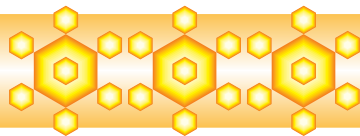


Estrutura Genética da Abelha Ibérica (*Apis mellifera iberiensis*)



Revelada por marcadores do DNA Mitochondrial e Nuclear (SNPs)

M. Alice PINTO
Julio CHÁVEZ-GALARZA
Dora HENRIQUES

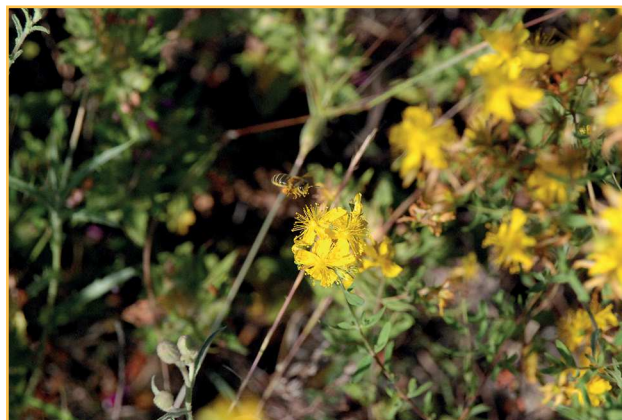
Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto
Politécnico de Bragança, Portugal.
apinto@ipb.pt



Introdução

Na sua ampla área de distribuição nativa, que inclui o Médio Oriente, África e Europa, a abelha melífera (*Apis mellifera*) teve que adaptar-se a uma grande diversidade de climas e floras. O processo de adaptação e diferenciação, que ocorreu ao longo dos últimos 300 000 de anos (Wallberg *et al.* 2014), deu origem a cerca de 30 subespécies, ou raças geográficas (Ruttner 1988; Engel 1999; Sheppard e Meixner 2003; Meixner *et al.* 2011), que Ruttner (1988) agrupou em quatro linhagens evolutivas, nomeadamente: a do Médio Oriente (O), a de África (A), a da Europa oriental (C) e a da Europa ocidental (M). A abelha ibérica (*A. m. iberiensis*) é uma das subespécies que se destaca do conjunto das 30 pela elevada complexidade genética. A ambição de dissecar tal complexidade tem motivado inúmeros inventários genéticos na Península Ibérica, fazendo da abelha ibérica a subespécie mais estudada no mundo do ponto de vista populacional e evolutivo.

A complexidade dos padrões de variação genética atribuída à abelha ibérica é comum a muitos outros animais endémicos da Península Ibérica, como por exemplo o coelho (Carneiro *et al.* 2013), a lagartixa ibérica (Pinho *et al.* 2009), o sardão (Miraldo *et al.* 2011), entre outros. Vários factores de natureza geomorfológica e ambiental contribuíram para a complexidade genética que hoje observamos neste canto da Europa. A elevada riqueza tanto geológica, como fisiográfica e climática, juntamente com o isolamento do resto da Europa, proporcionado pela barreira dos Pirenéus, e ao mesmo tempo a proximidade a África, proporcionada pelo Estreito



de Gibraltar, fizeram da Península Ibérica não só um importante refúgio durante as glaciações do quaternário (Hewitt 2000) como também uma ponte entre dois continentes, especialmente para os organismos com maior vagilidade (Carranza *et al.* 2004; Cosson *et al.* 2005; Guillaumet *et al.* 2006), como é o caso da abelha melífera (Whitfield *et al.* 2006; Wallberg *et al.* 2014).

Há mais de duas décadas que as populações de abelha ibérica têm sido alvo de inventários genéticos, os quais começaram com o uso de marcadores morfológicos (Cornuet & Fresnaye 1989; Arias *et al.* 2006; Miguel *et al.* 2011) passando mais tarde para os marcadores moleculares do DNA mitocondrial (Smith *et al.* 1991; Garnery *et al.* 1995, 1998a; Franck *et al.* 1998; De la Rúa *et al.* 2001, 2004, 2005; Arias *et al.* 2006; Miguel *et al.* 2007; Cánovas *et al.* 2008; Pinto *et al.* 2012, 2013), e do DNA nuclear (Franck *et al.* 1998; Garnery *et al.* 1998b; De la Rúa *et al.* 2002, 2003; Miguel *et al.* 2007, 2011; Cánovas *et al.* 2011; Chávez-Galarza *et al.* 2013, 2015).

Estrutura Genética da Abelha Ibérica

Os estudos que têm usado marcadores do DNA mitocondrial revelaram a co-ocorrência de duas linhagens evolutivas formando um gradiente caracterizado pela predominância da linhagem A na metade sudoeste e da linhagem M na metade nordeste da Península Ibérica (Franck *et al.* 1998; Cánovas *et al.* 2008; Miguel *et al.* 2007; Chávez-Galarza *et al.* 2015). Assim, o DNA mitocondrial indica que a abelha ibérica partilha uma herança comum tanto com a abelha negra (*A. m. mellifera*) da Europa ocidental como com as abelhas Africanas. Porém, certos marcadores moleculares do DNA nuclear, como é o caso dos microsátélites, contam uma história discordante do DNA mitocondrial pois se por um lado não distinguem a abelha ibérica da abelha negra por outro lado mostram uma profunda diferenciação entre estas duas subespécies Europeias e as subespécies africanas (Franck *et al.* 1998). Para complicar ainda mais as coisas, os resultados obtidos com os microsátélites contrastam com outros marcadores como a morfologia, feromonas e alozimas (ver referências bibliográficas em De la Rúa *et al.* 2009), que tal como o DNA mitocondrial sugerem uma relação de proximidade genética com as abelhas do norte de África. Assim, apesar dos numerosos estudos genéticos, os padrões de diversidade da abelha ibérica, e os processos evolutivos que estão na sua génese, estão longe de ser cabalmente compreendidos. Na tentativa de melhorarmos a compreensão do que é afinal a abelha ibérica e de avaliarmos o potencial impacto da acção humana na assinatura gravada no seu genoma por milhares de anos de evolução, em 2010 iniciamos mais um estudo na Península Ibérica (ver descrição do projecto no artigo “Pinto *et al.* 2012” publicado nesta revista).



Fig. 1 – Mapa da Península Ibérica mostrando os centroides e o tamanho da amostra (n) de cada ponto de amostragem nos três transectos (AT, Atlântico; CT, central; MT, Mediterrânico) e a localização putativa dos refúgios glaciares (Bacia do Ebro e Cordilheira Bética) da abelha ibérica e de outros organismos endêmicos da Península Ibérica (adaptado de Gomez & Lunt 2007).

No presente artigo resumiremos os resultados até agora obtidos que julgamos mais interessantes para os apicultores mais curiosos.



Fig. 2a – Detalhes da amostragem na Península Ibérica. Colheita de amostras de abelhas.

Amostragem

Neste estudo, que só foi possível levar a cabo graças à colaboração e ao voluntarismo de inúmeros apicultores e técnicos de associações, foram amostradas 711 colónias ao longo de três transectos que atravessaram de norte a sul Portugal e Espanha (Fig. 1). Em cada ponto de amostragem (ver Fig. 1) foram amostrados entre 8 a 13 apiários e em cada apiário foram colhidas abelhas de três colónias. Durante mais de 100 dias de trabalho ininterrupto foram percorridos 13475 km, contactados 203 de apicultores e amostrados 235 apiários (Fig. 2). As amostras das 711 colónias foram trazidas para o laboratório onde foram submetidas a análise do DNA mitocondrial e do DNA nuclear. Enquanto o DNA mitocondrial foi analisado recorrendo à sequenciação de apenas uma região da molécula (região intergénica situada entre o final do gene que codifica o RNA de transferência da leucina, tRNA^{leu}, e o gene que codifica o citocromo c oxidase subunidade II, *cox2*) o DNA nuclear foi analisado recorrendo à tecnologia de *microarrays* que permitiu amostrar 1536 regiões distribuídas pelos 16 cromossomas da abelha. O marcador molecular que foi utilizado na amostragem dos 16 cromossomas é designado por “polimorfismo de nucleótido simples”, ou SNP, conforme abreviatura da designação anglo saxónica (*Single Nucleotide Polymorphism*). Apesar das 711 amostras terem sido genotipadas para os 1536 SNPs, apenas 383 SNPs se revelaram informativos (os restantes não eram polimórficos para a abelha ibérica). Parte dos resultados desta amostragem foram publicados na revista científica *Molecular Ecology* em dois artigos (Chávez-Galarza *et al.* 2013, 2015) os quais são resumidos a seguir.

Padrão de variação do DNA mitocondrial

Os resultados obtidos com o marcador do DNA mitocondrial confirmam a presença na Península Ibérica de duas linhagens de abelhas altamente divergentes, conforme exibido pela *network* construída a partir das sequências da região intergênica tRNA^{leu}-cox2 (Fig. 3). A *network* revela a existência de dois grupos distintos de haplótipos (tipos de DNA): os Africanos (linhagem A) e os da Europa ocidental (linhagem M). A Fig. 4 mostra a distribuição das frequências das duas linhagens de DNA mitocondrial em cada ponto de amostragem ao longo dos três transectos. Esta figura revela que enquanto a linhagem Africana (A) predomina nas populações de abelha que ocupam a metade sudoeste da Península Ibérica a linhagem da Europa ocidental (M) predomina nas populações mais próximas dos Pirenéus. Esta forte estruturação da diversidade mitocondrial é surpreendente uma vez que todos os anos milhares de colônias transumantes são deslocadas a grandes distâncias em Espanha (A. Pajuelo, comunicação pessoal).



Fig. 2b – Detalhes da amostragem na Península Ibérica. Localização de apiário com GPS e preenchimento da ficha de campo.

Padrão de variação do DNA nuclear

Os resultados dos SNPs obtidos ao nível da colónia e ao nível da população estão representados nas figuras 5 e 6, respectivamente. Tal como o DNA mitocondrial, os SNPs revelam uma forte estruturação da diversidade nuclear orientada ao longo de um eixo sudoeste-nordeste. A concordância dos padrões de diversidade entre dois marcadores moleculares independentes, um herdado via materna (DNA mitocondrial) e outro com herança biparental (SNPs), suporta uma hipótese de contacto entre populações causada por expansão pós-glacial.

A estrutura genética que hoje observamos na abelha ibérica foi provavelmente modelada por um longo período de diferenciação, devido ao isolamento das populações em diferentes refúgios glaciais, seguido de expansão que se seguiu ao aquecimento que se verificou há pouco mais de 10 000 anos.

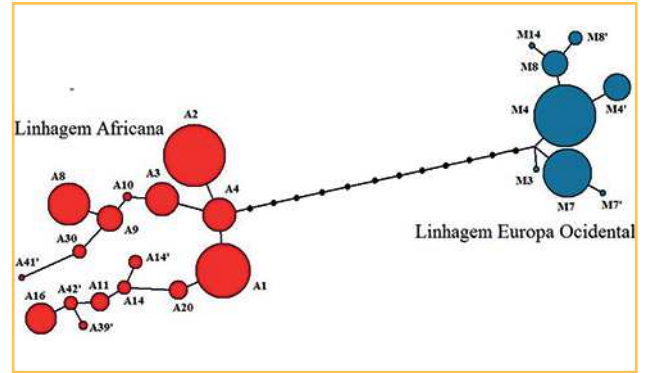


Fig. 3 – Network mostrando os diferentes tipos de DNA mitocondrial (haplótipos) encontrados na Península Ibérica. Os haplótipos formam claramente dois grupos divergentes representados a vermelho pela linhagem Africana (A) e a azul pela linhagem da Europa ocidental (M). O tamanho de cada círculo é proporcional à frequência do haplótipo.

Esta hipótese tem sido sugerida para um número cada vez maior de organismos ibéricos (revisto por Gomez & Lunt 2007). Os dois refúgios glaciais putativos inferidos para muitos organismos ibéricos (Gomez & Lunt 2007), incluindo a abelha ibérica (Chávez-Galarza *et al.* 2015), são indicados na Fig. 1. É provável que tenham existido pelo menos dois refúgios glaciais: um no canto nordeste de Espanha na costa mediterrânica, possivelmente perto do vale do Ebro, e outro no Sul de Espanha. O aquecimento global que ocorreu há cerca de 10 000 anos provavelmente ajudou à expansão das populações de abelhas que acabaram por colonizar toda a Península ibérica e Europa ocidental. De facto estudos genéticos, sugerem que a abelha negra que hoje se distribui por toda a Europa ocidental, teve origem na Península Ibérica (Miguel *et al.* 2007). O facto de partilharem uma história comum tão recente explica a proximidade genética das duas subespécies.

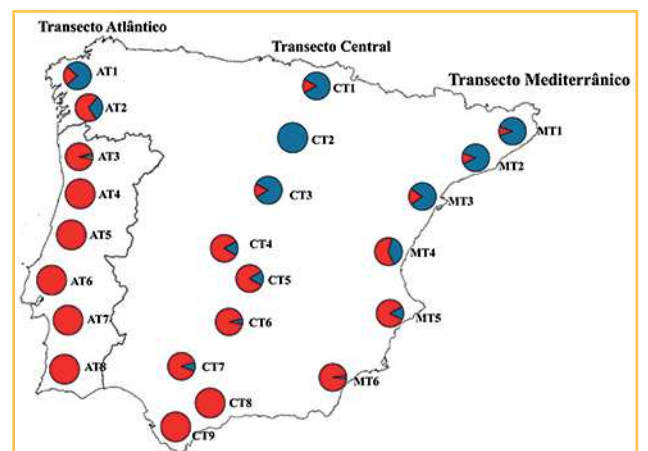


Fig. 4 – Distribuição das frequências de DNA mitocondrial da linhagem A (representada a vermelho) e da linhagem M (representada a azul) em cada ponto de amostragem ao longo dos três transectos.

Estrutura Genética da Abelha Ibérica

A forte estrutura recuperada pelos SNPs contrasta com a ausência de estrutura dos microsátélites (Franck *et al.* 1998; Cánovas *et al.* 2011). Os estudos anteriores conduzidos com este marcador molecular atribuíram a ausência de estrutura na abelha ibérica a um processo de homogeneização devido à transumância. Cánovas *et al.* (2011) sugerem que a movimentação massiva de colónias a grandes distâncias, típica na vizinha Espanha (mas menos comum em Portugal), facilita a troca de genes entre colónias de regiões geograficamente distantes. Contudo, os resultados que obtivemos com dois marcadores genéticos independentes, SNPs e DNA mitocondrial, não suportam a hipótese de Cánovas *et al.* (2011). Várias explicações, não mutuamente exclusivas, podem ser evocadas para a forte estrutura genética observada: ou a transumância ocorre depois da estação reprodutiva, evitando o fluxo de genes a grandes distâncias, ou existe algum tipo de barreira reprodutiva, ou a selecção natural favorece as populações locais e por isso a manutenção da estrutura.

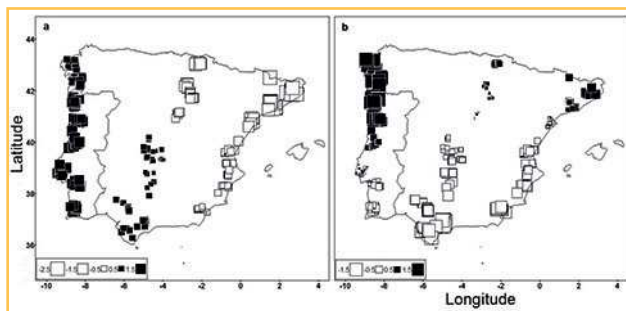


Fig. 5 – Estrutura global obtida por análise espacial de componentes principais usando os SNPs. Cada quadrado representa uma colónia. (a) Primeiro componente espacial global mostrando uma estrutura populacional com orientação sudoeste-nordeste. (b) Segundo componente espacial global destacando a presença de uma estrutura que diferencia as populações do Norte do transecto Atlântico relativamente ao resto da Península Ibérica.

Estudos genéticos usando diferentes marcadores têm mostrado que a abelha ibérica e a abelha negra, as duas únicas subespécies da linhagem M, estão mais próximas geneticamente das subespécies do norte de África do que das outras subespécies Europeias da linhagem C, como por exemplo da *A. m. ligustica* e *A. m. carnica*. Esta proximidade genética deve-se a uma provável colonização ancestral da Península Ibérica por abelhas africanas via estreito de Gibraltar. A presença dominante de DNA mitocondrial de origem Africana na Península Ibérica suporta esta hipótese.

A pergunta que naturalmente se coloca “Quando é que essa invasão ocorreu?” ainda não tem resposta. Porém, a forte diferenciação genética entre a abelha ibérica e a subespécie norte africana *A. m. intermissa* (Whitfield *et al.* 2006) sugerem que a colonização da Península Ibérica, e posteriormente da Europa ocidental, ocorreu há alguns milhares de anos atrás.

Conclusões

O DNA mitocondrial e o DNA nuclear (SNPs) revelaram a existência de uma forte e concordante estruturação da diversidade genética ao longo de um eixo nordeste-sudoeste na Península Ibérica, dando suporte a um cenário de contacto secundário que provavelmente ocorreu nos últimos 10 000 anos, após a expansão das populações de abelhas que se mantinham isoladas em refúgios glaciais. Este resultado, juntamente com a detecção de selecção no genoma da abelha ibérica (Chávez-Galarza *et al.* 2013), sugerem que uma complexa interacção entre adaptação e demografia tem modelado os padrões genéticos que hoje observamos na abelha ibérica. A actividade apícola contemporânea não parece ter alterado significativamente (pelo menos até agora) os padrões de diversidade genética que têm sido modelados pela natureza. Porém, este cenário poderia eventualmente mudar se os apicultores Portugueses e Espanhóis adoptassem por exemplo uma estratégia de introdução massiva de rainhas/colónias comerciais da linhagem C, tal como tem acontecido em vários países da Europa ocidental (revisto por De la Rúa *et al.* 2009; Pinto *et al.* 2014).

A abelha ibérica providencia serviços ambientais importantes através da polinização e é produtora de mel (para não falar de outros produtos da colmeia) em quantidades substanciais no contexto da União Europeia. Mas acima de tudo, a abelha ibérica representa um importante reservatório de diversidade que há cerca de 10000 anos colonizou toda a Europa ocidental (Franck *et al.*, 1998; Garnery *et al.* 1998a; Miguel *et al.* 2007) e que merece ser preservado.

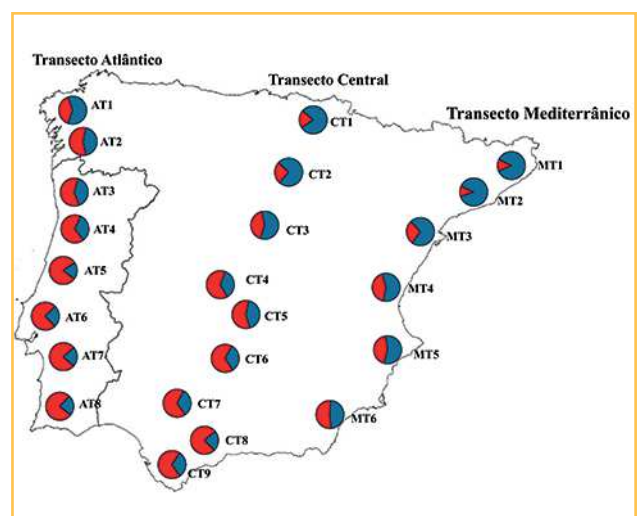


Fig. 6 – Estrutura ao nível da população recuperada pelos SNPs. Os SNPs dividem o genoma da abelha ibérica em dois grandes grupos representados a vermelho e a azul. A estrutura nuclear é concordante com a estrutura gerada pelo DNA mitocondrial.

Agradecimentos

Um sentido agradecimento a todas as pessoas que directa e indirectamente contribuíram para o sucesso deste projecto de investigação. Um agradecimento especial a António Pajuelo 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. Um número elevado de pessoas colaborou na recolha de amostras em Espanha e Portugal, nomeadamente: Ana, Anabela Mendes, Antonieta Caeiro, Armada Nunes, Amílcar Fernandes, Adérito Serpa, Adolfo, Albano Barros, Alberto, Alberto Aguiar, Alfredo Silva, António Sousa, António Hermenegildo, António Rosendo, António Tavares, Arlindo Justino, Armindo Almeida, Aurora Gonzalez 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 Moron Sabio, Beatriz, Blai Llambrich Subirats, Bruno Monteiro, 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 Jimenez, Domingo Gordo, Eládio Torrente Rodriguez, Escuela Forestal Santa Coloma de Farners, 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, German, Guillermo Rosell Carbonell, Gonzalo Calvo, Harildo Davila, Enrique Simó, Ignacio Rodriguez, Ildfonso Soler, Isabelo Gareia, Isel Espirito, Ismael Llaría, 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 Luís Pinho, José Luís 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 Antonio, José Antonio Altamirano, José Francisco, José Gabriel Gonzalez, Jose Garcia, José Gil, José Gonzalez, José Luis Gonzalez, Jose Maria Oliva, Jose Mascarelle Sanchez, José Masi, José Navarro, José Pires, José Robledo, Jose Vicente,

Josicarmen Martin, Juan, Juan Bautista, Juan José, Juan Jose Lleixà, Juan Jose Martinez Martinez, Juan Jose Nauboliver, Juan Pedro, Julia Gómez Zardoya, Julio Agra Blanco, Júlio Jesus Jorge, Julio Rivas, Jullian, Laura Garcia Peña, Lola Moreno, Luís Esperança Lourenço, Manuel Barbosa Rodrigues, Manuel Dovampo, Manuel Merca, Manuel Jardim, Manuel Marques, Manuel Terceiro, Manel Simon Vallemajor, Marco Pereiro, Maria José, Marina Lopez Loureiro, Melchior Silva Ferreira, Miguel Mendes Lopes, Maria Carmen, Maria José Ponce Carbajal, Manuel Gonzalez 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 Dionísio, 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 Candeias, Simões Alegria, Simeó Parareda, Tiago Moreira, Telma Marreiros, Vicente Garcia Fernandez, Vitorino Martin, Xavier, Xavier Colado, Xavier Llobet Guiy, Xesús Raimundez Rodriguez, e Xesús Asorey. A recolha de amostras só foi possível graças à ajuda de Andreia Brandão, Inês Moura, Margarida Neto e Irene Munõz. João Paulo Castro e João Azevedo deram uma ajuda preciosa com o GPS e SIG. Um agradecimento muito especial a Colette Abbey pelo excelente trabalho de genotipagem dos SNPs. Danny Weaver autorizou a utilização da OPA (Oligo Pool Assay). Cátia Neves fez uma leitura atenta do manuscrito. Um agradecimento à Federação Nacional de Apicultores Portugueses e a todas as Associações de Apicultores de Portugal pela colaboração na amostragem. Julio Chávez-Galarza e Dora Henriques foram financiados com Bolsas de Doutoramento SFRH/BD/68682/2010 e SFRH/BD/84195/2012, respectivamente, da Fundação para a Ciência e Tecnologia. Este projecto foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e pelo programa COMPETE/QREN/EU através do projecto PTDC/BIA-BEC/099640/2008.

**Adoce com NATUREZA
consuma MEL**

Referências bibliográficas

- Arias MC, Rinderer TE, Sheppard WS (2006) Further characterization of honey bees from the Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *Journal of Apicultural Research*, 45, 188–196.
- 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, 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.
- Carneiro M, Stuart JEB, Afonso S *et al.* (2013) Steep clines within a highly permeable genome across a hybrid zone between two subspecies of the European rabbit. *Molecular Ecology*, 22, 2511–2525.
- Carranza S, Arnold EN, Wade E, Fahd S (2004) Phylogeography of the false smooth snakes, *Macroprotodon* (Serpentes, Colubridae): mitochondrial DNA sequences show European populations arrived recently from Northwest Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 523–532.
- Chávez-Galarza, J.; Henriques, D.; Johnston, J.C.; Patton, J.C.; Rufino J.; Carneiro M.; Pinto, M.A. 2015. Revisiting the Iberian honey bee contact zone: maternal and genome-wide nuclear variation provide support for secondary contact from historical refugia in Iberian honey bees (*Apis mellifera iberiensis*). *Molecular Ecology* 24, 2973–2992.
- Chávez-Galarza, J.; Henriques, D.; Johnston, J.S.; Azevedo, J.C.; Patton, J.C.; Muñoz, I.; De la Rúa, P.; Pinto, M.A. (2013) Signatures of selection in the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) revealed by a genome scan analysis of single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, 22, 5890–5907.
- Cornuet JM, Fresnaye J (1989) Biometrical study of honey bee populations from Spain and Portugal. *Apidologie*, 20, 93–101.
- Cosson JF, Hutterer R, Libois R *et al.* (2005) Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in the western Mediterranean: a case study with the greater white-toothed shrew, *Crocodyrus russula* (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology*, 14, 1151–1162.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA (2001) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, 10, 1733–1742.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA (2002) Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 40, 164–168.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA (2003) Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution*, 35, 339–350.
- De la Rúa P, Hernandez-García R, Jiménez Y, Galián J, Serrano J (2005) Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from northeastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect Systematics & Evolution*, 36, 21–28.
- De la Rúa P, Jaffé R, Dall’Olio R, Muñoz I, Serrano J (2009) Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40, 263–284.
- De la Rúa P, Jiménez Y, Galián J, Serrano J (2004) Evaluation of the biodiversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from eastern Spain. *Journal of Apicultural Research*, 43, 162–166.
- Engel MS (1999) The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera : Apidae: Apis). *Journal of Hymenoptera Research*, 8, 165–196.
- Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52, 1119–1134.
- Garnery L, Franck P, Baudry E *et al.* (1998a) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution*, 30, S31–S47.
- Garnery L, Franck P, Baudry E *et al.* (1998b) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*, 30, S49–S74.
- Garnery L, Mosshine EH, Oldroyd BP, Cornuet JM (1995) Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*, 4, 465–471.
- Gomez A, Lunt DH (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: *Phylogeography of Southern European Refugia* (eds Weiss S, Ferrand N), pp. 155–188. Springer, The Netherlands.
- Guillaumet A, Pons JM, Godelle B, Crochet PA (2006) History of the Crested Lark in the Mediterranean region as revealed by mtDNA sequences and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39, 645–656.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.
- Meixner MD, Leta MA, Koeniger N, Fuchs S (2011) The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*-*Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie*, 42, 425–437.
- Miguel I, Baylac M, Iriondo M *et al.* (2011) Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*, 42, 150–161.
- Miguel I, Iriondo M, Garnery L, Sheppard WS, Estonba A (2007) Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and postglacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie*, 38, 141–155.
- Miraldo A, Hewitt GM, Paulo OS, Emerson BC (2011) Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 170.
- Pinho C, Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Harris DJ, Ferrand N (2009) Genetic admixture between the Iberian endemic lizards *Podarcis bocagei* and *Podarcis carbonelli*: evidence for limited natural hybridization and a bimodal hybrid zone. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47, 368–377.
- Pinto MA, Henriques D, Chávez-Galarza J *et al.* (2014) Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*, 53, 269–278.
- Pinto MA, Henriques D, Neto M *et al.* (2013) Maternal diversity patterns of Ibero-Atlantic populations reveal further complexity of Iberian honey bees. *Apidologie*, 44, 430–439.
- Pinto MA, Muñoz I, Chávez-Galarza J, De la Rúa P (2012) The Atlantic side of the Iberian Peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity. *Apidologie*, 43, 663–673.
- Ruttner F (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honey Bees*. Springer, Berlin.
- Sheppard WS, Meixner MD (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34, 367–375.
- Smith DR, Palopoli MF, Taylor BR *et al.* (1991) Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 82, 96–100.
- Wallberg A, Han F, Wellhagen G *et al.* (2014) A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 46, 1081–1088.
- Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH *et al.* (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314, 642–645.