



El empleo de marcadores nucleares en el análisis genético de poblaciones de *Apis mellifera*.

The use of nuclear markers in the genetic analysis of *Apis mellifera* population

Autora: Lic. Anais Rodríguez Luis¹

1- Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera de El Cano a El Chico km/0.Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba. Teléfono: 72020890.

reserva_r@ciapi.minag.cu

Recibido: 2-9-2015

Aprobado: 5-10-2015

RESUMEN

El empleo de marcadores nucleares constituye una eficaz herramienta para estudios de genética poblacional y de diversidad genética de *Apis mellifera* debido a su herencia biparental. Su utilización para el genotipado de las obreras permite obtener información tanto de la abeja reina (madre) como de los zánganos (padres) con los cuales la reina se aparea. El análisis nuclear involucra el polimorfismo de haloenzimas, los microsatélites y más recientemente el polimorfismo de nucleótidos simples o SNPs (de sus siglas en inglés, single nucleotide polymorphisms). El empleo de estos marcadores moleculares ha posibilitado la comprensión de la discriminación de subespecies y un mejor entendimiento del flujo de genes. Además han contribuido en la detección de diferencias genéticas entre las poblaciones comerciales y las naturales. Estos marcadores, también han sido utilizados para la determinación de niveles de introgresión entre diferentes subespecies analizadas.

Palabras clave: abejas/ADN/microsatélites/haloenzimas/polimorfismo.

ABSTRACT

The use of nuclear markers is an effective tool for studies of population genetics and genetic diversity of *Apis mellifera* because of its two-parent inheritance. Its use for genotyping of workers provides information about both Queen Bee (mother) and drones (parents) with which the queen mates. The analysis involves nuclear polymorphism haloenzymes, microsatellites and more recently the single nucleotide polymorphism (SNPs). The use of these molecular markers has facilitated the understanding of discrimination of subspecies and a better understanding of gene flow. They have also contributed to the detection of genetic differences between commercial stocks and natural. These markers have also been used to determine levels of introgression between different subspecies analyzed.

Keywords: honey bee/DNA/microsatellite/allozymes/polymorphisms.

INTRODUCCIÓN

El género *Apis* comprende 10 especies, 9 de las cuales están confinadas a Europa. *Apis mellifera*, no obstante, está distribuida desde África Sub-Sahariana hasta el centro de Asia y norte de Europa y está compuesta de más de dos docenas de subespecies morfológicamente y geográficamente distintas (W. S. Sheppard y Meixner, 2003). Por su parte, la introducción de las abejas mellíferas en el continente Americano tuvo lugar principalmente por América del Norte con la entrada de *A. mellifera ligústica* y luego con otras 9 subespecies de Oriente Cercano, Europa y el Norte de África (W. S. Sheppard y Meixner, 2003). Mientras que en América del Sur este proceso comenzó con la entrada de *A. mellifera mellifera* y *A. mellifera ibérica* a las que posteriormente se le sumó *A. mellifera scutelata*, subespecie de origen africano, que se introdujo en 1956 en Brasil (Kerr, 1967; Kerr, Del Rio y Barrionuevo, 1982; WS Sheppard, 1989; WS Sheppard, Arias, Grech y Meixner, 1997; W. S. Sheppard y Meixner, 2003).

La amplia distribución llevada a cabo de forma natural y resultante de las importaciones combinada con una baja habilidad migratoria condujeron a una elevada diferenciación genética (Ruttner, 1988) reflejado en las numerosas subespecies actualmente identificadas (M. D. Meixner y col., 2013; Ruttner, 1992).

La taxonomía intra-específica de las abejas estaba basada fundamentalmente en marcadores morfométricos, los cuales se pueden subdividir en cuatro grupos principales: tamaño corporal, patrones de coloración, vascularización de las alas y características de las pilosidades. Apoyado en estos caracteres Ruttner en 1988 identificó cuatro linajes fundamentales de *A. mellifera*: linaje M correspondiente al oeste de Europa y al noroeste del Mediterráneo, el linaje C que ocupa el sureste de Europa y el este del Mediterráneo, el linaje O en el Oriente cercano y Asia Occidental y el linaje A desde el continente africano). Sin embargo, el desarrollo de técnicas moleculares, que incluyen el empleo de la variación del ADN mitocondrial, y su aplicación en estudios sobre la variación intra-específica de *A. mellifera* mostraron la existencia tres principales linajes evolutivos (A, M, C) los cuales actualmente son utilizados para reflejar la historia evolutiva de dicha especie (Garner y col., 1998a; Garnery, Solignac, Celebrano y Cornuet, 1993). De modo que el modelo propuesto por Ruttner de los cuatro linajes fue mayoritariamente rechazado.

El creciente empleo de marcadores mitocondriales y nucleares para el estudio de la diversidad genética en las abejas de la miel, han desplazado poco a poco a los marcadores morfométricos, particularmente en estudios de genética poblacional y en el establecimiento de relaciones filogenéticas entre subespecies. Entre los marcadores nucleares empleados con esta finalidad se encuentran las haloenzimas, los microsátélites y el polimorfismo de nucleótidos simples

MARCADORES MOLECULARES

Las haloenzimas como marcadores nucleares

El polimorfismo enzimático en abejas de la miel ha sido estudiado extensivamente en las últimas dos décadas (I Kandemir y Kence, 1995) constituyendo el primer tipo de marcador molecular aplicado para entender la diversidad genética de las abejas (G Badino, Celebrano y Manino, 1988a; Dedej, Biasiolo y Piva, 1996; Garstide, 1980; I Kandemir y Kence, 1995; Lobo, Del Lama y Mestriner, 1989; M. D. Meixner y col., 2010; Mestriner, 1969; Nunamaker y Wilson, 1981; WS Sheppard y Berlocher, 1984). Los estudios de haloenzimas han contribuido a la comprensión de la discriminación de subespecies (De Jong y De Jong, 1983; M. D. Meixner y col., 2010; Nunamaker y Wilson, 1981; Rinderer y col., 1993; WS Sheppard, 1989; Spencer y col., 1986), revelando la existencia de zonas híbridas entre ellos (W. S. Sheppard y McPheron, 1986). También se han utilizado tanto para la realización de observaciones a ciegas del comportamiento de las abejas (Robinson, Page Jr y Fondrk, 1990; Robinson y Page, 1988) como para el estudio de la reproducción de las obreras (Miller lli y Ratnieks, 2001; Visscher, 1996).

Aunque los niveles de variación genética detectados para las haloenzimas son pequeños, en combinación con datos morfométricos han sido adecuados para construir filogenias consistente de diversas subespecies de *A. mellifera* (G Badino y col., 1988a; W. S. Sheppard, 1988) y para la detección de diferencias genéticas entre las poblaciones comerciales y las naturales (Arias y Sheppard, 1996; Schiff y Sheppard, 1995). Los datos aportados por estos marcadores han permitido un mejor entendimiento del flujo de genes, la estructura poblacional (Guido Badino, Celebrano y Manino, 1983; G Badino y col., 1988a; Del Lama, Lobo, Soares y Del Lama, 1990; M. Meixner, Sheppard, Dietz y Krell, 1994; W. S. Sheppard y McPheron, 1986) y los efectos fundadores (Cornuet y Fresnaye, 1979; WS Sheppard y col., 1988).

Dentro de estos marcadores se cuentan la enzima málica (ME), la esterasa (EST), la fosfoglucomutasa (PGM), la hexoquinasa (HK), la fosfatasa alcalina (ALP), la malato deshidrogenasa (MDH), la α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α -GPDH), la alcohol deshidrogenasa (ADH), entre otros tantos. Sin embargo el locus de la MDH es uno de los más polimórficos y ha sido ampliamente utilizado (Cornuet, 1982; Cornuet, Daoudi y Chevalet, 1986; Del Lama y col., 1990; Lobo y col., 1989).

El polimorfismo haloenzimático es un parámetro que varía en dependencia de la distribución geográfica de las subespecies en estudio, encontrándose diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones (De Jong y De Jong, 1983). Por ejemplo, se encontró que la ME presentaba tres alelos distribuidos entre varias poblaciones europeas (WS Sheppard y Berlocher, 1984; W. S. Sheppard y McPheron, 1986), sin embargo también fue reportado como no polimórfico en abejas

provenientes de algunas poblaciones de Turquía (Irfan Kandemir, Kence y Kence, 2000) y recientemente fue reportado que en diversas poblaciones de *Apis mellifera* provenientes de Polonia esta haloenzima presentaba dos alelos (Figura 1) con diferentes valores de frecuencias alélicas (E. Ivanova y col., 2012).

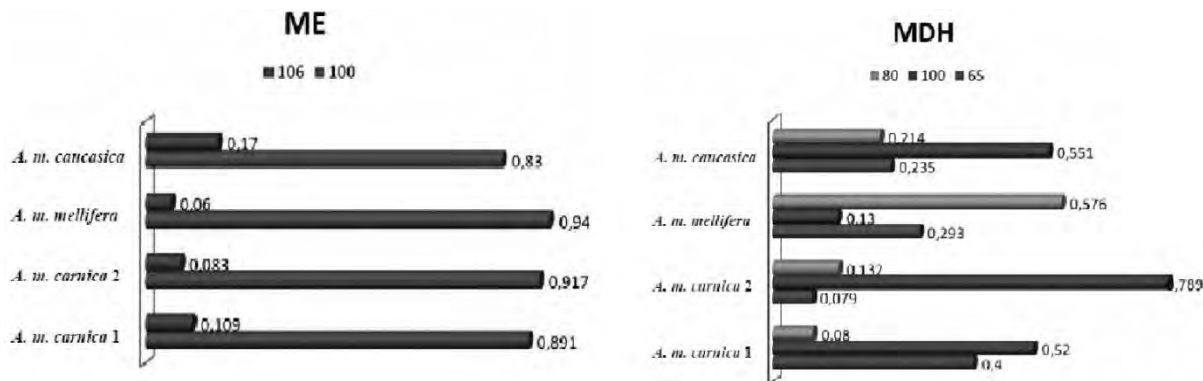


Figura 1: Polimorfismo haloenzimático de ME y MDH y sus correspondientes frecuencias alélicas resultante de un estudio de diferentes poblaciones de *Apis mellifera* provenientes de Polonia. Tomado de Ivanova 2012 (E. Ivanova y col., 2012).

Por su parte en el locus MDH-1 han sido detectados cinco alelos en diferentes poblaciones de Europa, Turkey, Brasil y Estados Unidos (De Jong y De Jong, 1983; E. N. Ivanova, Bienkowska y Petrov, 2011; I Kandemir y Kence, 1995; Irfan Kandemir y col., 2000; M. Meixner y col., 1994; M. D. Meixner y col., 2010); mientras que para diversas poblaciones provenientes de Polonia se reportó solo la existencia de tres alelos de dicho locus con diferentes frecuencias alélicas (figura 1) (E. Ivanova y col., 2012). Otro ejemplo del polimorfismo del locus MDH-1 es el estudio realizado por Badino y colaboradores en *Apis mellifera L*, en el cual encontraron dos alelos que denominaron Mdh-1-F y Mdh-1-S de acuerdo a su movilidad electroforética (Figura 2). En base a la movilidad relativa esos alelos corresponden a Mdh-100 y Mdh-65 respectivamente (Guido Badino, Celebrano, Manino y Ifantidis, 1988b). Debido a que sus frecuencias alélicas difieren mucho entre los diferentes linajes de *A. mellifera* ha sido extensamente utilizado en los estudios sobre la propagación de las abejas melíferas africanizadas (Cornuet, 1982; Cornuet y col., 1986; Del Lama y col., 1990; Lobo y col., 1989; M. D. Meixner y col., 2010).

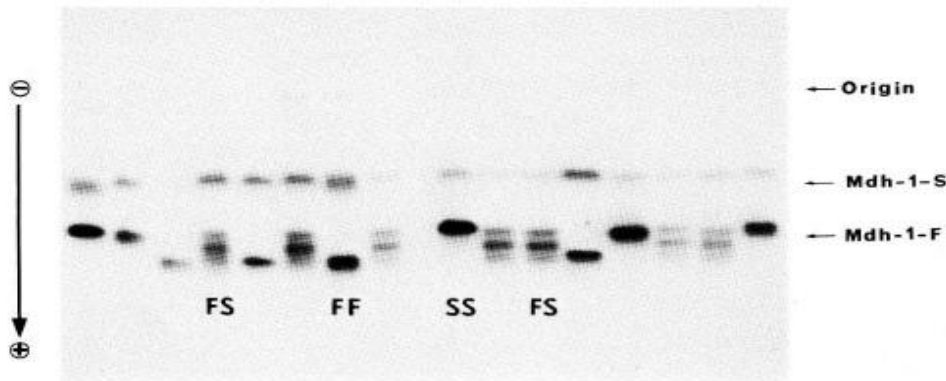


Figura 2: Patrones electroforéticos de MDH en *Apis mellifera*. A la izquierda se muestra la dirección el campo eléctrico. *Mdh-1-F* (corresponde al alelo *Mdh-1*-que presenta una rápida movilidad electroforética) y *Mdh-1-S* (corresponde al alelo *Mdh-1* que presenta una movilidad electroforética lenta). *FF*: homocigoto del alelo *Mdh-1-F*, *SS*: homocigoto del alelo *Mdh-1-S*, *FS*: heterocigoto. Tomado de *Badino 1988 (Guido Badino y col., 1988b)*.

Sin embargo, existe evidencia de que la variación de algunos de estos locus puede ser interpretado como una consecuencia de la adaptación fisiológica a diferentes climas y no tiene porque necesariamente reflejar flujos genéticos. Cabe destacar además que dado que existen pocos loci polimórficos en las abejas y no hay diferencias fijas entre subespecies, el empleo de loci enzimáticos es más adecuado cuando se realiza un estudio a nivel poblacional.

El empleo de haloenzimas como herramienta genética en comparación con los caracteres morfométricos medibles establecidos, resulta en una técnica de mayor robustez para los análisis de diversidad y diferenciación producto a que mediante las haloenzimas se pueden identificar variaciones puntuales y discretas (mutaciones) mientras los caracteres morfométricos presentan una variación más continua y que puede presentar superposiciones (Bouga, Harizanis, Kiliyas y Alahiotis, 2005; Coelho y Mitton, 1988). Un ejemplo de lo antes mencionado es el estudio realizado por Bouga y colaboradores en el cual, demostraron que a través de análisis haloenzimáticos la subespecie *A. m. cypria* era una subespecie pura de Chipre y diferente del resto de las subespecies en estudio provenientes de Grecia; lo cual resulta en contraste con lo reportado por Ruttner empleando caracteres morfométricos (M. D. Meixner y col., 2010; Ruttner, 1988).

Los microsatélites como marcadores nucleares

Los microsatélites de DNA son un tipo de secuencias repetidas en tándem un número variable de veces (VNTR, de sus siglas en inglés Variable of Tándem Repeats). Entre ellos se encuentran las repeticiones cortas en tándem (STR, de sus siglas en inglés short tándem repeats) y las repeticiones de secuencias simples (SSR, de sus siglas en inglés simple sequence repeats). De manera general

los microsatélites son segmentos de ADN con un motivo de secuencia que va desde 1 a 6 bases, repetidos de 4 a probablemente 100 o más veces (Engel y Schultz, 1997). La variación en el número de repeticiones posibilita la formación de diferentes alelos.

Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN. Son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. A pesar de esto, la variabilidad que presentan resulta útil y versátil para su uso como marcadores moleculares, particularmente para determinar diferenciación de la población, procedentes de una tasa de mutación alta (Levinson y Gutman, 1987) durante la replicación, por adición o eliminación de unidades de repetición en comparación con los microsatélites originales.

Entre los insectos, las abejas y los abejorros fueron los primeros para los cuales se desarrollaron los microsatélites de ADN (Arnaud Estoup, Garnery, Solignac y Cornuet, 1995; A Estoup, Presa, Krieg, Vaiman y Guyomard, 1993) con la finalidad de determinar zonas de introgresión entre *A. m. mellifera* y *A. m. ligústica*. Diversos estudios sobre la diferenciación de *A. mellifera* en diferentes poblaciones provenientes tanto de África como de Europa y Asia se han llevado a cabo empleando diferentes loci de microsatélites siendo posible la detección en algunos casos de introgresión entre las poblaciones analizadas (Arnaud Estoup y col., 1995; Garner y col., 1998b). La forma más común para detectar microsatélites es diseñar primers que son únicos a un locus del genoma y al par de base a cada lado de la porción repetida. De modo que un único par de primers funciona para cada individuo de la especie y produce amplicones de diferente talla para cada uno de los alelos (figura 3). La combinación de dos o más loci en un análisis simultáneo empleando un PCR multiplex permite alcanzar una mayor efectividad en el análisis pues se registran Varios punto de mutación a la vez.

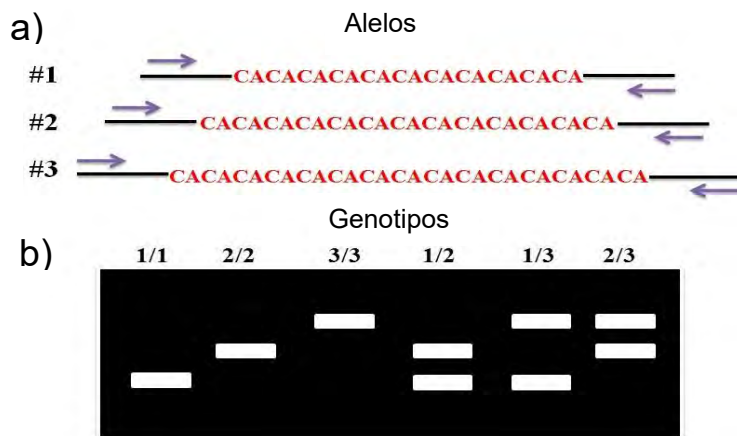


Figura 3: Esquema del análisis electroforético de un locus de microsatélite. a) representación de un locus de microsatélite con un número variable de repeticiones de la secuencia base-b)- Gel de electroforesis del mismo locus de microsatélites: carril 1/1 individuo homocigótico del alelo 1, carril 2/2 individuo homocigótico del alelo 2, carril 3/3 individuo homocigótico del alelo

3, carril 1/2 individuo heterocigótico con los alelos 1 y 2, carril 1/3 individuo heterocigótico con los alelos 1 y 3 y carril 2/3 individuo heterocigótico con los alelos 2 y 3. Tomado de genomics.cafs.ac.cn/ssrdb/index.php?do=about.

El análisis mediante loci de microsatélites de conjunto con análisis de DNA mitocondrial permite un análisis más complejo y detallado debido a que son dos tipos de marcadores independientes (Garner y col., 1998a, 1998b). Un ejemplo de los antes mencionado es el estudio desarrollado por Franck y colaboradores en el cual se demostró que las abejas ibéricas presentaban una influencia limitada de África del Norte siendo una subespecie bastante pura (Franck, Garnery, Celebrano, Solignac y Cornuet, 2000). Sin embargo los resultados de la filogenia basada en análisis de ADN mitocondrial y ADN nuclear no siempre son congruentes, lo cual se atribuye a que dichos marcadores presentan modos diferentes de evolución y de transmisión (Avice, 2012; Bouga y col., 2005; Moritz, Dowling y Brown, 1987).

Los problemas y las posibles dificultades con el uso de microsatélites competen esencialmente a la homoplasia entre diferentes especies. En biología molecular, se le denomina alelos homoplásicos u homoplásticos a fragmentos que tienen el mismo tamaño pero no la misma secuencia de bases (basándose en la metodología de separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de los fragmentos generados por PCR). Sin embargo en PAGE bajo condiciones desnaturalizantes se parte de la hipótesis de que fragmentos de igual tamaño tienen la misma secuencia es por esto, que los alelos homoplásicos llevan a error en el sentido que pueden hacer pensar que dos fragmentos son iguales cuando en realidad sólo tienen en común la longitud en pares de bases. En el análisis filogenético este fenómeno conduce a interpretaciones erróneas, haciendo a los organismos homoplásicos parecer más cercanos de lo que realmente son (Arnaud Estoup y col., 1995).

Estudios detallados demostraron que 7 alelos diferentes, tienen la misma longitud de microsatélites en el locus A113 en ocho poblaciones (Viard, Franck, Dubois, Estoup y Jarne, 1998). Debido a que la mayoría de los estudios sobre los microsatélites de ADN se limitan a la determinación de la longitud de cada alelo, entonces tiene lugar una subestimación de la riqueza alélica. Esta es una advertencia importante a tener en cuenta al interpretar los resultados de los estudios entre las poblaciones de abejas pertenecientes a diferentes linajes.

Empleo de polimorfismo de nucleótidos simples

El polimorfismo de un único nucleótido o de nucleótidos simples (SNP), es una variación en la secuencia de ADN que afecta una sola base: Adenina (A), Timina (T), Citocina (C) o Guanina (G) de una secuencia del genoma. Sin embargo, algunos autores consideran que los cambios de unos pocos nucleótidos, como también pequeñas inserciones y deleciones pueden ser consideradas como SNP, donde el término Polimorfismo de nucleótido simple es más adecuado. Una de estas

variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP de lo contrario es considerado entonces como una mutación puntual.

Los SNP que se localizan dentro de una secuencia codificante pueden modificar o no la cadena de aminoácidos que producen, llamándose SNP no-sinónimos cuando el cambio de base produce un nuevo aminoácido de naturaleza diferente al original, y SNP sinónimo (o mutación silenciosa) cuando el cambio de base produce un nuevo aminoácido de igual naturaleza.

Un método extendido para la detección de SNP es el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (SNP-RFLP) el cual tiene como fundamento que si un alelo contiene un punto de reconocimiento para una enzima de restricción mientras que otro no, la digestión de los dos alelos genera fragmentos de diferente longitudes. Si no existe este punto discriminatorio para la enzima de restricción, a menudo puede introducirse mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Debido a que los SNP no cambian mucho de una generación a otra, es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones. Además resultan muy útiles en la identificación de subespecies debido a que permite el empleo de métodos más potentes y robustos que conducen a una identificación más fiable y a una estimación más precisa de los niveles de introgresión.

Este marcador genético ha sido utilizado en estudios de africanización e introgresión entre las abejas africanas y europea (Behura y col., 2006), del mismo modo que han sido empleadas en los estudios de introgresión e identificación genética de las abejas comerciales y nativas especialmente en los países europeos donde la actividad apícola, fundamentalmente el comercio de reinas, ha favorecido la distribución de subespecies de *Apis mellifera* (Muñoz y col., 2015). Estos marcadores también han sido útiles en estudios de introgresión de abejas del linaje C en las abejas negras (Henriques y col., 2012), en estudios de biogeografía y filogenia de abejas africanizadas y nativas, y para la realización de un mapa genético basado en selección positiva de las abejas obreras teniendo en cuenta el alto flujo de genes y el remplazamiento, del mismo modo que ha sido útil en el entendimiento de los orígenes y las diversas migraciones de *Apis mellifera*.

El empleo de SNPs para la identificación de las subespecies requiere tecnologías de alto rendimiento y es necesario un ensayo de SNP (comercialmente disponible o desarrollado en el laboratorio), lo cual resulta un inconveniente si se tiene en cuenta la cantidad de tiempo y el equipamiento de alta tecnología requerido para su desarrollo. Otra desventaja relacionada con este tema es que a diferencia de los seres humanos y otros organismos modelo, sólo hay un ensayo de SNP comercial disponible para las abejas de la miel el cual fue diseñado para la detección de la tolerancia a Varroa en *A. m. cárnica* por lo tanto su aplicación en la identificación de las subespecies no es apropiado (Spötter, Gupta, Nürnberg, Reinsch y Bienefeld, 2012).

Otros obstáculos de trabajar con miles de loci de SNP están relacionados con el tamaño de los conjuntos de datos, ya que requieren ordenadores más potentes, sobre todo para los análisis y el alto costo de las técnicas empleadas en el genotipado.

Los microsatélites como marcadores nucleares

Los microsatélites de DNA son un tipo de secuencias repetidas en tándem un número variable de veces (VNTR, de sus siglas en inglés Variable of Tándem Repeats). Entre ellos se encuentran las repeticiones cortas en tándem (STR, de sus siglas en inglés short tándem repeats) y las repeticiones de secuencias simples (SSR, de sus siglas en inglés simple sequence repeats). De manera general los microsatélites son segmentos de ADN con un motivo de secuencia que va desde 1 a 6 bases, repetidos de 4 a probablemente 100 o más veces (Engel y Schultz, 1997). La variación en el número de repeticiones posibilita la formación de diferentes alelos.

Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN. Son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. A pesar de esto, la variabilidad que presentan resulta útil y versátil para su uso como marcadores moleculares, particularmente para determinar diferenciación de la población, procedentes de una tasa de mutación alta (Levinson y Gutman, 1987) durante la replicación, por adición o eliminación de unidades de repetición en comparación con los microsatélites originales.

Entre los insectos, las abejas y los abejorros fueron los primeros para los cuales se desarrollaron los microsatélites de ADN (Arnaud Estoup, Garnery, Solignac y Cornuet, 1995; A Estoup, Presa, Krieg, Vaiman y Guyomard, 1993) con la finalidad de determinar zonas de introgresión entre *A. m. mellifera* y *A. m. ligústica*. Diversos estudios sobre la diferenciación de *A. mellifera* en diferentes poblaciones provenientes tanto de África como de Europa y Asia se han llevado a cabo empleando diferentes loci de microsatélites siendo posible la detección en algunos casos de introgresión entre las poblaciones analizadas (Arnaud Estoup y col., 1995; Garner y col., 1998b). La forma más común para detectar microsatélites es diseñar primers que son únicos a un locus del genoma y al par de base a cada lado de la porción repetida. De modo que un único par de primers funciona para cada individuo de la especie y produce amplicones de diferente talla para cada uno de los alelos (figura 3). La combinación de dos o más loci en un análisis simultáneo empleando un PCR multiplex permite alcanzar una mayor efectividad en el análisis pues se registran Varios punto de mutación a la vez.

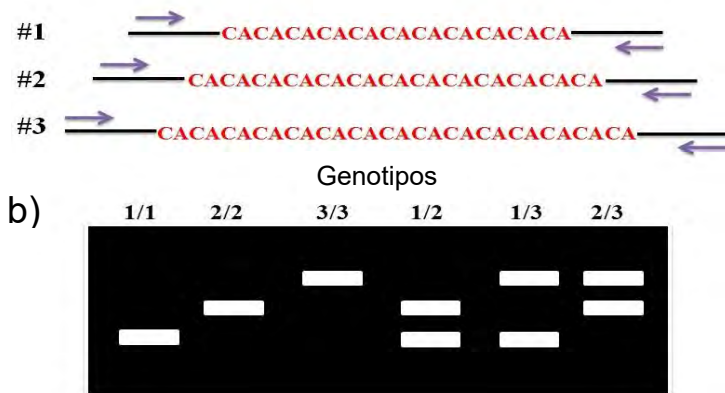


Figura 3: Esquema del análisis electroforético de un locus de microsatélite. a) representación de un locus de microsatélite con un número variable de repeticiones de la secuencia base-b)- Gel de electroforesis del mismo locus de microsatélites: carril 1/1 individuo homocigótico del alelo 1, carril 2/2 individuo homocigótico del alelo 2, carril 3/3 individuo homocigótico del alelo 3, carril 1/2 individuo heterocigótico con los alelos 1 y 2, carril 1/3 individuo heterocigótico con los alelos 1 y 3 y carril 2/3 individuo heterocigótico con los alelos 2 y 3. Tomado de genomics.cafs.ac.cn/ssrdb/index.php?do=about.

El análisis mediante loci de microsatélites de conjunto con análisis de DNA mitocondrial permite un análisis más complejo y detallado debido a que son dos tipos de marcadores independientes (Garner y col., 1998a, 1998b). Un ejemplo de los antes mencionado es el estudio desarrollado por Franck y colaboradores en el cual se demostró que las abejas ibéricas presentaban una influencia limitada de África del Norte siendo una subespecie bastante pura (Franck, Garnery, Celebrano, Solignac y Cornuet, 2000). Sin embargo los resultados de la filogenia basada en análisis de ADN mitocondrial y ADN nuclear no siempre son congruentes, lo cual se atribuye a que dichos marcadores presentan modos diferentes de evolución y de transmisión (Awise, 2012; Bouga y col., 2005; Moritz, Dowling y Brown, 1987).

Los problemas y las posibles dificultades con el uso de microsatélites competen esencialmente a la homoplasia entre diferentes especies. En biología molecular, se le denomina alelos homoplásicos u homoplásticos a fragmentos que tienen el mismo tamaño pero no la misma secuencia de bases (basándose en la metodología de separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de los fragmentos generados por PCR). Sin embargo en PAGE bajo condiciones desnaturalizantes se parte de la hipótesis de que fragmentos de igual tamaño tienen la misma secuencia es por esto, que los alelos homoplásicos llevan a error en el sentido que pueden hacer pensar que dos fragmentos son iguales cuando en realidad sólo tienen en común la longitud en pares de bases. En el análisis

filogenético este fenómeno conduce a interpretaciones erróneas, haciendo a los organismos homoplásicos parecer más cercanos de lo que realmente son (Arnaud Estoup y col., 1995).

Estudios detallados demostraron que 7 alelos diferentes, tienen la misma longitud de microsatélites en el locus A113 en ocho poblaciones (Viard, Franck, Dubois, Estoup y Jarne, 1998). Debido a que la mayoría de los estudios sobre los microsatélites de ADN se limitan a la determinación de la longitud de cada alelo, entonces tiene lugar una subestimación de la riqueza alélica. Esta es una advertencia importante a tener en cuenta al interpretar los resultados de los estudios entre las poblaciones de abejas pertenecientes a diferentes linajes.

Empleo de polimorfismo de nucleótidos simples

El polimorfismo de un único nucleótido o de nucleótidos simples (SNP), es una variación en la secuencia de ADN que afecta una sola base: Adenina (A), Timina (T), Citocina (C) o Guanina (G) de una secuencia del genoma. Sin embargo, algunos autores consideran que los cambios de unos pocos nucleótidos, como también pequeñas inserciones y deleciones pueden ser consideradas como SNP, donde el término Polimorfismo de nucleótido simple es más adecuado. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP de lo contrario es considerado entonces como una mutación puntual.

Los SNP que se localizan dentro de una secuencia codificante pueden modificar o no la cadena de aminoácidos que producen, llamándose SNP no-sinónimos cuando el cambio de base produce un nuevo aminoácido de naturaleza diferente al original, y SNP sinónimo (o mutación silenciosa) cuando el cambio de base produce un nuevo aminoácido de igual naturaleza.

Un método extendido para la detección de SNP es el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (SNP-RFLP) el cual tiene como fundamento que si un alelo contiene un punto de reconocimiento para una enzima de restricción mientras que otro no, la digestión de los dos alelos genera fragmentos de diferente longitudes. Si no existe este punto discriminatorio para la enzima de restricción, a menudo puede introducirse mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Debido a que los SNP no cambian mucho de una generación a otra, es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones. Además resultan muy útiles en la identificación de subespecies debido a que permite el empleo de métodos más potentes y robustos que conducen a una identificación más fiable y a una estimación más precisa de los niveles de introgresión.

Este marcador genético ha sido utilizado en estudios de africanización e introgresión entre las abejas africanas y europea (Behura y col., 2006), del mismo modo que han sido empleadas en los estudios de introgresión e identificación genética de las abejas comerciales y nativas especialmente en los países europeos donde la actividad apícola, fundamentalmente el comercio de reinas, ha favorecido

la distribución de subespecies de *Apis mellifera* (Muñoz y col., 2015). Estos marcadores también han sido útiles en estudios de introgresión de abejas del linaje C en las abejas negras (Henriques y col., 2012), en estudios de biogeografía y filogenia de abejas africanizadas y nativas, y para la realización de un mapa genético basado en selección positiva de las abejas obreras teniendo en cuenta el alto flujo de genes y el reemplazamiento, del mismo modo que ha sido útil en el entendimiento de los orígenes y las diversas migraciones de *Apis mellifera*.

El empleo de SNPs para la identificación de las subespecies requiere tecnologías de alto rendimiento y es necesario un ensayo de SNP (comercialmente disponible o desarrollado en el laboratorio), lo cual resulta un inconveniente si se tiene en cuenta la cantidad de tiempo y el equipamiento de alta tecnología requerido para su desarrollo. Otra desventaja relacionada con este tema es que a diferencia de los seres humanos y otros organismos modelo, sólo hay un ensayo de SNP comercial disponible para las abejas de la miel el cual fue diseñado para la detección de la tolerancia a *Varroa* en *A. m. carnica* por lo tanto su aplicación en la identificación de las subespecies no es apropiado (Spötter, Gupta, Nürnberg, Reinsch y Bienefeld, 2012).

Otros obstáculos de trabajar con miles de loci de SNP están relacionados con el tamaño de los conjuntos de datos, ya que requieren ordenadores más potentes, sobre todo para los análisis y el alto costo de las técnicas empleadas en el genotipado.

CONCLUSIONES

El uso de ADN nuclear brinda marcadores de gran utilidad para la realización de estudios filogeográficos en *A. mellifera*. Si bien el polimorfismo de haloenzimas fue en un primer momento de gran utilidad, sobre todo en combinación con datos morfométricos, el reciente desarrollo de la técnica ha dado lugar a su desplazamiento en favor de otros marcadores. El empleo de microsatélites se ha convertido en una opción excelente para estudios filogenéticos debido a que son secuencias no codificantes, por lo que no están sometidos a presiones evolutivas, y sobre todo debido a su alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. En el caso de las abejas se han empleado para detectar procesos de africanización y eventos de introgresión entre poblaciones silvestres y comerciales. Otro tipo de marcador nuclear, son los SNP que si bien constituyen una fuente muy importante de información no son tan empleados debido al costo y complejidad de los estudios que involucran estos marcadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, M. y Sheppard, W. (1996). *Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (Apis mellifera L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. Molecular phylogenetics and evolution*, 5(3), 557-566.
- Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*: Springer Science & Business Media.
- Badino, G., Celebrano, G. y Manino, A. (1983). *Population structure and Mdh-1 locus variation in Apis mellifera ligustica. Journal of Heredity*, 74(6), 443-446.
- Badino, G., Celebrano, G. y Manino, A. (1988a). *Genetica di popolazione delle sottospecie mediterranee di Apis mellifera L.sulla base di varianti alloenzimatiche. Apic. Mod*, 79, 233-239.
- Badino, G., Celebrano, G., Manino, A. y Ifantidis, M. D. (1988b). ALLOZYME VARIABILITY IN GREEK HONEYBEES (*APIS MELLIFERA* L.) 1. *Apidologie*, 19(4), 377-386.
- Behura, S. K., Johnston, S., Smith, D. R., Tsutsui, N. D., Whitfield, C. W., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Sheppard, W. S., Suarez, A. V. y Weave, D. (2006). Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314 (October 2015).
- Bouga, M., Harizanis, P. C., Kiliadis, G. y Alahiotis, S. (2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, 36.
- Coelho, I. y Mitton, I. (1988). Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation of enzymes in. *Ecology*, 2, 1-41.
- Cornuet, J. (1982). *The MDH polymorphism in some West Mediterranean honeybee populations*. Paper presented at the Proceedings of the IX Congress IUSSI, Westview Press, Boulder, CO.
- Cornuet, J., Daoudi, A. y Chevalet, C. (1986). Genetic pollution and number of matings in a black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) population. *Theoretical and Applied Genetics*, 73(2), 223-227.
- Cornuet, J. y Fresnaye, J. (1979). Honey yield in interracial honeybee (*Apis mellifica* L.) hybrids during successive generations of backcrosses to the local race. *Apidologie (France)*.
- De Jong, D. y De Jong, P. H. (1983). Longevity of africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). *Journal of economic entomology*, 76(4), 766-768.
- Dedej, S., Biasiolo, A. y Piva, R. (1996). Morphometric and alloenzymatic characterisation in the Albanian honeybee population *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 27, 121-132.
- Del Lama, M., Lobo, J., Soares, A. y Del Lama, S. (1990). analysis of Africanized honeybee populations.
- Engel, M. S. y Schultz, T. R. (1997). Phylogeny and Behavior in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90(1).

- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. y Cornuet, J.-M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140(2), 679-695.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D. y Guyomard, R. (1993). n and $(GT)_n$ microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L.(brown trout). *Heredity*, 71, 488-496.
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M. y Cornuet, J. M. (2000). Hybrid origins of honey bees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular ecology*, 9(7), 907-921.
- Garner, L., Franck, P., Baudry, E., Solignac, M., Vautrin, D. y Cornuet, J.-M. (1998a). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evo.*, 30.
- Garner, L., Franck, P., Baudry, E., Solignac, M., Vautrin, D. y Cornuet, J.-M. (1998b). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genet. Sel. Evo.*, 30.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G. y Cornuet, J. M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. . *Experientia*, 49.
- Garstide, D. (1980). Similar allozyme polymorphism in honeybees. *Apis mellifera*, 649-650.
- Henriques, D., Chavez-Galarza, J., Kryger, P., Johnston, J. S., De la Rúa, P., Rufino, J., Dall'Olio, R., Garnery, L. y Pinto, M. A. (2012). Introgression of lineage c honey bees into black honey bee populations: a genome-wide estimation using single nucleotide polymorphisms (SNPS).
- Ivanova, E., Bienkowska, M., Panasiuk, B., Wilde, J., Staykova, T. y Stoyanov, I. (2012). Allozyme variability in populations of *A. mellifera mellifera* (Linnaeus 1758.), *A. m. carnica* (Pollman, 1879) and *A. m. caucasica* (Gorbachev, 1916) from Poland. *Acta Zool. Bulg. Suppl*, 4, 81-88.
- Ivanova, E. N., Bienkowska, M. y Petrov, P. P. (2011). Allozyme polymorphism and phylogenetic relationships in *Apis mellifera* subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria. *Folia biologica*, 59(3-4), 121-126.
- Kandemir, I. y Kence, A. (1995). Allozyme variability in a central Anatolian honeybee. *Apis mellifera*, 503-510.
- Kandemir, I., Kence, M. y Kence, A. (2000). Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, 31(3), 343-356.
- Kerr, W. E. (1967). The history of the introduction of African bees to Brazil. *S. Afr. Bee J*, 39(2), 3-5.
- Kerr, W. E., Del Rio, S. d. L. y Barrionuevo, M. (1982). The southern limits of the distribution of the Africanized honeybee in South America [*Apis mellifera adansonii*]. *American Bee Journal*.

- Levinson, G. y Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*, 4(3), 203-221.
- Lobo, J. A., Del Lama, M. y Mestriner, M. (1989). Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). *Evolution*, 794-802.
- Meixner, M., Sheppard, W., Dietz, A. y Krell, R. (1994). Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie*, 25(2), 188-202.
- Meixner, M. D., Costa, C., Kryger, P., Hatjina, F., Bouga, M., Ivanova, E. y Büchler, R. (2010). Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 85-92.
- Meixner, M. D., Pinto, M. A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E. y Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4).
- Mestriner, M. (1969). Biochemical polymorphisms in bees (*Apis mellifera ligustica*).
- Miller Iii, D. y Ratnieks, F. (2001). The timing of worker reproduction and breakdown of policing behaviour in queenless honey bee (*Apis mellifera* L.) societies. *Insectes sociaux*, 48(2), 178-184.
- Moritz, C., Dowling, T. y Brown, W. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 269-292.
- Muñoz, I., Henriques, D., Johnston, J. S., Chávez-Galarza, J., Kryger, P. y Pinto, M. A. (2015). Reduced SNP Panels for Genetic Identification and Introgression Analysis in the Dark Honey Bee (*Apis mellifera mellifera*). *PloS one*, 10(4).
- Nunamaker, R. y Wilson, W. (1981). Comparison of MDH allozyme patterns in the African honey bee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the Africanized populations of Brazil. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 704-710.
- Rinderer, T., Bucu, S., Rubink, W., Daly, H., Stelzer, J., Riggio, R. y Baptista, F. (1993). Morphometric identification of Africanized and European honey bees using large reference populations. *Apidologie*, 24.
- Robinson, G. E., Page Jr, R. E. y Fondrk, M. K. (1990). Intracolony behavioral variation in worker oviposition, oophagy, and larval care in queenless honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 26(5), 315-323.
- Robinson, G. E. y Page, R. E. (1988). Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature*, 333(6171), 356-358.
- Ruttner, F. (1988). Biogeography and taxonomy of Honeybees.
- Ruttner, F. (1992). *Natural history of honey bees*: Ehrenwirth Verlag.

- Schiff, N. M. y Sheppard, W. S. (1995). Genetic analysis of commercial honey bees (Hymenoptera: Apidae) from the southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 88(5), 1216-1220.
- Sheppard, W. (1989). A history of the introduction of honey bee races into the United States. II. *American bee journal (USA)*.
- Sheppard, W., Arias, M., Grech, A. y Meixner, M. (1997). *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*, 28(5), 287-293.
- Sheppard, W. y Berlocher, S. (1984). Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. *Journal of Apicultural Research*, 23(2), 64-69.
- Sheppard, W., Huettel, M., Needham, G., Page Jr, R., Delfinado-Baker, M. y Bowman, C. (1988). Biochemical genetic markers, intraspecific variation, and population genetics of the honey bee, *Apis mellifera*. *Africanized honey bees and bee mites.*, 281-286.
- Sheppard, W. S. (1988). Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations. *Annals of the Entomological Society of America*, 81(6), 886-889.
- Sheppard, W. S. y McPheron, B. A. (1986). Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. *Apidologie*, 17(1), 21-32.
- Sheppard, W. S. y Meixner, M. D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34(4), 367-376.
- Spencer, R., Kleinpeter, S., Lancaster, V., Sylvester, T. E., Allen, R. H., Brown, M. A., Pesante, J. D., Daniel, V. y Collins, A. M. (1986). Field and simplified techniques for identifying Africanized and European honey bees.
- Spötter, A., Gupta, P., Nürnberg, G., Reinsch, N. y Bienefeld, K. (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(2), 323-332.
- Viard, F., Franck, P., Dubois, M.-P., Estoup, A. y Jarne, P. (1998). Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution*, 47(1), 42-51.
- Visscher, P. K. (1996). Reproductive conflict in honey bees: a stalemate of worker egg-laying and policing. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39(4), 237-244.