

**Avaliação dos padrões de diversidade genética nas
populações de abelha melífera do território interior
Português:
a rusticidade posta à prova**

Helena Isabel Alves Carvalho Guedes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias Animais*

Orientado por
Professora Doutora Maria Alice da Silva Pinto

Bragança
2010

Avaliação dos padrões de diversidade genética nas populações de abelha melífera do território interior Português: a rusticidade posta à prova

Conteúdo

Índice de Figuras	1
Índice de Tabelas	2
Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução	6
Metodologia	8
<i>Amostragem</i>	8
<i>Análise Molecular</i>	10
<i>Análise Estatística</i>	13
Resultados.....	14
<i>Frequência Haplotípica</i>	17
<i>Diversidade Genética</i>	21
<i>Distância Genética entre populações</i>	23
Discussão	24
Considerações Finais	26
Bibliografia	27

Índice de Figuras

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUB-ESPÉCIES E RESPECTIVAS LINHAGENS DE <i>A. MELLIFERA</i> NA EUROPA E NORTE DE ÁFRICA (DE LA RÚA ET AL., 2009A)	6
FIGURA 2 - CONCELHOS AMOSTRADOS	8
FIGURA 3 - NÚMERO DE APIÁRIOS AMOSTRADOS POR DISTRITO	9
FIGURA 4 - MAPA DO CROMOSSOMA DE <i>APIS MELLIFERA</i> . FONTE: (CROZIER ET AL., 1993).....	10
FIGURA 5 – AS AMPLIFICAÇÕES FORAM REALIZADAS EM TERMOCICLADOR, UNO II BIOMETRA	10
FIGURA 6 – GEL DE AGAROSE DE USO ROTINEIRO DE 1%, SIGMA-ALDRICH® MOSTRANDO O POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO (COLUNA 1: BENCH TOP DNA LADDER DE 100PB, PROMEGA®)	11
FIGURA 7 - GEL DE AGAROSE DE 4% MOSTRANDO A ELEVADA VARIABILIDADE DE HAPLÓTIPOS ENCONTRADA NAS AMOSTRAS ANALISADAS. POÇO 1 CARREGADO COM MARCADOR <i>STEP LADDER</i> DE 50 BP. OS RESTANTES POÇOS FORAM CARREGADOS COM AMOSTRAS (VER HAPLÓTIPO NA FOTO).....	11
FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE NOVOS HAPLÓTIPOS POR DISTRITO	16
FIGURA 9 - FREQUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS POR DISTRITO	18
FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUB-LINHAGENS AFRICANAS, POR DISTRITO	18
FIGURA 11 - PADRÃO GEOGRÁFICO DE VARIABILIDADE GENÉTICA	20
FIGURA 12 - DISTRITOS COM MAIOR [A] E MENOR [B] DISTÂNCIA GENÉTICAS DE NEI (1978).....	23

Índice de Tabelas

TABELA 1 – HAPLÓTIPOS IDENTIFICADOS NAS CINCO LINHAGENS EVOLUCIONÁRIAS E RESPECTIVOS COMPRIMENTOS DOS FRAGMENTOS PRÉ E PÓS DIGESTÃO COM <i>DRAI</i> , (ADAPTADO DE FRANCK ET AL. 2001)	12
TABELA 2 - FÓRMULAS DE CÁLCULO PARAMETRIZADAS NA APLICAÇÃO GENALEX 6.4 (PEAKALL ET AL., 2006)	13
TABELA 3 – HAPLÓTIPOS E RESPECTIVOS COMPRIMENTOS DOS FRAGMENTOS PRÉ E PÓS DIGESTÃO <i>DRAI</i>	14
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE HAPLÓTIPOS DE LINHAGENS A, M E C, POR DISTRITO. N – DIMENSÃO DA AMOSTRA;	14
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS NOVOS HAPLÓTIPOS, POR DISTRITO. N REPRESENTA O TAMANHO DA AMOSTRA;	15
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DE LINHAGENS DE HAPLÓTIPOS MITOCONDRIAIS, POR DISTRITO. N REPRESENTA O TAMANHO DA AMOSTRA;	15
TABELA 7 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA POR DISTRITO	17
TABELA 8 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS POR DISTRITO. OS HAPLÓTIPOS AFRICANOS ENCONTRAM-SE AGRUPADOS NAS TRÊS SUB-LINHAGENS.	19
TABELA 9 - HAPLÓTIPOS PRIVADOS POR POPULAÇÃO E FREQUÊNCIA	21
TABELA 10 - DIVERSIDADE GENÉTICA POR DISTRITO. TAMANHO DA AMOSTRA (N), N.º DE ALELOS (N _A), DIVERSIDADE GÉNICA (H) E DIVERSIDADE GÉNICA NÃO ENVIESADA (U _H), CORRIGIDA PARA O TAMANHO DA AMOSTRA. ESTATÍSTICAS OBTIDAS COM O PROGRAMA GENALEX 6.4 (PEAKALL ET AL., 2006)	21
TABELA 11 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ZONAS LÍMITROFES ENTRE PORTUGAL E ESPANHA. TAMANHO DA AMOSTRA (N), DIVERSIDADE GENÉTICA NÃO ENVIESADA (U _H), CORRIGIDA PARA O TAMANHO DA AMOSTRA.	22
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DE DIVERSIDADE GENÉTICA CALCULADOS PARA OS DISTRITOS APENAS COM OS CONCELHOS DO PRESENTE ESTUDO E DISTRITO COMPLETO. TAMANHO DA AMOSTRA (N), N.º DE ALELOS (N _A), DIVERSIDADE GENÉTICA (H) E DIVERSIDADE GENÉTICA NÃO ENVIESADA (U _H), CORRIGIDA PARA O TAMANHO DA AMOSTRA.	22
TABELA 13 - MATRIZ DE DISTÂNCIAS GENÉTICAS NÃO ENVIESADAS DE NEI (1978) ENTRE OS DIVERSOS PARES DE POPULAÇÕES.	23

Agradecimentos

«Se a Rainha fosse mais inteligente, seria porventura e inevitavelmente neurótica (...) talvez por nunca sair da colmeia e passar os dias confinada na obscuridade, numa espécie de noite eterna, em perpétua azáfama...»

The Queen must die: and another affairs of bees and men,
de William Longgood

O meu primeiro agradecimento dirijo-o à Professora Doutora Alice Pinto, pelo desafio que me lançou e pela sua entrega a este projecto; pela partilha e orientação.

Estendo-o às minhas colegas que partilharam e colaboraram na realização deste trabalho: Inês Moura, Larissa Souza e Margarida Neto.

Este trabalho foi possível graças à colaboração de várias instituições e pessoas a elas associadas, que permitiram a cobertura nacional da amostragem, sem as quais esta tarefa teria sido inconciliável com as demais. Reconheço o valor do trabalho e colaboração de Dr^a Ana Belo (DGV-DSV Alcains); Dr^a Ana Paula (DSV Elvas); Eng^o João Neto (Apilegre); Dr^a Maria José Valério (LNIV); Dr^a Magda Tavares (Capolib); Eng^o Miguel Maia (Sicolmeia); Dr^a Nair Oliveira (DSV Vila Franca de Xira); Eng^o Osvaldo Silva (Apiguadiana); Eng^o Paulo Varela (Montemormel); Eng^o Ricardo Pereira; Eng^a Sandra Diniz (Ribafloz); e Eng^a Telma Marreiros (DSV Algarve), e a todos os colaboradores da Associação dos Apicultores do Parque Natural de Montesinho.

Às minhas amigas Anabela Mendes e Dulce Alves deixo uma palavra de carinho pelo apoio e estímulo a “sair da colmeia e da perpétua azáfama”.

E finalmente agradeço à minha Família, a minha colmeia, o meu refúgio.

A todos expresso a mais profunda gratidão.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa Apícola Nacional (PAN 2009-2010, Medida 6A) e do projecto de investigação PTDC/BIA-BEC/099640/2008 (COMPETE/QREN/EU).

Resumo

A Península Ibérica, pela sua proximidade com o Norte de África, explica a presença de linhagem africana na Europa. A abelha que habita nesta região é a *Apis mellifera iberiensis* Engel 1999. A Península Ibérica, representa um dos redutos das populações de abelhas que povoam a Europa, quer pela sua localização quer pelas barreiras naturais que a limitam. As abelhas ibéricas são o resultado da interacção entre as abelhas de linhagem Europeia (M) que sobreviveram ao último fenómeno glacial e as abelhas da linhagem Africana (A) que colonizaram o sudoeste europeu.

Partindo dos estudos que caracterizaram o perfil evolutivo da abelha *A. m. iberiensis* em Espanha, foram aplicadas as mesmas metodologias de análise, em território Português, ao longo dos distritos do interior, acompanhando a linha fronteira entre os dois países. Este trabalho permitiu caracterizar, por análise molecular, a linhagem materna predominante nas populações. Tal como em Espanha, a linhagem A de origem Africana é dominante, e está presente em mais de 93% das colónias. É evidente a distribuição clinal com orientação Sul-Norte de substituição gradual da sub-linhagem A_I pela sub-linhagem A_{III}. A sub-linhagem A_{II}, a qual é dominante no Norte de África, também está presente em Portugal, contudo sem se destacar perante as demais.

A frequência observada de haplótipos pertencentes à linhagem C foi muito baixa (0,02%), pelo que concluímos que a poluição genética, por linhagens exóticas, no interior de Portugal continental é muito reduzida.

Nos nove distritos estudados, a diversidade genética é elevada, com valores máximos de 0,92 no distrito de Castelo Branco. É também neste distrito que cinco novos haplótipos foram identificados, entre os nove que não se encontraram referenciados para o território Espanhol. Esta variabilidade genética pode suportar a hipótese de que na Península Ibérica a distribuição dos haplótipos a nível regional, está associada às condições climáticas locais, aos ecossistemas e às práticas apícolas (De La Rúa et al., 2009b).

Na área de estudo, que representa aproximadamente 10% do território espanhol, é possível correlacionar a distância genética com a distância geográfica das populações. As maiores distâncias genéticas calculadas pelo índice de Nei, foram observadas entre as populações de Vila Real, Santarém e Faro, que representam exactamente os distritos mais norte, central e sul de Portugal continental.

Palavras-Chave: ADNmt; Linhagem Africana; Haplótipos; Diversidade Genética; Padrão Geográfico.

Abstract

The Iberian Peninsula, by its proximity with the North of Africa, explains the presence of the African honey bee lineages in Europe. The resident honey bee is the *Apis mellifera iberiensis* Engel 1999, formerly known as *A. m. iberica* Goetze 1964. The geographical position of the Iberian Peninsula, and its natural barriers, represent the last refuge for the European honey bees. The Iberian honey bees are the result of the interaction between the M lineage from Europe, and the A Lineage from Africa, that colonised the Eastern of Europe.

Following previous studies which characterized the patterns of genetic diversity of *A. m. iberiensis* in Spain, the same methodology was applied to honey bee populations across the Portuguese border with Spain. This study allowed characterization of the predominant maternal lineage among the Portuguese honey bee population. As it was reported in Spain, the A lineage is dominant with over 93% of honey bee colonies belonging to this lineage. It is also remarkable the clinal distribution of the haplotypes. The sublineage A_I, which is dominant in southern Portugal, is gradually replaced by sublineage A_{III} in the north. The A_{II} sublineage, which is dominant North Africa, is also present in Portugal, but in lower frequencies than the others sublineages.

The frequency of haplotypes belonging to the C lineage was very low (0,02%). With this result, we can conclude that genetic pollution, by exotic honey bee lineages, is very low in continental Portugal.

The genetic diversity is high in the nine geographical regions studied. The highest value was observed in Castelo Branco (0,92), in which it was also found the largest number of new haplotypes (5), that were never identified in previous studies. This genetic variability might support the hypothesis that at the Iberian Peninsula the haplotypic distribution has a direct relationship with the environmental conditions, the ecosystems and the beekeeping practices (De La Rúa et al., 2009b).

This study was focused in a small area (approximately 10% of the Spain). Nevertheless it was possible to establish a direct relationship between the genetic distance (estimated by Nei's Indice), and the geographical distance of the populations. The higher values for genetic distance were found between Vila Real, Santarém and Faro populations, which are located exactly at the North, Center and South of Portugal.

Key-Words: mtDNA; African Lineage; Haplotype; Genetic Diversity; Geographical pattern

Introdução

A abelha melífera, *Apis mellifera* L, apresenta uma notável diferenciação geográfica, já que lhe são conhecidas 29 subespécies (Engel, 1999) as quais se agrupam em cinco linhagens evolucionárias (A, M, C, O e Y) com base em marcadores morfométricos (Ruttner, 1988; Nielsen et al., 1999), moleculares (Franck et al., 2000b; De La Rúa et al., 2001b; Franck et al. 2001; Cánovas et al. 2008; Miguel et al. 2007), comportamentais (Estoup et al., 1994; Hernández-Garcia et al., 2009) e nucleares recorrendo essencialmente a alozimas (Arias et al., 2006) e microsatelites (Estoup et al., 1993; De La Rúa et al., 2002).

Três destas linhagens ocorrem naturalmente na Europa (Figura 1). A Europa Ocidental é ocupada pela linhagem A, na metade sudoeste da Península Ibérica, e pela linhagem M, que se estende desde o nordeste de Espanha até à Escandinávia. A linhagem C ocupa a parte central e oriental da Europa. Enquanto a área de distribuição oriental está representada por sete subespécies, a ocidental está representada apenas por duas espécies.

Esta distribuição natural tem sofrido alterações causadas pelas actividades dos apicultores. A transumância de longa distância e o comércio de rainhas fecundadas expuseram as diversas abelhas autóctones de cada região à crescente hibridação introgressiva, que conduzirão eventualmente à perda das características de adaptabilidade, moldadas pela selecção natural (De La Rúa et al., 2009a).



Figura 1 - Distribuição das sub-espécies e respectivas linhagens de *A. mellifera* na Europa e Norte de África (De La Rúa et al., 2009a)

As abelhas da Península Ibérica são consideradas uma subespécie (*Apis mellifera iberiensis*), a qual tem origem na hibridação entre as linhagens A e M (Engel, 1999). Desde o primeiro estudo morfométrico e comportamental (Ruttner, 1988), inúmeros estudos suportaram esta hipótese, com base na análise de (i) alozimas (Smith et al., 1995), (ii) feromonas (Hepburn et al., 1996); (iii) ADN mitocondrial (ADNmt) (Arias et al., 1996) e (iv) microssatélites (Cánovas et al., 2008). Estes estudos sugerem que as abelhas ibéricas são o resultado da ampla integração entre abelhas da linhagem M, sobreviventes do último evento glacial, e Norte-Africanas da linhagem A, que colonizaram o sudoeste europeu (Cánovas et al., 2008).

As populações de *A. m. iberiensis* mostram, em termos de composição genética materna (ADNmt), um gradiente evidenciado em que as populações do Norte da Península se aproximam da subespécie Europeia *Apis mellifera mellifera* enquanto as do Sul são similares à subespécie Norte-Africana *Apis mellifera intermissa* (Cánovas et al., 2008).

Em Espanha, o estudo genético das populações de abelhas tem sido abrangente (Franck et al., 1998; De La Rúa et al., 2001a; De La Rúa et al., 2005; Cánovas et al., 2008), e com os diversos trabalhos publicados é possível inferir sobre a evolução das abelhas melíferas e a actual diversidade. Contrariamente às populações de abelhas que habitam a parte espanhola da Península Ibérica, a composição genética das populações Portuguesas é praticamente desconhecida, uma vez que apenas duas populações foram examinadas até à data deste estudo: uma na região do Porto e outra na região de Évora (Franck et al. 1998, 2001)

Assim, pretende-se com o presente estudo contribuir para a caracterização genética da abelha em Portugal através da análise da distribuição geográfica da variabilidade genética materna (ADNmt) no interior do País. Concretamente, os objectivos deste estudo incluem: (i) quantificação da diversidade genética num transecto Norte-Sul do interior de Portugal Continental e (ii) quantificação do grau de poluição genética proveniente de abelhas exóticas.

Metodologia

Amostragem

A avaliação dos padrões genéticos numa população requer a amostragem que cumpra os requisitos mínimos de representatividade dessa população. As abelhas, organizadas em enxames, são exploradas pelo Homem em apiários ou colmeais, onde a promiscuidade dos cruzamentos entre as rainhas e os zângãos é notória. Este facto foi considerado como uma das principais causas da biodiversidade nas populações de abelhas (De La Rúa et al., 2009a).

Neste estudo o procedimento de amostragem foi estruturado de forma a serem abrangidos os distritos que compõem a raia fronteiriça entre Portugal e Espanha, nomeadamente:

- (i) Bragança – (BGC)
- (ii) Vila Real – (VLR)
- (iii) Guarda – (GRD)
- (iv) Castelo Branco – (CTB)
- (v) Portalegre – (PTL)
- (vi) Santarém – (STR)
- (vii) Évora – (EVR)
- (viii) Beja – (BEJ)
- (ix) Faro – (FAR)

Dos distritos com faixa litoral, apenas foram considerados os concelhos do interior, tendo como referência de divisão fronteiras naturais como montanhas e rios. Ficaram divididos os distritos de Santarém (Concelhos de Abrantes, Constância e Mação); Beja (concelhos de Almodôvar, Beja, Castro Verde, Cuba, Mértola e Serpa) e Faro (Concelhos de Alcoutim; Castro Marim, Faro, Loulé, Olhão, S. Brás de Alportel, Tavira e Vila Real de Santo António) (Figura 2).

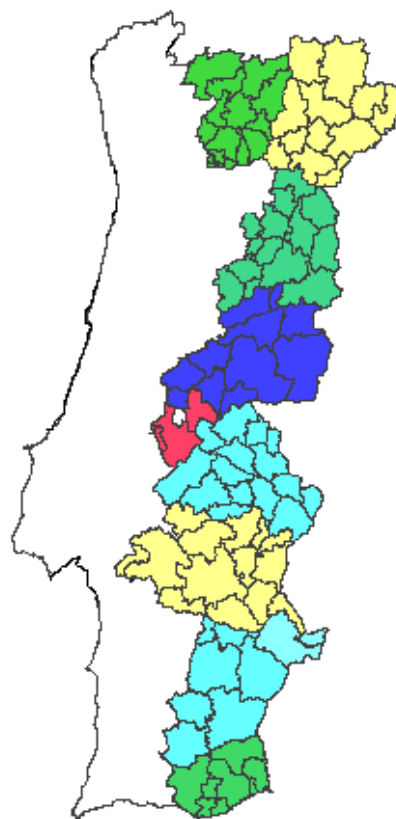


Figura 2 - Concelhos amostrados

A unidade básica deste estudo foi o apiário, ou seja, em cada um foi analisada uma abelha proveniente de uma colónia desconhecida, a qual representa todo o apiário. Foram contactados apicultores, organizações de produtores, técnicos apícolas e laboratórios de diagnóstico de patologias das abelhas, a quem foi solicitada a colaboração na colheita de abelhas. A todos eles foram disponibilizados tubos de plástico para conservação das abelhas e entregues as instruções para identificação das amostras.

As abelhas foram conservadas em álcool absoluto ou a 96%, em tubos de plástico estanques e mantidas a -20°C. Para cada amostra foram recolhidos os seguintes dados: (i) nome do apicultor; (ii) número de apicultor (de acordo com o registo nacional da Direcção Geral de Veterinária imposto pelo Decreto-Lei 203/2005 de 25 de Novembro); (iii) Freguesia de instalação do apiário (com a codificação normalizada do Instituto Nacional de Estatística para o território nacional); (iv) número e identificação do local do apiário; (v) data de recolha.

Para construção da colecção de abelhas a serem submetidas a análise molecular, foram considerados os seguintes critérios de selecção das amostras:

- (i) Freguesias diferentes;
- (ii) Da mesma freguesia, de apicultores diferentes;
- (iii) Do mesmo apicultor, em freguesias diferentes.

Considerou-se como material válido, as abelhas recolhidas que continham informação da localização capaz de ser sujeita a esta triagem. As amostras cuja identificação estava incompleta foram excluídas do estudo. No final do processo de catalogação, contamos com 422 apiários amostrados cuja distribuição por distritos é indicada na Figura 3.

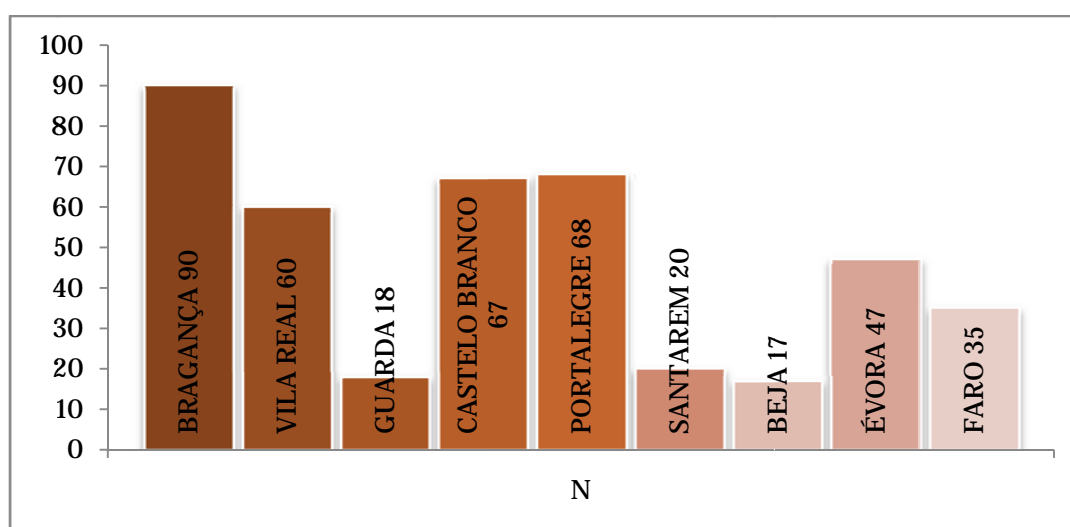


Figura 3 - Número de apiários amostrados por distrito

As amostras foram catalogadas e registadas numa base de dados, com toda a informação pertinente para o estudo, sendo-lhe atribuída uma numeração sequencial, designada «número de colecção», com a estrutura **Am#**, de forma a identificar “*Apis mellifera* #”.

Análise Molecular

O ADN mitocondrial (ADNmt) da abelha é um cromossoma pequeno e circular com 16343pb representado na Figura 1 (Crozier et al., 1993). Ao contrário de outros

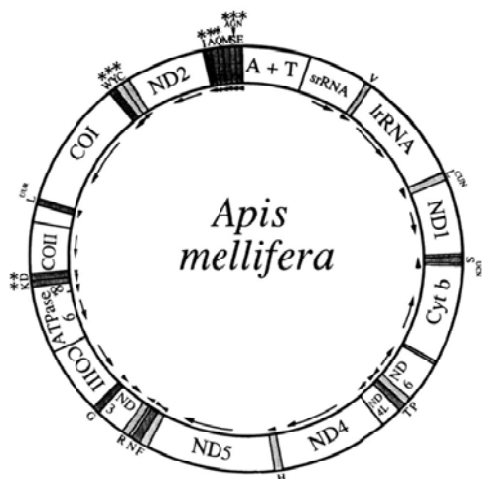


Figura 4 - Mapa do cromossoma de *Apis mellifera*. Fonte: (Crozier et al., 1993)

marcadores moleculares, o ADNmt é monoparental (materno) e por ser herdado da mãe toda a descendência de uma rainha, partilha o mesmo ADNmt. O mesmo tipo de ADNmt (haplótipo) de uma única abelha é considerado representativo da sua própria colónia (Sheppard et al., 2000).

O teste *DraI* tem sido muito usado nos estudos bio-geográficos da *A. mellifera*. Este teste distingue os haplótipos das diferentes linhagens evolucionárias de com base na sequência e comprimento da região intergénica situada entre o RNAt da leucina e a subunidade II da citocromo oxidase [tRNA^{leu}-COII] do

ADNmt (De La Rúa et al., 2001a). O teste *DraI* desenvolvido por Garnery et al. (1993), consiste na amplificação por PCR (*polimerase chain reaction*) da referida região intergénica seguida da digestão com a enzima de restrição *DraI*.

O teste *DraI* foi aplicado a 533 amostras, incluindo repetições dos casos em que o ADNmt não foi amplificado com sucesso, validando assim 420 amostras de abelhas, originárias de 420 apiários distribuídos pelos distritos limítrofes da raia fronteiriça oriental de Portugal Continental.

Para a aplicação do teste *DraI*, o ADNmt foi extraído da pata anterior pelo método Chelex a 10% (Walsh et al. 1991) em 452 obreiras, considerando as repetições nos casos de não funcionamento da 1ª extracção. O ADNmt foi armazenado a uma temperatura de -20° C até posterior análise molecular.

A reacção de PCR foi realizada num volume de 25µl, contendo 2mmol de cada dNTP, 0,15µl de *Taq* Thermo Scientific, o que corresponde a 0,75 unidades de *Taq*, 20mM de MgCl₂ e 1µl de ADN diluído a 10%.

As amplificações foram realizadas num termociclador de marca UNO II BIOMETRA (Figura 5) seguindo o perfil



Figura 5 – As amplificações foram realizadas em termociclador, UNO II BIOMETRA

de temperaturas adaptado de Garnery et al. (1993). Este perfil consistiu num período inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 4 segundos a 92°C, 45 segundos a 48°C, terminando com 2 minutos a 62°C (Garnery et al., 1993). Finalizados os 35 ciclos houve um período final de 20 minutos a 65°C. Os *primers* utilizados foram o E2 (5'-GGC AGA ATA AGT GCA TTG-3') e o H2 (5'-CAA TAT CAT TGA TGA CC-3') (Garnery et al., 1992), em concentração final de 2pmol.

Após PCR o comprimento dos fragmentos amplificados foi determinado num gel de agarose de uso rotineiro a 1% (Figura 6).

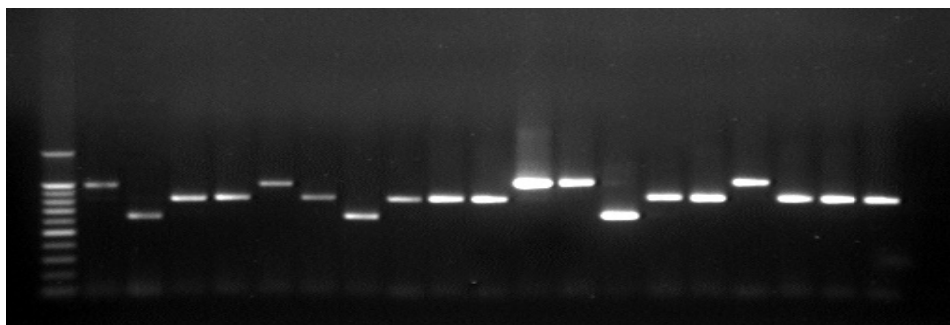


Figura 6 – Gel de agarose de uso rotineiro de 1%, Sigma-Aldrich® mostrando o polimorfismo de comprimento (coluna 1: bench top DNA ladder de 100pb, Promega®)

Subsequentemente, o restante produto PCR foi submetido a uma digestão com a enzima de restrição *DraI*. Após a digestão, o comprimento dos fragmentos digeridos foi determinado num gel de agarose de elevada resolução (agarose *wide-range 3:1 ratio* da Sigma-Aldrich®), a 4%. Após tingimento com brometo de etídio, o gel foi visualizado e gravada a imagem no *Eagle Eye* (Figura 7).

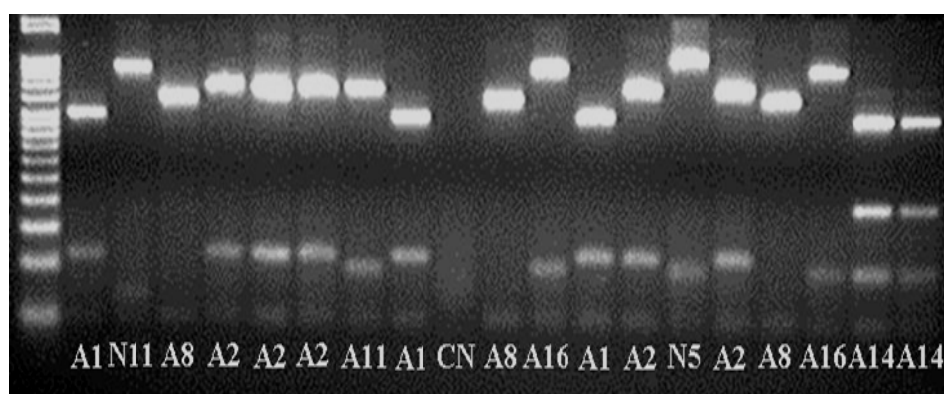


Figura 7 - Gel de agarose de 4% mostrando a elevada variabilidade de haplótipos encontrada nas amostras analisadas. Poço 1 carregado com marcador *step ladder* de 50 bp. Os restantes poços foram carregados com amostras (ver haplótipo na foto).

As amostras foram identificadas com base no padrão de bandas exibido nos géis pré-digestão (Figura 6) e pós-digestão (Figura 7) utilizando os mapas de restrição,

desenvolvidos por Franck et al. (2001). Na Tabela 1 estão compilados todos os haplótipos, e respectivos padrões de bandas, representados nesses mapas de restrição.

Tabela 1 – Haplótipos identificados nas cinco linhagens evolucionárias e respectivos comprimentos dos fragmentos pré e pós digestão com *DraI*, (adaptado de Franck et al. 2001)

Linhagem	Haplótipos	Comprimento total pré digestão	Comprimento dos fragmentos pós digestão														
			47	95	65	422	142	65	65	131	422	142	65	65	65	131	131
M	M3	629	47	95	65	422											
	M4	825	142	65	65	131	422										
	M4'	1021	142	65	65	65	131	131	422								
	M4''	1217	142	65	65	65	65	131	131	131	422						
	M5	810	142	65	65	116	422										
	M6	629	142	65	422												
	M7	825	47	95	65	65	131	422									
	M7'	1021	47	95	65	65	65	131	131	422							
	M8	825	114	28	65	65	131	422									
M9	1006	142	65	65	65	116	131	422									
A	A1	638	47	108	483												
	A2	831	47	108	676												
	A3	1024	47	108	869												
	A4	831	47	108	193	483											
	A4'	1024	47	108	193	193	483										
	A4''	1217	47	108	193	193	193	483									
	A6	832	47	108	193	64	420										
	A8	638	47	591													
	A9	831	47	784													
	A10	1024	47	977													
	A11	816	47	93	676												
	A12	638	47	80	28	483											
	A13	831	47	301	483												
	A14	816	47	93	193	483											
	A15	1009	47	93	193	193	483										
	A16	1009	47	93	869												
	A19	633	47	103	483												
	A20	623	47	93	483												
	A21	623	47	65	28	483											
	A24	639	47	172	420												
	A25	833	47	108	152	43	483										
	A26	820	47	97	193	483											
	A27	636	46	108	482												
	C	C1	572	47	41	64	420										
		C2	571	47	40	64	420										
	O	O1	642	47	108	67	420										
		O1'	838	47	108	67	67	129	420								
O1''		1034	47	108	67	67	67	129	129	420							
O2		823	47	108	67	67	114	420									
Y	O3	637	47	103	67	420											
	Y1	819	47	92	198	482											
	Y2	819	47	92	64	134	482										

Análise Estatística

Todos os dados foram analisados recorrendo à aplicação GenAlex 6.4 (Peakall et al., 2006). Foram calculadas as frequências haplotípicas, diversidade genética e distâncias genéticas de (Nei, 1978) entre pares de populações (Tabela 2).

Tabela 2 - Fórmulas de cálculo parametrizadas na Aplicação GenAlex 6.4 (Peakall et al., 2006)

Frequência haplotípica

$$= \frac{Nx}{N}$$

Diversidade genética
h

$$= 1 - \sum p_i^2$$

Diversidade genética não enviesada
uh

$$= \left(\frac{N}{N-1} \right) h$$

Distância genética de Nei
Nei D

$$= -\ln \left(\frac{\sum_{i=1}^k P_{ix} P_{iy}}{\sqrt{(\sum_{i=1}^k p_{ix}^2)(\sum_{i=1}^k p_{iy}^2)}} \right)$$

Resultados

Nas 420 amostras analisadas foram identificados 17 haplótipos já referenciados por Garnery et al. (1993); De La Rúa et al. (2001); Franck et al. (2001) e Cánovas et al. (2007). Contabilizaram-se: 391 amostras com haplótipos da linhagem Africana: A1, A2, A3, A4, A4', A8, A9, A10, A11, A14, A15, A16, A20; 7 da linhagem oeste europeia: M4, M6 e M7; e 1 da linhagem da Europa Oriental: C1. Foram identificados, em 21 amostras, 9 haplótipos não referenciados na literatura e que foram designados como N1, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11 e N13 (Tabela 3). A numeração não sequencial em que se apresentam os novos haplótipos deve-se ao facto de terem sido identificados 13 a nível nacional e que não se enquadram na área geográfica em que incide o presente estudo. A confirmação dos novos haplótipos requer a sequenciação e validação nas linhagens existentes.

Tabela 3 – Haplótipos e respectivos comprimentos dos fragmentos pré e pós digestão *DraI*

Haplótipos	Comprimento Total pré digestão	Comprimento dos fragmentos pós digestão				
N1	1040	47	93	440	460	
N5	1240	47	93	1100		
N6	816	47	65	28	676	
N7	788	28	47	65	193	483
N8	939	47	108	784		
N9	1011	47	108	265	591	
N10	988	47	93	172	676	
N11	1009	28	47	65	869	
N13	822	47	93	260	422	

Nas Tabela 4 e Tabela 5 encontram-se a distribuição dos haplótipos por distrito. A análise destas tabelas permite verificar que os haplótipos A2, A16 e A1 são os mais comuns com 79, 65 e 60 amostras respectivamente.

Tabela 4 - Distribuição de haplótipos de linhagens A, M e C, por distrito. N – Dimensão da Amostra;

Distrito	N	A1	A2	A3	A4	A4'	A8	A9	A10	A11	A14	A15	A16	A20	C1	M4	M6	M7
BRAGANÇA	90	7	7	3	0	0	3	5	0	25	5	0	27	1	1	1	1	2
VILA REAL	58	2	3	11	0	0	1	8	1	5	0	1	25	0	0	0	0	0
GUARDA	18	5	2	0	1	0	2	2	2	1	0	1	2	0	0	0	0	0
C.BRANCO	67	6	11	6	3	1	10	5	0	4	5	0	5	0	0	0	0	1
PORTALEGRE	68	15	11	7	5	1	5	8	2	2	0	0	5	1	0	1	0	1
SANTAREM	20	1	6	0	2	0	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ÉVORA	47	6	17	7	0	1	10	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BEJA	17	9	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
FARO	35	9	16	0	1	0	3	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	420	60	79	35	12	3	41	37	5	38	12	2	65	2	1	2	1	4

Relativamente aos novos haplótipos, o N1 é o mais comum, com 8 amostras, seguido do N5 e N11 com 3 amostras cada.

Tabela 5 - Distribuição dos novos haplótipos, por distrito. N representa o tamanho da amostra;

Distrito	N	N1	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N13	Total
BRAGANÇA	90	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
VILA REAL	58	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
GUARDA	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASTELO BRANCO	67	3	2	0	1	0	0	1	3	0	10
PORTALEGRE	68	2	0	0	0	0	1	0	0	1	4
SANTAREM	20	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3
ÉVORA	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BEJA	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FARO	35	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
TOTAL	420	8	3	2	1	1	1	1	3	1	21

Com base na análise filogenética de 50 caracteres, incluindo mutações pontuais, inserções e deleções (Franck et al., 2001), agruparam os haplótipos africanos em três sub-linhagens: A_I, A_{II} e A_{III}. De acordo com estes autores os haplótipos aqui encontrados: A1, A2, A3, A4 e A4' pertencem à sub-linhagem A_I; os A8, A9 e A10 à A_{II}, e finalmente os haplótipos A11, A14, A15, A16 e A20 estão incluídos na A_{III}.

A Tabela 6 congrega a distribuição das 420 amostras pelas três sub-linhagens e linhagens de haplótipos determinados por distrito. Verifica-se que a sub-linhagem A_I é a mais comum, com 189 amostras, e a A_{II} é a mais rara com apenas 83 amostras. As linhagens C e M estão marginalmente representadas por apenas 1 e 7 amostras respectivamente.

Tabela 6 - Distribuição de Linhagens de haplótipos mitocondriais, por distrito. N representa o tamanho da Amostra;

Distrito	N	A _I	A _{II}	A _{III}	A	C	M	Novos Haplótipos
BRAGANÇA	90	17	8	58	83	1	4	2
VILA REAL	58	16	10	31	57	0	0	1
GUARDA	18	8	6	4	18	0	0	0
CASTELO BRANCO	67	27	15	14	56	0	1	10
PORTALEGRE	68	39	15	8	62	0	2	4
SANTAREM	20	9	8	0	17	0	0	3
BEJA	17	16	0	1	17	0	0	0
ÉVORA	47	31	14	2	47	0	0	0
FARO	35	26	7	1	34	0	0	1
TOTAL	420	189	83	119	391	1	7	21

A distribuição geográfica dos novos haplótipos está representada na (Figura 8). Verifica-se que os novos haplótipos se concentram na zona centro, sendo no distrito de Castelo Branco onde o maior número foi identificado, num total de 5 em 67 amostras validadas. A região da Beira Baixa é muito frequentada por explorações transumantes com origem quer no Litoral quer em Espanha, e este movimento de colónias pode explicar a concentração dos novos haplótipos encontrados.

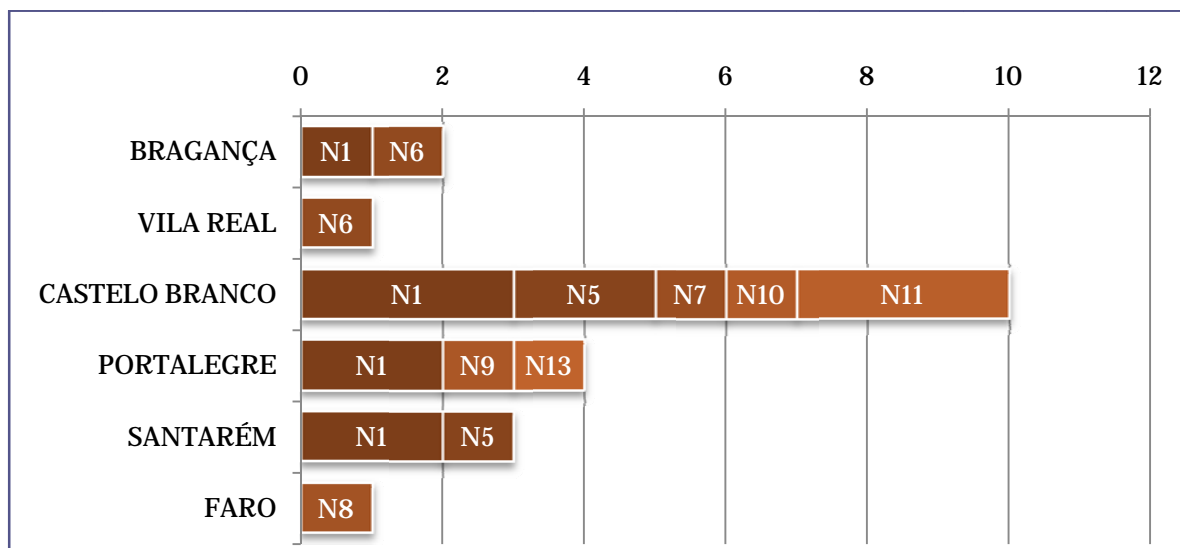


Figura 8 – Distribuição de novos haplótipos por distrito

Frequência Haplotípica

A frequência haplotípica representa a proporção de um haplótipo numa determinada população e é usada para descrever a diversidade genética dessa população.

Neste estudo foram calculadas as frequências de cada haplótipo para os diferentes distritos (Tabela 7).

Constatamos que os haplótipos mais representativos são: A1 na Guarda, Portalegre e Beja; A2 em Castelo Branco, Évora e Faro; A8 em Santarém e A16 em Bragança e Vila Real.

Tabela 7 - Frequência haplotípica por distrito

	BRAGANÇA	VILA REAL	GUARDA	C.BRANCO	PORTALEGRE	SANTAREM	ÉVORA	BEJA	FARO
A1	0,078	0,034	0,278	0,090	0,221	0,050	0,128	0,529	0,257
A2	0,078	0,052	0,111	0,164	0,162	0,300	0,362	0,353	0,457
A3	0,033	0,190		0,090	0,103		0,149	0,059	
A4			0,056	0,045	0,074	0,100			0,029
A4'				0,015	0,015		0,021		
A8	0,033	0,017	0,111	0,149	0,074	0,350	0,213		0,086
A9	0,056	0,138	0,111	0,075	0,118	0,050	0,085		0,114
A10		0,017	0,111		0,029				
A11	0,278	0,086	0,056	0,060	0,029		0,021		
A14	0,056			0,075			0,021		0,029
A15		0,017	0,056						
A16	0,300	0,431	0,111	0,075	0,074			0,059	
A20	0,011				0,015				
C1	0,011								
M4	0,011				0,015				
M6	0,011								
M7	0,022			0,015	0,015				
N1	0,011			0,045	0,029	0,100	0,100	0,100	0,100
N5				0,030		0,050	0,050	0,050	0,050
N6	0,011	0,017							
N7				0,015					
N8									0,029
N9					0,015				
N10				0,015					
N11				0,045					
N13					0,015				

Ao analisarmos detalhadamente cada população, podemos verificar que os haplótipos se distribuem nas populações numa proporção equilibrada e variada, indiciando uma elevada diversidade. Os valores encontrados mostram que, mesmo os haplótipos mais frequentes, fazem-se representar em proporções baixas entre os 0,164 do haplótipo A2 em Castelo Branco e 0,529 do A1 na população de Beja.

Relativamente aos haplótipos novos, é evidente que estes se concentram nas populações Centro e Sul.

A distribuição de todos haplótipos por distrito revela que há grande presença de A1, A2, A3, A8, A9 e A16 em toda a área de estudo (Figura 9).

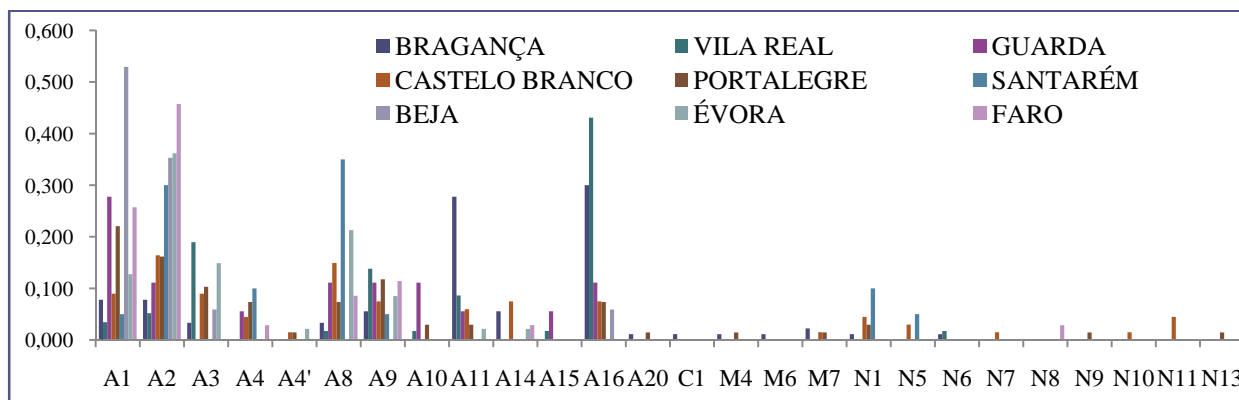


Figura 9 - Frequência de haplótipos por distrito

A linhagem Africana é indubitavelmente a mais frequente em qualquer das populações estudadas. Seguindo a classificação de Franck et al., (2001), na Figura 10 está representada a distribuição das sub-linhagens Africanas por distrito. É notório o cline Sul – Norte do domínio de A_I para A_{III}. Os distritos mais centrais, como Castelo Branco e Guarda apresentam maior equilíbrio entre as três sub-linhagens. Estas aparecem em quase todos os distritos, excepção feita para Santarém, onde não foi encontrado nenhum dos haplótipos que compõem a sub-linhagem A_{III}, e de Beja onde são também ausentes os haplótipos que integram a A_{II}. Recordamos que estes distritos se estendem até ao litoral, e apenas foram integrados no presente estudo, as amostras dos concelhos mais interiores.

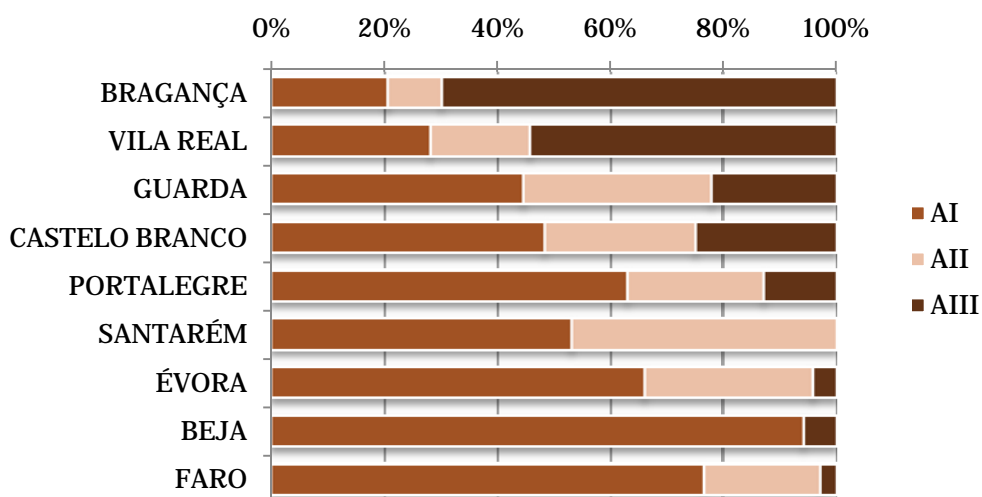


Figura 10 - Distribuição das sub-linhagens Africanas, por distrito

A análise da frequência haplotípica confirma a dominância da linhagem A no interior de Portugal, tendo sido a que apresentou maiores frequências em cada um dos distritos com a prevalência da sub-linhagem A_I em 7 dos 9 distritos amostrados (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequências haplotípicas por distrito. Os haplótipos Africanos encontram-se agrupados nas três sub-linhagens.

	BRAGANÇA	VILA REAL	GUARDA	CASTELO BRANCO	PORTALEGRE	SANTAREM	ÉVORA	BEJA	FARO
A _I	0,189	0,276	0,444	0,403	0,574	0,450	0,660	0,941	0,743
A _{II}	0,089	0,172	0,333	0,224	0,221	0,400	0,298		0,200
A _{III}	0,644	0,534	0,222	0,209	0,118		0,043	0,059	0,029
C _I	0,011								
M ₄	0,011				0,015				
M ₆	0,011								
M ₇	0,022			0,015	0,015				
N ₁	0,011			0,045	0,029	0,100	0,100	0,100	0,100
N ₅				0,030		0,050	0,050	0,050	0,050
N ₆	0,011	0,017							
N ₇				0,015					
N ₈									0,029
N ₉					0,015				
N ₁₀				0,015					
N ₁₁				0,045					
N ₁₃					0,015				

A linhagem M apenas foi identificada nos distritos de Bragança, Castelo Branco e Portalegre com 4,4%, 0,1% e 3%, respectivamente.

A linhagem C está representada numa única amostra no distrito de Bragança com representatividade quase inexpressiva de 1,1%. A esta linhagem pertencem as sub-espécies *A.m. ligustica* e *A. m. carnica* (Whitfield et al., 2006), pelo que podemos inferir a presença desta linhagem pela introdução de rainhas exóticas. Franck et al. (2000) sugerem que a presença de abelhas de linhagem C em vários pontos do continente europeu, deriva parcialmente da introdução de rainhas italianas (caracteristicamente mais dóceis, muito prolíferas, pouco enxameadoras) para recuperar o efectivo dizimado nos anos 80 pela expansão da *Varroa destructor* na Europa. A Península Italiana está limitada no seu ponto continental, tal como a Ibérica, por uma cordilheira montanhosa que favorece a manutenção natural das populações residentes (Franck et al., 2000).

A representação das frequências haplotípicas, com a linhagem Africana agrupada em sub-linhagens, no mapa de Portugal permite a visualização do padrão geográfico da variabilidade mitocondrial (Figura 11).

A análise desta figura permite confirmar a existência dum cline Sul-Norte, caracterizado pela substituição gradual da sub-linhagem A_I pela A_{III} adiantada na Figura 10.

Podemos ainda verificar que apenas nos distritos de Bragança, Castelo Branco e Portalegre, a frequência da linhagem Africana é inferior a 95%.

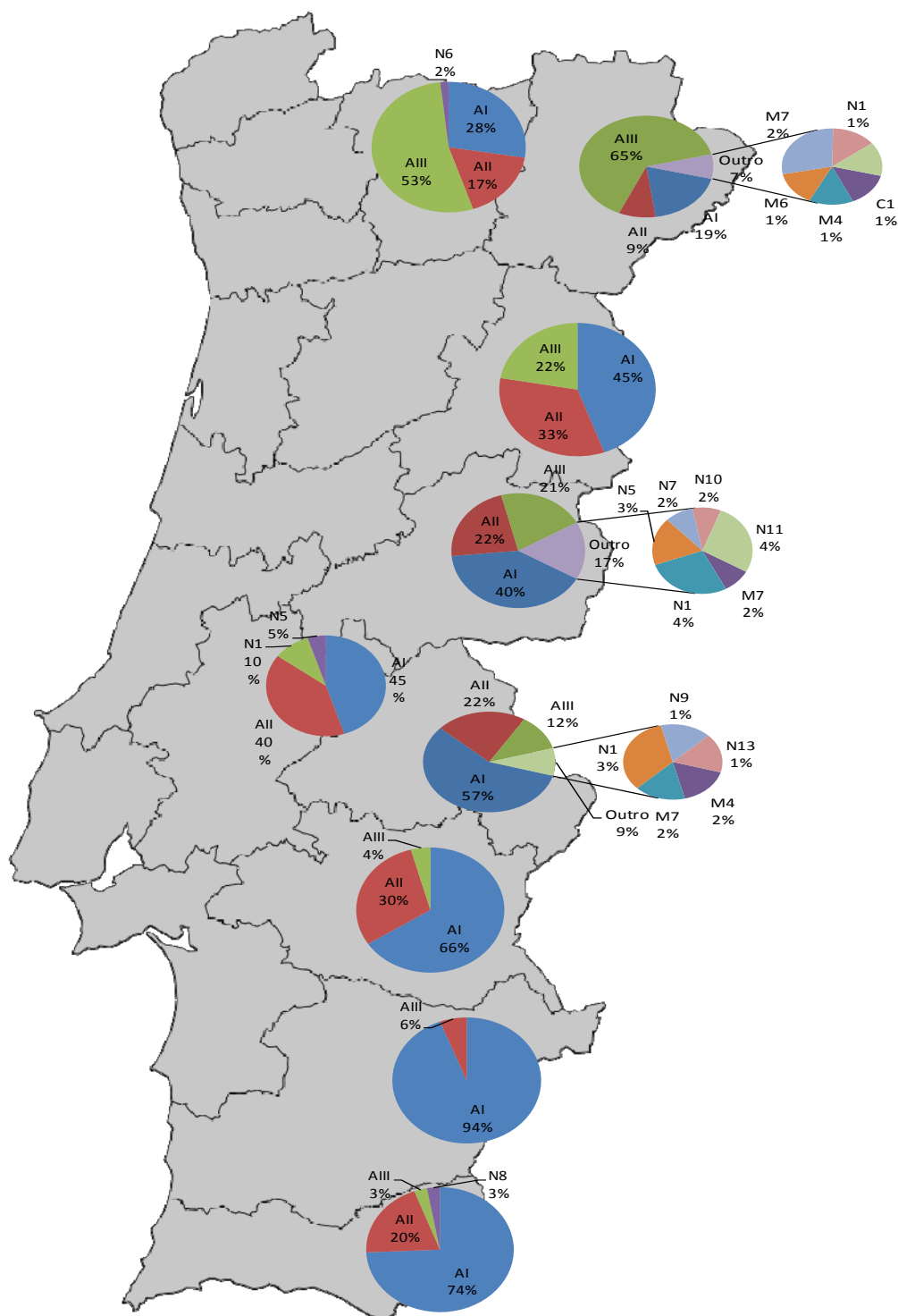


Figura 11 - Padrão geográfico de variabilidade genética

Foram ainda identificados oito haplótipos que apenas se manifestam num único distrito (Tabela 9). Estes haplótipos são conhecidos em genética de populações por haplótipos (ou alelos) privados, a apresentam normalmente frequências baixas. Numa população que apresente uma estrutura genética bem definida e clara, os haplótipos privados permitem a atribuição de um indivíduo a essa população.

Tabela 9 - Haplótipos privados por população e frequência

População	Haplótipo	Frequência
BRAGANÇA	C1	0,011
BRAGANÇA	M6	0,011
CASTELO BRANCO	N10	0,015
CASTELO BRANCO	N11	0,045
CASTELO BRANCO	N7	0,015
PORTALEGRE	N13	0,015
PORTALEGRE	N9	0,015
FARO	N8	0,029

Diversidade Genética

A diversidade de ADN mitocondrial foi calculada e compilada na Tabela 10. É no Distrito de Castelo Branco que a diversidade genética exibe valores mais elevados. No oposto encontra-se Beja, com os valores mais baixos, contudo superiores a 0,6. A Guarda ainda apresenta valores superiores a 0,9 e os demais distritos escalam-se entre os 0,723 de Faro e 0,894 de Portalegre.

Tabela 10 - Diversidade Genética por distrito. Tamanho da amostra (N), n.º de alelos (Na), diversidade génica (h) e diversidade génica não enviesada (uh), corrigida para o tamanho da amostra. Estatísticas obtidas com o programa GenAlEx 6.4 (Peakall et al., 2006)

População	N	Na	I	h	uh
BRAGANÇA	90	15	2,047	0,811	0,820
VILA REAL	58	10	1,712	0,747	0,760
GUARDA	18	9	2,058	0,852	0,902
CASTELO BRANCO	67	16	2,535	0,907	0,920
PORTALEGRE	68	16	2,373	0,881	0,894
SANTAREM	20	7	1,639	0,760	0,800
ÉVORA	47	8	1,699	0,777	0,794
BEJA	17	4	1,038	0,588	0,625
FARO	35	7	1,470	0,702	0,723

A região geográfica estudada apresenta valores de diversidade em geral mais elevados do que aqueles que têm sido reportados para Espanha (Cánovas et al. 2007; De La Rúa et al. 2009a). Comparando os resultados obtidos no interior de Portugal com os obtidos para Espanha nas regiões limítrofes, vemos que há uma tendência à aproximação dos valores de diversidade (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação dos valores de diversidade genética em zonas limítrofes entre Portugal e Espanha. Tamanho da amostra (N), diversidade genética não enviesada (uh), corrigida para o tamanho da amostra.

População	N	uh
BRAGANÇA	90	0,820
GUARDA	18	0,902
CASTELO BRANCO	67	0,920
PORTALEGRE	68	0,894
ÉVORA	47	0,794
BEJA	17	0,625
FARO	35	0,723
SALAMANCA*	19	1,000
CÁCERES*	8	0,679
HUELVA*	27	0,590

***Dados de Cánovas et al. 2007**

Conforme mencionado anteriormente, para os distritos de Santarém, Beja e Faro apenas foram incluídos neste estudo os concelhos do interior (Figura 2). Estes três distritos foram analisados na globalidade (interior e litoral) por Pinto (2010). Tal como encontrado nesse estudo, o distrito de Beja é o que exhibe a diversidade mais baixa (0,625) enquanto em Santarém é mais elevada (0,8) (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação dos valores de Diversidade Genética calculados para os Distritos apenas com os Concelhos do presente estudo e Distrito completo. Tamanho da amostra (N), n.º de alelos (Na), diversidade genética (h) e diversidade genética não enviesada (uh), corrigida para o tamanho da amostra.

Pop	N	Na	h	uh	Pop	N	Na	h	uh
SANTAREM	20	7	0,760	0,800	SANTAREM	61	13	0,869	0,883
BEJA	17	4	0,588	0,625	BEJA	46	6	0,527	0,539
FARO	35	7	0,702	0,723	FARO	50	7	0,683	0,697
Estudo Actual					Dados de Pinto, 2010				

Distância Genética entre populações

A distância geográfica e a presença de barreiras entre as populações são consideradas factores isolantes que explicam a vasta quantidade de variabilidade de ADNmt nas Geralmente, quanto menor a distância entre duas populações, maior similaridade genética entre elas. A distância genética de Nei (1978) calculada com o programa Genalex 6.4 (Peakall et al., 2006), entre pares de população encontra-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Matriz de distâncias genéticas não enviesadas de Nei (1978) entre os diversos pares de populações.

BGC	VRL	GRD	CTB	PTL	STR	EVR	BEJ	FAR	
0,000									BRAGANÇA
0,173	0,000								VILA REAL
0,401	0,555	0,000							GUARDA
0,456	0,563	0,073	0,000						C BRANCO
0,633	0,599	0,000	0,049	0,000					PORTALEGRE
1,489	1,983	0,365	0,049	0,362	0,000				SANTAREM
1,134	1,177	0,257	0,021	0,141	0,048	0,000			ÉVORA
1,079	1,413	0,000	0,407	0,080	0,727	0,310	0,000		BEJA
1,213	1,646	0,121	0,190	0,118	0,222	0,053	0,081	0,000	FARO

As maiores distâncias genéticas foram observadas entre Vila Real e Santarém (1,983) e entre Vila Real e Faro (1,646), já as menores foram observadas para os seguintes pares de populações: Guarda – Portalegre e Guarda – Beja (0,000) e entre Castelo Branco – Évora (0,021). As distâncias genéticas observadas estão positivamente correlacionadas com as distâncias geográficas entre os distritos mencionados, como se pode confirmar na Figura 12 [a], [b].

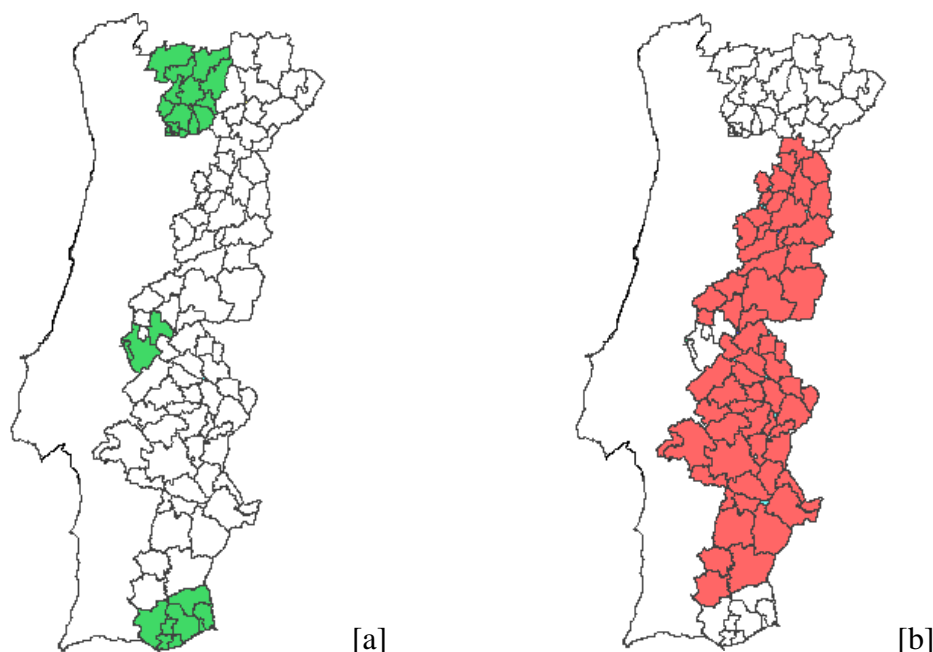


Figura 12 - Distritos com maior [a] e menor [b] distância genéticas de Nei (1978)

Discussão

Tal como havia sido demonstrado para Espanha (Franck et al. 1998; Cánovas et al. 2008), a linhagem A é também a dominante em Portugal. A sub-linhagem A_I predomina no Sul do País enquanto a A_{III} concentra-se no Norte, um cenário não congruente com o relatado por De La Rúa et al. (2009a) quando afirmam que esta sub-linhagem apresenta uma ocupação ibero-atlântica, com particular presença nos arquipélagos macaronésicos. A sub-linhagem A_{II}, está dispersa por todo o território, mas com menor frequência que a A_I tal como em Espanha.

A linhagem C apenas foi identificada no distrito de Bragança. Esta presença incipiente é na realidade partilhada com inúmeros estudos realizados por toda a Península. O haplótipo C1, o único da linhagem C identificado neste estudo, que já havia sido reportado nas ilhas Canárias e Açores, com frequências de 15% e 35% (De La Rúa et al., 2006) foi também identificado com frequências muito baixas na Espanha Continental (De La Rúa et al., 2009a; Miguel et al., 2007). Sendo esta uma linhagem que não está presente naturalmente nas populações ibéricas, podemos concluir que não há poluição genética por linhagens exóticas das populações na área amostrada.

Os haplótipos de linhagem M, são dominantes no Norte de Espanha, onde a linhagem A praticamente se reduz à sub-linhagem A_I. Nas províncias a Norte da Cordilheira Cantábrica (Corunha, Castela-Leão, e Asturias) os haplótipos M4 e M6 são os que apresentam maior frequência (De La Rúa et al., 2009b), enquanto o M7 domina no País Basco, na face Oeste e Central dos Pirenéus, e não tem expressão na região Mediterrânea (Miguel et al., 2007). Apesar de os mesmos haplótipos da linhagem M terem sido identificados na faixa continental de Portugal, a distribuição das frequências não é a mesma. O haplótipo mais frequente é o M7, representando 57,1% de entre os haplótipos M identificados contrariando os dados apresentados por Miguel et al. (2009). Esta linhagem aparece apenas em Bragança, Castelo Branco e Portalegre, regiões que apresentam condições edafoclimáticas muito similares e ciclos produtivos semelhantes, pelo que estes dados sugerem que estas sejam abelhas, que apesar de ocuparem áreas geográficas relativamente afastadas, tem características de rusticidade da linhagem M, a informação necessária para melhor adaptação a regiões montanhosas e climas frios (Kraus et al., 2007) como é o caso de Bragança, com a Serra “De la Cabrera” a Norte, e de Castelo Branco e Portalegre situados a Sul da Serra da Estrela. Esta hipótese é congruente com a de que as populações de M se refugiaram nas zonas de clima mais rigoroso da península, empurradas pelas populações de A, que encontraram nas regiões mais cálidas condições climáticas favoráveis à sua fixação (De La Rúa et al., 2009b). Muitos foram os autores que comprovaram que o repovoamento ou re-colonização apícola do território europeu, no período pós-glaciar, teve como ponto de partida as populações de abelhas de linhagem M

que sobreviveram ao período glacial. No mesmo período, também as abelhas de linhagem A, oriundas de África, subiram e colonizaram a Península Ibérica (Miguel et al., 2007).

Os afloramentos montanhosos são considerados barreiras naturais à miscigenação, e tal facto favorece o apuramento das raças, bem como o desenvolvimento das populações por linhas evolutivas divergentes, mesmo que geograficamente próximas. A co-habitação das duas linhagens no território ibérico permitiu a hibridação entre as duas, e os Pirenéus são a maior barreira à progressão da linhagem Africana por todo o território norte-europeu. Em menor escala, as formações montanhosas da meseta ibérica também contribuiram para a conservação dessa variabilidade de combinações genéticas (Miguel et al., 2007).

As principais formações montanhosas em Portugal dividem o território Norte e Centro na orientação Sudoeste-Noroeste (Serras de Aires, da Estrela, do Marão), e no Sul do País em orientação Este-Oeste (Serras de Monchique e Caldeirão). Esta configuração natural define com rigor a condição litoral e interior das regiões, e com ela surgem as especificidades das populações que as ocupam.

A distribuição espacial dos haplótipos encontrados, confirmam o cline Sul-Norte de substituição gradual da sub-linhagem A_I por A_{III}. Este padrão é consistente com a distribuição clinal verificada em Espanha (De La Rúa et al. 2009b; Cánovas et al. 2007). A sub-linhagem A_I, também em Portugal é a mais abundante, aparecendo por todo território, ainda que com frequências mais baixas no Norte. A sub-linhagem A_{II} surge com uma frequência relativamente baixa, mas constante em quase todo o território, num gradiente em que o padrão Norte se espelha na transposição do Rio Tejo. Por fim a A_{III} apresenta frequências muito baixas no sul, apenas prevalecendo sobre as demais em Trás-os-Montes e Beira Alta, ou seja a nordeste das Serras do Marão e Estrela.

Os resultados conseguidos na análise genética das populações de abelhas do interior de Portugal Continental, ajudam a consolidar as hipóteses que se conhecem do comportamento evolutivo das abelhas em Espanha. A diversidade elevada que se observa no território português, afina as conclusões de Cánovas et al. (2007); Miguel et al. (2007); De La Rúa et al. (2009a,b).

Os haplótipos novos são mais representativos no Nordeste Transmontano e Beiras: Interior e Baixa. A sequenciação destes haplótipos permitirá compreender melhor a diversidade destas regiões, porém é provável que sejam de origem africana, dada a dominância desta linhagem em Portugal.

Considerações Finais

O comportamento humano, na exploração apícola, pesa na balança quando se analisa a dispersão populacional das abelhas. A transumância e o comércio de abelhas, na perseguição de maiores rendimentos, ultrapassam as limitações naturais, contornam obstáculos e facilitam a dispersão das abelhas.

O Norte Alentejano e Beira Baixa são ainda dois destinos da transumância ibérica. As rotas nacionais privilegiam 3 movimentos principais: (i) em longitude: litoral – interior; (ii) em Latitude: Sul-Norte e (iii) em altitude: desde as planícies e para serras. O factor humano, que se reconhece como factor que influencia a dispersão das populações (De La Rúa et al., 2009b), pode ajudar a explicar a proximidade genética das populações identificadas nestas áreas, não só pelo fluxo genético que possam provocar ao deslocar as colónias de abelhas, para os nichos com haplótipos específicos, mas também porque podem ter sido amostradas colónias que no momento da colheita estavam de passagem por estes locais.

A exploração das abelhas enquanto actividade produtiva, deverá ser cuidadosa e consciente, considerando que (i) As subespécies de abelhas são importantes reservatórios de adaptações ao meio local, ecotipos, e a chave da sua sobrevivência. A sua extinção significa a perda de uma incalculável rusticidade criada pela selecção natural ao longo de milhares de anos. (ii) as abelhas são os principais insectos polinizadores das culturas e flora espontânea, e asseguram os ciclos reprodutivos das plantas; (iii) dada a sua adaptabilidade e larga dispersão, as abelhas funcionam como polinizadores, quando as populações de outros insectos polinizadores naturais baixam, sob a influência de desequilíbrios nos ecossistemas; (iv) as abelhas europeias estão no cerne de muitas indústrias, paralelas ou não, que geram receitas de significativo valor em cada região (De La Rúa et al., 2009a).

O interior de Portugal apresenta um padrão de diversidade genética notável. As frequências haplotípicas evidenciam elevada diversidade dentro das populações. Os haplótipos privados que foram determinados, à excepção dos encontrados em Bragança, são haplótipos novos. A sequenciação pode ajudar a definir e estruturar as respectivas populações.

Bibliografía

- Arias, Maria Cristina e Sheppard, Walter S. 1996.** Molecular Phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA Sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolutions*. 3, 3 de Junho de 1996, Vol. 5, pp. 557-566.
- Arias, Maria Cristina; Rinderer, Thomas E; Sheppard, Walter S. 2006.** Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and Azores. *Apidologie*. 2006, Vol. 37, pp. 699-708.
- Arias, Maria Cristina, Rinderer, Thomas E e Sheppard, Walter S. 2006.** Further characterization of honey bees from Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *Journal of Apicultural Research*. 2006, Vol. 45(4), pp. 188-196.
- Cánovas, Fernando; De La Rúa, Pilar; Serrano, José; Galián, José. 2008.** Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J Zool Syst Evol Res*. 2008, Vol. 46(1), pp. 24-30.
- Crozier, R H e Crozier, Y C. 1993.** The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete Sequence and genome organization. Janeiro de 1993, Vol. 133, pp. 97-117.
- De La Rúa, Pilar; Galián, José; Serrano, José; Moritz, Robin F A. 2001a.** Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology* 10, 1733-1742. 2001a.
- De La Rúa, Pilar; Galián, José; Serrano, José; Moritz, Robin F A. 2001b.** Molecular characterization and population structure of honeybees from Balearic islands (Spain). *Apidologie*. 2001b, Vol. 32, pp. 417-427.
- De La Rúa, Pilar; Galián, José; Serrano, José; Moritz, Robin F A. 2002.** Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. *Journal Zool.Syst. Evol Research*. 2002, Vol. 40, pp. 164-168.
- De La Rúa, Pilar; Hernández-García, Raquel; Jiménez, Yolanda; Galián, José; Serrano, José. 2005.** Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from northeastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect systematics & evolution*. 2005, Vol. 36, pp. 21-28.
- De La Rúa, Pilar; Jaffé, Rudolfo; Dall'Olio, Raffaele; Muñoz, Irene; Serrano, José. 2009a.** Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* 40. DOI: 10.1051/apido/2009027, 2009a.
- De La Rúa, Pilar; Muñoz, Irene; Piñero, Ana; Hernández-García, Raquel; Cánovas, Fernando; Galián, José; Serrano, José. 2009b.** Historia Evolutiva de la Abeja Ibérica. *Adaptacion y Evolucion. 150 años después del Origen de las Especies*. s.l. : SESBE, 2009b, Vols. Diversidad, Filogenia y Filogenómica, Cap. 3.3 , pp. 162-169.
- Engel, M S. 1999.** The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *J Hymenopt Res: 8: 165 - 196*. 1999.

- Estoup, Arnaud; Solignac, Michel; Harry, Myriam; Cornuet, Jean-Marie. 1993.** Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleid Acids Research*. 1993, Vols. 21, N.º 6.
- Estoup, Arnaud, Solignac, Michel e Cornuet, Jean-Marie. 1994.** Precise assessment of the number of partrilines and genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings: Biological Sciences*. 22 de Outubro de 1994, Vol. 258 (1351), pp. 1-7.
- Franck, Pierre; Garnery, Lionel; Solignac, Michel; Cornouet, Jean-Marie. 1998.** The origin of west european of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellites and mitochondrial data. *STOR. Evolution*, Aug de 1998, Vols. 52, n.º 4, pp. 1119-1134.
- Franck, Pierre; Garnery, Lionel; Celebrano, G; Solignac, Michel; Cornuet, Jean-Marie. 2000a.** Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*. 9, 2000, pp. 907-921.
- Franck, Pierre; Garnery, Lionel; Solignac, Michel; Cornuet, Jean-Marie. 2000b.** Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*. EDP Sciences, 2000, pp. 167 - 180.
- Franck, Pierre; Garnery, Lionel; Loiseau, A; Oldroyd, B P; Hepburn, H R; Solignac, Michel; Cornuet, Jean-Marie. 2001.** Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 86, 2001, pp. 420-430.
- Garnery, Lionel, Cornuet, Jean-Marie and Solignac, Michel. 1992.** Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*. 1, 1992, pp. 145-154.
- Garnery, Lionel; Solignac, Michel; Celebrano, G; Cornuet, Jean-Marie. 1993.** A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetics structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49, 1993, pp. 1016-1021.
- Hepburn, H R e Radloff, S E. 1996.** Morphometric and pheromonal analyses of *Apis mellifera* L along a transect from the Sahara to the Pyrenees. *Apidologie*. 1996, Vol. 27, pp. 35-45.
- Hernández-García, Raquel, De La Rúa, Pilar e Serrano, José. 2009.** Mating frequency in *Apis mellifera iberiensis* queens. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 2009, Vol. 48(2), pp. 121-125.
- Kraus, F B, Franck, P e Vandame, R. 2007.** Asymmetric introgression of African genes in honeybee populations (*Apis mellifera* L) in Central Mexico. *Heredity*. 2007, Vol. 99, pp. 233-240.
- Miguel, Irati; Iriondo, Mikel; Garnery, Lionel; Sheppard, Walter S; Estonba, Andone. 2007.** Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie*, 2007, Vol. 38; pp. 141-155.
- Nei, Masatoshi. 1978.** Estimation of average heterozigosity and genetic distance for a small number of individuals. *Genetics*. 1978, Vol. 89, pp. 145-163.
- Nielsen, David I; Ebert, Paul R; Hunt, Greg J; Guzmán-Novoa, Ernesto; Kinnee, Scott A; Page, Jr, Robert E. 1999.** Identification of Africanized honey Bees (hymenoptera: Apidae)

Incorporating morphometrics and an improved Polymerase Chain Reaction mitotyping procedure. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1999, 92 (2), pp. 167-174.

Peakall, Rod e Smouse, Peter. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. 6.4 *Molecular Ecology Notes*. [Software]. 2006. pp. 288-295.

Pinto, M Alice. 2010. *Padrões geográficos de diversidade genética da abelha melífera em Portugal (Continente e Ilhas): a história contada pelo ADN mitocondrial*. CIMO, IPB. s.l. : FNAP, 2010. Relatório apresentado ao Programa Apícola Nacional 2010 - Medida 6 A.

Ruttner, F. 1988. *Biogeography and taxonomy of honey bees*. s.l. : Springer, 1988.

Sheppard, Walter S e Smith, Deborah R. 2000. Identification of African-derived bees in the Americas: a survey of methods. *Ann. Entomol Soc. Am.* 2000, Vol. 93 (2), pp. 159-176.

Smith, D R e Glenn, C T. 1995. Allozyme Polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*. 1995, Vol. 86, pp. 12-16.

Whitfield, Charles W; Behura, Susanta K; Berlocher, Stewart H; Clark, Andrew G; Johnston, J Spencer; Sheppard, Walter S; Smith, Deborah R; Suarez, Andrew V; Weaver, Daniel; Tsutsui, Neil D. 2006. Thrice out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science*. 27 de Outubro de 2006, Vol. 314, pp. 642-645.