PADRÕES DE VARIAÇÃO MATERNA DA ABELHA IBÉRICA: UM ESTUDO DE FINA RESOLUÇÃO ESPACIAL

Dora Henriques, Julio Chávez-Galarza, Irene Muñoz , Pilar De la Rúa, João Carlos Azevedo, John Spencer Johnston , Maria Alice Pinto

Introdução

Estudos prévios usando diferentes marcadores do ADN mitocondrial sugerem que a Península Ibérica tem sido uma área de contacto secundário natural entre duas linhagens divergentes de abelhas (linhagem Africana e linhagem da Europa ocidental) formando um cline com orientação sudoeste-nordeste (Fig. 2.A). Porém, é provável que com a crescente intensificação da actividade apícola haja uma alteração do padrão de diversidade moldado pelas forças evolutivas ao longo de milhares de anos. Nesta comunicação o padrão de variação materna é representado espacialmente usando dados de sequenciação da região intergénica tRNA^{leu}-cox2 do mtDNA obtidos para 649 colónias recentemente amostradas ao longo de três transeptos com orientação norte-sul (costa Atlântica, região central e costa Mediterrânica). Este estudo constitui a mais recente e completa representação espacial da diversidade materna à escala de toda Península Ibérica permitindo uma avaliação da influência dos processos antropogénicos (como por exemplo transumância e introdução de rainhas exóticas) na composição genética materna da abelha ibérica.

Material e Métodos

Amostragem

Um total de 649 indivíduos foram amostrados na Península Ibérica ao longo de três transeptos com orientação norte-sul (costa Atlântica, região central e costa Mediterrânica).

O transepto atlântico é representado por 228 indivíduos distribuídos por 8 pontos de amostragem, o transepto central contém 237 indivíduos distribuídos por 9 pontos e o transepto mediterrânico é constituído por 184 indivíduos distribuídos por 6 pontos de amostragem.

Como populações de referência estudaram-se 70 indivíduos *A.m.mellifera* e 27 indivíduos *A.m.intermissa.*

Genotipagem

A região intergénica tRNA^{leu}-Cox2 foi amplificada usando os primers E2 e H2, de acordo com a reacção PCR descrita por Garnery *et al.* (1993). De seguida os produtos PCR foram sequenciados.

Usando o software MEGA 5.05 (Tamura *et al*. 2011) as sequências foram verificadas manualmente para excluir erros de sequenciação. Posteriormente estas foram alinhadas com as sequências de referência publicadas no NCBI .

Análise das sequências

A região intergénica tRNA^{leu}-cox2 é uma região muito utilizada porque permite a distinção das linhagens principais, devido à forma do elemento P e ao número de repetições do elemento Q. A linhagem C é caracterizada pela ausência do elemento P. Por sua vez, a linhagem M é caracterizada por uma deleção de 15pb no elemento P (Fig.1). Nas linhagens Africanas o elemento P pode ter 2 formas distintas o P_0 (sub-linhagem A_I e A_{II}) e o P_1 (sublinhagem A_{III}). O P_0 difere do P_1 por uma deleção de 15pb. A distinção entre as linhagens A_I e A_{II} é dada pelo número de zonas de corte da *Dra*I no primeiro elemento Q, sendo que a A_I contém duas zonas de corte e o A_{II} um sítio de reconhecimento (Fig.1).

Depois de identificados os haplótipos foi representado espacialmente o padrão de variação materna tendo em conta linhagens, sub-linhagens e haplótipoc PCR-RFLP.

As estatísticas sumárias foram calculadas usando o software GeneAlex 6.41 (Peakall e Smouse 2006).

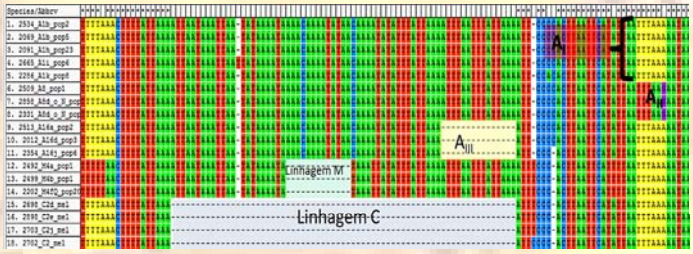

Fig.1

Resultados e Discussão

Foram encontrados 15 haplótipos novos sendo que 9 estão presentes no transepto Atlântico, dos quais 4 estão na quarto ponto de amostragem (TA4; Fig.3.B).

A Península Ibérica contém principalmente haplótipos das linhagens A e M, sendo que só a população 3 do transepto Atlântico (TA3) contém um indivíduo que pertence à linhagem C (Fig. 2).

Pode-se verificar que, apesar da transumância, ainda é possível observar um cline com orientação sudoeste-nordeste, sendo que as populações sudoeste são caracterizadas por um maior componente de linhagem A e as do Noroeste da linhagem M (Fig 2.A e B).

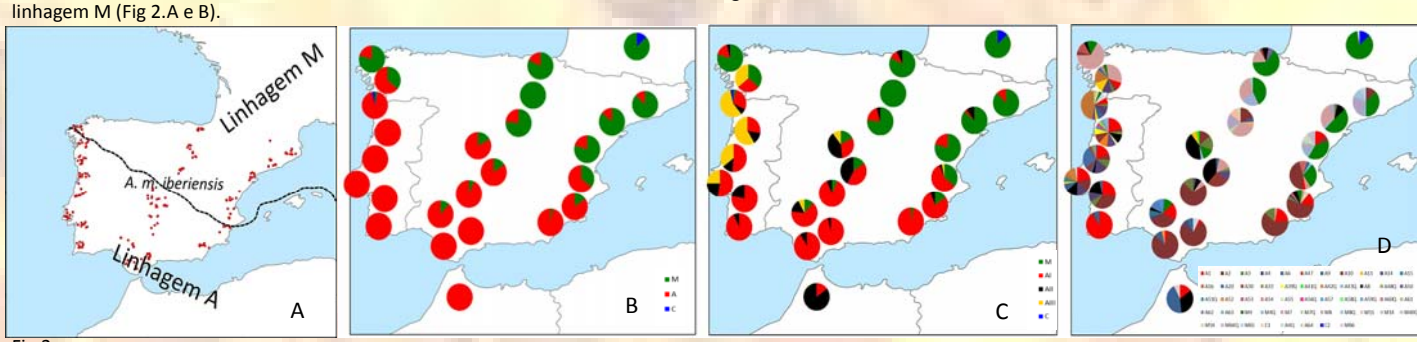

Fig.2

O transepto Atlântico apresenta maior número de alelos e de alelos privados (Fig.2.C e Fig.3.B). O ponto de amostragem 4 contém maior número de alelos e alelos privados no transepto Atlântico (Fig.3.B). Os pontos de amostragem que apresentam menor nível de diversidade são os mais a sul do transepto Atlântico e Central (Fig.3.A). Apesar dos pontos de amostragem mais sul do transecto mediterrânico não apresentarem níveis significativamente baixos de diversidade, são os que menor número de alelos contém (Fig.3). Parece haver uma tendência para os pontos de amostragens mais centrais de cada transepto terem uma maior diversidade (Fig. 2 e 3). Este estudo mostra a importância da análise conjunta das abelhas em Espanha e em Portugal para a compreensão dos padrões genéticos existentes na Península Ibérica.

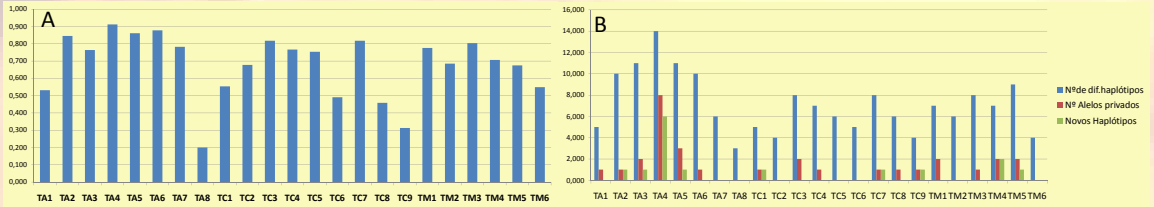

Fig.3

Agradecimentos

São numerosas as pessoas que têm contribuído para este projecto e a quem estamos profundamente agradecidos. Um agradecimento especial a António Palavelo por nos facilitar o contacto com os numerosos apicultores e técnicos de Associações de Apicultores de Espanha e pela sua disponibilidade para resolver todos os problemas que enfrentamos durante a amostragem. Agradecemos profundamente a todos as pessoas da extensa lista que se segue (e também àquelas que por lapso ou por vontade expressa não constam da lista) a inestimável colaboração na recolha de amostras em Espanha e Portugal: Ana, Anabela Mendes, Antonieta Caeiro, Armada Nunes, Amilcar Fernandes, Adérito Serpa, Adolfo, Albano Barros, Alberto, Alberto Aguiar, Alfredo Silva, António Sousa, António Hermenegildo, António Rosende, António Tavares, Arlindo Justino, Armindo Almeida, Aurora Gonzáles Azevedo, Abel Dias Mateo, Adelino Gilabert Ortega, Adolfo Gamo, Afonso Montes, Agostin Romero Guerrero, Albert Tort, Algel Andres Redondo, Anastasio, Antonio, Antonio Campoy, Antonio Domingo, Antonio Malvel, Antonio Tortosa, Apicola Brull Casanova, Atanasio Morion Sabio, Beatriz, Blai Llambrich Subirats, Bruno Montero, Bruno Martins, Calisto Gordo, Carmen Fusti, Ceciclipo Lopez, Celestino Arroyo, Constancio Barquero, Carlos Batista, Carlos Mendes, Carlos Teixeira, Centro de Formación y Experimentación Agro-Florestal de Sergude, Claudino Tregeiro, Claudio, Cristina Martins Peres, Custódio Pitadas, David Godinho, David Perucha, Diego Alberto, Diego Jiminez, Domingo Gordo, Eladio Torrente Rodriguez, Escuela Forestal Santa Coloma de Farnen, Esperanza Fernandez, Ester, Esther Muñoz, Emilio Ramirez, Fernando Oliveira, Francisco Iglesias, Francisco Ribeiro, Fernando Calatayud, Florian Jimenez, Francisca Jimenez, Francisco Martinez Azorin, Francisco Mira Yala, Francisco Soler Bonillo, Gabriel Morgada, Germani, Guillermo Rosell Carbonell, Gonzalo Calvo, Harildo Davila, Enrique Simó, Ignacio Rodriguez, Ildefonso Soler, Isabelo Gareia, Isel Espirito, Ismael Llaria, Inácio dos Santos Mamel, Inmaculada Segura Guimerá, Isidro, Jaume Cambra, Jaime Gutierrez, João Esteves Manso, João Gandino Dias, Joaquim Gomes, Joaquim Marques, Joaquim Neves Alexandre, Joaquim Romão, Jorge Novais, José Afonso, José António Sequeira, José Augusto Alves, José Carneiro, José Coelho, José da Costa Silva, José Heleno Ferreira, José Janeiro Lamas, José Lourenço, José Luis Pinho, José Luis Rei, José Maria Nascimento, José Duarte Silva, José Flores Serrano, José Ribeiro, Juan José Garrido, Jordi Guaspe, Jordi Murato Balmes, Jordi Sacot, Jorge Bela Mora, José, José António, José António Altamirano, José Francisco, José Gabriel Gonsalez, Jose Garcia, José Gil, José Gonsalez, José Luis Gonzalez, Jose Maria Oliva, Jose Mascarelle Sanchez, José Masi, José Navarro, José Pires, José Robledo, Jose Vicente, Joscarmen Martin, Juan, Juan Bautista, Juan José, Juan Jose Lleixà, Juan Jose Martinez Martinez, Juan Jose Naubolliver, Juan Pedro, Julia Goméz Zardoya, Julio Agra Blanco, Júlio Jesus Jorge, Julio Rivas, Jullian, Laura Garcia Peña, Lola Moreno, Luis Esperança Lourenço, Manuel Barbosa Rodrigues, Manuel Dovampo, Manuel Merca, Manuel Jardim, Manuel Marques, Manuel Terceiro, Manel Simon Vallenajor, Marco Pereira, Maria José, Marina Lopez Loureiro, Melchior Silva Ferreira, Miguel Mendes Lopes, Maria Carmen, Maria José Ponce Carbajal, Manuel Gonsalez Melo, Manuel Robledo, Marcian Rico, Maria Tereza Sierra, Mariano, Marta Rebelo, Martin Coñuelo Cano, Martin Esteves, Miguel Gil, Miguel Maia, Miguel Serrano Martinez, Nazario Fernander, Nicolas Espino, Norbina Gomes da Mata, Nuno Lopes, Paulo Manuel Dionisio, Paulo Varela, Pascual Domingo, Pau Bars, Pedro Jorge Carneira Barreiro, Pedro, Rafael Anton Palacios, Rafael Ribas, Ramon Ferre, Raul Molina Rimenez, Ricardo Gonzalez, Ricardo Pereira, Rita, Rogelio Rodriguez Alvarez, Rogme Lena Varela, Rui Vasco Martins Caetano, Rodolfo Montalva Palau, Ruan Garcia, Ruan Rubio Asensi, Sadurni, Salvador Lopez, Salvador Mallofre, Severiana Salgado, Sérgio Candelas, Simões Alegria, Simeó Paraneda, Tiago Moreira, Telma Marreiros, Vicente Garcia Fernandez, Vitorino Martin, Xavier, Xavier Colado, Xavier Llobet Guiy, Xesús Raimundez Rodriguez, e Xesús Asorey. A obtenção da colecção de referência das outras subespécies só foi possível graças a Andrew Abrahams, Bjørn Dahle, Gabriele Soland, Gilles Fert, Jevrosima, Lennard Pisa, Lionel Garnery, Norman Carreck, Raffaele dall'Olio, Romee Van der Zee, Said Aboulfaraj, Santiago Saenz, Wahida Loucif. Um agradecimento especial a Per Kryger pelas amostras da Dinamarca e por ter facilitado os contactos com os colegas dos outros países da Europa Ocidental. A amostragem dos apiários da Península Ibérica só foi possível devido ao empenho das bolseiras do projecto Andreia Brandão e Inês Moura, da voluntária Margarida Neto e finalmente da Irene Muñoz que, para além de acompanhar a amostragem no Galiza, fez os contactos telefónicos com os apicultores de toda a Espanha. João Paulo Castro deu uma ajuda preciosa com o GPS e SIG. Um agradecimento muito especial a Colette Abbou pelo excelente trabalho laboratorial de extracção de

Bibliografia

GARNERY, L., M. SOLIGNAC, G. CELEBRANO and J. M. CORNUET (1993) A simple test using restricted PCR-amplifiedmitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. Experientia 49: 1016-1021.

TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI *et al.* (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using MaximumLikelihood, Evolutionary Distance, and Maximum ParsimonyMethods. Molecular Biology and Evolution doi: 10.1093/molbev/msr121.

PEAKALL R, SMOUSSE PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6, 288–295.