



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Caracterización morfométrica y molecular de las
abejas melíferas en la provincia de Huesca

Morphometric and molecular characterization of
honey bees in the province of Huesca

Autor

Javier Abizanda Cases

Director/es

Jesús Yániz Pérez de Albéniz

Ester Sales Clemente

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

2018

ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
Resumen.....	3
Abstract	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 El origen de la abeja	7
1.2 <i>Apis mellifera</i>	8
1.3 Técnicas para la identificación de las subespecies de <i>Apis mellifera</i>	10
1.3.1 Morfometría	10
1.3.2 Técnicas moleculares.....	16
1.4 La abeja ibérica: <i>Apis mellifera iberiensis</i>	22
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1 Muestreo.....	35
3.2 Adquisición y tratamiento de los datos obtenidos mediante el análisis morfométrico	37
3.2.1 Preparación de las muestras alares y adquisición de imágenes.....	37
3.2.2 Procedimiento de análisis de imagen.....	38
3.2.3 Caracterización mediante morfometría geométrica	40
3.2.4. Análisis estadístico.....	41
3.3 Adquisición y tratamiento de los datos obtenidos mediante el análisis molecular	41
3.3.1 Extracción y obtención de las muestras de ADN	41
3.3.2 Amplificación mediante PCR y electroforesis.....	42
3.3.3 Secuenciación y análisis de las secuencias amplificadas	43
4. RESULTADOS	47
4.1 Datos del análisis geométrico morfométrico del ala anterior derecha	47
4.2 Datos del análisis molecular de la región ARNt ^{leu} -COII del ADNmt.....	56

Índice

5. DISCUSIÓN.....	61
6. CONCLUSIONES	67
7. BIBLIOGRAFÍA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1. Imagen representativa de la pintura en la Cueva de la Araña (Sepúlveda, 1986).....	7
Figura 2. Esquema del ADN mitocondrial de <i>Apis mellifera</i> (Crozier y Crozier, 1993).	19
Figura 3. Abejas obreras nodrizas sobre el cuadro de puesta (a) y muestras conservadas en etanol absoluto en tubos de 50 ml debidamente identificados (b).....	35
Figura 4. a) Esquema de colocación de las alas sobre el portaobjetos. b) Muestras alares preparadas.	37
Figura 5. Equipo empleado para la obtención de las imágenes digitales: cámara Canon 600D montada sobre el microscopio Leica DM 4500B y controlada mediante el software EOS Utility.	38
Figura 6. a) Localización de los 19 puntos de las intersecciones de las venas (hitos) del ala delantera considerados en el análisis de morfometría geométrica en <i>A. mellifera</i> (WingMarks, CC BY-NCSA 4.0). b) Imagen procesada utilizada como plantilla (WingMarks, CC BY-NCSA 4.0). c) Posición de los 19 puntos de referencia y visualización de la forma promedio representada por las líneas blancas (Rašić y col., 2015).	40
Figura 7. Visualización de productos de la PCR obtenidos mediante el par de cebadores E2-H2 a partir de ADN de abejas de diferentes apiarios. Las primeras y últimas columnas de las dos líneas de pocillos se corresponden a los marcadores de pesos moleculares.	43
Figura 8. Diagrama de dispersión de <i>Apis mellifera</i> obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando todos los individuos. Negro: <i>A. m. iberiensis</i> ; rosa: <i>A. m. ligustica</i> ; rojo: Buckfast x <i>A. m. carnica</i> x <i>A. m. iberiensis</i> ; azul: <i>A. m. carnica</i> ; verde: Buckfast; amarillo: F1 Buckfast x <i>A. m. iberiensis</i> . *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad.	47
Figura 9. Diagrama de dispersión de <i>Apis mellifera</i> obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando las medias por colmena. Negro: <i>A. m. iberiensis</i> ; rosa: <i>A. m. ligustica</i> ; rojo: Buckfast x <i>A. m. carnica</i> x <i>A. m. iberiensis</i> ; azul: <i>A. m. carnica</i> ; verde: Buckfast; amarillo: F1 Buckfast x <i>A. m. iberiensis</i> . *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad.	48
Figura 10 (a). Gráficos de gradillas de <i>A. m. iberiensis</i> (Iberi), Buckfast (Buckf) y el híbrido F1 Buckfast x <i>A. m. iberiensis</i> (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de	

intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud y dirección de la diferencia entre el ala promedio y el ala de las líneas seleccionadas. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 49

Figura 10 (b). Gráficos de gradillas del híbrido Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni) y *A. m. ligustica* (Ligus).* Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud y dirección de la diferencia entre el ala promedio y el ala de las líneas seleccionadas. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 50

Figura 11 (a). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 51

Figura 11 (b). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 52

Figura 11 (c). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 53

Figura 11 (d). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 54

- Figura 12.** Diagrama de dispersión de los colmenares de *A. m. iberiensis* obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando todos los individuos. *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad. 55
- Figura 13.** Diagrama de dispersión de los colmenares de *A. m. iberiensis* obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando las medias por colmena. *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad. 55
- Figura 14.** Gráficos de gradillas de comparación entre *A. m. iberiensis* linaje mitocondrial M (Iberi) y *A. m. iberiensis* linaje mitocondrial A (IberA). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad. 56
- Figura 15.** Linajes determinados en 36 abejas muestreadas en otros tantos apiarios, y número de abejas de cada linaje. 56
- Figura 16.** Linajes determinados en los 36 apiarios incluidos en el estudio. Azul: linaje M; rojo: linaje A; verde: linaje C, forma circular: 1 apiario; forma ovalada: 2 apiarios. 58

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1. Localización de los 36 apiarios incluidos en el estudio y número de colmenas muestreadas en cada uno.	36
Tabla 2. Haplotipos y linajes de las muestras representativas de los 36 apiarios.	57

RESUMEN/ ABSTRACT

Resumen

Las prácticas apícolas actuales están cambiando la distribución geográfica de la especie *Apis mellifera* en toda Europa, incluyendo la península ibérica en los últimos años. Estas prácticas provocan una pérdida en la variabilidad genética existente en la especie lo que hace necesario realizar programas de conservación. El primer paso para ello es el estudio de dicha variabilidad mediante la identificación de las subespecies, entre las 29 actualmente reconocidas, y la caracterización de la variabilidad genética intra-subespecie. Existen multitud de técnicas desarrolladas, aunque las más empleadas son las que se basan en la morfometría geométrica del ala y en la secuencia del ADN mitocondrial.

El objetivo general de este Trabajo Fin de Máster fue caracterizar la variabilidad genética en abejas melíferas de la provincia de Huesca, para conocer el estado actual de las explotaciones apícolas en lo que respecta a la conservación de la subespecie *Apis mellifera iberiensis*. Para ello se recogieron muestras de abejas obreras de 36 apiarios de diferentes comarcas. Se analizó la morfometría geométrica de las venas alares y la región ARNt^{leu}-COII del ADN mitocondrial. Los resultados morfométricos mostraron que existe una diferenciación entre *A. m. iberiensis* y el resto de subespecies e híbridos que se están introduciendo en esta región. Sin embargo, el análisis morfométrico no permitió diferenciar entre linajes de la subespecie *A. m. iberiensis*. Los resultados del análisis molecular fueron consistentes con los morfométricos. Los resultados moleculares muestran un cambio en la distribución geográfica de *A. m. iberiensis* en la provincia de Huesca en relación a estudios previos debido, por un lado, a un cambio en la distribución clinal de la península ibérica y, por otro, a la introducción de otras subespecies e híbridos.

Palabras clave.— *Apis mellifera iberiensis*, morfometría geométrica del ala, ADN mitocondrial, secuenciación, subespecies.

Abstract

Current beekeeping practices are changing the geographical distribution of the species *Apis mellifera* throughout Europe, including the Iberian Peninsula in recent years. These practices cause a loss in the existing genetic variability of the species, therefore conservation programs for this species must be carried out. The first step for this is the identification of the subspecies, among the 29 currently recognized, and the characterization of intra-breed genetic variability. There are multitude of techniques developed, although the most commonly used are those based on the geometric morphometry of the wing and the sequence of the mitochondrial DNA.

The main objective of this dissertation was to characterize the variability of honey bees in the province of Huesca, to learn about the current state of apiculture farms concerning the conservation of the subspecies *Apis mellifera iberiensis*. To this end, samples of worker bees were collected from 36 apiaries from different regions. The geometric morphometry of the wing veins and the RNAt^{leu}-COII region of the mitochondrial DNA were analyzed. The morphometric results showed that there is a differentiation between *A. m. iberiensis* and the rest of breeds and hybrids that are being introduced inside this region. However, the morphometric analysis did not allow to differentiate between lineages of the subspecies *A. m. iberiensis*. The results of the molecular analysis were consistent with the morphometric ones. The molecular results showed a change in the geographical distribution of *A. m. iberiensis* in the province of Huesca due, on the one hand, to a change in the clinal distribution of the Iberian Peninsula and, on the other hand, to the introduction of subspecies and hybrids.

Key words.— *Apis mellifera iberiensis*, wing geometric morphometric, mitochondrial DNA, sequencing, subspecies.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El origen de la abeja

El inicio de la existencia de las abejas es incierto y todo lo que hay son suposiciones sobre su origen, pues son muy escasos los fósiles de estos insectos conservados en ámbar. Una de las suposiciones planteadas es que su origen se debe a determinadas especies de avispas carnívoras que pasaron a consumir las proteínas que les ofrecía el polen de las plantas. Con el cambio alimenticio se acentuaría la transformación morfológica de aquellas primitivas abejas, sobreviviendo aquellas especies nuevas que debían su existencia a mutaciones genéticas que les adaptaban a las nuevas condiciones ambientales, quedando cada vez más vinculadas a las plantas que las alimentaban. Se estableció una gradación en el desarrollo de los cestillos del polen, de la lengua y del buche, para obtener y transportar el néctar y el polen, dando origen a numerosas especies más o menos adaptadas a la vida en común con las plantas. Así, el avance evolutivo de la abeja se ha ido sucediendo hasta alcanzar la cumbre actual con la *Apis mellifera* (Sepúlveda, 1986).

Independientemente de las diversas hipótesis que se puedan plantear sobre su origen, la abeja ha sido un insecto también ligado a la evolución del hombre (Sepúlveda, 1986; Bravo y col., 1989). En España, el desarrollo apícola parte desde los tiempos de la prehistoria, dando constancia de ello las pinturas rupestres del arte levantino. El hombre del Levante español dejó su mensaje, desde el paleolítico, pintado en las piedras de la Cueva de la Araña, en Bicorp (Valencia) y en otros refugios con pinturas menos definidas. En la Cueva de la Araña se aprecia lo que parece ser una mujer alrededor de la cual se ven revolotear lo que se piensan que son abejas (Figura 1). En la península ibérica, las primeras explotaciones apícolas de las cuales hay registros aparecen en el reino de Tartesos (1000-500 a.C.). Desde entonces son varias las obras donde se hace referencia a la apicultura española, desde la época romana hasta la actual (Sepúlveda, 1986).



Figura 1. Imagen representativa de la pintura en la Cueva de la Araña (Sepúlveda, 1986).

Fuera de la geografía española, las primeras referencias de la apicultura se pueden encontrar en regiones como Natal (África del Sur), Zimbawe y la India, así como en las antiguas civilizaciones egipcia, griega y romana, y en el imperio de Carlomagno (Bravo y col., 1989).

1.2 *Apis mellifera*

El género *Apis* comprende cuatro especies: *Apis dorsata*, *A. florea*, *A. cerana* y *A. mellifera* (Jean-Prost y Medori, 1995), todas con un genoma de 16 cromosomas. Entre ellas, *A. mellifera* es la abeja de mayor interés económico y la que se ha expandido a nivel global a través de África, de Europa y Asia occidental (Miguel y col., 2010). Su nombre latino indica portadora de miel, y le fue dado por Linneo en la 10ª edición de su *Systema Naturae* en 1758; posteriormente le cambió el nombre por *Apis mellifica* (que fabrica miel) pero la Regla Internacional de Nomenclatura decidió que el primer nombre no puede ser cambiado, y por esta razón este es el más empleado en la bibliografía sobre apicultura. No obstante, hay algunas obras, especialmente europeas, en las que se denomina *Apis mellifica* (Sepúlveda, 1986). También es frecuente un tercer calificativo que da categoría de subespecie, localizadas en un país determinado o región, tales como *Apis mellifera ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasiana*, etc. Esto se debe a que dentro de la especie *A. mellifera* existen grandes agrupaciones con características propias que las diferencian entre sí, ocupando grandes áreas geográficas limitadas por barreras naturales que le dieron carácter a través de los milenios de su evolución filogenética. Estas grandes agrupaciones se diferencian a simple vista por sus características exteriores de coloración, siendo negras, amarillas o grises, que a su vez comprenden diversas subespecies (Sepúlveda, 1986).

La especie *Apis mellifera* muestra una considerable variación geográfica debido a la adaptación a factores del clima, vegetación, plagas y patógenos. Actualmente se conocen 29 subespecies de *Apis mellifera* en su rango de distribución por África, Europa y Asia occidental. Por otro lado, se han caracterizado en esta especie cinco linajes evolutivos basados en características morfométricas, moleculares, ecológicas, etológicas y fisiológicas. Cuatro de ellos se encuentran en la cuenca mediterránea: linaje africano (A), linaje de Europa occidental y del norte (M), linaje de Europa sudoriental (C) y linaje de Oriente Próximo y Medio (O) (Cánovas y col., 2008; Cánovas y col., 2011; Miguel y col., 2010; de la Rúa y col., 2013; Pinto y col., 2013; Charistos y col., 2014). Esta clasificación fue apoyada en gran parte por estudios del ADN mitocondrial que revelaron una quinta rama evolutiva adicional, llamada Y (Yemenítica de Etiopía) (Miguel y col., 2010; Meixner y col., 2013). Sin embargo, a pesar de que los estudios filogeográficos eran consistentes en términos de su descripción de las ramas evolutivas de *Apis mellifera*, todavía existía controversia sobre la diferenciación de la rama M y las poblaciones de

la rama A de África del Norte y, más específicamente, sobre la relación entre la subespecie *A. m. intermissa* (rama A), *A. m. mellifera* (rama M de Europa noroccidental) y *A. m. iberiensis* (rama M de la península ibérica) (Miguel y col., 2010).

Recientemente, con el advenimiento de las técnicas moleculares, los linajes C, M, A, O e Y, han sido confirmados. Además, se ha añadido un nuevo linaje independiente recientemente descrito, Z, que contiene las poblaciones de *Apis mellifera* diseminadas en Libia (Péntek-Zakar y col., 2015), lo que hace aumentar hasta 6 el número de linajes de *A. mellifera*.

Apis mellifera, como mencionábamos, es una especie con un gran valor económico que va más allá de la apicultura, ya que la mayor parte de la polinización animal, quizás el 80%, es la realizada por las abejas. El cálculo más reciente del beneficio económico global de la polinización asciende a un total de 265 billones de euros en productividad debida a la polinización de las plantas. Como en cualquier valoración de un servicio ecológico, el valor de la polinización es incalculable al resultar irremplazable (Yániz y col., 2016).

A pesar de su importancia, el número de abejas parece estar disminuyendo en todo el mundo, en especial, en Norteamérica y Europa. Un fenómeno de reciente aparición es la desaparición inexplicable de grandes poblaciones de abejas en las colmenas, conocida como *Colony Collapse Disorder* (CCD) o síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC). La mayor parte de esta despoblación abrupta sucede durante el invierno. En los últimos inviernos, la mortalidad media de las colonias en Europa se sitúa en torno al 20% anual, llegando a superar el 50% en algunos países y en años concretos (Yániz y col., 2016).

Aunque existe cierta unanimidad en que el SDC tiene un origen multifactorial, hay indicios de que la falta de diversidad genética de los linajes más frecuentemente utilizados en apicultura puede jugar un papel relevante (Ellis y col., 2010). La falta de diversidad genética hace a las abejas más susceptibles a los pesticidas y enfermedades (agentes nosógenos), que siempre aparecen como elementos determinantes en el SDC (Yániz y col., 2016). Sin embargo, la riqueza genética en la especie está cada vez más influenciada por la apicultura. La demanda de alto rendimiento económico por parte de las explotaciones apícolas, combinada con características de comportamiento deseables, ha llevado a cambios considerables causados por la cría sistemática de abejas (Meixner y col., 2013). Esto ha provocado una considerable disminución de la variabilidad genética de la especie, ya que los apicultores de todo el mundo prefieren el mismo tipo de abeja: mansa, trabajadora y buena para vivir en colmenas hechas por el hombre. Dos subespecies europeas, *Apis mellifera ligustica*, de Italia, y *Apis mellifera carnica*, de los Balcanes, son las predominantes en la apicultura en todo el mundo (Yániz y col., 2016). En

consecuencia, el patrón de distribución geográfica original de la especie se está disolviendo en toda Europa mediante importaciones masivas y una práctica creciente del comercio de reinas y de movimientos de colonias. Estas actividades ponen en peligro las subespecies y los ecotipos regionales con una tendencia creciente hacia la uniformidad de las poblaciones en toda Europa. Esta disminución de la diversidad genética reduce el potencial de las colonias para evolucionar en respuesta al cambio del ambiente, por ejemplo siendo menos capaces de controlar la temperatura de la colmena y, como se ha comentado, las hace más sensibles a los agentes nosógenos, como por ejemplo con menor capacidad para adaptarse al ácaro parásito *Varroa destructor* (Meixner y col., 2013). Debido a esta reducción de diversidad dada por la introducción de subespecies, son diversos los países Europeos (Francia, Dinamarca, Noruega, Suiza, Eslovenia y Austria) que cuentan con programas para proteger las poblaciones de abejas autóctonas (Muñoz y col., 2013). Existe en este sentido un consenso bastante generalizado sobre la necesidad de identificar estas valiosas variedades regionales para preservar a las abejas adaptadas a nivel local (Meixner y col., 2013).

1.3 Técnicas para la identificación de las subespecies de *Apis mellifera*

Las técnicas utilizadas en los estudios sobre *Apis mellifera* se pueden dividir en técnicas morfométricas y moleculares. Inicialmente el único método para describir la diversidad de las abejas fue la morfometría tradicional, denominada morfometría clásica. Posteriormente se desarrollaron métodos bioquímicos, como aloenzimas e isoenzimas, y marcadores moleculares de ADN nuclear o mitocondrial (Charistos y col., 2014). Sin embargo, a pesar de los diversos métodos desarrollados, la variabilidad de la abeja se estudió durante mucho tiempo a través de la morfometría, con la notable excepción del ADN mitocondrial (ADNmt) (Garnery y col., 1998). El análisis del ADNmt, al igual que la morfometría, nos permite distinguir los linajes principales de *Apis mellifera* (Garnery y col., 1992).

1.3.1 Morfometría

En el campo de la biología el estudio de la variación morfológica se ha basado fundamentalmente en el empleo de métodos cuantitativos que pretenden caracterizar el tamaño y la forma de los organismos: las llamadas técnicas morfométricas (Torcida y Perez, 2012).

Los primeros estudios morfométricos combinaron el empleo de medidas lineales entre puntos anatómicos con técnicas estadísticas uni y multivariadas para el análisis de las diferencias de tamaño y de forma. Este enfoque, actualmente denominado morfometría clásica o tradicional, alcanzó gran desarrollo en la segunda mitad del siglo XX por la creciente

disponibilidad de computadoras y de programas para análisis estadísticos multivariados. A finales del siglo XX se afianzó el enfoque cuantitativo que hoy denominamos morfometría geométrica o síntesis morfométrica. Se definió como la fusión empírica de la geometría con la biología y tuvo como propósito extraer información de la geometría de una forma biológica para propósitos comparativos particulares (Torcida y Perez, 2012).

En el campo de la apicultura, el concepto de morfometría se desarrolló tras la introducción del concepto de taxonomía numérica de la abeja melífera por DuPraw en los años 1964 y 1965 (Meixner y col., 2013), que fue el primero en utilizar un conjunto de características cuantitativas para la venación de alas (Charistos y col., 2014), y fue desarrollado a fondo por Ruttner y col. en 1978, permitiendo diferenciar entre subespecies de *Apis mellifera*. La diferenciación de subespecies se basa en características morfométricas, las cuales muestran cambios graduales entre rangos, principalmente entre subespecies que a menudo difieren solo ligeramente en los valores medios de varios caracteres corporales. Las partes del cuerpo más utilizadas en los análisis morfométricos se pueden dividir en cuatro categorías principales: caracteres de tamaño corporal, patrones de coloración, características de venación de ala (ángulos y distancias definidas por los puntos de intersección de las venas) y características de pilosidad. De todos los caracteres descritos en la literatura, el conjunto de 36 caracteres discriminantes basados en la aplicación de la taxonomía numérica descritos por Ruttner en 1988 es el que contiene las medidas denominadas morfometría clásica. Este autor proporcionó la única compilación completa y bien documentada de datos para caracteres morfométricos para la mayoría de las subespecies de *Apis mellifera* (Meixner y col., 2013).

Los datos obtenidos en estudios de morfometría clásica son de excelente calidad (Garnery y col., 1998). Por ejemplo son los empleados para la identificación de abejas africanizadas (híbridos entre la subespecie africana *A. m. scutellata* con otras subespecies de *A. mellifera* como *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis* y otras) debido a su alta viabilidad y bajos costos (Francoy y col., 2008). Sin embargo, estos datos no son adecuados para inferir relaciones filogenéticas entre subespecies (Garnery y col., 1992). Por otro lado, los estudios filogeográficos basados en datos morfológicos tradicionales son en gran medida consistentes en términos de descripción de las ramas evolutivas de *Apis mellifera* (Miguel y col., 2010).

El sistema de clasificación descrito por Ruttner en 1988 es el más aceptado y, aunque es eficiente, la clasificación con tales características es muy lenta (Silva y col., 2015). Se han realizado varios intentos para simplificar la determinación morfológica, como la reducción del número de caracteres, utilizando una sola célula de ala o usando un programa diseñado específicamente para las mediciones morfométricas. En 1978, Daly y Balling aplicaron con éxito

Introducción

un método para diferenciar las abejas africanizadas y europeas en América del Sur (Charistos y col., 2014). Este método consistía en medir manualmente 25 caracteres de las alas, esternitos y patas con un micrómetro ocular. Estas medidas fueron analizadas con estadísticas multivariantes para hacer las identificaciones (Francoy y col., 2008).

Más tarde, en 1982, Daly y col. comenzaron a utilizar mediciones digitales para investigar la morfometría de *Apis mellifera*, reduciendo significativamente el tiempo necesario para medir, almacenar y analizar los datos. Desde entonces, se han publicado muchas investigaciones centradas en determinaciones morfométricas y utilizando métodos multivariantes (Charistos y col., 2014). El inicio de las mediciones digitales surgió como un método mejorado del anterior, el cual llevó al desarrollo del primer *software* específico. La mejora consistió en la incorporación de mediciones computarizadas obteniéndose el "*Fast Africanized Bee Identification System*" (FABIS) para la identificación preliminar en el campo. Este método utiliza 25 medidas morfométricas, introducidas manualmente en un programa informático, de cinco partes de cada abeja montadas en bálsamo. Aunque tiene una buena precisión, requiere personal especializado y varias horas de preparación y análisis por cada muestra de 10 abejas. Estas limitaciones y la continua reducción de los costos de la tecnología de biología molecular convirtieron a los sistemas de reconocimiento de ADN en una alternativa atractiva a la morfometría (Francoy y col., 2008). A pesar de lo anterior, los métodos morfométricos se siguieron desarrollando y avanzando.

La búsqueda en la reducción y simplificación de trabajo ha llevado a la mayoría de los investigadores a utilizar 10 o menos caracteres del conjunto descrito por Ruttner en 1988, variando considerablemente en la elección y número de los caracteres escogidos, e incorporando ocasionalmente caracteres adicionales (Meixner y col., 2013). La elección de estos caracteres es fundamental para obtener datos que permitan realizar una buena clasificación de los individuos analizados, evitando siempre aquellos caracteres que proporcionen información irrelevante (Silva y col., 2015). La misma tendencia se ha buscado mediante la reducción del número de abejas necesarias para realizar el análisis morfométrico, siendo recomendable un mínimo de 10 abejas que pueden reducirse a 5 con rasgos más estables como la venación de las alas. Es por ello, que poco a poco se ha ido estableciendo el análisis de la venación de las alas como el método morfométrico más utilizado actualmente. También se ha observado que filogenéticamente, la venación del ala es más informativa en comparación con las categorías de tamaño, color o pilosidad más sensibles al medio ambiente y, por lo tanto, representa un conjunto de caracteres algo comparable a los caracteres moleculares (Meixner y col., 2013).

Miguel y col. (2010) refirieron un alto grado de consistencia entre la morfometría de ala y la información molecular.

Existen tres enfoques principales para realizar el análisis de la venación de las alas: en primer lugar la morfometría de ala clásica, como lo define Ruttner (1988), que captura la variación en la forma del ala calculando 11 ángulos entre 18 uniones en la venación del ala que constituyen un subconjunto de un conjunto de 17 ángulos introducidos por DuPraw en 1965. En segundo lugar el método DAWINO (análisis discriminante con rendimiento numérico) que ha sido el menos utilizado. Este método utiliza el conjunto completo de ángulos definido por DuPraw, complementado por 7 mediciones lineales, 5 índices y un área. El tercer método es el análisis geométrico de forma del ala o morfometría geométrica del ala (Meixner y col., 2013), que desde su desarrollo inicial ha mostrado repetidamente tener un mejor poder descriptivo y un mayor poder estadístico que la morfometría tradicional. Este método ha demostrado su utilidad en la caracterización e identificación de poblaciones o linajes, en el estudio del proceso de africanización de las poblaciones americanas, o incluso en análisis más exigentes de heredabilidad o asimetría de ala individual (Miguel y col., 2010).

El método denominado morfometría geométrica del ala reemplazó a los anteriores métodos morfométricos en las décadas de 1980 y 1990. Este método se basa en las coordenadas cartesianas de 19 puntos de referencia ubicados en las intersecciones de las venas del ala, denominados hitos (Torcida y Perez, 2012). La numeración de la localización de los 19 puntos varían de unos estudios a otros, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de compararlos (Meixner y col., 2013). El enfoque más extendido en la morfometría geométrica es representar cada espécimen por las posiciones relativas de los puntos de referencia morfológicos que se pueden ubicar con precisión y establecer una correspondencia uno a uno entre todos los individuos (Klingenberg, 2011). Este enfoque de la morfometría geométrica, que se basa en la teoría de la forma, utiliza el Análisis de Procrustes para estudiar las coordenadas cartesianas de los puntos anatómicos. Este análisis se utiliza para obtener variables de tamaño y de forma a partir de las coordenadas cartesianas de puntos y analizarlas posteriormente mediante el empleo de técnicas estadísticas multivariadas (Torcida y Perez, 2012). La forma se define como toda la información geométrica sobre una configuración de hitos excepto por su tamaño, posición y orientación (Klingenberg, 2011). Existen dos metodologías para realizar el Análisis de Procrustes: la superposición por mínimos cuadrados y la superposición robusta por medianas repetidas (Torcida y Perez, 2012). De estas dos metodologías, la primera es la que comúnmente utilizan los programas empleados en estudios de entomología. El proceso de medición mediante la superposición de las coordenadas del punto de referencia mediante mínimos cuadrados o GLS

Introducción

(*Generalized Least Squares*) es el siguiente: en primer lugar las muestras se centran, se normalizan a unidades de tamaño centrado y se rotan interactivamente para minimizar la suma de distancias al cuadrado entre cada ubicación y su promedio de muestra (Meixner y col., 2013), es decir, elimina la variación en tamaño, posición y orientación de los datos sobre las coordenadas del punto de referencia (Klingenberg, 2011). Las diferencias de forma se analizan mediante análisis multivariado de varianza (MANOVA), análisis de variables canónicas (CVA) y análisis de discriminación múltiple, y los patrones de forma a lo largo de los ejes canónicos se estiman mediante regresión multivariada. Para este tipo de análisis, los paquetes de software más utilizados han sido Morpheus, NTSYS, MorphoJ (Meixner y col., 2013) y DrawWing (Tofilski, 2004).

En la morfometría geométrica de la venación de las alas, un programa de uso frecuente es tpsDig (Rohlf, 2001), que requiere el trazado manual de todas las intersecciones de las venas con un clic del ratón. La principal ventaja de este *software* es su flexibilidad, pero requiere mucha interacción humana que es propensa a errores y problemas de reproducibilidad.

En 1995 Schröder y col. desarrollaron el primer *software* basado únicamente en características extraídas de las alas anteriores, el sistema ABIS (*Automatic Bee Identification System*). Este sistema no se basa en la morfometría geométrica. El sistema original fue mejorado a una nueva versión automática, que era capaz de identificar y marcar automáticamente los puntos de referencia en las imágenes digitales de las alas, requería menos información del usuario y tenía una mayor precisión en la identificación de especies de abejas que la versión original. Esta nueva versión del programa debía ser entrenada con al menos 20 ejemplares de cada clase (como especies, subespecie o población) (Francoy y col., 2008). ABIS fue capaz de discriminar a los miembros europeos de los géneros *Colletes*, *Andrena* y *Bombus* al nivel de especies con una precisión del 99,8% (Francoy y col., 2008; Charistos y col., 2014), e identificó correctamente el 94% de las abejas en una comparación de subespecies de *Apis mellifera*. Francoy y col. (2008) identificaron correctamente el 85% de los individuos de *A. m. ligustica* y el 80% de los individuos de *A. m. carnica*. A pesar de obtener buenos resultados en la identificación de abejas, su método de extracción de características impedía la identificación de especies sin agujijón (Silva y col., 2015).

Tofilski desarrolló en el año 2004 el sistema DrawWing, que permite la identificación automática de 18 hitos para algunos géneros. Sin embargo, solo es posible realizar la identificación en tres especies previamente definidas por el autor, y este *software* no puede ser entrenado para identificar nuevas especies (Silva y col., 2015). Según los autores, este *software* reduce el tiempo de análisis y mejora la precisión en la identificación de los hitos. El equipo

recomendado para el análisis con el *software* DrawWing fue un escáner fotográfico. Sin embargo, el uso de este *software* con imágenes obtenidas con diferentes equipos parece ser problemático, lo que puede explicar por qué en la mayoría de los artículos sobre este tema, excepto en aquellos en que Tofilski participó como coautor, investigadores como Franco y col. (2008), Charistos y col. (2014), Francis y col. (2014) y Rašić y col. (2015), entre otros, han seguido utilizando el *software* tpsDig en lugar de DrawWing.

En un intento de automatizar el proceso de captura, nuestro grupo ha desarrollado un programa específico, el WingMarks (disponible en <http://iuca.unizar.es/es/noticias/wingmarks-software>). Este *software* escrito en MATLAB permite realizar el análisis geométrico de las imágenes pero únicamente está diseñado para *Apis mellifera*. Además, está adaptado para la utilización de diferentes equipos en la obtención de imágenes y es el que se utilizó en este trabajo final de grado.

El *software* MorphoJ combina la superposición de Procrustes con una amplia gama de métodos para el análisis de formas en diferentes contextos biológicos. El programa ofrece un entorno integrado y fácil de usar para análisis multivariados estándar, como componentes principales, análisis discriminante y regresión multivariante, así como aplicaciones especializadas que incluyen filogenia, genética cuantitativa y análisis de modularidad en datos de formas (Klingenberg, 2011). Este programa es el normalmente utilizado por los autores tras obtener las coordenadas de las uniones venosas (Charistos y col., 2014; Francis y col., 2014; Rašić y col., 2015; Yániz y col., 2016).

Los nuevos métodos de medidas automatizadas y morfometría geométrica junto con los avances en el análisis estadístico y el *software* de reconocimiento de imágenes han hecho que este método sea rentable, rápido y preciso. Estos métodos proporcionan información que refleja el origen genético de las poblaciones de *Apis mellifera* (Miguel y col., 2010). Se han utilizado para distinguir las abejas africanizadas de las subespecies africanas y europeas y para la caracterización de los linajes evolutivos de *A. mellifera* (Meixner y col., 2013). Este método también se ha utilizado para identificar subespecies (Silva y col., 2015) y para explicar las diferencias entre las subespecies de *A. mellifera* mediante la interpretación de gráficos de vectores de subespecies y gradillas de deformación (Rašić y col., 2015). Por ejemplo, se utilizó para analizar las diferencias entre tres subespecies de *Apis mellifera* en Polonia: *A. m. mellifera*, *A. m. carnica* y *A. m. caucasica* (Meixner y col., 2013). En un estudio reciente elaborado por Oleksa y Tofilski (2015) la morfometría geométrica del ala y el análisis de microsatélites proporcionaron una discriminación similar de las subespecies de *Apis mellifera*, mostrando que la morfometría de venación del ala es adecuada para rastrear las relaciones filogenéticas entre

Introducción

las subespecies. Rašić y col. (2015) encontraron diferencias entre líneas de cría a nivel de colonia en *A. m. carnica* en Serbia y Montenegro, mediante la comparación de gráficos de gradillas, por lo que este enfoque permitió diferenciar niveles taxonómicos menores, por ejemplo ecotipos o líneas de cría, lo cual no había sido evidenciado anteriormente. Las regiones del ala que más contribuyen a la discriminación son fácilmente identificadas en la deformación de gradillas (Kandemir y col., 2011).

Los beneficios fundamentales de la morfometría geométrica sobre los enfoques tradicionales incluyen el nuevo método empleado para cuantificar la diferencia entre las formas (el Análisis de Procrustes), la explicación de las propiedades del espacio de manera multidimensional, el desarrollo de métodos estadísticos especializados para el estudio de la forma y el desarrollo de nuevas técnicas para la representación gráfica de los resultados (Meixner y col., 2013). Es decir, la morfometría geométrica proporciona una mejor información acerca del tamaño y la forma de una estructura desde un punto de vista cuantitativo frente a los métodos anteriores (Torcida y Perez, 2012). Meixner y col. (2013) observaron que este método fue más preciso que la morfometría clásica del ala aunque el grado de mejora fue moderado. También corroboraron que las alas anteriores proporcionan suficiente información para distinguir los grupos de abejas debido a la alta precisión en la clasificación obtenida. Apoyando a este último estudio, Silva y col. (2015) indicaron que la morfometría geométrica utilizada a partir de las imágenes del ala produjo una buena clasificación de *Apis mellifera*, indicando que también podría aplicarse para clasificar otras especies. Sin embargo, hasta el momento este método solo se ha utilizado para diferenciar algunas subespecies dentro de *Apis mellifera*. Por tanto, aunque dentro de la morfometría el análisis geométrico automatizado del ala puede resultar ser el método de identificación más eficiente en el futuro, aún no está claro cómo este método discriminará a todas las subespecies europeas y ecotipos conocidos entre sí; a pesar de que a partir de estas coordenadas utilizadas en la mayoría de los estudios geométricos se pueden calcular los 30 caracteres DAWINO, que incluyen los ángulos de alas de Ruttner (1988). Sin embargo, las coordenadas no pueden ser creadas desde los ángulos de ala clásicos (Meixner y col., 2013) aunque en un estudio realizado se intentó volver a medir las muestras de referencia con el método geométrico para vincular la morfometría geométrica a las caracterizaciones de subespecie obtenidas por el método clásico (Kandemir y col., 2011).

1.3.2 Técnicas moleculares

El estudio del polimorfismo enzimático surgió entre las décadas de los 60 y los 70, aplicándose a la caracterización de innumerables especies. En el caso del orden social de *Hymenoptera* la variabilidad genética detectada permaneció desesperadamente baja. Solo se

lograron avances significativos con la introducción de las tecnologías del ADN, el ADNmt primero y luego los marcadores nucleares, como el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) o los microsatélites (Garnery y col., 1998).

Los análisis llevados a cabo en *A. mellifera* se han basado en la variación de dos tipos de marcadores: las aloenzimas y los basados en el ADN nuclear (RFLP, RAPD, AFLP y microsatélites). Las aloenzimas y los microsatélites han sido los marcadores más utilizados en las poblaciones de abejas europeas. Además los microsatélites también han sido ampliamente utilizados en las poblaciones de abejas africanas. El resto de marcadores nucleares se han usado principalmente en estudios sobre el proceso de africanización en el continente americano (Muñoz, 2013; Péntek-Zakar y col., 2015). A pesar de ello, las técnicas moleculares se han utilizado en multitud de estudios para fines diversos, tal como se muestra mediante algunos ejemplos a continuación.

Los marcadores RAPD fueron utilizados para mapear el genoma de *Apis mellifera* (Hunt y Page, 1995). Sin embargo, y a pesar de su variabilidad, estos marcadores siguieron siendo de poco interés para el análisis genético de población donde las abejas obreras diploides son la principal fuente de ADN. Se desarrolló también una sonda híper-variable para el análisis de población, pero un solo locus no fue suficiente para caracterizar la diversidad genética de las poblaciones. Hasta finales de la década de 1990, los microsatélites se utilizaron principalmente en *Apis mellifera* en los campos de la evolución molecular, modelos teóricos de mutaciones y sociobiología (Garnery y col., 1998).

Más recientemente, en 2006, un estudio basado en marcadores polimórficos de un solo nucleótido (SNPs), llevado a cabo por Whitfield y col., sirvió para revelar una marcada diferenciación entre todas las ramas descritas por Ruttner en 1988. Detectaron diferencias importantes entre las ramas A y M, aunque las diferencias fueron menores que entre las ramas M y C. Las poblaciones del norte de África se agruparon cerca del resto de las poblaciones africanas y lejos de las europeas occidentales (Miguel y col., 2010).

Otro ejemplo de la utilidad de las técnicas moleculares son los estudios desarrollados en los que se utilizan marcadores nucleares de herencia biparental para controlar la introgresión entre la endémica *A. m. mellifera* y la subespecie del linaje C introducida. A este respecto, los primeros estudios se basaron en la utilización de microsatélites y RFLP amplificados mediante PCR, mientras que Muñoz y col. (2015) seleccionaron un subconjunto de SNPs altamente informativos, comúnmente conocidos como *Ancestry-Informative Markers* (AIMs), para realizar la identificación genómica y para medir la introgresión en *A. m. mellifera* en nueve países de

Introducción

Europa. Las abejas que utilizaron habían sido identificadas previamente con herramientas morfométricas y moleculares, empleando en este último caso microsatélites y ADNmt.

La introgresión se define como el movimiento de genes de una población a otra o entre taxones sociales diferentes, generalmente aisladas geográficamente, a través de la hibridación seguida por el retrocruzamiento, dando lugar a individuos híbridos fértiles que pueden desplazar a uno o ambos taxones parentales. En el caso de *Apis mellifera* la hibridación introgresiva ocurre tanto de manera natural por el apareamiento incontrolado entre zánganos y reinas de distintas subespecies (Muñoz, 2013; Péntek-Zakar y col., 2015), como antrópica. Evaluar la introgresión es una actividad importante en los programas de mejoramiento de abejas, especialmente para llevar a cabo programas de conservación de subespecies nativas. Esta actividad requiere herramientas moleculares que sean confiables, baratas y preferiblemente automatizadas (Muñoz y col., 2015).

El ADNmt ha sido también ampliamente usado en estudios sobre la biogeografía de las poblaciones y subespecies y sobre la diversidad genética entre las poblaciones de *A. mellifera*. El genoma mitocondrial se caracteriza por su contenido conservado de genes, alto nivel de sustituciones de nucleótidos y por proporcionar un marcador uniparental (herencia materna) (de La Rúa y col., 2013; Péntek-Zakar y col., 2015). En el caso de *A. mellifera*, todos los miembros de una colmena (obreras y zánganos) comparten el mismo ADNmt, de forma que estudiando solo un individuo se obtiene información a nivel de colmena de forma directa (de La Rúa y col., 2013), ya que esta molécula circular no varía por recombinación, pasando sin alteración a la descendencia, salvo que haya mutaciones puntuales (de la Rúa, 1999). Esta característica no recombinante en combinación con ensayos relativamente simples y económicos ha hecho que el ADNmt sea uno de los marcadores más populares en los estudios genéticos de *Apis mellifera* (Meixner y col., 2013). Además, su análisis proporciona información sobre eventos evolutivos del pasado (de La Rúa y col., 2013).

En la mayoría de las especies animales estudiadas hasta ahora, el tamaño del ADNmt es notablemente homogéneo y está generalmente entre 16 y 20 kb. Obviamente, esto se debe primero a su alta conservación en el contenido de genes, pero también a la ausencia o falta de secuencias intergénicas y a la falta de intrones. El cromosoma mitocondrial de *A. mellifera* (Figura 2) contiene 13 genes codificantes de proteínas, dos genes ribosomales, 22 ARN transferentes y una región rica en A + T, y es conservativo en cuanto a la posición de los mismos. Ambas características son estables en términos evolutivos (Crozier y Crozier, 1993).

Introducción

Los estudios basados en RFLP consistían en digerir todo el genoma mitocondrial con endonucleasas de restricción aisladas de bacterias. Mediante esta técnica se confirmaron los linajes A, M y C, y se reveló la existencia de algunos haplotipos específicos de subespecies, aunque ningún conjunto de enzimas de restricción proporcionó un marcador de diagnóstico para la identificación de subespecies. Este método se reemplazó por los RFLP de PCR, en los que la variación se revela mediante restricción dentro de una región amplificada por PCR, para superar la desventaja del primer método, que requería grandes cantidades de ADN de alta calidad. Mediante este segundo método se pudo discriminar la variación en algunas subespecies de Europa del este, previamente no detectadas con otros métodos de ADNmt (Meixner y col., 2013).

El ensayo más popular de los RFLP de PCR ha sido la amplificación por PCR de la región no codificante localizada entre los genes ARNt^{leu} y COII seguida de la digestión con la endonucleasa *DraI*, lo cual genera patrones de bandas identificables por sus diferencias de tamaño (Garnery y col., 1993). Mediante esta prueba se han identificado más de 100 haplotipos que han asignados correctamente a sus linajes evolutivos. Sin embargo, a pesar del mayor poder de resolución de la prueba *DraI* en comparación con otros ensayos, este método no puede identificar a *Apis mellifera* a nivel de subespecie porque no produce haplotipos de diagnóstico (Meixner y col., 2013), es decir, haplotipos exclusivos de subespecie.

La variación en los fragmentos amplificados y digeridos se debe a que en la región amplificada, como se ha mencionado, se encuentran dos secuencias denominadas P y Q, que están presentes en distintas combinaciones y formas en los diferentes linajes de abejas. Actualmente hay descritas cuatro formas de la secuencia P: P (con 54 pb, típica de las subespecies del linaje de Europa occidental como por ejemplo *A. m. mellifera* y las poblaciones del norte de *A. m. iberiensis*), P₀ (con 67 pb, característica de las subespecies del linaje evolutivo africano y de las poblaciones del sur de *A. m. iberiensis*), P₁ (con 50 pb, presente en las poblaciones atlánticas de abejas) y P₂ (descrita en el linaje Y o etíopico). Mientras que solo una de las cuatro formas de secuencia P se encuentra en la región intergénica, hasta cuatro copias de la secuencia Q se pueden hallar en dicha región, excepto en las subespecies del linaje evolutivo C que no poseen ninguna copia de la secuencia P y solo presentan una copia de la secuencia Q (de la Rúa, 1999; de la Rúa y col., 2013; Muñoz, 2013). La secuencia Q presente en todas las subespecies tiene una longitud de 194 - 196 pb. Esta secuencia está dividida, a su vez, en tres subunidades según su similitud con regiones adyacentes del ADNmt: Q₁ es similar al extremo 3' del gen ARNt^{leu}, Q₂ es similar al gen del ARNt^{leu} y Q₃ es muy parecida a la secuencia P (de la Rúa, 1999). Desde la publicación de este test, se ha utilizado para estudiar la diversidad

genética en poblaciones nativas de abejas (Pinto y col., 2012; Muñoz, 2013) y también para determinar el origen de las poblaciones africanizadas y el proceso de africanización en el continente americano (Muñoz, 2013).

El ADN mitocondrial ha sido considerado una molécula neutral desde el punto de vista evolutivo. Sin embargo, se está acumulando evidencia de que está sujeto a presiones de selección. Este hecho ha llevado a utilizar la selección como posible alternativa para explicar la variación clinal formada por los linajes occidentales europeos y africanos en la península ibérica y la pérdida de haplotipos europeos en poblaciones de abejas africanizadas por heterosis negativa en híbridos. Teniendo en cuenta la alta tasa de mutación de la región intergénica ARNt^{leu}-COII, especialmente para las secuencias con más de dos elementos Q, y suponiendo un largo tiempo desde la invasión de África, este es un escenario plausible. Este escenario fue corroborado en un estudio por Pinto y col. (2013), en el cual se sugiere que el lado atlántico de la península ibérica ha sido un lugar de contacto de haplotipos de múltiples orígenes y posiblemente un lugar de diversificación materna.

Precisamente, ha sido con el ADNmt con el que se ha observado el origen híbrido de *A. m. iberiensis*, ya que muestra haplotipos pertenecientes a los linajes evolutivos A y M, lo que ha sido documentado en miles de muestras representativas de toda la península (Cánovas y col., 2011). Mediante la prueba *Dral* se evaluó la variación de la subespecie *A. m. iberiensis* (Pinto y col., 2012). La determinación del haplotipo presente en cada muestra se basa en la combinación de los tipos de secuencias presentes en la región intergénica descritos anteriormente (P y Q) y la posición variable de las secuencias dianas de la enzima *Dral* (de la Rúa y col., 2013).

Sin embargo, en los últimos estudios la variación en el ADNmt se evalúa mediante la secuenciación directa del fragmento amplificado en la región ARNt^{leu}-COII. La secuenciación se ha empleado principalmente para caracterizar nuevos haplotipos detectados previamente con la prueba *Dral*. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Pinto y col. (2012) en el que confirmaron 16 haplotipos presentes en Portugal mediante la secuenciación directa en ambas direcciones, utilizando los *primers* E2 y H2, mientras que por su parte Wu y col. (2017) constataron mediante esta estrategia la expansión de *Apis mellifera* en Taiwan. Por tanto, la secuenciación debe emplearse más a menudo ya que proporciona una mayor resolución que puede revelar patrones de diversidad que de otro modo no se habrían detectado (Meixner y col., 2013).

Una herramienta útil para realizar las comparaciones de secuencia obtenidas mediante secuenciación son los programas desarrollados para fines genéticos. Un ejemplo de dichos

programas es el *software* Geneious, que permite operar entre todos los sistemas operativos comúnmente utilizados. La aplicación proporciona módulos centrales para permitir la visualización, manipulación y transferencia de secuencias de ADN, secuencias de aminoácidos, alineaciones por pares y múltiples, árboles filogenéticos, estructuras tridimensionales o cromatogramas de secuencia, entre otros (Kearse y col., 2012).

1.4 La abeja ibérica: *Apis mellifera iberiensis*

La subespecie de abeja que habita en la península ibérica es la *Apis mellifera iberiensis*, diferenciada del resto de subespecies conocidas por primera vez por Goetze en 1964 (Bravo y col., 1989; de la Rúa, 1999). Los primeros estudios basados en la morfometría y el comportamiento constataron que las abejas del norte peninsular son más parecidas a las europeas septentrionales y las del sur a las africanas (de la Rúa, 2013).

Entre las 29 subespecies de abejas reconocidas, la subespecie *A. m. iberiensis* ha sido una de las más estudiadas para patrones de diversidad. De hecho, se han realizado estudios de *A. m. iberiensis* desde la década de 1970 utilizando la morfología, las enzimas, las feromonas, el ADNmt y los microsatélites (de la Rúa, 2013; Charistos y col., 2014), que apoyaron la primera hipótesis de que la subespecie *A. m. iberiensis* son el resultado de una amplia intergradación entre abejas del linaje M que sobrevivieron al último máximo glacial (hace aproximadamente unos 20.000 años), y abejas norteafricanas del linaje A que recolonizaron el suroeste europeo (de la Rúa, 2013). De estos estudios han surgido patrones diferenciales y complejos de diversidad, que aún no se han resuelto completamente (Pinto y col., 2012). En cualquier caso, en la revisión más reciente del género *Apis*, (Engel, 1999), basada en caracteres morfométricos, y según los resultados de análisis moleculares basados en caracteres nucleares, se considera que las poblaciones de *A. m. iberiensis* corresponden a una única subespecie (de la Rúa, 2013).

La primera hipótesis sobre el origen de la *A. m. iberiensis* fue propuesta por Ruttner en 1978, quien utilizando un amplio conjunto de caracteres morfológicos relacionados con las distancias del cuerpo y del ala, ratios y ángulos, color y pilosidad (Miguel y col., 2010) la incluyó en un amplio estudio filogenético de las subespecies conocidas, situándola como un eslabón entre la abeja del norte de África, *A. m. intermissa*, y la abeja centroeuropea, *A. m. mellifera* (Bravo y col., 1989). Ruttner sugirió que la subespecie *A. m. iberiensis* forma parte de una clina geográfica de subespecies que se extiende desde el norte de África a Europa occidental, pasando por la península ibérica. Esta clina la forman las subespecies *A. m. sahariensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. iberiensis* y *A. m. mellifera*. En el esquema de Ruttner, las subespecies *A. m. intermissa*, *A. m. iberiensis* y *A. m. mellifera* están asociadas formando el linaje evolutivo M de subespecies del

Mediterráneo occidental de *A. mellifera* y se les supone un origen gradual a partir del noreste del continente africano. Según esta hipótesis, la subespecie *A. m. iberiensis* se habría diferenciado antes que la subespecie *A. m. mellifera* (de la Rúa, 1999; Miguel y col., 2010).

Esta hipótesis, basada en estudios morfológicos, fue apoyada por Cornuet en 1982 y 1983 utilizando como marcador genético la aloenzima malato deshidrogenasa (Mdh) que situaba a la abeja española como tramo de transición entre la africana y la *A. m. europea*. Mediante el empleo de este marcador encontró en *A. m. iberiensis* unas frecuencias genéticas del locus Mdh entre las presentadas por las abejas africanas y la *A. m. mellifera* europea (Bravo y col., 1989). Estos estudios fueron respaldados por un estudio realizado por Bravo y col. (1989) en el que tomaron las provincias de Córdoba y Cádiz, estableciendo un gradiente norte-sur. Estudiaron dos loci enzimáticos, esterasas y Mdh. Los resultados obtenidos de estos dos loci situaban a *A. m. iberiensis* como punto intermedio entre las subespecies europeas y las africanas.

Estudios posteriores sobre la distribución de caracteres morfológicos en las poblaciones de *A. m. iberiensis*, proporcionaron la base para plantear una segunda hipótesis sobre el origen de *A. m. iberiensis*. Según esta hipótesis, esta subespecie es el resultado del contacto secundario entre dos subespecies originadas alopátricamente, *A. m. intermissa* en Marruecos y *A. m. mellifera* en algún lugar de Europa occidental. Al encontrarse ambas subespecies en la península ibérica se habría formado una nueva híbrida (de la Rúa, 1999). En 1989 los datos de Cornuet y Fresnaye, obtenidos tras analizar seis de los caracteres morfológicos de Ruttner en *A. m. iberiensis* (Miguel y col., 2010), corroboraron la presencia de una zona de hibridación entre las subespecies africanas y las europeas occidentales de *A. m. mellifera* a lo largo de la península, observándose un gradiente norte-sur de caracteres morfológicos, siendo las abejas del norte más parecidas a la subespecie *A. m. mellifera* de Europa occidental, mientras que las del sur se asemejan a la subespecie *A. m. intermissa* que habita en Marruecos (de la Rúa, 1999). Es importante señalar que otros estudios biométricos de la subespecie *A. m. iberiensis* dieron lugar a la descripción de grupos morfológicos menores, relacionados con las diferentes características ecológicas y climáticas. En 1984 Sepúlveda encontró diferencias entre abejas procedentes de distintos puntos de Andalucía (de la Rúa, 1999); Izquierdo y col. (1985) determinaron diferencias significativas entre las abejas asturianas y las de la meseta norte, y Santiago y col. (1986) describieron dos ecotipos de abejas separados por la cordillera Cantábrica. En 1995 Orantes y García demostraron mediante análisis discriminante de siete características morfométricas la existencia de tres grupos biométricos de *A. m. iberiensis* en diferentes apiarios del sur peninsular. Grupos semejantes fueron también identificados por Hepburn y Radloff, en 1996,

Introducción

quienes analizaron características morfológicas de poblaciones de abejas distribuidas a lo largo de un transecto entre los Pirineos y el Sahara, mediante estadísticos multivariados (de la Rúa, 1999).

Los estudios moleculares basados en la secuencia de diferentes genes del ADNmt (Garnery y col., 1992) y en los mapas de restricción de la molécula completa del ADNmt (Smith y col., 1991; Sheppard y col., 1996) indicaban que la península ibérica era, efectivamente, una zona de hibridación entre las subespecies *A. m. intermissa* y *A. m. mellifera*, ya que las abejas del sur mostraban haplotipos mitocondriales africanos (linaje A), mientras que las del norte presentaban haplotipos típicos de la subespecie europea occidental (linaje M) (de la Rúa, 1999). En 1995 Garnery y col. subrayaron que esta distribución de haplotipos mitocondriales podía haber surgido como resultado de un contacto secundario entre poblaciones de ambos linajes. Esto suponía el rechazo de la hipótesis de Ruttner referente a una clina geográfica gradual desde la subespecie *A. m. intermissa* hasta la *A. m. mellifera*, y el apoyo al origen híbrido de las abejas peninsulares (de la Rúa, 1999).

La frecuencia de distribución de los alelos de la aloenzima Mdh encontrada por Smith y Glean en 1995, también apoyaba la hipótesis del origen híbrido de la subespecie *A. m. iberiensis* basada en el ADNmt, aunque la fosfoglucomutasa (Pgm) no mostró un reparto diferencial de alelos entre el norte y el sur peninsular, sino uno más homogéneo y sin patrón geográfico concreto (de la Rúa, 1999; Miguel y col., 2010).

En 1995, Garnery y col. publicaron un estudio sobre la distribución de haplotipos mitocondriales basados en la región intergénica ARNt^{leu}-COII de poblaciones peninsulares pertenecientes a *A. m. mellifera* y *A. m. iberiensis*, y también de las tres subespecies presentes en Marruecos, *A. m. intermissa*, *A. m. major* y *A. m. sahariensis*. Encontraron que el haplotipo más frecuente en las poblaciones del sur peninsular estaba ausente en la de Marruecos y viceversa. También confirmaron con sus resultados que la península ibérica era zona de hibridación secundaria entre las subespecies *A. m. mellifera* y *A. m. intermissa*. Posteriormente en 1998, Franck y col. ampliaron este estudio con datos de poblaciones francesas de *A. m. iberiensis*, en donde aparecen haplotipos de origen africano y europeo (de la Rúa, 1999).

A pesar de la concordancia de estudios diversos basados en el ADNmt, la hipótesis sobre el origen híbrido de las poblaciones de *A. m. iberiensis* fue rechazada por los estudios basados en loci microsatélites (de la Rúa, 1999; Miguel y col., 2010). Si la hipótesis de una intergradación primaria sobre el origen de las poblaciones de *A. m. iberiensis* fuera cierta, la variabilidad de los microsatélites en estas poblaciones debería mostrar una modificación gradual de las frecuencias

de los distintos alelos en el eje norte-sur. Por otro lado, si la hipótesis que supone un contacto secundario fuera la correcta, debería haber un gradiente de frecuencias alélicas similar al encontrado en la variación de los haplotipos del ADNmt o de los alelos de la aloenzima Mdh. Sin embargo, el análisis de los datos de los microsatélites no apoyaba ninguna de las dos hipótesis (de la Rúa, 1999). Los resultados basados en loci de microsatélites rechazaban ambas hipótesis debido a que todas las abejas clasificadas en el linaje M presentan perfiles genéticos muy similares, sin rastros de intergrado entre los linajes A y M (Garnery y col., 1998; Miguel y col., 2010). La existencia de haplotipos A, muy diversificados y de alta frecuencia, fue reinterpretada como consecuencia de la importación múltiple de diferentes orígenes por el hombre (Garnery y col., 1998), por lo que estos autores sugieren una tercera hipótesis que postula un origen múltiple de las poblaciones de abejas *A. m. iberiensis* parecida a *A. m. intermissa*, como resultado de sucesivas introducciones de abejas desde Marruecos durante los ocho siglos de presencia musulmana en la península ibérica (Garnery y col., 1998; de la Rúa, 1999).

De este modo las migraciones humanas sobre la península ibérica con sus enseres traerían también sus abejas. Por el norte, solo podríamos recibir nuestras mismas abejas de otras épocas geológicas. Por el sur nos llegarían otras abejas negras del norte de África, que se cruzarían con las ibéricas de Andalucía dando lugar a explotaciones híbridas. Las subespecies amarillas también debieron ser importadas en época árabe. Tenemos una referencia en el “Tratado de Agricultura” de Ibn Wafid, donde da consejos en su capítulo 88 de cómo eliminar los machos, aconseja que siempre se deje uno “bermejo rubio o pintado en negro”. Estas características corresponden justamente a los zánganos de las abejas saharianas, de las cuales no quedan vestigios, pero nos demuestra que en el siglo XI teníamos abejas del tronco amarillo en Toledo. Por el sur, también pudo venir la *Tellian* actual con las sucesivas oleadas de pueblos norteafricanos que, por sus condiciones más similares a las nuestras, resistieron la absorción, legando a su descendencia muchas de las características propias. En todo este proceso racial, la subespecie *A. m. iberiensis* tiene a su favor el estar adaptadas a las condiciones ecológicas, independientemente de que sus características genéticas sean dominantes (Sepulveda, 1986).

En época reciente la historia evolutiva de *A. mellifera* en la península ibérica ha estado probablemente influida por las técnicas apícolas. En este sentido, la práctica intensiva de la trashumancia en las últimas décadas, la pérdida masiva de colmenas por varroosis y otras patologías, y la compraventa de colmenas a escala trans-regional, son factores que están cambiando de forma acelerada la citada distribución clinal. Otras influencias humanas, como la introducción de otras subespecies, han tenido posiblemente poca influencia sobre las poblaciones de *A. m. iberiensis* actuales (de la Rúa y col., 2013).

Introducción

La península ibérica puede considerarse como una excepción a la tendencia global de reducción de la diversidad genética en Europa antes descrita (apartado 1.2), ya que en ella se ha conservado, con relativamente escasa contaminación genética externa la subespecie *A. m. iberiensis*. Sin embargo, y a pesar de las considerables ventajas de mantener nuestra subespecie autóctona, en los últimos años se observa una tendencia creciente a la introducción de abejas mejoradas de las subespecies *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica* o derivadas de ellas, lo que supone un riesgo para la conservación de la *Apis mellifera iberiensis*. La hibridación con subespecies foráneas puede amenazar las subespecies nativas cuando los apicultores locales importan y propagan abejas importadas. En este sentido, la trashumancia en apicultura y la utilización de solo unas pocas subespecies para su manejo comercial ha sido muy negativo para la conservación de las especies nativas en muchas partes del mundo debido a la fragmentación, hibridación y cría selectiva (Yániz y col., 2016).

En un estudio reciente llevado a cabo por Cánovas y col. (2008), utilizando el ADNmt, se realizó un análisis de la distribución de los haplotipos mitocondriales de *A. m. iberiensis* en la península ibérica con respecto a una nueva división del linaje evolutivo africano en “sublinajes”, anteriormente desarrollada en otros trabajos realizados. En dicho trabajo se establecieron tres sublinajes africanos según la distribución y frecuencia que presentan diferentes haplotipos distribuidos por los continentes africano y europeo. De esta forma el sublinaje denominado AI se distribuye mayoritariamente en la península ibérica y está caracterizado por la presencia con una alta frecuencia de los haplotipos A1 y A2, el sublinaje AII presente en el Norte de África, principalmente en Marruecos, presenta una mayoría de haplotipos como A8, A9 y A10, mientras que el sublinaje AIII tiene distribución atlántica, comprendiendo la región macaronésica y la costa atlántica de la península ibérica, y se caracteriza por la presencia de haplotipos como A11, A14, A15 y A16.

El extenso muestreo realizado en el trabajo de Cánovas y col. permitió corroborar hipótesis previas acerca de la variación clinal de los linajes evolutivos africano (A) y europeo occidental (M). En las 1021 colonias muestreadas se observaron un total de 22 haplotipos (12 del linaje M y 10 del linaje A), cuya frecuencia demuestra que los haplotipos A disminuyen siguiendo una tendencia SO-NE, mientras que los haplotipos M aumentan. Los resultados que obtuvieron apoyan la hipótesis de un origen africano de *A. mellifera* y una colonización temprana de Europa occidental aprovechando los periodos interglaciares más cálidos del Pleistoceno. Posteriormente hubo una diferenciación regional, ocurrida posiblemente en refugios durante los periodos más fríos. La distribución de los haplotipos parece, por tanto, estar

influida a nivel regional por la adaptación a condiciones climáticas locales y por prácticas apícolas, tal y como ya se ha mencionado (de la Rúa y col., 2013).

En este mismo estudio, se puede observar que Aragón es una de las regiones españolas en las que mejor se ha conservado, sin hibridar, el linaje M de *Apis mellifera iberiensis*. Además se observa que Huesca y Zaragoza fueron las únicas provincias en las que solo se detectó la presencia del haplotipo M. Sin embargo, el número de apiarios y colonias analizado fue reducido (6 apiarios y 43 colonias en Huesca), y la situación ha podido modificarse en los últimos años. Además, la provincia de Huesca presenta un elevado riesgo de introducción de abejas foráneas por ser una región típicamente receptora de apicultores trashumantes de otras regiones, incluidos apicultores franceses en los últimos tiempos. Esta recepción de abejas de diversas zonas sin ningún control genético implica un riesgo para la abeja local. Recientemente, se ha observado también que algunos apicultores profesionales han optado por la utilización de abejas mejoradas de otras subespecies, con el riesgo consiguiente de hibridación en esas regiones (Yániz y col., 2016).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es realizar una caracterización morfométrica y molecular de *Apis mellifera* en la provincia de Huesca para conocer el estado actual de las explotaciones apícolas en lo que respecta a la conservación de la subespecie *Apis mellifera iberiensis*. Para alcanzar el objetivo general se deben de abordar una serie de objetivos específicos previos, que son los siguientes:

1. Caracterizar abejas de colmenas localizadas en la provincia de Huesca mediante análisis morfométrico, en relación con abejas de otras procedencias.
2. Determinar los linajes y haplotipos de abejas de colmenas localizadas en la provincia de Huesca mediante análisis del ADN mitocondrial.
3. Comparar los resultados obtenidos mediante los dos tipos de tipos de análisis.
4. Evaluar la fiabilidad del programa de análisis morfométrico utilizado para tal estudio.
5. Evaluar la introducción de subespecies distintas a *A. m. iberiensis* según los datos obtenidos respecto a los existentes en estudios anteriores.
6. Analizar la distribución de linajes y haplotipos dentro de *A. m. iberiensis* en la provincia de Huesca.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestreo

En primer lugar se realizó un muestreo de abejas obreras en colmenares de diversas zonas de España, principalmente en la provincia de Huesca. La mayoría de los apiarios están registrados en el ADS n.º 1 de la provincia de Huesca, principalmente de las comarcas de la Hoya de Huesca, el Somontano de Barbastro y Los Monegros. Las muestras se obtuvieron mediante extracción directa de las abejas obreras nodrizas sobre cuadros de puesta (Figura 3a) en tubos de plástico de 50 ml (Figura 3b). Los tubos se identificaron con etiquetas y se rellenaron con etanol absoluto. Tras ello las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su procesado.

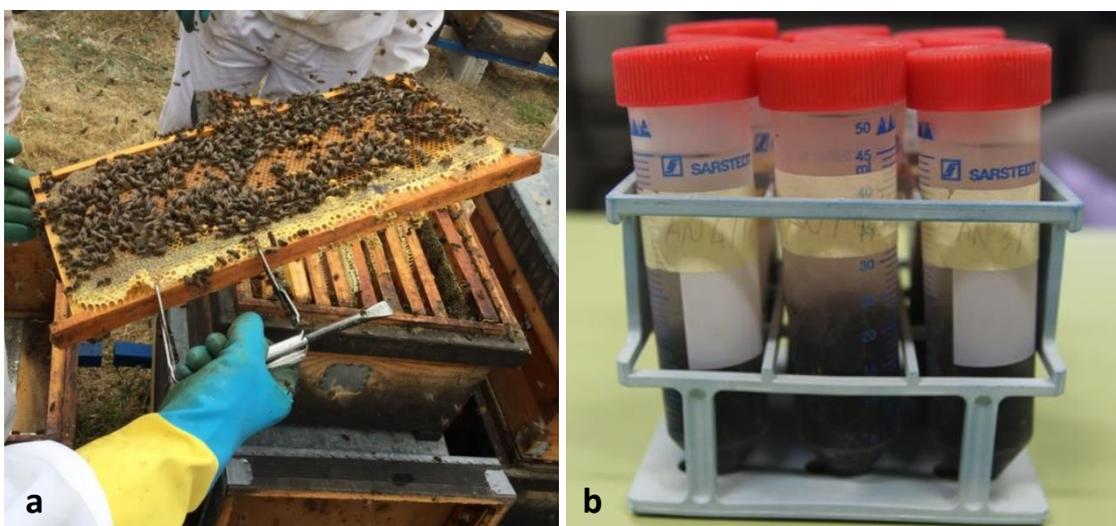


Figura 3. Abejas obreras nodrizas sobre el cuadro de puesta (a) y muestras conservadas en etanol absoluto en tubos de 50 ml debidamente identificados (b).

Para el estudio se contó con un total de 34 apicultores y 36 apiarios (Tabla 1). De cada apiario se obtuvieron habitualmente muestras de 5 colmenas, aunque osciló entre 1 y 12 colmenas, dependiendo del tamaño del apiario. El número total de colmenas muestreadas fue 193 de las que se recogieron un mínimo de 8 obreras por colonia. En el muestreo se incluyeron, a efectos comparativos, algunos colmenares ubicados en la provincia de Zaragoza, así como dos apiarios de otras provincias del norte de España (Ourense y Navarra), otro de Tarragona y cinco de Málaga. Entre las colmenas muestreadas, 22 distribuidas en 5 apiarios contenían abejas de subespecies distintas a la subespecie *A. mellifera iberiensis*: 12 se correspondían con la subespecie sintética Buckfast, 4 a híbridos F1 Buckfast x *A. mellifera iberiensis*, 1 a un híbrido Buckfast x *A. mellifera carnica* x *A. mellifera iberiensis*, 2 a *A. m. carnica* y 3 a *A. m. ligustica*. Por otro lado, las muestras de la provincia de Málaga se muestrearon para tener mayor probabilidad

Material y métodos

de obtener abejas de la subespecie *A. mellifera iberiensis* probablemente pertenecientes al linaje A.

Tabla 1. Localización de los 36 apiarios incluidos en el estudio y número de colmenas muestreadas en cada uno.

Localidad	Abrev.	Provincia	N	Subespecie esperada
Alcubierre	AB	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Archidona	AD	Málaga	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Aguas	AG	Huesca	10	<i>A. m. iberiensis</i>
Ainsa	AI	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Almudévar	AL	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Aniés	AN	Huesca	5 + 5*	<i>A. m. iberiensis</i>
Alcalá del Obispo	AO	Huesca	6	<i>A. m. iberiensis</i>
Antequera	AQ	Málaga	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Bembibre	BB	Ourense	6	<i>A. m. iberiensis</i>
Bolea	BO	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Castelflorite	CA	Huesca	10	<i>A. m. iberiensis</i>
Colmenar	CM	Málaga	5 + 5*	<i>A. m. iberiensis</i>
Comares	CO	Málaga	4	<i>A. m. iberiensis</i>
Desojo	DE	Navarra	5	<i>A. m. iberiensis</i>
El Perelló	EP	Tarragona	4	<i>A. m. iberiensis</i> , <i>A. m. ligustica</i> , Buckfast
Fago	FA	Huesca	3	<i>A. m. iberiensis</i>
Fiscal	FI	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Fonz	FO	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Junzano	JN	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Lanaja	LA	Huesca	6	Buckfast
Monflorite	MF	Huesca	2	<i>A. m. iberiensis</i>
Monzón	MZ	Huesca	6	<i>A. m. iberiensis</i>
Nueno	NU	Huesca	10	<i>A. m. iberiensis</i>
Padarniú	PA	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Pradejón	PR	Huesca	1	<i>A. m. ligustica</i>
Radiquero	RA	Huesca	2	<i>A. m. iberiensis</i>
San Esteban	SE	Huesca	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Siétamo	SI	Huesca	2	<i>A. m. iberiensis</i>
Tamarite de Litera	TA	Huesca	6	<i>A. m. iberiensis</i>
Tauste	TU	Zaragoza	12	<i>A. m. iberiensis</i> , <i>A. m. carnica</i> , Buckfast, F1 Buckfast x <i>A. m.</i> <i>iberiensis</i> , Buckfast x <i>A. m. carnica</i> x <i>A. m. iberiensis</i>
Tarazona	TZ	Zaragoza	2	<i>A. m. iberiensis</i>
Yéqueda	YE	Huesca	7	<i>A. m. iberiensis</i>
Zaragoza	ZA	Zaragoza	5	<i>A. m. iberiensis</i>
Zuera	ZU	Zaragoza	9	<i>A. m. iberiensis</i> , F1 Buckfast x <i>A. m.</i> <i>iberiensis</i>

* Dos apiarios

3.2 Adquisición y tratamiento de los datos obtenidos mediante el análisis morfométrico

3.2.1 Preparación de las muestras alares y adquisición de imágenes

Para la preparación de las alas se escogieron 8 abejas al azar de cada una de las colmenas muestreadas. El número total de abejas analizadas mediante morfometría fue de 1534. En primer lugar se sacó el tubo del congelador y se extrajeron las abejas una a una. Tras ello se les arrancó el ala anterior derecha y con la ayuda de un bisturí se realizó un corte escindiendo el remigio, siempre evitando dañar las intersecciones de la venas. A continuación, las alas se hidrataron progresivamente haciéndolas pasar por una serie de distintas disoluciones etanol: agua con menor concentración en volumen de etanol en cada paso (90:10, 70:30, 50:50), y finalmente a agua destilada, secando el agua sobrante de la superficie de las alas con papel.

Las alas se colocaron en el orden de extracción de las abejas sobre portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de 24x24 mm, el cual se fijaba con celo, de forma que las muestras quedasen fijadas y planas para su posterior fotografiado. El orden de colocación de las alas sobre el portaobjetos era de arriba abajo, colocando primero cuatro alas bajo el cubreobjetos izquierdo y en segundo lugar cuatro más bajo el cubreobjetos derecho, tal y como se puede ver en la Figura 4a.



Figura 4. a) Esquema de colocación de las alas sobre el portaobjetos. **b)** Muestras alares preparadas.

Material y métodos

Las muestras (Figura 4b) se fotografiaron en microscopio Leica DM 4500B (Leica, Wetzlar, Alemania), con un objetivo PLAN Achromatic 1,25x CORR (Leica) y utilizando la siguiente configuración del filtro A: intensidad 8, FD 32 y AP 18. Se capturaron las imágenes con una cámara Canon EOS 600D digital (Canon Inc., Tokyo, Japón) controlada mediante un ordenador utilizando el *software* EOS Utility (Canon Inc., Tokyo, Japón), utilizando la siguiente configuración del programa: ISO 400, 1:100, S3, lámpara de tungsteno (Figura 5).

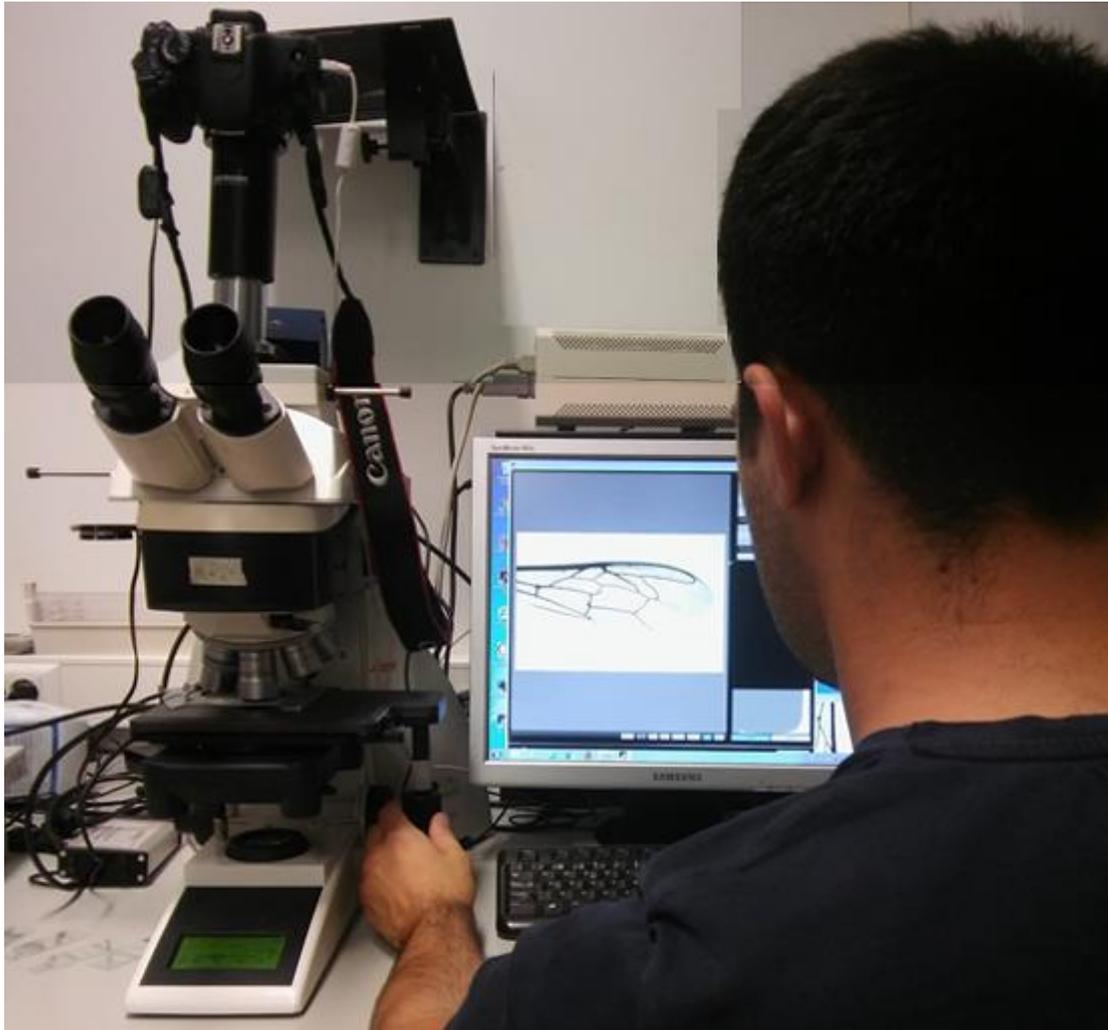


Figura 5. Equipo empleado para la obtención de las imágenes digitales: cámara Canon 600D montada sobre el microscopio Leica DM 4500B y controlada mediante el software EOS Utility.

3.2.2 Procedimiento de análisis de imagen

El análisis morfométrico geométrico de las imágenes de las muestras se realizó utilizando el programa WingMarks, un archivo ejecutable independiente generado con el Compiler Toolbox de MATLAB® (The Mathworks Inc., Natick, MA, Estados Unidos) v.8.6 (R2015b) en una computadora de escritorio (CPU Intel® Core™ I7-6700K a 4.00 GHz, 32.0 GB de RAM) con Windows 10® (x64). El archivo ejecutable WingMarks, desarrollado por el grupo en la Escuela

Politécnica Superior, se distribuye bajo licencia de Creative Commons (CC BY-NC-SA 4.0), está disponible online de forma gratuita en <http://iuca.unizar.es/es/noticias/wingmarks-software>. Mediante el *software* WingMarks se determinaron las coordenadas de los 19 puntos de intersección de las venas del ala delantera para cada imagen (Figura 6a). Para fines de procesamiento, WingMarks ajusta las imágenes a un ancho de 800 píxeles y las convierte en escala de grises.

Antes de su análisis, se cargó una imagen de uno de los especímenes de cada subespecie en el entorno gráfico para usarlo como plantilla para la subespecie en estudio. Para corregir la inclinación de la imagen, se trazaron manualmente dos puntos correspondientes a los extremos de la celda radial (puntos 12 y 15 en la Figura 6a). La transformación espacial subsiguiente basada en estos puntos aseguró que los 19 nodos de la venación del ala mostraran siempre una configuración uniforme y reconocible (Figura 6b). Las coordenadas de las 19 intersecciones de venas se trazaron manualmente y se almacenaron (en un archivo con extensión .mat) para su uso posterior como patrón para la detección automática en las otras muestras.

Para las imágenes de ala restantes se creó un nuevo archivo .mat para cada conjunto de muestras de cada colmena utilizando la plantilla creada con anterioridad. Tras ello se realizó la localización de los hitos para cada una de las imágenes. Para estas imágenes solo la corrección de inclinación se realizó manualmente, asignando los puntos 12, 15 y 5 (Figura 6a), siempre siguiendo este orden. Tras ello, el programa localizó automáticamente el resto de los puntos, los cuales fueron revisados para verificar que habían sido asignados correctamente. En caso de que los hitos no fuesen asignados correctamente, estos se relocalizaron manualmente. De esta forma se obtuvo la medida de los diecinueve hitos, tal como muestra la Figura 6c. Las coordenadas se almacenaron en dos archivos, uno con extensión .mat y en otro con .tps identificado con el nombre de la muestra. En todos los casos el orden de medición se realizó siguiendo la colocación sobre el portaobjetos (Figura 4a). Mediante esta metodología se aseguró poder localizar cualquier medición errónea y realizar su corrección, aunque esta fuese detectada en el último punto de corrección con MorphoJ. Finalmente todos los datos de los archivos se reunieron en un archivo con extensión .txt, para su posterior utilización con la aplicación externa MorphoJ (Klingenberg, 2011).

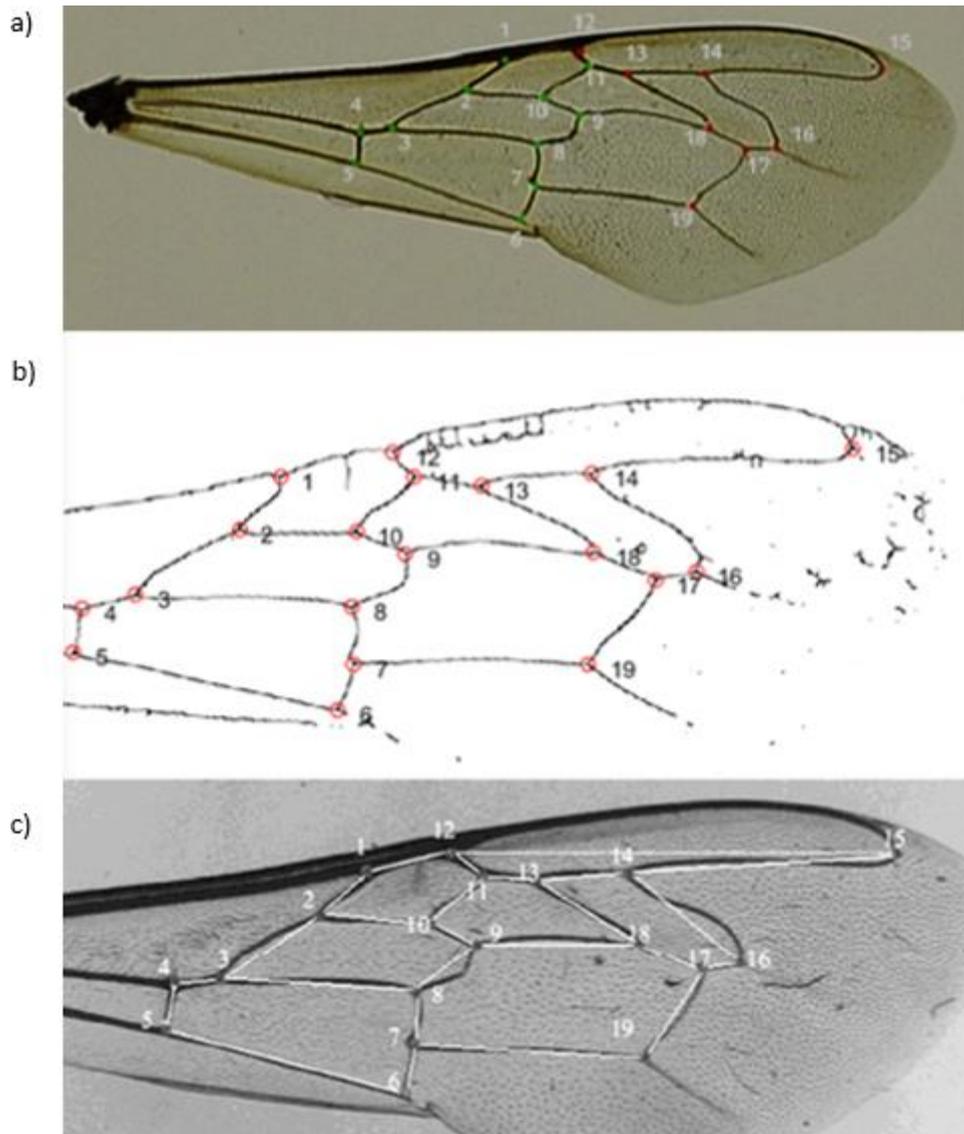


Figura 6. **a)** Localización de los 19 puntos de las intersecciones de las venas (hitos) del ala delantera considerados en el análisis de morfometría geométrica en *A. mellifera* (WingMarks, CC BY-NCSA 4.0). **b)** Imagen procesada utilizada como plantilla (WingMarks, CC BY-NCSA 4.0). **c)** Posición de los 19 puntos de referencia y visualización de la forma promedio representada por las líneas blancas (Rašić y col., 2015).

3.2.3 Caracterización mediante morfometría geométrica

Para la caracterización mediante morfometría geométrica se utilizó el programa libre MorphoJ, versión 1.06d (Klingenberg, 2011) (disponible en http://www.flywings.org.uk/morphoj_page.htm). En primer lugar se importó el archivo .txt que contenía todos los datos y se verificó por última vez que la localización de los hitos fuese la correcta para corregir cualquier error cometido. Para ello se observó gráficamente la desviación de los puntos de intersección de las venas de cada muestra, detectando los *outliers*.

3.2.4. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, los datos de las abejas se agruparon a priori según la subespecie o híbrido al que supuestamente pertenecían. Estos datos fueron proporcionados por los apicultores para cada colmena. Las abejas de la subespecie *A. m. iberiensis* se analizaron en esta fase sin diferenciar entre los posibles linajes al que pertenecían. Tras la obtención de los resultados moleculares, se realizó un nuevo análisis morfométrico en el que se compararon las abejas pertenecientes al linaje A y M de *A. m. iberiensis* para determinar si el análisis morfométrico era capaz de discriminar entre ambos linajes.

Una vez corregidos los errores, se analizaron las diferencias de forma mediante análisis canónico de varianza (CVA) utilizando el programa MorphoJ. De esta forma se obtuvieron los resultados por abejas. Tras ello se observaron las diferencias de forma a nivel de colmena mediante CVA, mediante la media de los individuos de cada colmena.

Para visualizar las diferencias de forma entre las subespecies se utilizaron los gráficos de gradilla. Por un lado se obtuvieron los gráficos de gradilla para las medias de los individuos de colmena para cada subespecie. Por otro lado se obtuvieron los gráficos de gradilla para las medias de los individuos de colmena comparando las subespecies dos a dos con 1000 rondas de permutación.

3.3 Adquisición y tratamiento de los datos obtenidos mediante el análisis molecular

3.3.1 Extracción y obtención de las muestras de ADN

Las abejas utilizadas para la extracción del ADN corresponden al ala número 1 de cada colmena colocada sobre el portaobjetos, tal como se puede ver en la Figura 4a. Para mantener en todo momento a las abejas identificadas, tras arrancar el ala, la abeja manipulada se guardó aparte en tubos de centrífuga de 1 ml en etanol absoluto a -80 °C, debidamente identificados y por orden, de forma que se permitiese la identificación entre la primera muestra del análisis morfométrico y del análisis genético posteriormente. Este paso se realizó para las 4 primeras abejas de cada colmena, de forma que nos asegurásemos la disponibilidad de poder utilizar otra muestra en caso de que fallase el análisis molecular, así como de la disponibilidad de ADN para posibles ensayos futuros.

Para la extracción del ADN se utilizó la primera abeja de la primera colmena de cada apiario. El total de abejas utilizadas fue de 36, una por apiario. El ADN se extrajo usando el método de Chelex® (Walsh y col., 1991). Para la extracción se seccionaron las tres patas del lado

Material y métodos

izquierdo de cada abeja obrera y se introdujeron en tubos de 200 µl. Las patas se seccionaron con la ayuda de unas pinzas, las cuales eran esterilizadas con ayuda de un mechero de alcohol antes y después de cada seccionamiento. Posteriormente los tubos que se calentaron a 37 °C durante 10 minutos para evaporar el etanol. Se añadieron 100 µl de Chelex® (Bio-rad) al 5 %, y 5 µl de la enzima proteinasa K (10 mg/ml, Promega, Madison, Estados Unidos) a cada tubo. A continuación los tubos sellados se agitaron 10 segundos en el vortex. Seguidamente se centrifugaron durante 30 segundos a 10.000 r.p.m. para reunir las disoluciones. Los tubos se introdujeron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapur) con el siguiente programa de extracción:

- incubación de la placa durante 60 minutos a 55 °C,
- inactivación de la enzima proteinasa K durante 15 minutos a 99 °C,
- mantenimiento de la placa un minuto a 37 °C,
- desnaturalización durante 15 minutos a 99 °C

Tras la extracción, los tubos se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 1 minuto. Tras ello, se tomaron 2 µl del sobrenadante para la reacción de amplificación por PCR.

3.3.2 Amplificación mediante PCR y electroforesis

La amplificación del ADN^{mt} se llevó a cabo según el método descrito por Garnery y col. (1993), el cual se basa en la amplificación de la región intergénica ARN^{t^{leu}}-COII mediante los cebadores E2 (5'- GGCAGAATAAGTGACATTG -3') y H2 (5'- CAATATCATTGATGAACC -3') localizados en el ARN^{t^{leu}} y en la subunidad II de la citocromo oxidasa respectivamente. Para cada reacción de PCR se utilizaron dNTPs 0,2 mM (Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade, Roche, Alemania), 0,4 µM de cada cebador (E2 y H2), 0,5 U de KapaTaq Taq Polimerasa (KapaBiosystems, Boston, Estados Unidos) y 2 µl de la disolución que contenía el ADN, en un volumen final de 15 µl. Las PCRs se realizaron en un termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Estados Unidos) con el siguiente programa de amplificación:

- desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos,
- 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C (desnaturalización), 45 segundos a 48 °C (anillado), 2 minutos a 62 °C (extensión),
- extensión final durante 20 minutos a 65 °C

Los productos de la amplificación se examinaron en geles de TBE (89 mM Tris-borato, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8) y agarosa al 1 %, que tras la electroforesis fueron teñidos

con bromuro de etidio para posteriormente ser visualizados con luz ultravioleta. Los tamaños de los productos de amplificación de la región intergénica se obtuvieron por comparación con un marcador de pesos moleculares conocidos (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder, Fermentas) (Figura 7). En cada pocillo del gel se cargó un volumen de 2 µl del producto de la PCR.

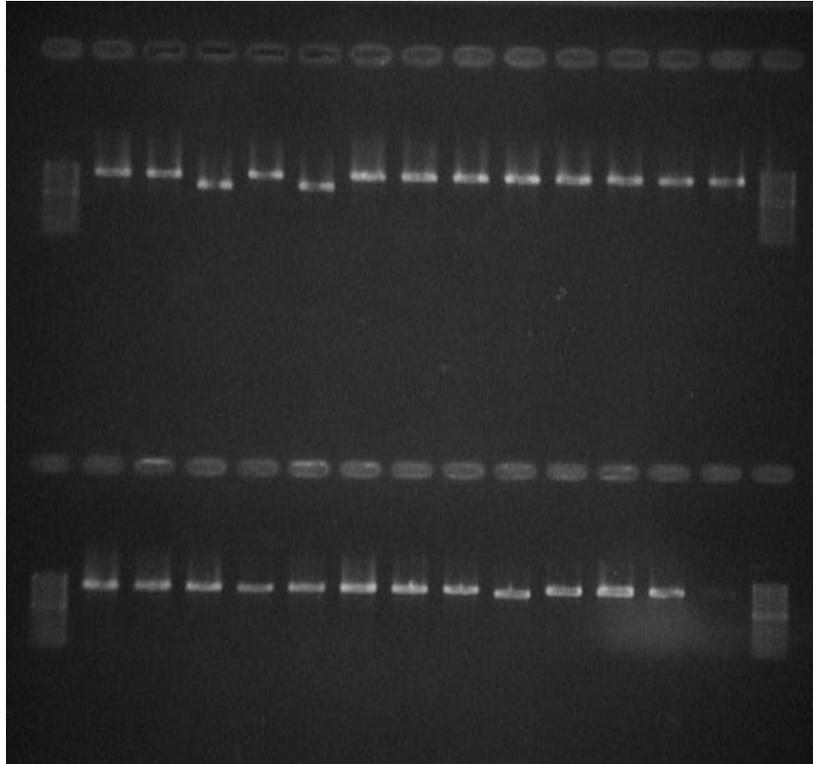


Figura 7. Visualización de productos de la PCR obtenidos mediante el par de cebadores E2-H2 a partir de ADN de abejas de diferentes apiarios. Las primeras y últimas columnas de las dos líneas de pocillos se corresponden a los marcadores de pesos moleculares.

3.3.3 Secuenciación y análisis de las secuencias amplificadas

Tras comprobar la amplificación correcta en gel de agarosa, los productos de la PCR se mandaron a secuenciar a una empresa externa (Secugen S.L., Madrid, España) con el cebador E2 (dirección 5' -3'). Algunas muestras se secuenciaron también con el cebador H2, empleándose entonces la secuencia consenso de las obtenidas a partir de las dos hebras. Para realizar el análisis de los cromatogramas obtenidos se utilizó el programa Geneious R11 (Geneious® 11.0.3, Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda, Kearse y col., 2012). En primer lugar se importaron los archivos con extensión .ab1 que contenía los cromatogramas de las 36 muestras y se depuraron los extremos de las secuencias.

Una vez obtenidas las 36 secuencias, se compararon con la base de datos Genbank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para determinar la o las secuencia(s) de mayor similitud.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Datos del análisis geométrico morfométrico del ala anterior derecha

Cuando se estudiaron todas las subespecies de *Apis mellifera* considerando las 1534 abejas individualmente, los resultados del análisis canónico de varianza indicaron que las variables primera, segunda y tercera explicaron el 86,5 %, 7,24 % y 3,34 % de la variación total, respectivamente. El diagrama de dispersión mostró ciertas superposiciones entre el híbrido Buckfast y el resto, excepto con la subespecie *A. m. iberiensis* que fue la que se diferenció más claramente del resto de abejas analizadas. La subespecie *A. m. ligustica* mostró una superposición principalmente con el híbrido de Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis*, y la subespecie *A. m. carnica* se superpuso principalmente con el híbrido F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (Figura 8).

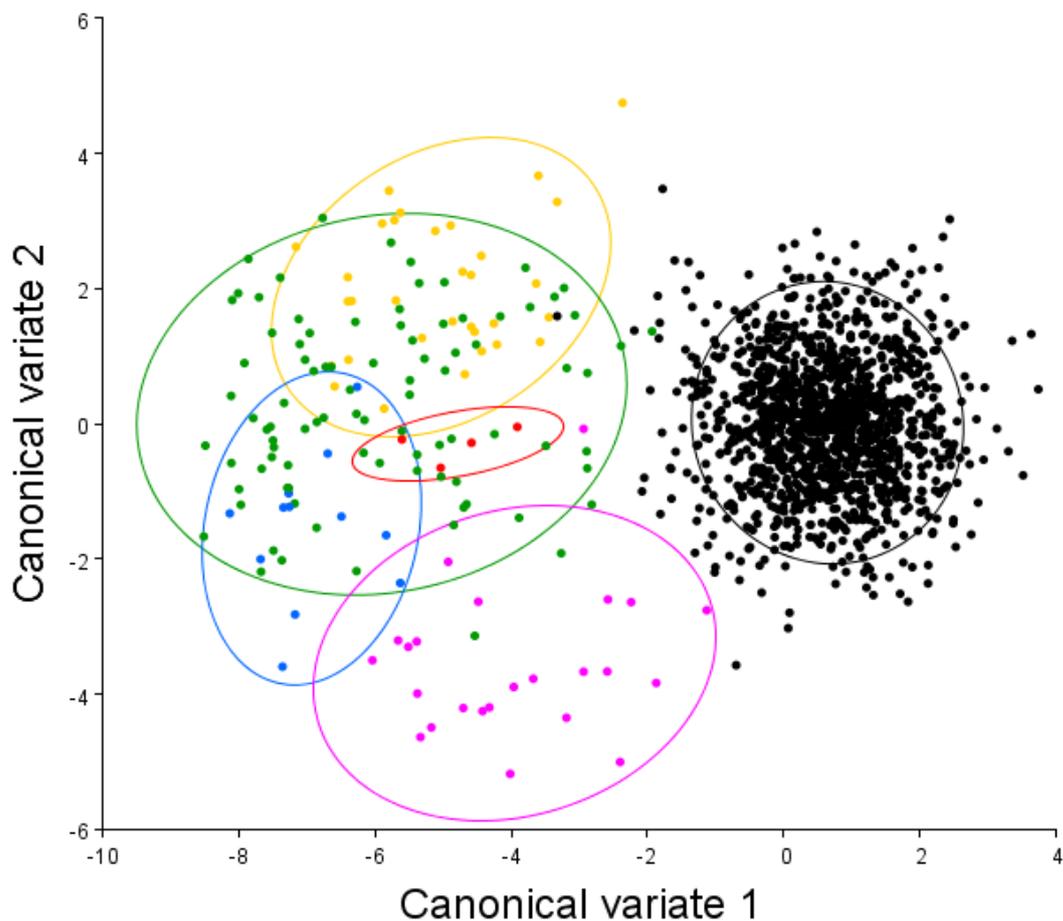


Figura 8. Diagrama de dispersión de *Apis mellifera* obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando todos los individuos.

Negro: *A. m. iberiensis*; rosa: *A. m. ligustica*; rojo: Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis*; azul: *A. m. carnica*; verde: Buckfast; amarillo: F1 Buckfast x *A. m. iberiensis*. *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad.

Resultados

Una vez obtenidas las medias para cada colmena de las coordenadas de las intersecciones venosas de las alas, los resultados del análisis canónico de varianza indicaron que las variables primera, segunda y tercera explicaron el 83,81 %, 7,27 % y 4,51 % de la variación total, respectivamente. En este caso, el diagrama de dispersión mostró una excelente discriminación de la subespecie *A. m. iberiensis* respecto del resto de subespecies analizadas. El análisis también reveló una clara discriminación entre la subespecie *A. m. ligustica* y el resto, pero en este caso el número de colmenas analizado fue bajo, por lo que para obtener resultados más fiables debería de aumentarse el número de muestras de colmenas (Figura 9).

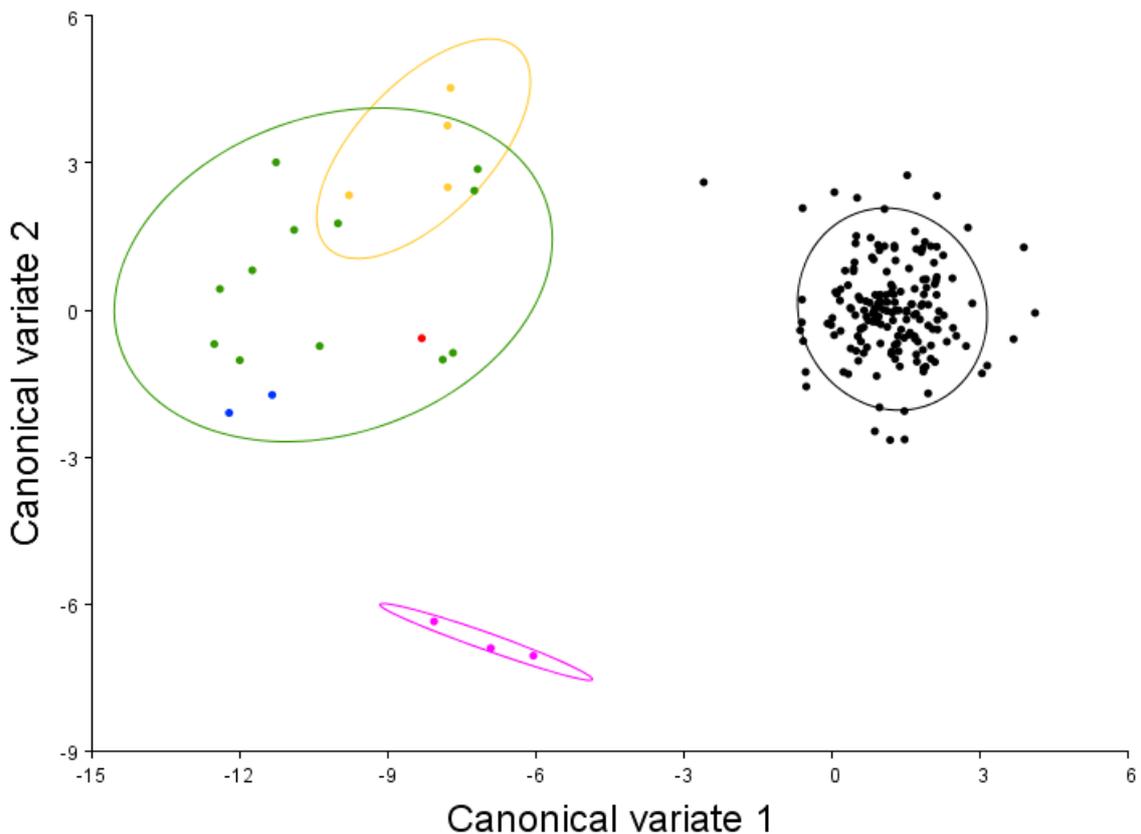
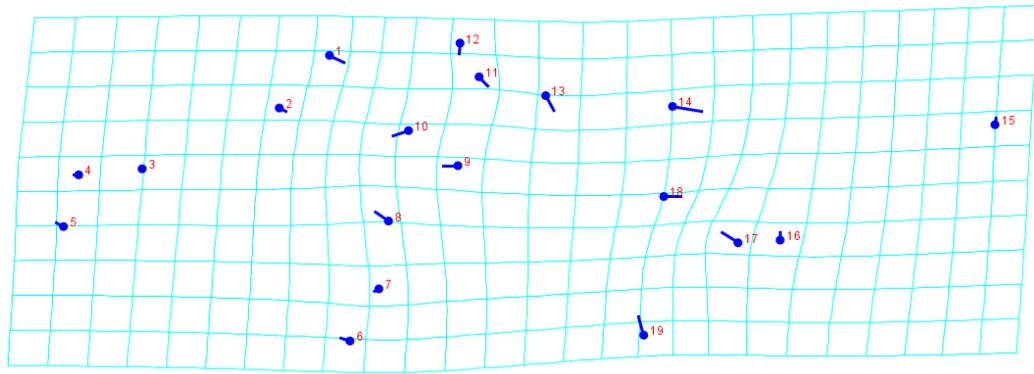
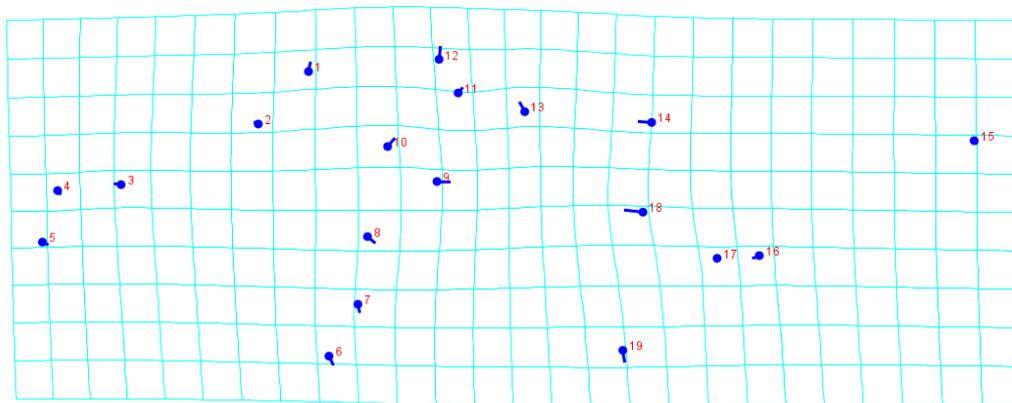


Figura 9. Diagrama de dispersión de *Apis mellifera* obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando las medias por colmena. Negro: *A. m. iberiensis*; rosa: *A. m. ligustica*; rojo: Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis*; azul: *A. m. carnica*; verde: Buckfast; amarillo: F1 Buckfast x *A. m. iberiensis*. *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad.

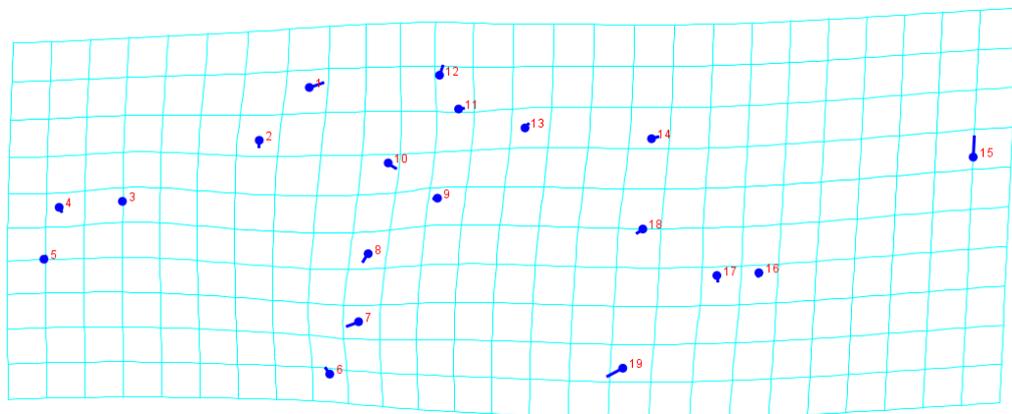
Los gráficos de gradillas mostraron la forma del ala para cada subespecie e híbrido (Figuras 10a y 10b). La comparación de las muestras dos a dos mostró las diferencias entre cada par, observándose una menor deformación de la cuadrícula a mayor similitud entre las subespecies e híbridos y una mayor deformación a menor similitud (Figura 11).



Iberi



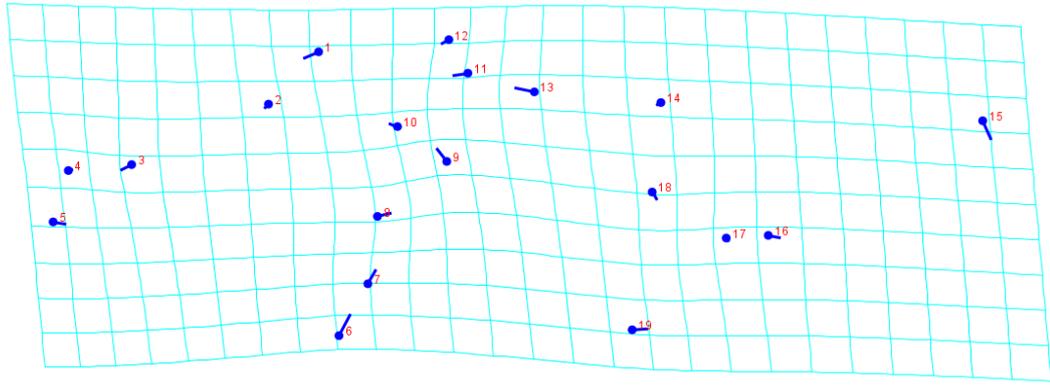
Buckf



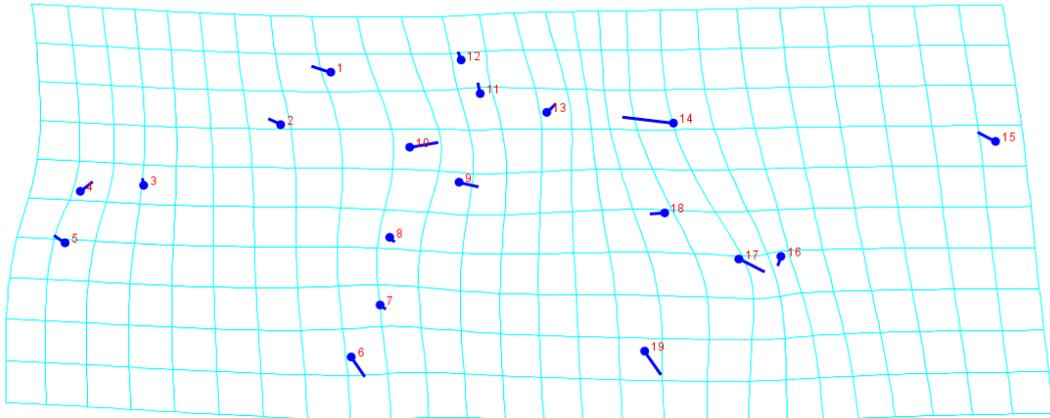
BucF1

Figura 10 (a). Gráficos de gradillas de *A. m. iberiensis* (Iberi), Buckfast (Buckf) y el híbrido F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud y dirección de la diferencia entre el ala promedio y el ala de las líneas seleccionadas. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.

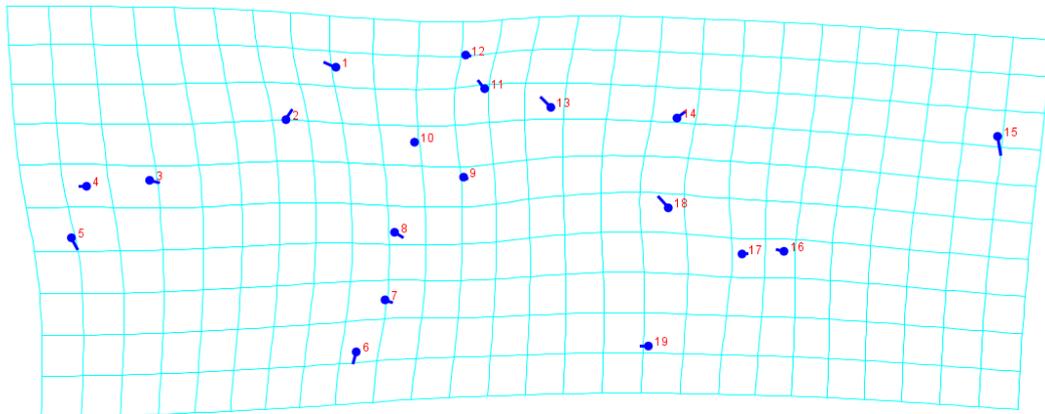
Resultados



BCalb

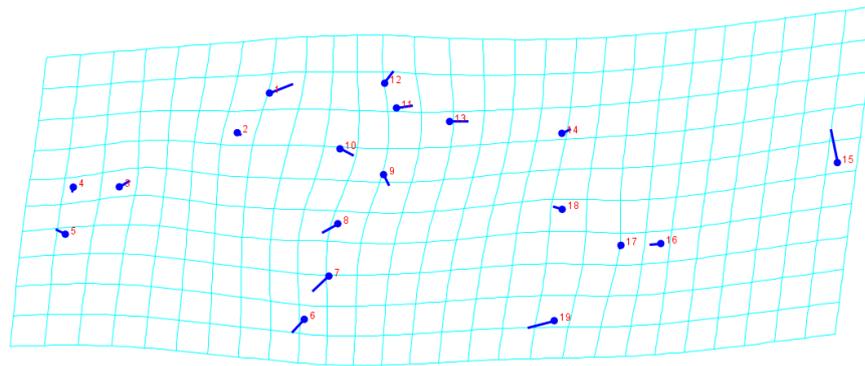


Carni

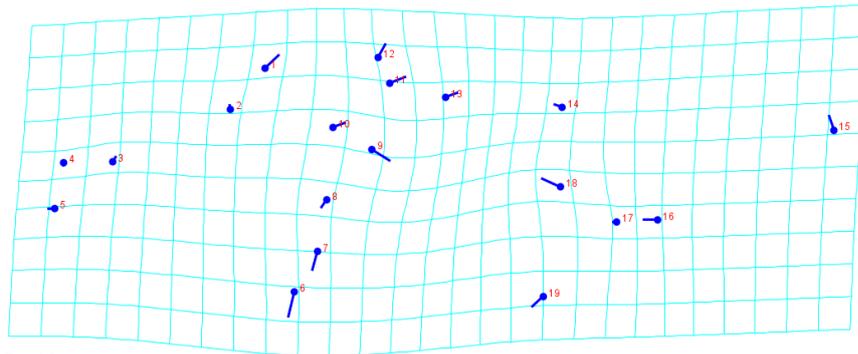


Ligus

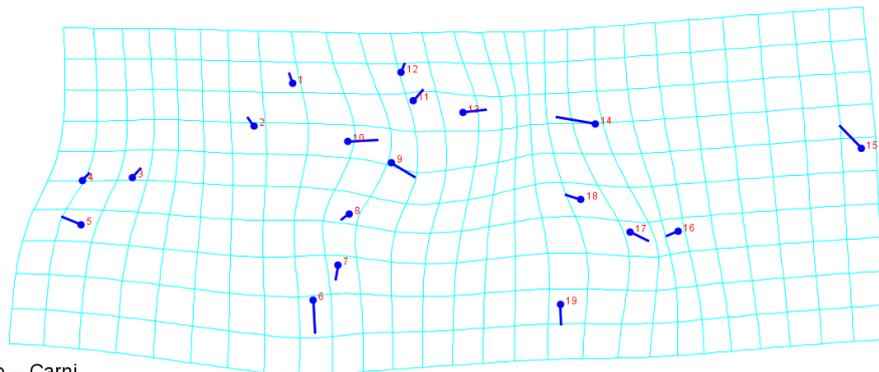
Figura 10 (b). Gráficos de gradillas del híbrido Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni) y *A. m. ligustica* (Ligus).* Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud y dirección de la diferencia entre el ala promedio y el ala de las líneas seleccionadas. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.



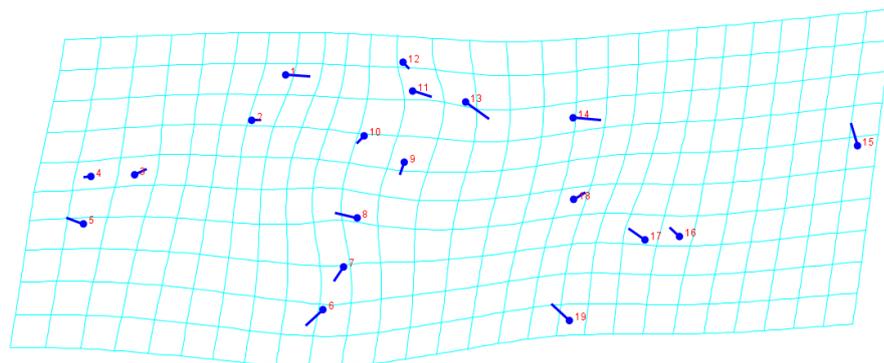
BCalb -- BucF1



BCalb -- Buckf



BCalb -- Carni



BCalb -- Iberi

Figura 11 (a). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas está aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.

Resultados

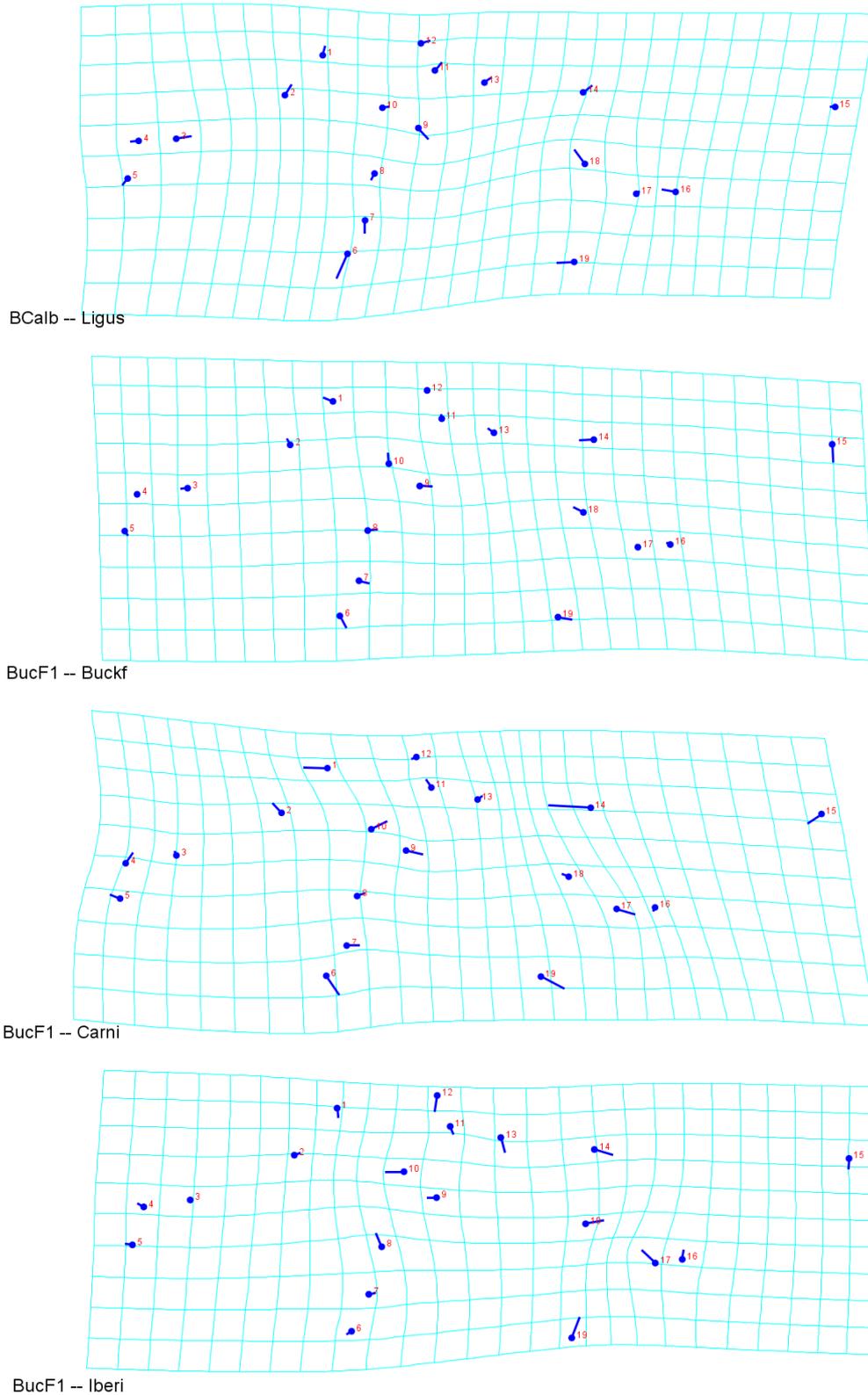


Figura 11 (b). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.

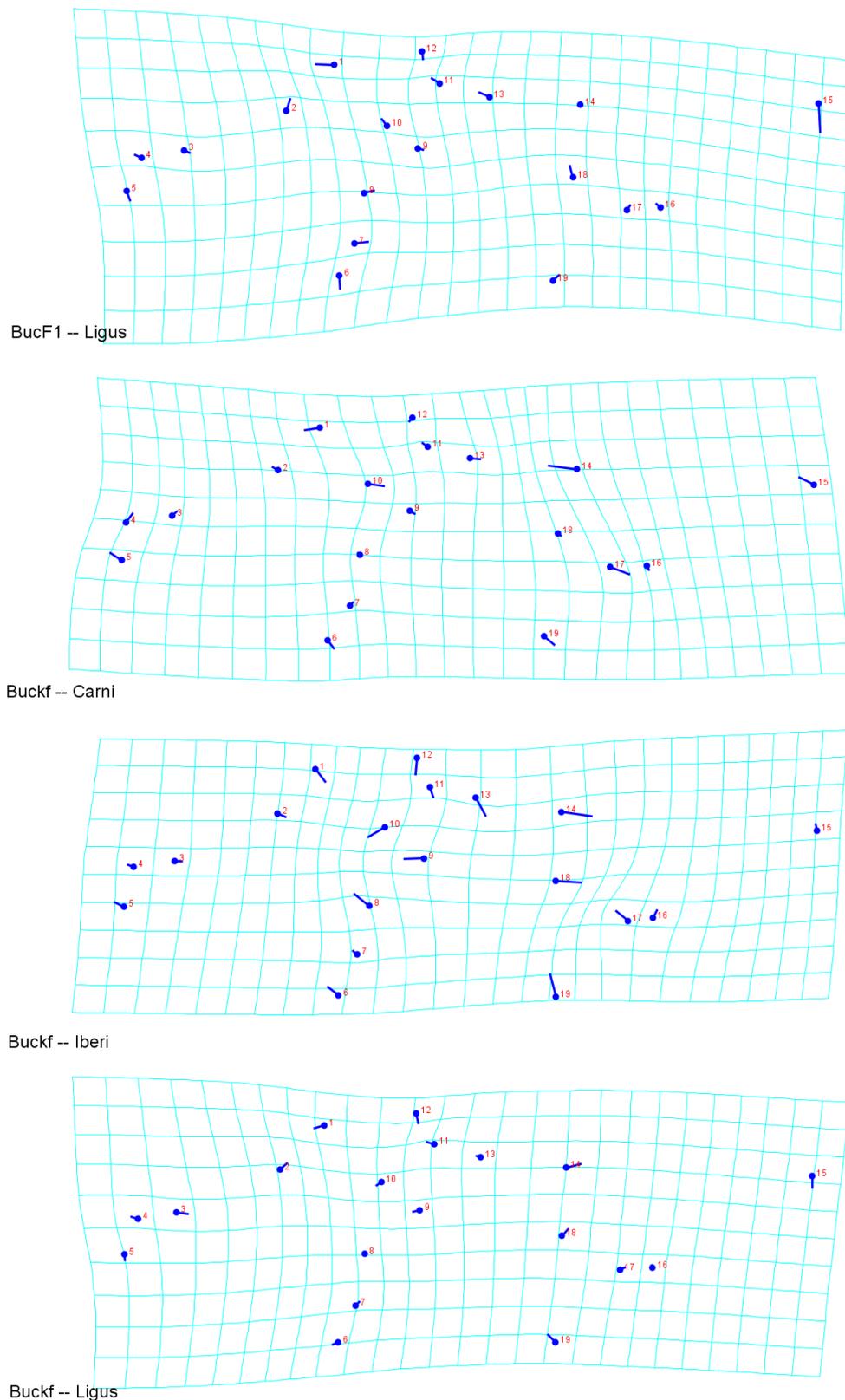
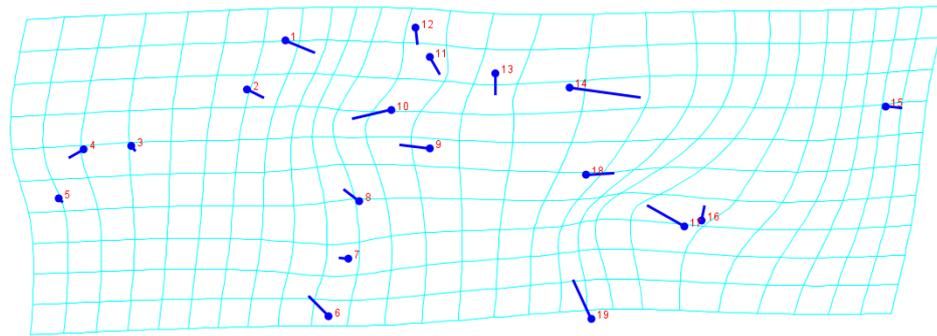
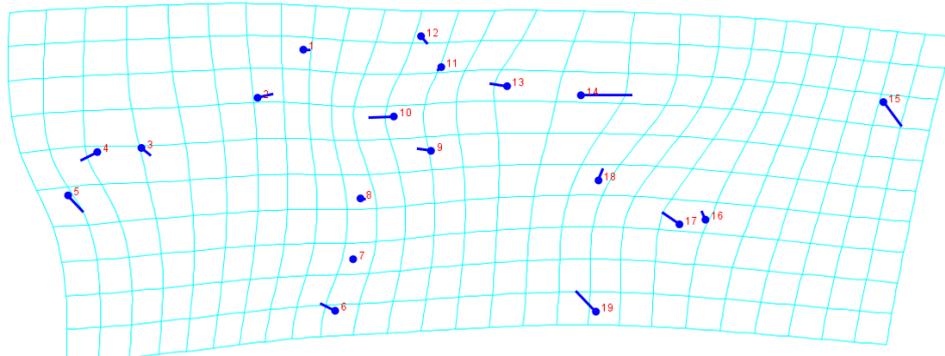


Figura 11 (c). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas esta aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.

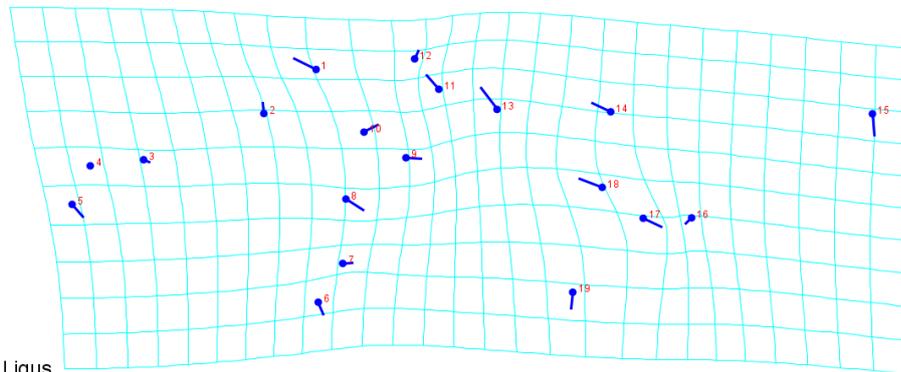
Resultados



Carni -- Iberi



Carni -- Ligus



Iberi -- Ligus

Figura 11 (d). Gráficos de gradillas de comparación dos a dos. Abreviaturas: *A. m. iberiensis* (Iberi), *A. m. ligustica* (Ligus), Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* (BCalb), *A. m. carnica* (Carni), Buckfast (Buckf), F1 Buckfast x *A. m. iberiensis* (BucF1). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas está aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.

Los diagramas de dispersión de *A. m. iberiensis*, una vez asignadas las colmenas a cada linaje mitocondrial tras realizar el análisis molecular, no mostraron ninguna discriminación entre las diferentes colmenas con linajes M y A. El gráfico de gradillas de comparación no mostró diferenciación entre ambos linajes.

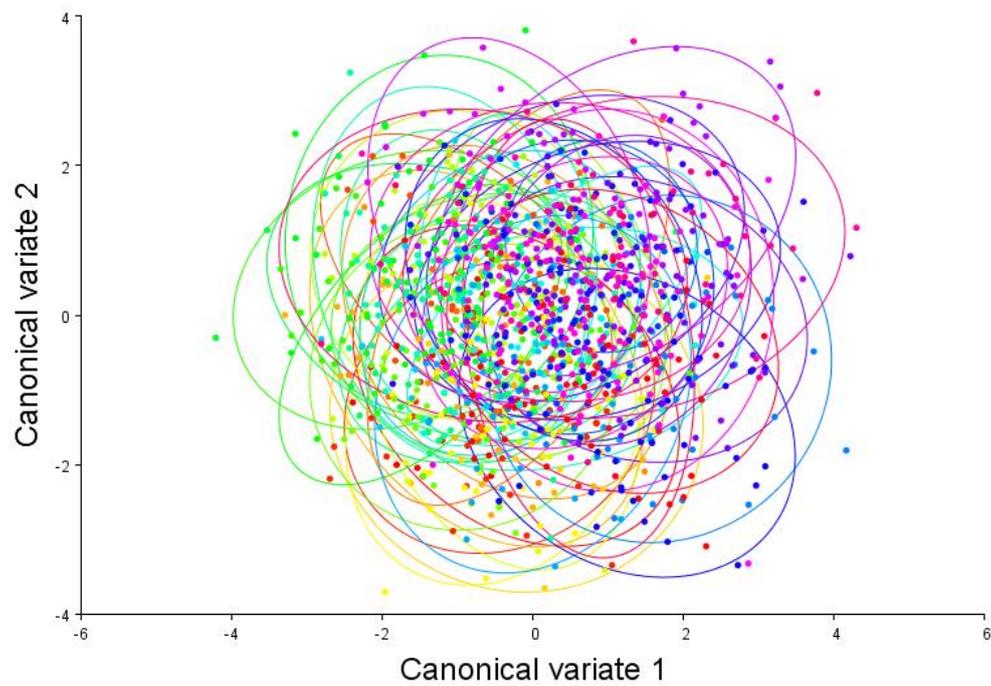


Figura 12. Diagrama de dispersión de los colmenares de *A. m. iberiensis* obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando todos los individuos. *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad.

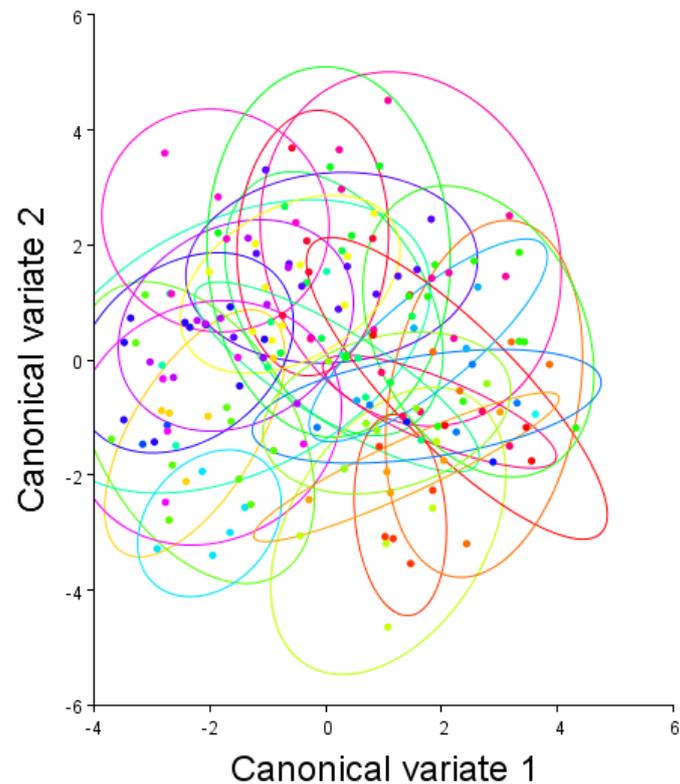
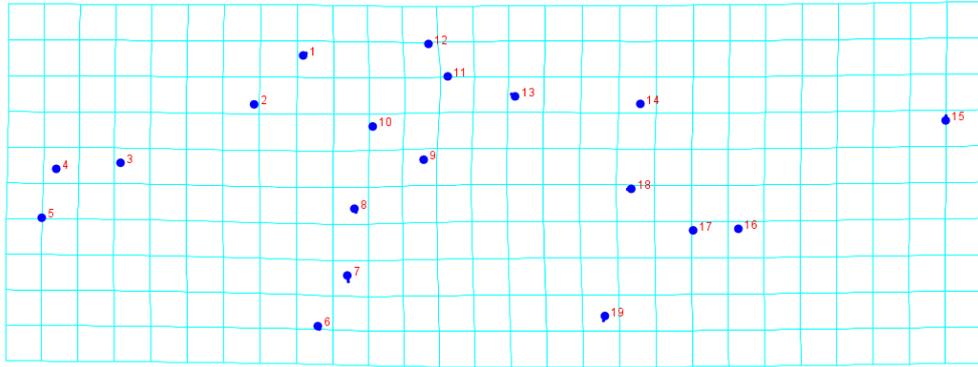


Figura 13. Diagrama de dispersión de los colmenares de *A. m. iberiensis* obtenido a partir del análisis canónico de varianza de las coordenadas cartesianas de los puntos de referencia en el ala delantera derecha considerando las medias por colmena. *Las elipses están dibujadas con un 90% de probabilidad.

Resultados



IberA -- Iberi

Figura 14. Gráficos de gradillas de comparación entre *A. m. iberiensis* linaje mitocondrial M (Iberi) y *A. m. iberiensis* linaje mitocondrial A (IberA). * Los puntos azules corresponden a los puntos de intersección de las venas y las líneas azules indican la magnitud en la que difieren las subespecies y/o híbridos. La magnitud de las líneas está aumentada por 4 para observar las diferencias con mayor claridad.

4.2 Datos del análisis molecular de la región ARNt^{leu}-COII del ADNmt

Los resultados obtenidos mediante el análisis molecular determinaron en las 36 abejas en las que se amplificó y secuenció la región ARNt^{leu}-COII un total de 3 linajes diferentes, M, A y C (Figura 15). Los linajes M y A corresponden a los apiarios de la subespecie *A. m. iberiensis* mientras que los linajes C se corresponden con los apiarios del resto de las subespecies y sus híbridos. La mayoría de muestras se relacionaron con más de una secuencia y haplotipo ya descritos, sin embargo la clasificación del linaje no difirió en ninguno de los casos (Tabla 2).



Figura 15. Linajes determinados en 36 abejas muestreadas en otros tantos apiarios, y número de abejas de cada linaje.

Tabla 2. Haplotipos y linajes de las muestras representativas de los 36 apiarios.

Abeja	Secuencia Genbank	Similitud (%)	Haplotipo	Linaje
AB1	KX463886/ FJ743636	99,8	M4/ M3	M
AD1	KX463811/ KX463748	99,0	A53a'/ A2	A
AG1	KX463907	100	M8	M
AI1	KX463936	98,9	M8'	M
AL1	KX463886/ FJ743636	99,5	M4/ M3	M
AN1	KX463886	99,7	M4	M
AN8	KX463886/ FJ743636	99,4	M4/ M3	M
AO1	KX463749	100	A2a	A
AQ1	KX463792	99,5	A4m	A
BB1	KX167352	99,4	A2d	A
BO1	KX463886/ FJ743636	99,7	M4/ M3	M
CA1	KX463739	99,9	A1h	A
CM1	KX463772	99,5	A48a	A
CM6	KX463811/ KX463748	99,3	A53a'/ A2	A
CO1	KX463811/ KX463748	99,0	A53a'/ A2	A
DE1	KX463749	99,6	A2a	A
EP1	KX463886	99,1	M4	M
FA1	KX463886/ FJ743636	98,9	M4/M3	M
FI1	KX463886/ FJ743636	99,3	M4/ M3	M
FO1	KX463886	99,8	M4	M
JN1	KX463886	99,5	M4	M
LA1	JQ977699/ FJ824582/ EF033655	99,2	C1a/ C1/ C1	C
MF1	KX463919	99,1	M7n	M
MZ1	KX463895	99,5	M4n	M
NU1	KX463886/ FJ743636	99,8	M4/ M3	M
PA1	KX463937	99,0	M8a'	M
PR1	JQ977699/ FJ824582/ EF033655	99,9	C1a/ C1/ C1	C
RA1	KX463922	99,3	M69	M
SE1	KX493936	97,9	M8'	M
SI1	KX463886/ FJ743636	98,9	M4/ M3	M
TA1	KX463763	99,0	A2o	A
TU1	JF723979/ HQ287900	100	C2s/ C31	C
TZ1	KX463911/ KX463906/ KX463903/ KX463902/ KX463886/ FJ743636	99,0	M7/ M75/ M70a/ M70/ M4/ M3	M
YE1	KX463886/ FJ743636	98,8	M4/ M3	M
ZA1	KX463886/ FJ743636	99,4	M4/ M3	M
ZU1	JQ977699/ FJ824582/ EF033655	99,2	C1a/ C1/ C1	C

Resultados

En la provincia de Huesca, con un total de 24 apiarios analizados, se observó una predominancia del linaje M, aunque están presentes los tres linajes, dado que en algunos apiarios se han introducido reinas del linaje C y las abejas analizadas de los apiarios de Alcalá del Obispo, Castelflorite y Tamarite presentaron linaje A (Figura 16). Las cinco muestras procedentes de apiarios de la provincia de Málaga, así como la muestra de Bembibre (Ourense) y la de Desojo (Navarra) se asignaron también al linaje A.



Figura 16. Linajes determinados en los 36 apiarios incluidos en el estudio. Azul: linaje M; rojo: linaje A; verde: linaje C, forma circular: 1 apiario; forma ovalada: 2 apiarios.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante el análisis morfométrico de alas de *Apis mellifera* han permitido diferenciar la subespecie *A. m. iberiensis* del resto de subespecies e híbridos, en los cuales se utilizó como progenitor esta subespecie. El diagrama de dispersión que considera las medias por colmena mostró una mejor diferenciación entre las muestras de abejas ibéricas y el resto de subespecies frente al diagrama que considera todos los individuos. Según los diagramas de dispersión los híbridos se asemejan más a la subespecie sintética Buckfast, aunque en el caso del híbrido Buckfast x *A. m. carnica* x *A. m. iberiensis* solo se dispuso de una colmena, por lo que no se puede conocer realmente la variabilidad de este híbrido ni obtener conclusiones fiables.

El análisis morfométrico, por el contrario, no permitió diferenciar entre la subespecie *A. m. carnica* y la subespecie Buckfast. Dentro del linaje C, las únicas muestras que se agruparon aparte del resto son las de la subespecie *A. m. ligustica*, particularmente cuando se emplearon en los análisis las medias por colmena, aunque para obtener conclusiones claras se deberían analizar un mayor número de colmenas. Todos estos resultados son en principio lógicos, pues cabe esperar que las subespecies pertenecientes al mismo linaje, definido morfométricamente, estén más próximas en la línea evolutiva y por tanto se parezcan más entre sí. Aunque la nube de puntos de la subespecie *A. m. ligustica* no se superpuso con las del linaje C en el diagrama, se observó que el rango de valores de la variable canónica 1 fue similar al del resto de muestras con linaje C. Considerando los resultados de las medias por colmena, la variable canónica 1, que explicó el 83,81 % de la variabilidad, permitió diferenciar entre la subespecie *A. m. iberiensis* y el resto; mientras que la variable canónica 2, que explica el 7,27 % de la variabilidad, ha permitido distinguir también la subespecie *A. m. ligustica* del resto.

Los gráficos de gradillas para cada subespecie e híbrido mostraron la forma del ala de cada uno de ellos. Los gráficos de gradilla para *A. m. iberiensis* indicaron que las intersecciones venosas del ala con menor variación fueron: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15 y 16 mientras que para *A. m. carnica* los hitos que menor variación presentaron fueron: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 16 y 18. El resto de subespecies e híbridos mostraron una escasa variación en todos o en la mayoría de sus hitos (Figura 10 a y b).

En términos generales en los gráficos de gradillas las mayores deformaciones se observaron entre *A. m. iberiensis* y el resto de subespecies, especialmente en el gráfico en el que se compara las subespecies *A. m. iberiensis* y *A. m. carnica*. Por su parte, la subespecie

Discusión

Buckfast se asemejó más a los híbridos derivados de ella que a las otras subespecies de linaje C (Figura 11).

Estos estudios también revelaron un patrón común de desplazamientos relativos en la misma dirección de los puntos 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17 y 18 cuando se compararon la subespecie *A. m. iberiensis* respecto a *A. m. ligustica* y *A. m. carnica* y con la subespecie sintética Buckfast. La magnitud del desplazamiento para cada uno de estos puntos y subespecies fue, sin embargo, distinta (Figura 11 c y 11 d).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el análisis molecular del ADNmt se observó que las muestras representativas de los 5 apiarios de Málaga presentaron un linaje mitocondrial A, tal y como se esperaba. Sin embargo, en el análisis molecular también se detectaron 5 abejas con linaje mitocondrial A en Ourense, Navarra y Huesca. Los 5 apiarios a los cuales pertenecen estas muestras se reclasificaron como linaje A.

El análisis morfométrico geométrico no permitió diferenciar entre los distintos linajes mitocondriales de la subespecie *A. m. iberiensis*, ya que las nubes de puntos de ambos linajes se encuentran superpuestas. Esto nos indica que la diferenciación de ambos linajes mediante la morfometría geométrica del ala es compleja, debiéndose utilizar por tanto más caracteres. Este hecho es acorde con la revisión más reciente del género *Apis* basada en caracteres morfométricos en la que, a pesar de las diferencias, considera que las poblaciones de *Apis mellifera iberiensis* corresponden a una única subespecie (de la Rúa, 2013). Estos resultados también son apoyados por el estudio de Meixner y col. (2013), pudiéndose observar como todos los estudios morfométricos clasifican a la subespecie *A. m. iberiensis* dentro del linaje M, mientras que los estudios basados en el linaje mitocondrial la encuadran en los linajes M y A. Estudios anteriores, basados en la morfometría y el comportamiento, ya constataron que las abejas del norte peninsular son más parecidas a las europeas septentrionales y las del sur a las africanas (de la Rúa, 2013). Este hecho no está en contra de los resultados obtenidos puesto que en este trabajo únicamente se utiliza el ala, mientras que las diferencias descritas anteriormente pueden hallarse en otros caracteres.

Otra explicación posible al por qué no es posible diferenciar entre linajes mitocondriales de *A. m. iberiensis* mediante los caracteres morfométricos del ala, es que estos estén influenciados, al menos en parte, por la herencia paterna. Como el ADNmt es de herencia materna, puede darse el caso de que dos reinas de diferente haplotipo de herencia materna tengan gran similitud genética por haberse cruzado durante varias generaciones con zánganos de la misma zona, dando como resultado obreras de morfología muy similar.

El gráfico de gradillas de comparación entre linajes de la subespecie *Apis mellifera iberiensis* no mostró ninguna diferencia en la localización de los hitos (Figura 14), siendo imposible diferenciar los dos linajes de esta subespecie mediante esta aproximación. Estos resultados apoyan los observados en los diagramas de dispersión, al contrario de lo referido por Rašić y col. (2015), quienes afirmaron que mediante esta estrategia fue posible diferenciar niveles taxonómicos menores, por ejemplo ecotipos o líneas de cría.

En el resto de las muestras, el análisis molecular confirmó el linaje de las abejas, de forma que las de la subespecie *A. m. iberiensis* se asignaron al linaje mitocondrial M, mientras que encuadró en el linaje C las muestras de las subespecies *A. m. carnica* y *A. m. ligustica*, la subespecie Buckfast y los dos híbridos.

Respecto a los resultados derivados del análisis del marcador molecular ARNt^{leu}-COII, se observó en varios casos similitud con más de un haplotipo, fundamentalmente debido a fallos en la secuenciación, ya que las muestras se secuenciaron en una sola dirección, aunque no se encontró ambigüedad respecto al linaje. En cualquier caso, se identificaron en total 26 secuencias y 25 haplotipos diferentes en las 36 abejas analizadas. El haplotipo más frecuente fue el M4 (15 muestras), aunque muchas de ellas se asociaron también al haplotipo M3.

La variabilidad de haplotipos en *A. m. iberiensis* que aquí se ha observado está en consonancia con otros estudios. Cánovas y col. (2008), utilizando el ADNmt, observaron en un estudio con 1017 abejas, un total de 22 haplotipos diferentes (12 del linaje M y 10 del linaje A). La variabilidad de esta subespecie ya había sido descrita con anterioridad en diversos estudios biométricos (Izquierdo y col., 1985; Santiago y col., 1986; Sepúlveda, 1986; Bravo y col., 1989; de la Rúa, 1999; Padilla y col., 2001).

Analizando la distribución de los apiarios de la subespecie *A. m. iberiensis* (Figura 16) se puede observar que en la provincia de Huesca se detectaron en tres apiarios abejas obreras con linaje mitocondrial A, a diferencia de los resultados de estudios anteriores, en los que en esta provincia solo se detectaron abejas de linaje M. Por ejemplo Huesca y Zaragoza fueron las únicas provincias españolas en las que en el estudio de Cánovas y col. (2008) solo se detectaron abejas de linaje M. Además, en este estudio los autores describieron una variación clinal de los haplotipos encontrados en dirección SO-NE, de manera que los linajes evolutivos africanos (A) disminuyeron siguiendo esta dirección a medida que aumentaban las frecuencias de los haplotipos del linaje europeo occidental (M). A este respecto, sin embargo, más recientemente de la Rúa y col. (2013) concluyeron que esta distribución clinal está cambiando de forma acelerada en los últimos años debido a la influencia de las técnicas apícolas como la

Discusión

trashumancia intensiva, la pérdida masiva de colmenas por varroosis y otras patologías, y la compraventa de colmenas a escala trans-regional. Los resultados obtenidos en el presente trabajo estarían en consonancia con esta hipótesis.

Cabe señalar, por otro lado, que los híbridos fueron clasificados como linaje mitocondrial C, lo cual implica que en los cruces se ha utilizado como progenitor materno la subespecie foránea. En nuestro estudio se detectaron abejas de este linaje en cuatro apiarios mediante el análisis molecular: uno en Huesca, dos en Zaragoza y uno en La Rioja. Además se detectó uno más con linaje C en Huesca mediante el análisis morfométrico. Esto es una evidencia clara de la introducción de subespecies de *Apis mellifera* procedentes de otras regiones europeas con vistas a una mayor rentabilidad en explotaciones apícolas de estas provincias. Este hecho apoya la idea reiterada por Meixner y col. (2013) sobre la práctica creciente del comercio de reinas, las importaciones masivas y los movimientos de colonias, que están en la base de las hibridaciones introgresivas, las cuales ponen en peligro las subespecies y los ecotipos regionales con una tendencia creciente hacia la uniformidad de las poblaciones en toda Europa. En nuestro caso, esto supone un riesgo para la conservación de *A. m. iberiensis*, a pesar de haber sido con anterioridad una excepción global a la tendencia de reducción genética en Europa. Además de por la introducción de abejas mejoradas de otras subespecies por parte de apicultores profesionales, existe un elevado riesgo de introducción de abejas foráneas en la provincia de Huesca por ser una región típicamente receptora de apicultores trashumantes de otras regiones, tanto de otras regiones de España como procedentes de Francia.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La morfometría geométrica de las alas se mostró como un método eficaz para diferenciar la subespecie *Apis mellifera iberiensis* de otras subespecies que se están introduciendo en los apiarios de la provincia de Huesca (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica* y la subespecie sintética Buckfast), lo que permite una fiable y rápida detección de la introducción de abejas foráneas.
2. La morfometría geométrica de las alas permitió diferenciar la subespecie *A. m. ligustica* de las subespecies *A. m. carnica* y *A. m. iberiensis* y de la subespecie sintética Buckfast.
3. Las intersecciones venosas del ala representadas por los puntos 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17 y 18 presentaron un patrón común de variación entre la subespecie *A. m. iberiensis* y las subespecies *A. m. ligustica* y *A. m. carnica* y la subespecie sintética Buckfast. El patrón observado es el desplazamiento individual de cada uno de estos puntos que siempre se produce aproximadamente en la misma dirección entre la subespecie ibérica y el resto; aunque la magnitud de variación para cada uno de estos puntos y subespecies es distinta.
4. La secuenciación de los productos de amplificación del locus ARNt^{leu}-COII permitió asignar linajes y haplotipos para abejas obreras de todas las subespecies estudiadas. Este método permitió diferenciar entre linajes y haplotipos de *A. m. iberiensis* a diferencia de la morfometría geométrica de las alas que no sirvió para diferenciar entre linajes de la subespecie *A. m. iberiensis*.
5. En los apiarios muestreados en la provincia de Huesca predominó el linaje M de *Apis mellifera iberiensis*, aunque se detectaron por primera vez abejas de linaje A y de linaje C. La aparición de linajes diferentes al M en los apiarios de la provincia de Huesca se explica por prácticas apícolas tales como la trashumancia, la compraventa de colmenas y el comercio de reinas que se traducen en un riesgo para la conservación de los ecotipos locales.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bravo, L., Bustos, M., Cobo, A., Espinosa, E., Flores, M., Flores, J. M., Gijón, H., Giordani, G., Josa, A., Llorente, J., Martín, E., Navarro, C. J., Padilla, F., Pellín, P., Puerta, F., Romero, P., Santidrián, S., Serrano, I., Usón, J. y Writter, W. (1989). Cursos de apicultura: Temas teóricos básicos. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica.
- Cánovas, F., de la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (2008). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46(1): 24-30.
- Cánovas, F., de la Rúa, P., Serrano, J., Galián, J. (2011). Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie* 42: 235-251.
- Charistos, L., Hatjina, F., Bouga, M., Mladenovic, M., Maistros, A.D. (2014). Morphological discrimination of greek honey bee populations based on geometric morphometrics analysis of wing shape. *Journal of Apicultural Science* 58(1): 75-84.
- Cornuet, J., Garnery, L., Solignac, M. (1991). Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics* 1128:393-403.
- Crozier, R.H., Crozier, Y.C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133: 97-117.
- De la Rúa (1999). Variabilidad genética, análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de *Apis mellifera* (Linneo 1758) (Hymenoptera: Apidae). Universidad de Murcia. Departamento de Biología Animal.
- De la Rúa, P., Acosta, J.A., Sánchez, O., Muñoz, I. (2013). Caracterización molecular de la biodiversidad de la cabaña apícola de la provincia de Albacete. *Sabuco* 9: 175-196.
- Ellis, J.D., Evans, J. D., y Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research* 49: 134-136. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.30.
- Engel, M.S. (1999). The first fossil *Euglossa* and phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae; Euglossini). *American Museum novitates* 3272: 1-14.
- Francis, R.M., Kryger, P., Meixner, M., Bouga, M., Ivanova, E., Andonov, S., Berg, S., Bienkowska, M., Büchler, R., Charistos, L., Costa, C., Dyrba, W., Hatjina, F., Panasiuk, B., Pechhacker, H., Kezić, N., Korpela, S., Conte, Y.L., Uzunov, A., Wilde, J. (2014). The genetic origin of honey

Bibliografía

- bee colonies used in the COLOSS Genotype-Environment Interactions Experiment: a comparison of methods. *Journal of Apicultural Research* 53(2): 188-204. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.02
- Francoy T.M., Wittmann D., Drauschke M., Müller S., Steinhage V., Bezerra-Laure M.A.F., De Jong D., Gonçalves L.S. (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie* 39(5): 448-494.
- Garnery, L., Cornuet, J.M., Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 1: 145-154.
- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J., Solignac, M. (1998). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution* 30(1): 49-74.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., Cornuet, J.M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49: 1016-1021.
- Hunt, G.J., Page, R.E. (1995). Linkage map of honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 139: 1371-1382.
- Izquierdo, J., Domínguez, A., Albornoz, J., Santiago, E. (1985). Discriminación entre poblaciones de abejas (*Apis mellifera*) de Asturias y la Submeseta Norte. *Boletín de Ciencias Naturales. IDEA* 35: 87-101.
- Jean-Prost, P. y Medori, P. (1995). *Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena.* Madrid: Mundi Prensa.
- Kandemir, I., Özkan, A., Fuchs, S. (2011). Reevaluation of honey bee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie* 42(5): 618-627.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Klingenberg, C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11(2): 353-357. doi: 10.1111/j.17550998.2010.0-2924.x

- Meixner, M.D., Pinto, M.A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J. D. Ellis; P. Neumann (Eds). The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>.
- Miguel, I., Baylac, M., Iriondo, M., Manzano, C., Garnery, L., Estonba, A. (2010). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* 42: 150-161.
- Muñoz, I. (2013). Variación genética y conservación de poblaciones de *Apis mellifera* L. Universidad de Murcia. Área de Biología Animal. Departamento de Zoología y Antropología Física.
- Muñoz, I., Henriques, D., Johnston, J. S., Chávez-Galarza, J., Kryger, P., 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): e0124365.
- Oleksa, A., Tofilski, A. (2015). Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie* 46(1): 49-60. doi: 10.1007/s13592-014-0300-7.
- Padilla, F., Valeiro, M.J., Campano, F., Jiménez, E., Puerta, F., Flores, J.M., Bustos, M. (2001). Estudio biométrico de poblaciones de abejas (*Apis mellifera* L.) del centro de Portugal y de Madeira. *Archivos de Zootecnia* 50: 67-77.
- Péntek-Zakar, E., Andrzej, O., Borowik, T., Kusza, S. (2015). Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecology and Evolution* 5(23): 5456-5467.
- Pinto, M.A., Henriques, D., Neto, M., Guedes, H., Muñoz, I., Azevedo, J.C., de la Rúa, P. (2013). Maternal diversity patterns of Ibero-Atlantic populations reveal further complexity of Iberian honeybees. *Apidologie* 44:430-439.
- Pinto, M.A., Muñoz, I., Chávez-Galarza, J., de la Rúa, P. (2012). The Atlantic of the Iberian Peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity. *Apidologie* 43: 663-673.
- Rašić, S., Mladenović, M., Stanisavljević, L. (2015). Use of geometric morphometrics to differentiate selected lines of carniolan honeybees (*Apis mellifera carnica*) in Serbia and Montenegro. *Archives of Biological Sciences* 67(3): 929-934.

Bibliografía

- Rohlf, F.J. (2001). TpsDig: digitize landmarks from image files, scanner, or video. Stony Brook, NY, USA: Department of Evolutionary Biology, University of New York.
- Santiago, E., Albornoz, J., Dominguez, A., Izquierdo, J.I. (1986). Étude biométrique des populations d'abeilles (*Apis mellifera*) du Nord-Ouest de l'Espagne. *Apidologie* 17(2): 79-92.
- Sepúlveda, G.J.M. (1986). Apicultura. Barcelona: Aedos.
- Silva, F.L., Grassi, S.M. L., Francoy, T.M., Costa, A.H.R. (2015). Evaluating classification and feature selection techniques for honeybee subspecies identification using wing images. *Computers and Electronics in Agriculture* 114: 68-77.
- Tofilski, A. (2004). DrawWing, a program for numerical description of insect wings. *Journal of Insect Science* 4: 17.
- Torcida, S., Perez, S.I. (2012). Análisis de Procrustes y el estudio de la variación morfológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica* 14(1): 131-141.
- Walsh, P.S, Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. ***BioTechniques* 10: 506-513.**
- Wu, M., Lu, T., Lu, K. (2017). PCR-RFLP of mitochondrial DNA reveals two origins of *Apis mellifera* in Taiwan. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24(5): 1069-1074.
- Yániz, J., Ángel, E., Martín, P., Sales, E., Santolaria, P. (2016). Caracterización de la abeja melífera en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada* 18: 257-271.