

**PUESTA EN MARCHA DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN  
GENÉTICA DE *Apis mellifera* EN CUBA**

**SETTING OFF THE MOLECULAR TECHNIQUES FOR THE GENETICS CHARACTERIZATION OF  
*Apis mellifera* IN CUBA**

**Autor(es):** Lic. Lisandra Benítez Álvarez<sup>1</sup>, Lic. Adriana Artiles Valor<sup>2</sup>, Lic. Aniley FernándezValle<sup>2</sup>, Lic. Yoelsis García Mayea<sup>1</sup> y Lic. Georgina Espinosa López<sup>3</sup>

1. Centro de Investigaciones Apícolas. El Cano a El Chico, km 0 La Lisa, La Habana. C.P. 19190. CUBA. Teléfono: (537) 202-0890
2. Centro de Investigaciones Pesqueras. Calle 246 No. 503 e/ 5ta Ave 3nida y Mar, Reparto Barlovento, Playa, La Habana, C.P 19100. CUBA. Teléfono (537) 209-7081
3. Facultad de Biología Universidad de La Habana. Calle 24 e/J e I. Plaza de la Revolución, La Habana. C.P. 10400. CUBA. Teléfono (537) 830-9821

[genetica@ciapi.minag.cu](mailto:genetica@ciapi.minag.cu)

**Recibido:** 22-4-2014

**Aprobado:** 3-5-2014

## RESUMEN

Por su importancia en la producción de alimentos, la abeja de la miel (*Apis mellifera*) está sometida a programas de crianza y manejo. Para esto debe tenerse en cuenta su potencial genético; relacionado con su capacidad para crecer, desarrollarse, reproducirse y resistir enfermedades. Este está determinado por factores genéticos, propios de cada individuo y heredados de sus progenitores, que no son controlables y que se expresan en dependencia de las condiciones ambientales. El escenario se hace más complejo cuando las descendencias son tan grandes. Es necesario entonces, un manejo genético para lograr un mejor desempeño productivo de estas poblaciones. En Cuba, esta especie está sometida a un programa de selección masar de progenitores guiados por la caracterización genética mediante marcadores moleculares. Dado esto, el presente trabajo tiene como objetivo la puesta en marcha de las técnicas moleculares utilizadas para la caracterización genética de *A. mellifera* en Cuba. Así, fue posible la puesta a punto de las técnicas para la detección de *loci* microsatélites de manera más eficaz utilizando ADN extraído mediante el método del Chelex a partir de músculo de tórax de la abeja, amplificación de secuencias mediante PCR con mezcla comercial TaqReadytoGo y electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida convencional sin modificaciones importantes.

**Palabras claves:** *Apis mellifera*, métodos moleculares, Cuba

## ABSTRACT

Due to its importance in food production, the honey bee (*Apis mellifera*) is subjected to breeding programs and management. To this must be taken into account their genetic potential; related to its ability to grow, develop, reproduce and disease resistance. This is determined by genetic, specific to each individual and their parents inherited factors that are not manageable and are expressed depending on environmental conditions. The scenario becomes more complex when the progeny are so great. Then, it is necessary a genetic management for better production performance of these stocks. In Cuba, this species is handled in a mass selection program of progenitors. This program is guided for the genetic characterization using molecular markers. Given this, the present work aims the implementation of molecular techniques for the genetic characterization of *A. mellifera* in Cuba. The

detection of microsatellite *loci* was efficiently achieved using DNA extracted by Chelex's method using the thorax muscle of the bee, subsequent sequence amplification by PCR with Ready to Go Taq commercial mixture and finally, conventional polyacrylamide gel electrophoresis without major modifications.

**Key words:** *Apis mellifera*, molecular methods, Cuba

## INTRODUCCIÓN

La abeja de la miel, *Apis mellifera*, fue introducida en Cuba en 1774. Primeramente se introdujo la subespecie *A. m. mellifera* (Pérez-Piñeiro, 2007), la de mayor distribución natural (Carreck, 2008). Posteriormente, en las décadas de 1940-1950 se introdujo la subespecie *A. m. ligústica* (Pérez-Piñeiro, 2007), correspondiente a un linaje diferente y proveniente de Italia. También se han reportado pequeñas introducciones de *A. m. cárnica* y *A. m. caucásica* (Genaro, 2008). Actualmente existen en Cuba poblaciones de la especie involucradas en la cadena productiva apícola. Estas muestran alta productividad, resistencia a enfermedades y adaptación local al clima de las diferentes zonas del territorio (Díaz y Domínguez, 1985). Por su importancia en la producción de alimentos esta especie está sometida a programas de crianza y manejo. Para esto debe tenerse en cuenta su potencial genético; relacionado con su capacidad para crecer, desarrollarse, reproducirse y resistir enfermedades. Este está determinado por factores genéticos, propios de cada individuo y heredados de sus progenitores, que no son controlables y que se expresan en dependencia de las condiciones ambientales. El escenario se hace más complejo cuando las descendencias son tan grandes. Es necesario entonces, un manejo genético para lograr un mejor desempeño productivo de estas poblaciones. Es por ello que se trabaja en un programa de selección masar de progenitores, guiados por la caracterización genética mediante marcadores moleculares, debido a que la selección de caracteres a gran escala y la propagación extendida de lotes seleccionados puede llevar a la disminución de la variabilidad genética de las poblaciones, haciéndolas más susceptibles a los efectos negativos de la consanguinidad (De-la-Rúa *et al.*, 2009). Dado esta problemática se hace inminente el estudio de la variabilidad genética de las poblaciones de la abeja melífera, tanto involucradas en la producción como en la vida silvestre, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo la puesta a punto de las técnicas moleculares utilizadas para la caracterización genética de *A. mellifera* en Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se optimizaron tres técnicas clásicas del trabajo con ácidos nucleicos; extracción de ADN, amplificación de secuencias y electroforesis, dado que estas serán las utilizadas para la caracterización genética (Fig. 1).

La muestra de partida fue tejido muscular de abejas obreras y se puso en marcha la extracción de ADN mediante dos métodos; el de solventes orgánicos y el del Chelex 100. La comprobación de ADN extraído se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa en el caso de la extracción con solventes orgánicos. La amplificación de secuencias de *loci* microsatélites se hizo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta amplificación fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa. Para la separación de los diferentes alelos y el genotipaje de los individuos se utilizó electroforesis desnaturalizante en gel de Poliacrilamida.

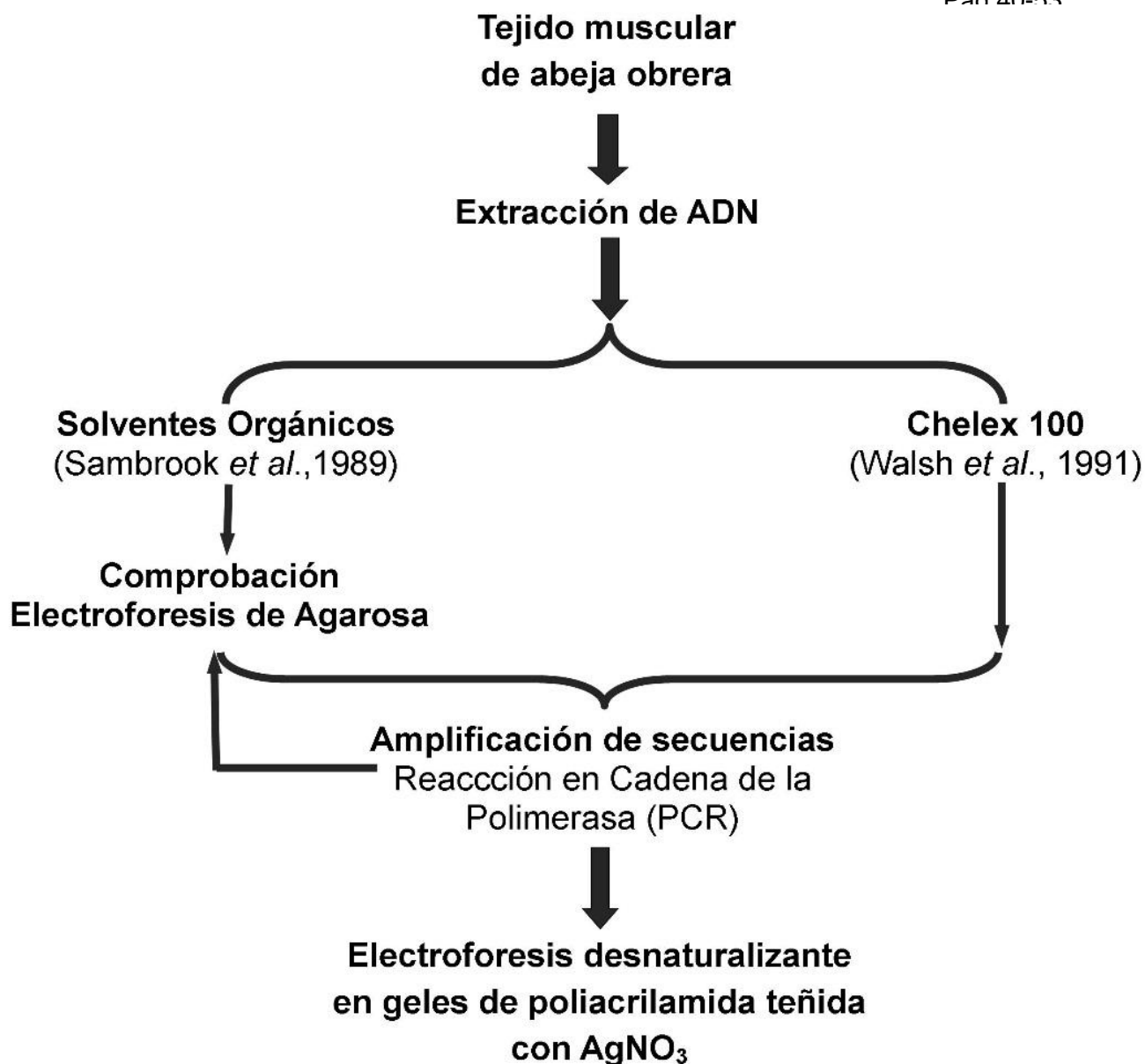


Figura 1. Diagrama de técnicas moleculares utilizadas para la caracterización genética de *Apis mellifera* en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Pesqueras y el Centro de Investigaciones Apícolas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a la introducción de los métodos moleculares los estudios genéticos se confinaban a un pequeño grupo de especies que podían ser cruzadas y mantenidas en el laboratorio. Sin embargo, los ensayos moleculares proveen evidencia física directa de secuencias de ADN o proteínas. Estos

pueden ser empleados en cualquier ser vivo, ampliando más el conocimiento sobre la gran diversidad genética existente y por consiguiente la biodiversidad (Awise, 2004).

A mediados de los años 60 ocurrió la primera explosión del interés en las técnicas moleculares con la introducción de la electroforesis de proteínas para estudios de evolución y genética de las poblaciones. A finales de la década del 70 se desarrollaron los métodos para el análisis del ADN. En los años 80 la introducción del PCR (del inglés PolimeraseChainReaction) revolucionó el campo de la biología molecular, desarrollándose un grupo de marcadores basados en esta técnica, tales como los *loci* microsatélites (Awise, 2004); siendo actualmente los más utilizados en estudios de variabilidad genética (Selkoe y Toonen, 2006). Para la realización de estos estudios es necesario utilizar una serie de métodos moleculares que permiten la detección y genotipaje de los marcadores microsatélites. Así, fueron puestas en marcha, bajo las condiciones de los laboratorios de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Pesqueras y el Centro de Investigaciones Apícolas, las siguientes técnicas:

## **1. Extracción de ADN**

### **1.1. Método con solventes orgánicos**

El método de extracción de ADN con solventes orgánicos se basa en la lisis celular que se realiza con detergentes como el SDS y enzimas, como la Proteinasa K. Posteriormente se hace una extracción con solventes orgánicos y el ADN, de naturaleza polar, pasa a la fase acuosa. Finalmente, se utiliza etanol absoluto y sales para precipitar el ADN. Esta precipitación en la fase acuosa se produce porque las sales disminuyen la constante dieléctrica del agua y las moléculas que solvatan el ADN, pasan a solvatar sales y al Etanol, que son compuestos hidrosolubles de menor tamaño.

Este método se probó con diferentes variantes de algunos de los pasos a seguir (Tabla I) hasta conformar el mejor protocolo en las condiciones experimentales existentes.

Tabla 1: Variantes utilizadas en la puesta en marcha de la extracción con solventes orgánicos (Sambrook *et al.*, 1989). En rojo aparecen las que rindieron mejores resultados cualitativos.

Tejido de partida	Buffer de Lavado	Mezcla de solventes orgánicos	Precipitación del ADN	Tiempo de precipitación
Músculo del tórax	TE (Tris:EDTA)	Fenol:Cloroformo	NaAc 3M	Hasta que se observe "medusa"
Músculo de la pata	TES (Tris:EDTA:NaCl)	Fenol:Alcoholisoamílico	NaCl 4M	Toda la noche

### 1.2. Método con Chelex (Walsh *et al.*, 1991)

Este procedimiento fue desarrollado para la extracción de ADN a partir de muestras forenses, por lo que rinde ADN a partir de pequeñas cantidades de tejido, sangre, saliva, semen, etc. Es simple, rápido, no requiere múltiples tubos de transferencia para la mayoría de los tipos de muestras y no involucra solventes orgánicos, sino una resina quelante, el Chelex 100. Es un método rápido y eficaz para la obtención de ADN nuclear de simple cadena, utilizado como molde para la amplificación de *loci* microsatélites (Walsh *et al.*, 1991). Este método fue muy efectivo para la extracción de ADN a partir de tejido muscular del tórax de la abeja.

Además de la simplicidad y rapidez que proporciona este método, las bandas obtenidas luego de la amplificación a partir de las muestras de ADN molde purificadas con resina Chelex fueron más nítidas y sin inespecificidades. Por esta razón, se escoge como método de elección para la extracción de ADN y la posterior amplificación de secuencias blanco como los microsatélites.

## 2. Amplificación de secuencias de ADN

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica para amplificar copias de un fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando miles de millones de copias de una secuencia particular de ADN. Esta se ha convertido rápidamente en una de las técnicas más utilizadas en Biología Molecular por ser un método rápido, barato y sencillo (Joshi y Deshpande, 2010).

Quedaron a punto las condiciones de amplificación de los *loci* A7, A24 y A113; los más polimórficos según lo reportado por la literatura (Estoup *et al.*, 1995, De-la-Rúa *et al.*, 2001, De-la-Rúa *et al.*, 2003). Se probaron condiciones diferentes para cada uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la técnica (Tabla II).

Se hizo especial énfasis en la enzima polimerasa utilizada y la concentración de Mg, su cofactor, puntos críticos en la PCR. Además se trabajó con diferentes soluciones tampones para la enzima, siendo el más óptimo el buffer total que refina la técnica reduciendo el pipeteo de otros elementos al incluirlos directamente en su composición.

Tabla 2: Variantes utilizadas en la estandarización de la amplificación de *loci* microsatélites mediante PCR. En rojo aparecen las variantes que rindieron mejores resultados.

Volumen final de reacción	Buffer de Reacción	Polimerasa	[Mg]	Volumen DNA
10 uL	Buffer total de Taq Ready to Go	TaqReadytoGo	1,0 mM	1 uL
20 uL	Buffer de Taq (CIGB)	Taq Pol (CIGB)	1,5 mM	2 uL
25 uL	Buffer de Taq con colorantes	Taq Pol (Promega)	2,0 mM	

### 3. Electroforesis

La electroforesis es una técnica analítica y preparativa empleada en el estudio de las proteínas y ácidos nucleicos. Es robusta y su resolución es muy alta en una dimensión y extremadamente alta en dos dimensiones. Su principio se basa en la migración de las moléculas bajo la acción de un campo eléctrico en un reticulado molecular que actúa como soporte. Este es un entramado tridimensional que impide o reduce la difusión y la convección y ha de ser compatible con los tampones habitualmente empleados, permitiendo la entrada del agua en sus poros. El tamaño de éstos debe permitir el paso de moléculas voluminosas como los ácidos nucleicos y las proteínas. Además, el soporte no debe tener cargas que interfieran con la migración de las moléculas de la muestra. El entramado retrasa las moléculas grandes respecto a las pequeñas por lo que la separación ocurre en función de la carga, la masa, la forma o por la combinación de estas propiedades en las moléculas. Con un apropiado método de tinción las fracciones pueden ser cuantificadas y caracterizadas por análisis de aminoácidos, secuenciación o espectrometría de masas (García-Segura *et al.*, s/a).

### 3.1. Electroforesis en geles de Agarosa

El agar es el ejemplo más representativo de soporte no restrictivo, es decir; su tamaño de poro no opone impedimento al paso de las moléculas. Se trata de un soporte que hay que preparar, algo común a la mayoría de los soportes electroforéticos. El tamaño del poro del reticulado es el aspecto más crítico en esta técnica puesto que depende del tamaño de las moléculas a separar. Depende de la concentración empleada, que nunca se conoce con exactitud, pues durante la preparación del gel hay pérdidas de agua. El agar en polvo se añade sobre el tampón de la electroforesis a 1000C para que se disuelva. La disolución caliente se deposita en un molde donde gelifica al enfriarse y luego se retira (García-Segura *et al.*, s/a).

La electroforesis en geles de Agarosa es una técnica muy sencilla y es utilizada, en este caso, para dos fines: a) la comprobación de ADN extraído y b) la comprobación de existencia de producto amplificado (Fig. 1), puesto que su aplicación está mayormente en la separación de moléculas grandes, permitiendo la verificación de presencia de ADN o producto amplificado en la muestra mediante tinción con Bromuro de Etidio y exposición a luz ultravioleta.



Figura 2. Comprobación de amplificación del locus A7 de *A. mellifera* en electroforesis de agarosa. Las bandas muestran la amplificación en todas las muestras excepto la cinco y el control negativo (C-), donde no se observan bandas y el patrón de peso molecular (PPM).

### 3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE del inglés PolyAcrylamide Gel Electroforesis) se utiliza para la separación de proteínas y ácidos nucleicos debido a su gran poder de separación (García-Segura *et al.*, s/a).

Los geles se confeccionan por la polimerización de la acrilamida en el tampón escogido en forma de lámina rectangular delgada y de forma tal que produzcan un efecto de tamizado molecular, participando así directamente en el proceso de separación (García-Segura *et al.*, s/a). De esta manera pueden analizarse varias muestras simultáneamente aplicándolas en paralelo, lo que constituye un buen método para comparar muestras semejantes.

Se estableció la cantidad de 10mL de tapón; una solución de poliacrilamida que polimeriza más rápido que la solución del gel, de la cual se estableció una cantidad de 100mL. Quedó exactamente determinada la proporción de TEMED y Persulfato de Amonio en cada caso. Estos últimos actúan como catalizadores que, a través de la formación de radicales libres, inician y aceleran la formación de un gel tridimensional (García-Segura *et al.*, s/a).

También se determinó los parámetros de corrida referentes a Voltaje, Potencia, Intensidad de la corriente y tiempo de corrida para cada uno de los *loci* microsatélites (Tabla III).

Tabla 3: Parámetros de corrida de tres *loci* microsatélites de *Apis mellifera*

<b><i>Loci</i> microsatélites</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Potencia</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Tiempo de corrida</b>
A7	2000 V	40 W	100 mA	3:00 Horas
A24	2000 V	40 W	100 mA	2:40 Horas
A113	2000 V	40 W	100 mA	3:30 Horas

### 3.3. Tinción de geles de poliacrilamida

La tinción mediante sales de plata es un método muy extendido, aunque es muy laboriosa y cara. Esta técnica se basa en el mecanismo de la reducción del ión plata (Ag<sup>+</sup>) a plata metálica (Ag<sup>0</sup>) (García-Segura *et al.*, s/a). Se estandarizó la tinción con iones plata para la visualización de las bandas de ADN de las muestras y de los marcadores de peso molecular. Se comprobó la importancia de la preparación de soluciones frescas para cada tinción y de la calidad del agua bidestilada para todo el proceso, la cual debe tener un pH cercano a 7 y una conductividad menor o igual a 1 microsiemens/cm<sup>2</sup>. En ensayos interlaboratorios se ha demostrado que este es un requisito indispensable para el éxito de la tinción (Jones *et al.*, 1997).

### 3.2.1. Lectura de geles de poliacrilamida. Genotipaje de muestras

Fue conciliada una metodología para la determinación de los genotipos visualmente. La talla de los alelos fue estimada mediante la comparación con patrones de peso molecular aplicados en carriles iniciales, intermedios y finales. Se estableció que las muestras que mostraran una sola banda serían identificadas como individuos homocigotos, mientras las que mostraran dos bandas de diferente talla serían identificados como individuos heterocigotos (Fig. 2). Para darle mayor precisión y exactitud a la estimación se estableció que la lectura debía ser realizada por varias personas.

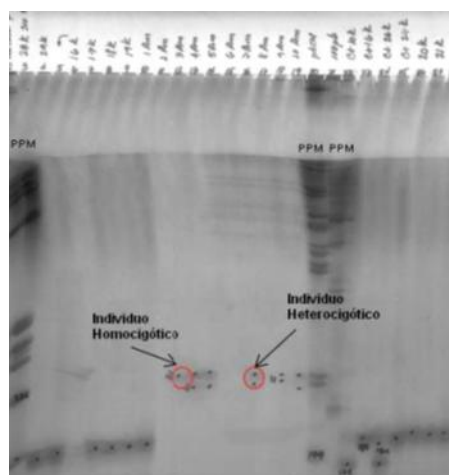


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida del locus A113 de *A. mellifera*. Se señalan las bandas; una para individuo homocigótico, dos para heterocigótico y las bandas del patrón de peso molecular (PPM).

La correcta puesta en marcha de estas técnicas se corroboró durante la determinación de la variabilidad genética del apiario del CIAPI mediante el genotipaje de 20 individuos, a partir de la información de los tres *loci* microsatélites. Los resultados, en cuanto a polimorfismo y tamaño de alelos coincidieron con los reportados en la literatura (Estoup *et al.*, 1995) y (Francket *et al.*, 1998).

## CONCLUSIONES

Fue posible la puesta a punto de las técnicas de detección de *loci* microsatélites para la caracterización genética de *Apis mellifera* utilizando ADN extraído mediante el método de solventes orgánicos modificado y mediante Chelex con mejores resultados, a partir de músculo de tórax de la abeja. Igualmente se logró la amplificación de secuencias mediante PCR con mezcla comercial

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avise JC. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Sunderland, Massachusetts, USA. 2004:684.
2. De-la-Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RF. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). *Apidologie*. 2001; 32 1-11.
3. De-la-Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz. RF. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genet SelEvol*. 2003;35 339–50.
4. De-la-Rúa P, Jaffé R, Dall’Olio R, Munoz I, Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. 2009;40:263–84.
5. Díaz ME, Domínguez DA. Características morfológicas de la abeja (*Apis mellifica*) en Cuba. *Cienc Tec Agric*. 1985;1:91-105.
6. Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 1995;140:679–95.
7. Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM. The origin of west European subspecies of honeybees(*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*. 1998;52:1119–34.
8. García-Segura JM, Gavilanes JG, Pozo AMd, Montero F, Oñaderra M, Vivanco F. Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. Madrid: proyecto editorial Ciencias Químicas; s/a.
9. Genaro JA. Origins, composition and distribution of the bees of Cuba (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). *Insecta Mundi*. 2008;0052:1-16.
10. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, deWielCv, et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*. 1997;3:381-90.
11. Joshi M, Deshpande JD. Polimerase Chain Reaction: Methods, principles and application. *International Journal of BiomedicalResearch*. 2010;1(5):81-97.
12. Pérez-Piñeiro A. Manual de Apicultura. La Habana; 2007.
13. Carreck NL. Are honey bees (*Apis mellifera* L.) native to the British Isles? *J Apic Res*. 2008;47:318–22.

14. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn, Cold Spring Harbor Press, New York. 1989;p 9.10-9.9.
- 

15. Selkoe KA, Toonen R J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 2006, 9: 615–629.
16. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 1991;10:506-2.