



REVISION

Marcadores moleculares para la selección en *Apis mellifera* Molecular markers for selection in *Apis mellifera*

Carlos Ariel Yadro¹, Anais Rodríguez¹

¹Centro de Investigaciones Apícola. CIAPI. Carretera El Cano a El Chico, km 0, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana. CP 19190. Teléfonos: 7280 7027 y 7280 7890.

*cyadrogarcia@gmail.com



Palabras clave

Programa de selección
Marcadores moleculares
Apis mellifera

Selection programs
Molecular markers
Apis mellifera

Editor: Anais Rodríguez
Luis, CIAPI, Cuba

Recibido Noviembre 27, 2019

Aceptado Diciembre 2, 2019

Copyrighth:© This work by Yadro y Rodríguez. is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Como citar este artículo:
Yadro, C. A. y Rodríguez, A. (2019). "Marcadores moleculares para la selección en *Apis mellifera*". Apiciencia. 21 (2).

El uso de marcadores moleculares basados en ADN es una de las herramientas más importantes en los programas modernos de selección animal. Algunos de estos marcadores han sido utilizados ampliamente para evaluar diversos parámetros poblacionales en *Apis mellifera*, diferenciar linajes maternos de esta especie y estimar el grado de introgresión en poblaciones híbridas. El surgimiento de marcadores y técnicas que permiten un alto flujo analítico y una mayor cobertura del genoma han permitido evaluaciones más certeras y aplicables a programas de selección. Si bien el sistema reproductivo poliándrico en esta especie constituye un desafío importante en los programas de selección genética se han realizado avances en la identificación de marcadores con alta probabilidad de asociación a características de interés económico.

The use of molecular markers based on DNA is one of the most important tools in modern animal selection programs. Some of these markers have been widely used to evaluate various population parameters in *Apis mellifera*, differentiate maternal lineages of this species and estimate the degree of introgression in hybrid populations. The emergence of markers and techniques that allow high analytical flow and greater genome coverage has allowed more accurate evaluations and applicable to selection programs. Although the polyandric reproductive system in this species constitutes an important challenge on genetic selection programs, advances have been made in markers identification with a high probability of association with economic interest traits.

Introducción

En las dos últimas décadas el uso de marcadores moleculares basados en polimorfismos de ADN ha ido ganando espacio en diferentes programas de selección. El desarrollo de tecnologías de alto flujo y con un precio relativamente asequible ha permitido la realización de estudios que involucran decenas de miles de marcadores genéticos. Además, ha proporcionado una visión más completa de las interacciones entre diferentes genes y los rasgos fenotípicos de los animales.

Los genomas eucarióticos presentan un número considerable de variaciones entre especies y entre individuos de una misma especie². De esas variaciones, el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP- restriction fragment length polymorphisms), los microsatélites (STR – secuencias repetidas en tándem) y los polimorfismos de nucleótido simple (SNP- single nucleotide polymorphisms) se encuentran entre los más utilizados en estudios poblacionales en *Apis mellifera*. El objetivo del presente trabajo es analizar el empleo de este tipo de marcadores en la descripción de poblaciones de esta especie y sus perspectivas de uso en programas de selección.

Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción

El polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, es generado por cambios nucleotídicos en sitios de restricción. Si el cambio de un nucleótido por otro conduce a la

eliminación del sitio de reconocimiento de una nucleasa de restricción, el ADN pierde la propiedad de ser cortado por esa nucleasa. En cambio, si el sitio de reconocimiento se encuentra presente, el proceso de digestión resultará en la obtención de fragmentos de menor tamaño que el producto sin digerir. En el caso de marcadores diploides y heterocigóticos (una copia lleva el sitio de restricción mientras que en la otra está ausente) se obtiene un patrón de electroforesis formado por una banda de mayor tamaño (producto sin digerir, sitio de restricción ausente) y una o varias bandas de menor tamaño (producto digerido, sitio de restricción presente). En el caso de *A. mellifera* varios ensayos de RFLP basados en ADN mitocondrial han sido desarrollados y se utilizan con la finalidad de estimar el origen materno de las colmenas (Fig. 1).

Microsatélites

Los microsatélites están formados por repeticiones continuas de pequeños motivos de secuencia-formados generalmente por unidades de dos a seis nucleótidos. Estos motivos de secuencias se repiten un número variable de veces dando lugar a regiones del genoma cuyo tamaño depende del número de repeticiones de la secuencia base (Fig. 2). Generalmente se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma en regiones no codificantes. La ausencia de presión selectiva permite altas tasas de mutación por lo que presentan un alto polimorfismo (variabilidad).

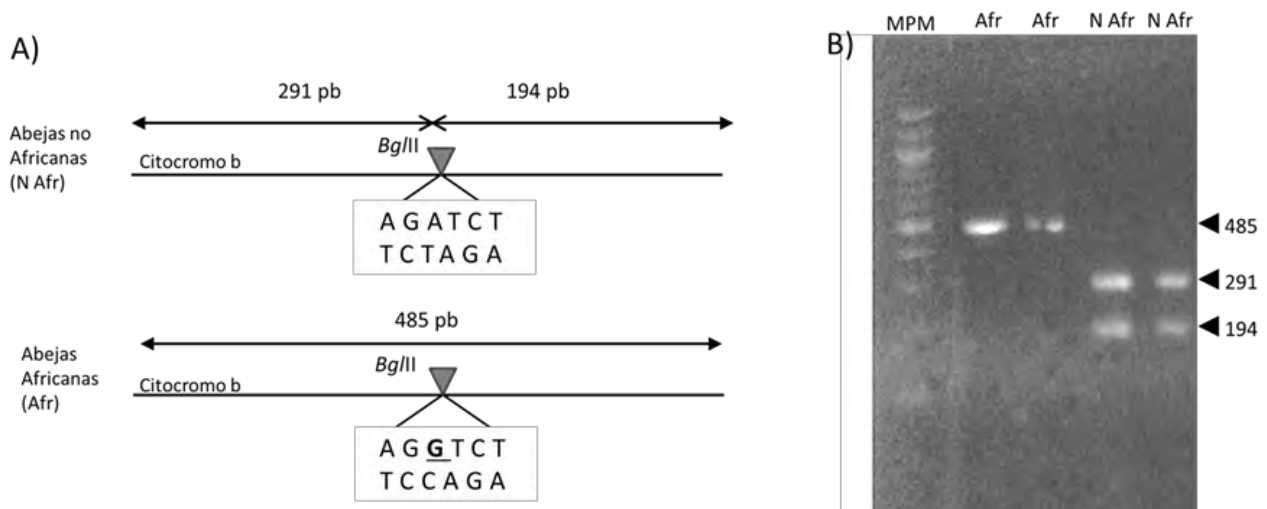


Figura 1. Representación de ensayo RFLP citocromo b/Bgl II para identificar abejas con ascendencia materna africana. A) Sitio de restricción para la Bgl II en el citocromo b. B) Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de digestión. Las abejas que no tienen ascendencia materna africana (N Afr) presentan intacto el sitio de restricción para la nucleasa Bgl II. El fragmento es cortado por la nucleasa y se obtienen dos productos de restricción de 194 y 291 pb. En el caso de las abejas con ascendencia materna africana (Afr) una mutación en el sitio de restricción impide la digestión por parte de la nucleasa y se observa un único fragmento con un tamaño de 485 pb.

Este tipo de marcadores ha sido una herramienta poderosa para el mapeo de genes que se encuentran asociados a características de interés económico en ganado lechero ^{7,23}. En *Apis mellifera* existen numerosos estudios que demuestran el empleo de microsatélites para caracterizar la variabilidad poblacional ^{8,24,27}. Incluso se han diseñado mapas genéticos basados en microsatélites ^{25,26}. Sin embargo, no se han realizado estudios robustos que muestren asociación entre estos marcadores y rasgos económicos importantes en las abejas.

SNP

Los polimorfismos de nucleótido simple se deben a la sustitución de un nucleótido por otro o a la delección o inserción de uno o pocos nucleótidos. Existen cuatro razones fundamentales por las que este tipo de marcadores ha sido objeto de un creciente interés. En primer lugar, tiene una gran prevalencia y es posible encontrarlos cerca o incluso

en el interior de cualquier locus, con mayor frecuencia que el resto de los marcadores. En segundo lugar, muchos de ellos se encuentran en regiones codificantes y afectan directamente la función de las proteínas. Por otra parte, su transmisión es más estable que la de los microsatélites lo cual los hace más adecuados como marcadores de selección a largo plazo. En último lugar son más adecuados para análisis en técnicas de alto flujo que otros marcadores ¹⁵. Sin embargo, su principal desventaja radica en que generalmente constituyen locus bialélicos, lo que significa que en una población generalmente solo se encuentran dos alelos. Como consecuencia la información contenida en un SNP es mucho menor que en un locus de microsatélites ².

En *A. mellifera* este tipo de marcadores ha sido uno de los más utilizados con fines de selección, fundamentalmente orientados a la diferenciación de perfiles genéticos y a la mejora de hábitoshigiénicos ^{3,28,29}.

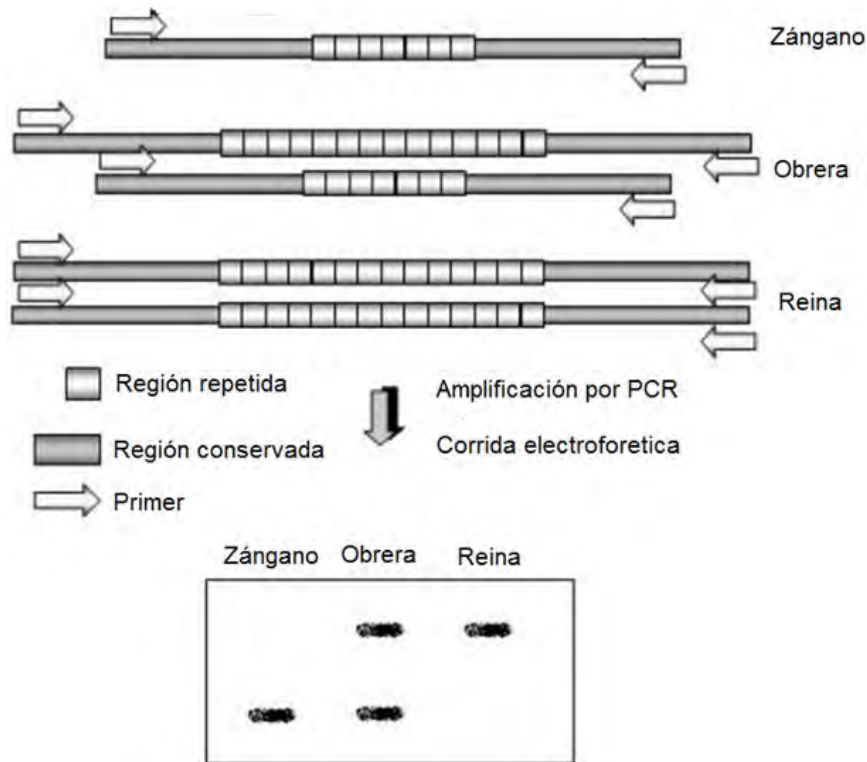


Figura 2. Representación del estudio de microsatélites en abejas. Cada microsatélite está formado por una región básica que se repite un número variable de veces. El número de repeticiones define alelos de diferente tamaño. Los individuos pueden ser hemigigóticos como en el caso del zángano y en este caso solo se obtiene una banda debido a la presencia de una sola copia del microsatélite. También se puede obtener una única banda en individuos diploides cuando las dos copias tienen el mismo tamaño, este sería el caso de una reina homigótica. La obrera en este caso presenta dos bandas siendo un diploide heterigótico, ha heredado un alelo del zángano y otro diferente de la reina.

Selección molecular en *Apis mellifera*

Con el completamiento del genoma de *A. mellifera* se crearon grandes expectativas en cuanto a una rápida selección de colmenas en base a características deseables³¹. En teoría con conocimiento de los genes codificantes para rasgos particulares sería posible la selección y cría de reinas y zánganos con los rasgos de interés⁴. Sin embargo, todavía se requiere mucha investigación antes de hacer realidad estas expectativas. La complejidad en la genética de las *A. mellifera* impone retos adicionales a los programas y mecanismos de selección.

Se debe considerar que la colonia está compuesta por dos generaciones –la reina y su descendencia de obreras-, y que además dentro de una colonia se pueden encontrar más de diez juegos de cromosomas debido al sistema poliándrico de esta especie. Teniendo esto en cuenta, la selección de un único rasgo a nivel individual puede ser altamente cuestionable, mucho más a nivel de la colonia. El surgimiento de nuevas herramientas moleculares y bioinformáticas pueden aumentar la precisión y confiabilidad de los programas de cría y selección^{10,11,21}. Sin embargo las mayoría de estas herramientas requieren de considerables recursos y un costoso trabajo de laboratorio⁴.

Incluso antes del completamiento del genoma de la abeja ya se desarrollaban esfuerzos orientados a detectar variantes genéticas relacionadas con rasgos de interés económico. Los primeros estudios fueron orientados fundamentalmente a identificar marcadores relacionados con la recolección de recursos florales. Es importante señalar que este tipo de rasgos comportamentales que involucra la toma de decisiones, la percepción de diferentes modalidades sensoriales, la información del estado del individuo y de la colonia y variables medioambientales, requieren una alta complejidad en su codificación genética⁹. Diferentes loci de carácter cuantitativo (QTL- Quantitative Trait Loci) relacionados con la recolección y el almacenamiento de polen en las colmenas han sido identificados. En este sentido, Hunt et al. (1995) identificaron dos QTL: pln1 y pln2. La combinación de ambos loci explicaba el 59% de la variación entre líneas de alta y baja recolección de polen. Un tercer QTL, pln3, fue identificado en 2000 también relacionado con la recolección de polen y néctar y la concentración del néctar colectado¹⁹. Dos años después se identificó un cuarto locus, Amfor, también relacionado con el comportamiento de recolección de las abejas. Sin embargo, de manera general las interacciones entre estos diferentes loci no resultan claras.

En las dos últimas décadas, la mayor parte de los estudios que emplean marcadores moleculares con fines de selección han estado orientados fundamentalmente a identificar genes relacionados con el comportamiento higiénico. En una de las primeras investigaciones Lapidge et al. (2002)

identificaron 7 QTL relacionados con el comportamiento higiénico frente al ácaro *Varroa destructor*. En 2008 se identificó un conjunto de 32 genes que presentaban niveles de expresión diferencial frente a la infección por *V. destructor*. Algunos de estos genes se han propuesto como candidatos en la resistencia a la varroasis y se encuentran relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, las vías olfativas y la excitabilidad neuronal¹⁷. Asimismo se han identificado tres loci que influyen la probabilidad de que abejas obreras se desempeñen en tareas higiénicas, dos loci relacionados con el desoperculado y un último locus que influye en el comportamiento de remoción¹⁸. Asimismo se han identificado tres loci involucrados con la supresión del ciclo reproductivo de *Varroa* en abejas resistentes provenientes de la isla de Gotland, Suecia¹. Además, Tsuruda et al. (2012) identificaron un QTL en el cromosoma 9 aparentemente relacionado con la identificación de los ácaros dentro de las celdas de cría.

Recientemente un conjunto de 44000 marcadores de SNP que proveen una considerable cobertura del genoma de la abeja se encuentra disponible²⁹. Usando este conjunto de marcadores en un estudio de defensa frente *Varroa* más de 151 SNP fueron identificados diferencialmente entre el grupo experimental y el grupo control. Además, se identificaron 7 SNP que mostraban diferencias entre abejas higiénicas y no higiénicas dentro de colmenas con elevado VSH²⁸.

Asimismo, se han desarrollado conjuntos de SNP orientados fundamentalmente a evaluar la integridad de poblaciones de interés así como estimar la introgresión entre los diferentes linajes en zonas y poblaciones protegidas^{12,16,22}.

Se ha establecido que el empleo de un conjunto relativamente reducido de SNPs tiene más poder con fines identificativos y de estudios de introgresión que los marcadores de microsatélites²⁰. En 2010 se desarrolló un estudio combinando microsatélites y SNP con el fin de diferenciar correctamente abejas de la raza ARS de otras que se distribuyen comercialmente en los Estados Unidos³.

También se han desarrollado estudios orientados a determinar la ancestría de las poblaciones y el grado de Africanización en poblaciones comerciales en los Estados Unidos^{5,6}.

Conclusiones

El sistema reproductivo en *A. mellifera* presenta retos considerables para estudios de asociación entre marcadores genéticos y características de interés económico. Sin embargo, el uso de este tipo de marcadores resulta de gran

utilidad en la caracterización de poblaciones de esta especie. El uso de técnicas cada vez más novedosas, permite la identificación de regiones del genoma asociadas a características particulares que abrirán las puertas a programas de selección más efectivos y mejor orientados.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron en igual medida a la realización de este trabajo

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés

Referencias Bibliográficas

- Behrens, D., Q. Huang, C. Geßner, P. Rosenkranz, E. Frey, B. Locke, R. F. Moritz and F. Kraus (2011). "Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*." *Ecology and evolution* 1: 451-458.
- Beuzen, N., M. Stear and K. Chang (2000). "Molecular markers and their use in animal breeding." *The Veterinary Journal* 160: 42-52.
- Bourgeois, L., W. S. Sheppard, H. A. Sylvester and T. E. Rinderer (2010). "Genetic stock identification of Russian honey bees." *Journal of economic entomology* 103: 917-924.
- Büchler, R., S. Andonov, K. Bienefeld, C. Costa, F. Hatjina, N. Kezic, P. Kryger, M. Spivak, A. Uzunov and J. Wilde (2013). "Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens." *Journal of Apicultural Research* 52: 1-30.
- Chapman, N. C., A. L. Bourgeois, L. D. Beaman, J. Lim, B. A. Harpur, A. Zayed, M. H. Allsopp, T. E. Rinderer and B. P. Oldroyd (2016). "An abbreviated SNP panel for ancestry assignment." *Apidologie*.
- Chapman, N. C., B. A. Harpur, J. Lim, T. E. Rinderer, M. H. Allsopp, A. Zayed and B. P. Oldroyd (2015). "A SNP test to identify Africanized honeybees via proportion of 'African' ancestry." *Molecular Ecology Resources* 15: 1346-1355.
- Daetwyler, H. D., F. S. Schenkel, M. Sargolzaei and J. A. B. Robinson (2008). "A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map." *Journal of dairy science* 91: 3225-3236.
- Garner, L., P. Franck, E. Baudry, M. Solignac, D. Vautrin and J.-M. Cornuet (1998). "Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci." *Genet. Sel. Evo.* 30.
- Greenspan, R. J. (2001). "The flexible genome." *Nature Reviews Genetics* 2: 383.
- Harismendy, O., P. C. Ng, R. L. Strausberg, X. Wang, T. B. Stockwell, K. Y. Beeson, N. J. Schork, S. S. Murray, E. J. Topol and S. Levy (2009). "Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies." *Genome biology* 10: R32.
- Hayes, B. and M. Goddard (2001). "Prediction of total genetic value using genomewide dense marker maps." *Genetics* 157: 1819-1829.
- Henriques, D., K. A. Browne, M. W. Barnett, M. Parejo, P. Kryger, T. C. Freeman, I. Muñoz, L. Garnery, F. Highet10 and J. S. Johnston11 (2018). "High simple throughput genotyping for estimating C-lineage introgression in the dark honeybee: an accurate and cost-effective SNP-based tool." *SCIENTIFIC REPoRTs* 8: 8552.
- Hunt, G. J., R. Page, M. K. Fondrk and C. J. Dullum (1995). "Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior." *Genetics* 141: 1537-1545.
- Lapidge, K. L., B. P. Oldroyd and M. Spivak (2002). "Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees." *Naturwissenschaften* 89: 565-568.
- Lipshutz, R. J., S. P. Fodor, T. R. Gingeras and D. J. Lockhart (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." *Nature genetics* 21: 20.
- Muñoz, I., D. Henriques, J. Johnston, J. Chávez-Galarza, P. Kryger and M. Pinto (2015). "Reduced SNP Panels for Genetic Identification and Introgression Analysis in the Dark Honey Bee (*Apis mellifera mellifera*)." *PLoS ONE* 10: e0124365.
- Navajas, M., A. Migeon, C. Alaux, M.-L. Martin-Magniette, G. Robinson, J. Evans, S. Cros-Arteil, D. Crauser and Y. Le Conte (2008). "Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection." *BMC genomics* 9: 301.
- Oxley, P. R., M. Spivak and B. P. Oldroyd (2010). "Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*)." *Molecular Ecology* 19: 1452-1461.
- Page Jr, R., M. Fondrk, G. Hunt, E. Guzman-Novoa, M. Humphries, K. Nguyen and A. Greene (2000). "Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior." *Journal of Heredity* 91: 474-479.
- Parejo, M., D. Henriques, M. A. Pinto, G. Soland-Reckeweg and M. Neuditschko (2018). "Empirical comparison of microsatellite and SNP markers to estimate introgression in *Apis mellifera mellifera*." *Journal of Apicultural Research* 57: 504-506.
- Pérez-Sato, J.-A., N. Châline, S. J. Martin, W. Hughes and F. L. Ratnieks (2009). "Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees." *Heredity* 102: 609.
- Pinto, M. A., D. Henriques, J. Chávez-Galarza, P. Kryger, L. Garnery, R. van der Zee, B. Dahle, G. Soland-Reckeweg, P. De la Rúa and R. Dall'Olio (2014). "Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data." *Journal of Apicultural Research* 53: 269-278.
- Ron, M., M. Band, A. Yanai and J. Weller (1994). "Mapping

- quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population." *Animal genetics* 25: 259-264.
24. Shaibi, T., H. M. G. Lattorff and C. Moritz (2008). "A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*." *Molecular Ecology Resources*.
25. Solignac, M., F. Mougél, D. Vautrin, M. Monnerot and J.-M. Cornuet (2007). "A third-generation microsatellite-based linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, and its comparison with the sequence-based physical map." *Genome biology* 8: R66.
26. Solignac, M., D. Vautrin, E. Baudry, F. Mougél, A. Loiseau and J.-M. Cornuet (2004). "A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L." *Genetics* 167: 253-262.
27. Solignac, M., D. Vautrin, A. Loiseau, F. Mougél, E. Baudry, A. Estoup, L. Garnery, M. Haberl and J. M. Cornuet (2003). "Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome." *Molecular Ecology Resources* 3: 307-311.
28. Spötter, A., P. Gupta, M. Mayer, N. Reinsch and K. Bienefeld (2016). "Genomewide association study of a *Varroa*-specific defense behavior in honeybees (*Apis mellifera*)." *Journal of Heredity* 107: 220-227.
29. Spötter, A., P. Gupta, G. Nürnberg, N. Reinsch and K. Bienefeld (2012). "Development of a 44K SNP assay focussing on the analysis of a *varroa*-specific defence behaviour in honey bees (*Apis mellifera carnica*)." *Molecular Ecology Resources* 12: 323-332.
30. Tsuruda, J. M., J. W. Harris, L. Bourgeois, R. G. Danka and G. J. Hunt (2012). "High-resolution linkage analyses to identify genes that influence *Varroa* sensitive hygiene behavior in honey bees." *PLoS One* 7: e48276.
31. Weinstock, G. M., G. E. Robinson, R. A. Gibbs, K. C. Worley, J. D. Evans, R. Maleszka, H. M. Robertson, D. B. Weaver, M. Beye and P. Bork (2006). "Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*." *Nature* 443: 931-949.