y 19 *A. m. carnica* (Serbia, Croacia) (Fig. 1).

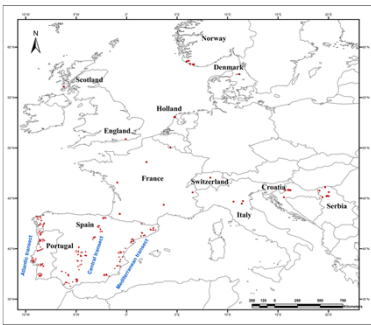


Fig. 1 – Localización de individuos muestreados

Genotipaje

Un panel de 1536 SNPs fueron genotipados usando *Illumina BeadStation 500G* y un *custom Oligo Pool Assay* (Fig. 2). Individuos fueron anotados usando el *software Illumina Genome Studio*.

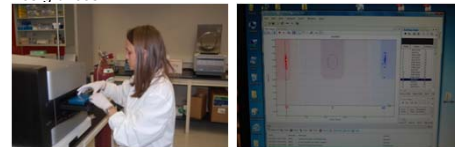
Dos *datasets* fueron considerados para analizar: (1) *A. m. iberiensis*, *A. m. ligustica* y *A. m. carnica*; (2) *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* y *A. m. carnica*. Estos *datasets* presentaron 1051 y 1183 SNP, respectivamente; luego de excluir los SNP monomórficos (2% *cut-off*) y *non-calls*.



Fig. 2 – Genotipaje

Análisis

La estructura poblacional y niveles de introgresión fueron inferidos usando el *software STRUCTURE* (Pritchard *et al.* 2000). *STRUCTURE* fue corrido usando los siguientes parámetros: modelo *admixture*, frecuencia de alelos correlacionados, 250000 *burnin*, 750000 MCMC iteraciones, número de grupos $K=2$ a 5, y 20 repeticiones por K . Estos resultados fueron exportados hacia el *software CLUMPP* 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) para obtener la media de los resultados permutados para cada K . *DISTRUCT* 1.1 (Rosenberg 2004) fue usado para construir los gráficos.



Resultados y Discusión

• *STRUCTURE* mostró que niveles de introgresión de la carga genética de subespecies del linaje C (*A. m. ligustica* y *A. m. carnica*) en *A. m. iberiensis* es muy reducida, representando < 5% en tres individuos (Fig. 3a). Este resultado es concordante con estudios usando DNA mitocondrial para España y Portugal, donde la frecuencia de haplotipos del linaje C es menos de 1% (Cánovas *et al.* 2009, Pinto *et al.* 2013).

• Por otro lado, *A. m. mellifera* presentó elevados niveles de introgresión tanto en individuos de poblaciones protegidas por programas de conservación como de no protegidas (Fig. 3b). Niveles de introgresión fluctuaron de 8 a 30%. Las poblaciones protegidas de Noruega, Escocia y Holanda presentaron los más bajos niveles de introgresión (<5%) mientras los más elevados valores fueron encontrados en poblaciones no protegidas de Inglaterra y Francia. Estudios previos obtuvieron resultados similares usando otros marcadores moleculares para varios países europeos entre ellos los que fueron representados en este trabajo (Jensen *et al.* 2005, Rortais *et al.* 2010, Soland-Reckeweg *et al.* 2009).

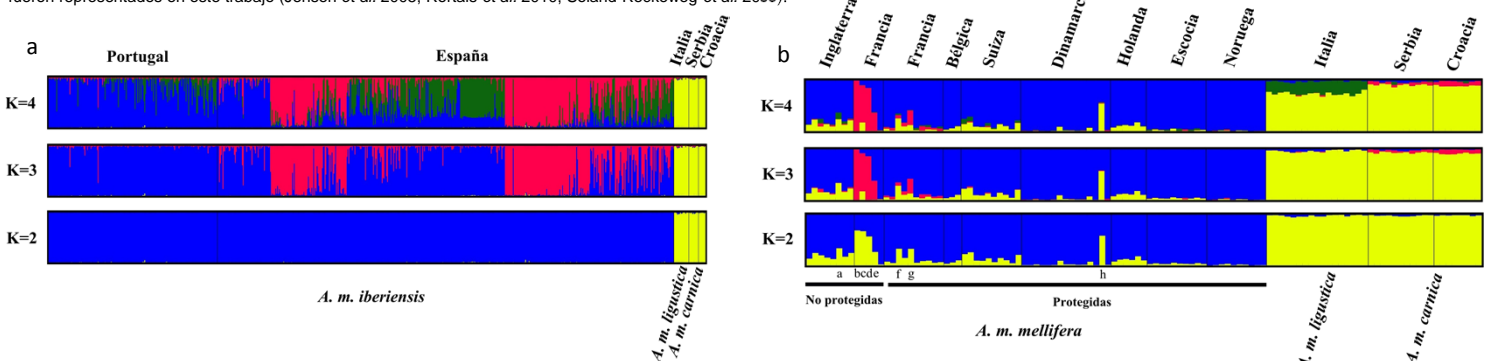


Fig. 3 – Resultados de *STRUCTURE* presentando niveles de introgresión. (a) *A. m. iberiensis*, (b) *A. m. mellifera*, letras de a-h indican individuos con >5% de introgresión del linaje C

• Estos resultados sugieren que a pesar de la crianza controlada para el caso de *A. m. mellifera*, algunas poblaciones que hacen parte de programas de conservación necesitan reajustes en la estrategia de gestión para evitar la presencia en *A. m. mellifera* de alelos pertenecientes a otros linajes.

• En el caso de *A. m. iberiensis* es importante evitar la introducción de abejas de los otros linajes de manera a mantener su integridad genética.

Referencias

Cánovas, F., P. De la Rúa, J. Serrano, and J. Galán. 2008. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46:24-30.
 Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.
 Jensen, A.B., K.A. Palmer, J.J. Boomsma, and B.V. Pedersen. 2005. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* 14:93-106.
 Pritchard, J.K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
 Rosenberg NA. 2004. *DISTRUCT*: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138.
 Rortais, A., G. Arnold, M. Alburaki, H. Legout, and L. Garnery. 2011. Review of the *Dral* COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genetics Resources* 3:383-391.
 Ruttner, F. 1988. *Biogeography and taxonomy of honey bees* Springer, Berlin.
 Soland-Reckeweg, G., G. Heckel, P. Neumann, P. Fluri, and L. Excoffier. 2009. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation* 13:317-328.

Agradecimientos

Un muy especial agradecimiento a Andrew Abrahams, Bjørn Dahle, Gabriele Soland, Gilles Fert, Lionel Garnery, Raffaele Dall'olio, Romee Van der Zee, Said Abdoullaraj, Santiago Saenz, Wahida Loucif, Pilar de la Rúa y Per Kryger que proveyeron las poblaciones de referencias. A Antonio Pajuelo por su invaluable colaboración en facilitar los contactos de apicultores de España. A Andreia Brandão, Inês Moura y Irene Muñoz apoyaron en el proceso de muestreo. Al apoyo fundamental de Marganda Neto por su preciosa ayuda en el muestreo del transecto Atlántico. A todos los apicultores de España y Portugal por su valiosísima colaboración durante el proceso de colecta. Extracción de DNA y genotipaje de SNPs fue llevado a cabo por Colette Abbey quien estuvo profundamente comprometida con este proyecto. Especial agradecimiento para el Dr. Clare Gill por proveer las facilidades para el genotipaje de SNPs y asistencia con los análisis. Julio Chávez-Galarza y Dora Henriques son financiados por la Fundação para a Ciência e Tecnologia a través de las becas doctorales SFRH/BD/68682/2010 y SFRH/BD/84195/2012, respectivamente. Esta investigación fue financiada por la Fundação para a Ciência e Tecnologia y COMPETE/OREN/EU a través del proyecto PTDC/BIA-BEC/099640/2008.

