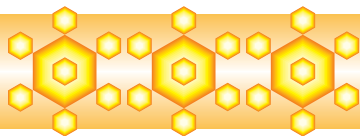


Padrões de Diversidade Neutral e Adaptativa da Abelha Ibérica



Um Projecto de Investigação à escala da Península Ibérica que
Integra as mais Avançadas Tecnologias Moleculares e Analíticas

Maria Alice Pinto*, João Carlos Azevedo, Filipe Costa, John C. Patton, J. Spencer
Johnston, Pilar De la Rúa
Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança (IPB)
Campus de Santa Apolónia, 5301-855 Bragança
*Coordenadora Científica do Projecto. Email: apinto@ipb.pt

A Península Ibérica é reconhecida como um importante *hotspot* de diversidade e endemismos de numerosas espécies de plantas e animais, representando por isso uma das regiões prioritárias para a conservação na Europa. Vários factores geomorfológicos e ambientais contribuíram para esta riqueza, nomeadamente: (i) localização geográfica no extremo sudoeste da Europa; (ii) isolamento em relação ao resto da Europa pela barreira geográfica dos Pirenéus; (iii) complexidade fisiográfica; (iv) diversidade climática resultante da heterogeneidade fisiográfica e das influências contrastantes do Atlântico e do Mediterrâneo. A conjugação destes factores fez da Península Ibérica não só um berço de diferenciação e especiação como também um importante refúgio que abrigou durante os vários períodos glaciares do Pleistoceno muitas das espécies de plantas e animais que hoje colonizam o Norte e Centro da Europa (Hewitt, 1999). A abelha negra (*Apis mellifera mellifera*), por exemplo, é um desses organismos cuja história está inextricavelmente ligada à Península Ibérica. Estudos moleculares sugerem que esta subespécie de abelha melífera tem origem num refúgio glacial Ibérico a partir do qual se expandiu (Miguel et al., 2007) até ocupar a área actual que vai desde França até à Escandinávia e desde as Ilhas Britânicas até à Ucrânia.

Aos factores acima mencionados acresce a proximidade ao continente Africano a qual possibilitou a troca de genes entre os organismos dos dois continentes tendo consequentemente contribuído para a notável diversidade e complexidade genética documentada para muitos organismos ibéricos (Gomez and Lunt, 2007), incluindo a abelha. De facto, os vários estudos da abelha ibérica baseados no ADN mitocondrial testemunham a co-ocorrência das linhagens Africana e Europeia formando um gradiente

caracterizado pela predominância de haplótipos (tipos de ADN mitocondrial) de origem Africana (linhagem A) na parte sul/noroeste e Europeia (linhagem M) na parte norte/nordeste da Península Ibérica (Serrano et al. 2011). Ou seja, a abelha ibérica (*A. m. iberiensis*) partilha haplótipos com subespécies Africanas (por exemplo *A. m. intermissa*, *A. m. scutellata*, *A. m. adansonii*) e com a abelha negra da Europa ocidental. Porém, certos marcadores moleculares do ADN nuclear, como é o caso dos microsatélites, contam uma história discordante do ADN mitocondrial pois não diferenciam a abelha ibérica da abelha negra e revelam níveis residuais de introgressão de genes de origem Africana na abelha ibérica (Franck et al., 1998). Para complicar ainda mais as coisas, estes resultados contrastam com outros marcadores genéticos nucleares como a morfologia, feromonas e alozimas (ver referências bibliográficas em De la Rúa et al. 2009), que tal como o ADN mitocondrial sugerem uma relação de proximidade genética com as abelhas do norte de África. Assim, apesar dos numerosos estudos empregando uma panóplia de marcadores genéticos, os padrões de diversidade da abelha ibérica, e os processos evolutivos que estão na sua génese, estão longe de ser cabalmente identificados e compreendidos. Ou seja, a abelha ibérica tem-se revelado um verdadeiro desafio para os cientistas, provavelmente ainda mais difícil do que outros organismos ibéricos pela complexidade acrescida dos processos contemporâneos mediados pelos humanos (por exemplo: o movimento de colónias, introdução de rainhas exóticas, selecção de colónias, introdução acidental de novos parasitas e doenças).

Com o advento da sequenciação do genoma da abelha melífera (Weinstock et al., 2006), nunca antes se dispôs de ferramentas moleculares e analíticas tão poderosas para dissecar a complexidade dos padrões de diversidade genética exibidos pela abelha ibérica.

Abelha Ibérica

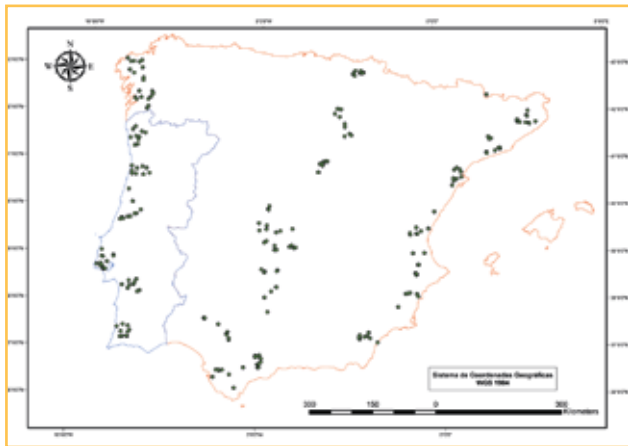


Fig. 1 - Mapa com a localização dos apiários amostrados. Cada ponto representa um apiário. Em cada apiário foram amostradas três colmeias.

Neste texto dar-se-á a conhecer um projecto de investigação que recorre às mais avançadas tecnologias moleculares e aos recursos genómicos disponíveis na plataforma BeeBase (<http://hymenoptergenome.org/beebase/>) num estudo de larga escala da abelha ibérica. Este projecto é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/BIA-BEC/099640/2008) e executado por uma equipa internacional que integra investigadores de dois centros de investigação portugueses, Centro de Investigação de Montanha do Instituto Politécnico de Bragança (Maria Alice Pinto e João Carlos Azevedo), Centro de Biologia Molecular e Ambiental da Universidade do Minho (Filipe Costa), uma Universidade Espanhola, Universidade de Múrcia (Pilar de la Rúa), e duas Universidades Americanas, Texas A&M University (J. Spencer Johnston) e Purdue University (John C. Patton).

O projecto teve início em Maio de 2010 com a colheita de amostras em apiários localizados em três transectos dispostos ao longo das costas Atlântica e Mediterrânica e centro da Península Ibérica (Fig. 1). A amostragem dos apiários ibéricos (Fig. 2) terminou em Julho de 2010 e só foi possível graças à colaboração de numerosos apicultores e técnicos das associações, que disponibilizaram o seu precioso tempo para ajudar nesta tarefa árdua mas ao mesmo tempo muito enriquecedora pela aprendizagem que resultou do contacto com os apicultores. Foram amostradas 711 colmeias representando 235 apiários e 203 apicultores de Portugal e Espanha. Paralelamente à colecção ibérica, construiu-se uma importante colecção de referência (total de 145 colónias) das subespécies *A. m. mellifera* (77), *A. m. intermissa* (31), *A. m. carnica* (20) e *A. m. ligustica* (17), com amostras provenientes de França, Dinamarca, Holanda, Suíça, Reino Unido, Noruega, Argélia, Marrocos, Croácia, Sérvia, Itália. Esta tarefa foi finalizada com sucesso em Agosto de 2011 graças à inestimável colaboração de muitos colegas investigadores da Europa e Norte de África.



Figura 2 - Detalhes da amostragem das abelhas ibéricas. (a) Colheita de zângãos dos quadros.



Apilore

S.L.

FÁBRICA DE CERA • COMPRA Y VENTA DE MIEL Y CERA

Miel • Polen • Jalea Real • Cera • Propóleos • Colmenas
Todo tipo de material apícola • Instalaciones completas
de extracción y envasado.

ALIMENTO ESPECIAL PARA ABEJAS

Alimento de invierno. Alimento estimulante de primavera.!! Líquido; ;

Quinta de Machado, s/n • Ctra. Nac. IV • 41400ECIJA (Sevilla) • Tel.: 954 83 33 14 - Fax: 954 83 14 36



Figura 2 - (b) Preparação das amostras imediatamente após a colheita das colmeias

A genotipagem do ADN nuclear dos 856 indivíduos foi concluída em Outubro de 2011. Para tal recorreu-se ao marcador molecular designado por “polimorfismo de nucleótido simples”, mais conhecido por SNP (*single nucleotide polymorphism*). O SNP é reconhecido como um dos marcadores moleculares mais interessantes e promissores devido à abundância no genoma, elevada variabilidade, co-dominância, qualidade dos dados, e possibilidade de utilização em grande escala (nº de SNPs e de indivíduos) permitida pelas novas tecnologias moleculares. Paralelamente ao projecto de sequenciação da abelha, foi desenhado um *chip*, para a plataforma da Illumina®, que contempla 1536 SNPs dispersos pelos 16 cromossomas, o que permite a amostragem de todo o genoma. Assim, recorrendo à tecnologia da Illumina®, disponível na Texas A&M University, o genoma dos 856 indivíduos foi amostrado através da genotipagem dos 1536 SNPs usando o *GoldenGate Genotyping Assay* da Illumina® (Fig. 3) e um painel de oligonucleótidos desenhado por encomenda (*custom oligo pool assay*) cuja utilização foi gentilmente autorizada por Danny Weaver (Genformatic).



Figura 2 - (c) Localização do apiário com GPS e preenchimento da ficha de campo

Os dados produzidos para cada indivíduo genotipado consistem numa cadeia de 1536 nucleótidos (por exemplo: GAAGGCGGCAAG...) correspondentes a 1536 posições dispersas pelos seus 16 cromossomas. Actualmente, estão-se a analisar os dados dos SNPs, estando-se a obter resultados bastante interessantes que serão oportunamente divulgados (em conferências e revistas científicas e técnicas) junto da comunidade científica e apícola.



Fig. 3 - Detalhes do procedimento analítico para obtenção dos SNPs. (a) Preparação do BeadChip.

Em adição à componente nuclear, a composição materna do conjunto das amostras será brevemente examinada através da sequenciação da região intergénica do ADN mitocondrial situada entre os genes RNA de transferência da leucina (tRNA^{Leu}) e citocroma oxidase II (coxII). Esta região mitocondrial tem sido amplamente analisada em estudos da diversidade da abelha em todo o mundo, e em especial na Península Ibérica (ver referências em (Cánovas et al., 2008)). Apesar da composição materna da abelha ibérica já ser conhecida de estudos anteriores, a análise do ADN mitocondrial irá auxiliar e completar a interpretação e representação dos padrões de diversidade gerados pelos SNPs.



Figura 3 - (b) iScanReader da Illumina é usado para analisar o sinal de fluorescência do BeadChip.

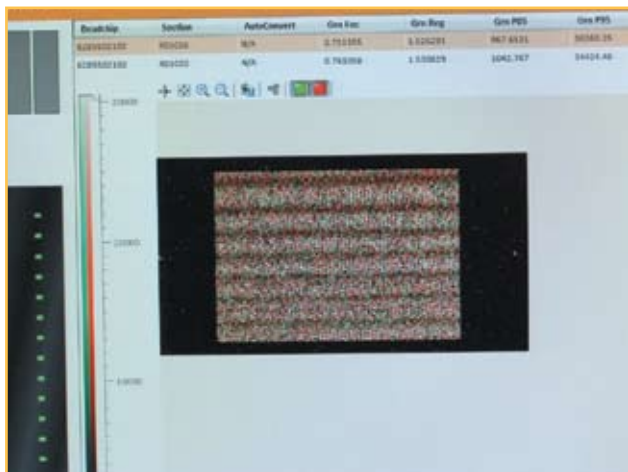


Figura 3 - (c) Imagem do BeadChip produzida pelo iScanReader.

Com este projecto pretende-se (1) identificar, representar e interpretar os padrões de diversidade genética (neutral e sob selecção) da abelha ibérica e (2) destrinçar e compreender os diferentes processos históricos e contemporâneos que tem moldado a diversidade que encontramos actualmente. Espera-se com esta abordagem identificar as regiões do genoma da abelha ibérica moldadas pela selecção natural, e por isso importantes na adaptação ao meio, e eventualmente compreender a base genética da adaptação, o que constitui um dos objectivos mais fundamentais e ambiciosos em biologia evolutiva.

A sobrevivência a longo prazo de qualquer ser vivo depende da sua diversidade genética; quanto menor for maior será a dificuldade de adaptação ao meio. Num contexto de profundas e rápidas alterações ambientais, os desafios que a abelha enfrenta são cada vez maiores. Assim, é imperativo conservar-se o notável património genético que chegou aos dias de hoje, após milhares de anos de evolução.

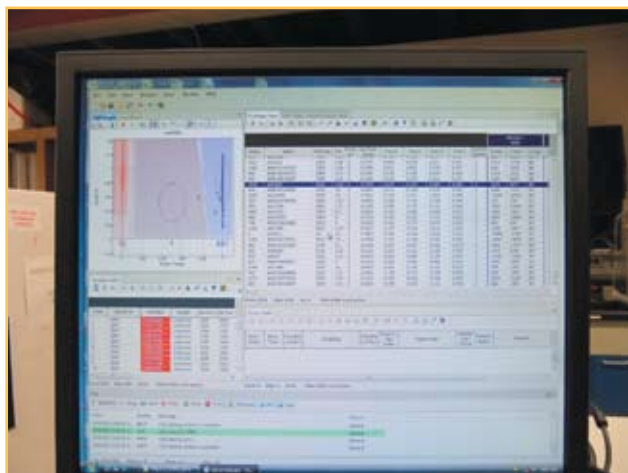


Figura 3 - (d) Genotipagem automática com o software GenomeStudio da Illumina®.

A diversidade genética é a matéria-prima que permite à abelha responder e adaptar-se a um crescente número de inimigos exóticos invasores (doenças, parasitas, predadores), à poluição, aos pesticidas, às alterações climáticas e às exigências de uma apicultura cada vez mais competitiva. Ao identificar os padrões e processos da diversidade e os componentes do genoma adaptativamente importantes para a abelha ibérica, este projecto irá fornecer informação de base para programas de melhoramento genético e de gestão e conservação a longo prazo da abelha ibérica. Conservar a diversidade genética da abelha ibérica é garantir a matéria-prima da apicultura e consequentemente a sustentabilidade do sector apícola.

Agradecimentos

São numerosas as pessoas que têm contribuído para este projecto e a quem estamos profundamente agradecidos. 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. 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, Amílcar Fernandes, Adérito Serpa, Adolfo, Albano Barros, Alberto, Alberto Aguiar, Alfredo Silva, António Sousa, António Hermenegildo, António Rosende, 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, Ceciclipto Lopez, Celestino Arroyo, Constancio Barquero, Carlos Batista, Carlos Mendes, Carlos Teixeira, Centro de Formación y Experimentación Agro-Florestal de Sergude, Claudino Tregreiro, 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, Floran 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, Ildefonso 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 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 bolsieras do projecto Andreia Brandão e Inês Moura, da voluntária Margarida Neto e finalmente da Irene Munõz que, para além de acompanhar a amostragem na Galiza, fez os contactos telefónicos com os apicultores de toda a Espanha. João Paulo Castro e Julio Chávez-Galarza deram uma ajuda preciosa com o GPS e SIG. Um agradecimento muito especial a Colette Abbey, pelo excelente trabalho laboratorial de extracção de ADN e genotipagem dos SNPs, e a Danny Weaver por autorizar a utilização da OPA (*Oligo Pool Assay*). A Federação Nacional de Apicultores Portugueses, e a todas as Associações de Apicultores de Espanha e Portugal que directa e indirectamente contribuíram para o sucesso do projecto. Este projecto é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e pelo programa COMPETE/QREN/EU através do projecto PTDC/BIA-BEC/099640/2008.

NOTA DE RODAPÉ

Os apicultores que colaboraram neste projecto e que estejam interessados em conhecer o tipo de ADN mitocondrial das suas colónias (se a origem é Africana, linhagem A, ou da Europa ocidental, linhagem M) devem enviar um *email* (com a identificação do apicultor e localização do apiário) para o endereço apinto@ipb.pt a solicitar essa informação. Contudo, informa-se que as análises só estarão concluídas em meados de 2012.



Apicola Los Ribes S.L.



La calidad que nunca para de crecer

Miel, Polen, Jalea Real, Láminas de cera, Colmenas, Material Apícola.
MAQUINARIA ALEMANA CARL FRITZ: Extractores, Deselladoras,
Centrifugadoras, Envasadoras, Maduradores, Bombas de trasiego, Mezcladoras,
Decantadoras, Inseminadoras de Reinas

Avda. Blasco Ibáñez, 24 • 46193 **MONTROY** (Valencia) • Tel.: 962 55 54 30 • Fax: 962 55 61 57

Abelha Ibérica



Referências Bibliográficas

Cánovas, F., P. De la Rúa, J. Serrano, and J. Galián. 2008. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46:24-30.

Franck, P., L. Garnery, M. Solignac, and J.M. Cornuet. 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52:1119-1134.

Gomez, A., and D.H. Lunt. 2007. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula Springer, Dordrecht.

Hewitt, G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:87-112.

Miguel, I., M. Iriondo, L. Garnery, W.S. Sheppard, and A. Estonba. 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* 38:141-155.

Weinstock, G.M., G.E. Robinson, R.A. Gibbs, K.C. Worley, J.D. Evans, R. Maleszka, H.M. Robertson, D.B. Weaver, M. Beye, P. Bork, C.G. Elsik, K. Hartfelder, G.J. Hunt, E.M. Zdobnov, G.V. Amdam, M.M.G. Bitondi, A.M. Collins, A.S. Cristino, H.M.G. Lattorff, C.H. Lobo, R.F.A. Moritz, F.M.F. Nunes, R.E. Page, Z.L.P. Simoes, D. Wheeler, P. Carninci, S. Fukuda, Y. Hayashizaki, C. Kai, J. Kawai, N. Sakazume, D. Sasaki, M. Tagami, S. Albert, G. Baggerman, K.T. Beggs, G. Bloch, G. Cazzamali, M. Cohen, M.D. Drapeau, D. Eisenhardt, C. Emore, M.A. Ewing, S.E. Fahrbach, S. Foret, C.J.P. Grimmelikhuijzen, F. Hauser, A.B. Hummon, J. Huybrechts, A.K. Jones, T. Kadowaki, N. Kaplan, R. Kucharski, G. Lebouille, M. Linial, J.T. Littleton, A.R. Mercer, T.A. Richmond, S.L. Rodriguez-Zas, E.B. Rubin, D.B. Sattelle, D. Schlipalius, L. Schoofs, Y. Shemesh, J.V. Sweedler, R. Velarde, P. Verleyen, E. Vierstraete, M.R. Williamson, S.A. Ament, S.J. Brown, M. Corona, P.K. Dearden, W.A. Dunn, M.M. Elekonich, T. Fujiyuki, I. Gattermeier, T. Gempe, M. Hasselmann, E. Kage, A. Kamikouchi, T. Kubo, T. Kunieda, M.D. Lorenzen, N.V. Milshina, M. Morioka, K. Ohashi, R. Overbeek, C.A. Ross, M. Schioett, T. Shippy, H. Takeuchi, A.L. Toth, J.H. Willis, M.J. Wilson, K.H.J. Gordon, I. Letunic, K. Hackett, J. Peterson, A. Felsenfeld, *et al.* 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931-949.

COSMÉTICA COM PRODUTOS DA COLMEIA

COSMÉTICA DO MEL



Embalagem de 1 kg
Embalagem de 25 g

- A qualidade dos nossos produtos comprova a nossa marca
- Produzimos cosméticos onde a base são produtos naturais procedentes da colmeia
- O nosso departamento de serigrafia coloca o nome que escolher entre uma ampla gama de produtos

C/ Parma 6, Pol. Industrial "El Henares"
19004 Guadalajara, España.

Tlf: 0034+ 949 214343 • Fax: 0034+949 222254

mieleria@mieleria.com
www.mieleria.com

