

DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA BASADA EN MATLAB PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA ABEJA MELÍFERA

Ángel-Beamonte¹, E., Martín-Ramos¹, P., Santolaria¹, P., Sales¹, E., Abizanda¹, J. y Yániz¹, J.L.

¹Grupo de investigación TECNOGAM, Instituto IUCA, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca. jyaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Cualquier estudio de la diversidad genética debe tener herramientas que permitan una identificación fiable de las posibles variantes genéticas. La genética molecular permite una caracterización precisa de la diversidad genética, aunque su utilización requiere instalaciones altamente especializadas, y consume mucho tiempo y recursos. Se ha determinado recientemente que la morfometría geométrica de las venas alares proporciona una discriminación similar de las subespecies de abejas melíferas al análisis de microsatélites (Oleksa y Tofilski, 2014). Por lo tanto, la morfometría geométrica de la venación del ala es particularmente adecuada para rastrear las relaciones filogenéticas entre las subespecies y variantes genéticas de abejas (Meixner et al., 2013). Su determinación es económica y simple y se puede hacer con poco equipo. La principal limitación de esta técnica es la necesidad de identificar con precisión las intersecciones venosas de las alas para obtener sus coordenadas.

En la morfometría geométrica de la venación de las alas, el tpsDig es uno de los programas más frecuentemente utilizados. Este programa requiere el trazado manual de todas las intersecciones de las venas mediante un clic del ratón. La principal ventaja de este software es su flexibilidad, aunque requiere mucha interacción humana que aumenta los errores y tiene problemas de reproducibilidad. Conociendo estas limitaciones, el objetivo de este estudio fue desarrollar un nuevo software basado en MATLAB para el reconocimiento automático de las intersecciones venosas del ala en *Apis mellifera* y evaluar su precisión y capacidad para discriminar diferentes variedades genéticas de abejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron al menos ocho abejas por colonia del área de cría. El ala anterior derecha de cada individuo se cortó cerca de su base y se montó cuidadosamente entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Las imágenes digitales de las alas se obtuvieron mediante un microscopio (DM4500B, Leica, Wetzlar, Alemania) con un objetivo PLAN APOchromatic 1.25 × y se fotografiaron con una cámara digital Canon EOS 600D (Canon Inc., Tokio, Japón). Para cada imagen, las coordenadas de 19 puntos de referencia ubicados en las intersecciones venosas se determinaron automáticamente con el nuevo software. La posición y numeración de los hitos fue la misma que en Smith et al. (1997).

En el primer experimento se determinó la fiabilidad y el error de medición. Para ello se fotografiaron cien alas y se evaluó la precisión en el reconocimiento de las intersecciones venosas. También se determinó el error de medición (es decir, la variabilidad de la determinación de coordenadas para un ala dada) del nuevo software en comparación con el tpsDig. Para ello se realizó el análisis repetido de la misma imagen de ala (3 alas, 30 repeticiones / ala). La variabilidad de cada coordenada se calculó utilizando coeficientes de variación (CVs). Los CV intra-ala se expresaron como la media de los valores individuales.

En el segundo experimento se estudió la morfometría geométrica de diferentes subespecies de abejas usando el nuevo software. Para ello se muestrearon un total de 90 colonias de 18 apiarios de *A. mellifera*, desglosadas de la siguiente manera: subespecie *A. m. iberiensis* (10), *A. m. ligustica* (2), *A. m. carnica* (2) e híbrido Buckfast (4). En total, se analizaron 720 abejas de 90 colonias. Las coordenadas de referencia obtenidas del nuevo software se procesaron posteriormente en el programa libre MorphoJ (Klingenberg, 2011b). La alineación se realizó usando superposición de Procrustes. Después de calcular el promedio de todas las abejas de cada colonia, se realizó un análisis canónico de varianza (CVA), utilizando subespecie/cepa como variable del grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nuevo software permitió el análisis del 100% de las alas. La precisión de la detección automática de las intersecciones fue del 100% en el 87% de los casos, mientras que la detección falló en un solo punto en el 9% de las muestras, en dos puntos en el 3%, y en más de dos puntos en el 1% de las muestras.

La determinación de las intersecciones usando el nuevo software fue altamente repetible, con coeficientes de variación más bajos que los de tpsDig: los CVs intra-alas variaron de 0,06 a 0,12% para el nuevo software y de 0,23 a 0,28% para el tpsDig.

Según los resultados del CVA, el primer, segundo y tercer ejes explicaron 68,19%, 19,59% y 12,22% de la variación total, respectivamente. El diagrama de dispersión de las colonias demostró una alta discriminación entre subespecies. Las pruebas de validación cruzada basadas en funciones discriminantes clasificaron correctamente el 100% de las colonias.

Algunos autores habían realizado intentos para construir sistemas automáticos de identificación de las intersecciones venosas del ala de abeja basados en análisis de imágenes (Tofilski, 2004; Meixner et al., 2013). Tofilski (2004) desarrolló el software Open DrawWing para determinar automáticamente las coordenadas de dieciocho puntos de referencia del ala. Utilizando el equipamiento descrito en esta comunicación, sin embargo, DrawWing falló más del 90% de las veces. Esta tasa de fracaso se podría atribuir al hecho de que DrawWing requiera un equipamiento de captura de imágenes específico o a la necesidad de disponer de conocimientos técnicos para utilizar correctamente el software. Ambas posibilidades pueden explicar por qué, aunque los creadores han utilizado con precisión DrawWing (Tofilski, 2004; Oleksa y Tofilski, 2015), rara vez ha sido utilizado por otros grupos, que han seguido utilizando el tpsDig para localizar manualmente las intersecciones venosas del ala (Francoy et al., 2008; Francoy et al., 2009; Miguel et al., 2011; Rasic et al., 2015b).

El nuevo software aquí presentado constituye una herramienta versátil, precisa y exacta para el reconocimiento automático de las uniones de las alas de *Apis mellifera*, permitiendo una rápida identificación de la diversidad genética de las abejas utilizando la morfometría geométrica. En términos de tolerancia, permitió la detección automática de todos los puntos de referencia en el 87% de los casos cuando se utilizó un microscopio convencional. Por otra parte, cuando la detección falló, ocurrió generalmente en una sola intersección, y el punto de referencia automático estaba cerca de la intersección real de la vena, así que una pequeña modificación permitió una corrección rápida del mismo. En lo que respecta a la repetibilidad, fue muy alta, con CV dentro del ala entre 0,06 y 0,12%. En relación con la aplicabilidad de las coordenadas extraídas, se obtuvieron altos resultados de discriminación entre subespecies cuando se usaron conjuntamente con MorphoJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Francoy, T.M. 2008. *Apidologie* 39, 488-U410.
- Francoy, T.M. 2009. *Genet Mol Res* 8, 709-717.
- Klingenberg, C.P., 2011. *Molecular Ecology Resources* 11, 353-357.
- Meixner, M.D. 2013. *J. Apic. Res.* 52, 1-28.
- Miguel, I. 2011. *Apidologie* 42, 150-161.
- Oleksa, A. *Apidologie* 46, 49-60.
- Rasic, S. 2015. *Archives of Biological Sciences* 67, 929-934.
- Smith, D. 1997. *J. Evol. Biol.* 10, 551-574.
- Tofilski, A., 2004. *Journal of insect science* 4, 17.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los apicultores participantes en el estudio por su ayuda al proporcionar muestras de abejas y al ADS nº 1 de Huesca por su colaboración. Este trabajo fue financiado por el programa "XXXI Concurso de Ayudas de Investigación 2015" del Instituto de Estudios Altoaragoneses, por el programa "Proyectos de investigación, desarrollo e innovación para jóvenes investigadores, convocatoria 2016" de Ibercaja Obra Social y por la DGA-FSE (proyecto A40).

DEVELOPMENT OF A MATLAB-BASED TOOL FOR THE STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF *APIS MELLÍFERA*

ABSTRACT: This study was designed to develop a novel MATLAB-based tool, aimed at facilitating the geometric morphometric analysis of forewing venation through an automatic recognition of wing vein junctions. Firstly, the ability of the new software to analyze wing images obtained by different optical equipment was evaluated. Even when a low-end USB-microscope was used for image collection, it reached 100% precision in the automatic detection of the landmarks for 74% of the samples, and most of failures corresponded to a single point. The measurement error of the new software was studied through repeated analysis of the same wing image, evincing that landmark determination was highly repeatable, even higher than that of widely used tpsDig software. In addition, a field test with 720 specimens from three subspecies (*A. m. iberiensis*, *A. m. ligustica*, and *A. m. carnica*) and from Buckfast hybrid, collected from 90 different colonies, was conducted. In conjunction with MorphoJ, the coordinates of the vein junctions extracted by the program led to an accurate classification of the specimens, confirmed by canonical variate analysis methods. The new software can thus be deemed as a versatile, precise and accurate tool for the automatic recognition of wing vein junctions of *Apis mellifera*, facilitating the identification of bee genetic diversity using geometric morphometry.

Keywords: *Apis mellifera*, wing geometric morphometry, landmarks, MATLAB, subspecies discrimination.