

Padrões de Diversidade Mitocondrial da Abelha Melífera em Portugal Continental



Maria Alice Pinto*, Dora Henriques, Margarida Neto e Helena Guedes

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança (IPB)

Campus de Santa Apolónia, 5301-855 Bragança

*Coordenadora Científica do Projeto. Email: apinto@ipb.pt



Introdução

A distribuição natural da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) abrange a África, a Europa e o Médio Oriente (Figura 1). Esta ampla área geográfica é ocupada por 30 subespécies (raças geográficas) de abelhas (Ruttner 1988; Engel 1999; Sheppard e Meixner 2003; Meixner et al. 2011) que têm sido agrupadas em quatro linhagens (Ruttner 1988), nomeadamente: a linhagem do Médio Oriente (O), a linhagem Africana (A), a linhagem da Europa oriental (C) e a linhagem da Europa ocidental (M). A Europa alberga uma importante componente dessa diversidade representada pela ocorrência de duas das quatro linhagens (C e M). A linhagem C agrupa cerca de uma dezena de subespécies, entre as quais se encontram as duas mais utilizadas pela apicultura à escala mundial: a italiana (*A. m. ligustica*) e a carniola (*A. m. carnica*). A linhagem M apesar de ocupar uma extensa área que vai desde o Sul da Península Ibérica até ao Sul da Escandinávia e desde o Reino Unido até à Rússia, agrupa apenas duas subespécies: a abelha negra (*A. m. mellifera*), a norte dos Pirenéus, e a abelha ibérica (*A. m. iberiensis*), na Península Ibérica.

Apesar da sua reduzida área de distribuição geográfica, estudos implementados com marcadores que traçam o ADN mitocondrial revelaram que a abelha ibérica é uma das subespécies com maior complexidade e diversidade genética (Franck et al. 1998; Miguel et al. 2007; Cánovas et al. 2008; Pinto et al. 2012). Em contraste com o ADN nuclear, o qual é transmitido à descendência pelo progenitor feminino e masculino, o ADN mitocondrial é apenas transmitido pela rainha. Isto significa que numa colónia tanto as obreiras como os zângãos vão ter o mesmo tipo de ADN mitocondrial que é igual ao da rainha. Dada a herança estritamente materna, os estudos com marcadores mitocondriais apenas contam a história materna da abelha. A maior simplicidade de interpretação do padrão materno explica em grande medida a preferência por marcadores mitocondriais a qual se reflete nos numerosos estudos da diversidade



Figura 1 – Distribuição geográfica de algumas subespécies de abelha melífera.

genética materna da abelha ibérica (Smith et al. 1991; Garnery et al. 1995; Franck et al. 1998; Miguel et al. 2007; Cánovas et al. 2008). Estes estudos revelaram que a abelha ibérica exhibe um padrão muito complexo e único que se deve à coexistência de duas linhagens na Península Ibérica: a Africana (A), que é predominante no sul, e a da Europa ocidental (M), que é predominante no norte. Acresce a esta complexidade o facto de existir maior variedade de tipos de ADN mitocondrial das linhagens M e A na Península Ibérica do que em todo o norte da Europa e África.

Abelha Melífera em Portugal Continental

Grande parte dos estudos genéticos tem sido conduzidos nas populações de abelha ibérica que habitam o lado Espanhol da Península Ibérica. Porém, apesar de Portugal representar uma pequena parcela da área total de distribuição da abelha ibérica, as particularidades tanto ambientais como da própria atividade apícola deste canto da Península justificam a caracterização das populações Atlânticas. É neste contexto que surgem os estudos genéticos que temos levado a cabo nos últimos três anos. Neste artigo revelamos os resultados obtidos com a identificação do ADN mitocondrial de 786 colónias amostradas de norte a sul de Portugal continental.

Método de identificação do ADN mitocondrial

A análise molecular consistiu na extração do ADN a partir de uma das patas da abelha. Seguidamente procedeu-se à amplificação (síntese de milhões de cópias a partir de uma) de um fragmento do ADN mitocondrial (Figura 2) usando a técnica molecular reação de polimerase em cadeia (PCR). Depois de amplificado, o ADN foi cortado com a enzima de restrição *DraI* (as enzimas de restrição são conhecidas como as tesouras moleculares pois cortam o ADN em sítios específicos). A fim de se identificar o tipo de ADN de cada colónia este foi colocado em um gel de agarose. O gel foi submetido a um campo elétrico o qual permitiu a separação dos fragmentos de ADN de acordo com o tamanho (eletroforese). Terminada a eletroforese o ADN foi visualizado à luz ultravioleta e identificado.

A identificação do tipo de ADN foi feita de acordo com o padrão de bandas que apareciam no gel (Figura 2). Por exemplo, enquanto o tipo A8 tem duas bandas e o A2 tem três bandas e o A14 tem quatro.

O gel representado na Figura 2 mostra seis tipos diferentes de padrões de bandas correspondendo a seis tipos de ADN mitocondrial, todos eles pertencentes à linhagem Africana (daí a utilização da letra A na designação). O gel representado na Figura 2 permitiu identificar o tipo de ADN de 18 colónias. Dezenas de géis foram analisados para identificar as 786 colónias.

Padrão de diversidade do ADN mitocondrial em Portugal

A grande maioria (772; 98,2%) das colónias analisadas possuía um ADN mitocondrial do tipo Africano (Figura 3). Das restantes colónias, 10 (1,2%) pertenciam à linhagem M e quatro à linhagem C (0,5%). No total, foram identificados 32 tipos de ADN mitocondrial: 28 da linhagem A, três da linhagem M e um da linhagem C (Figura 4). O tipo de ADN mais comum foi o A1 (20% das colónias) seguido do A16 (15,5%) e do A2 (14,8%).

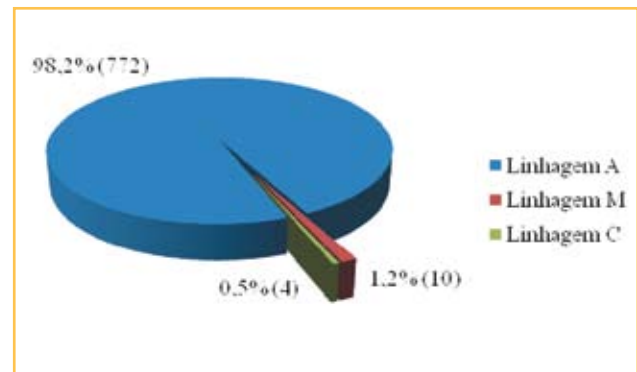


Figura 3 – Distribuição percentual das linhagens de abelhas em Portugal continental.

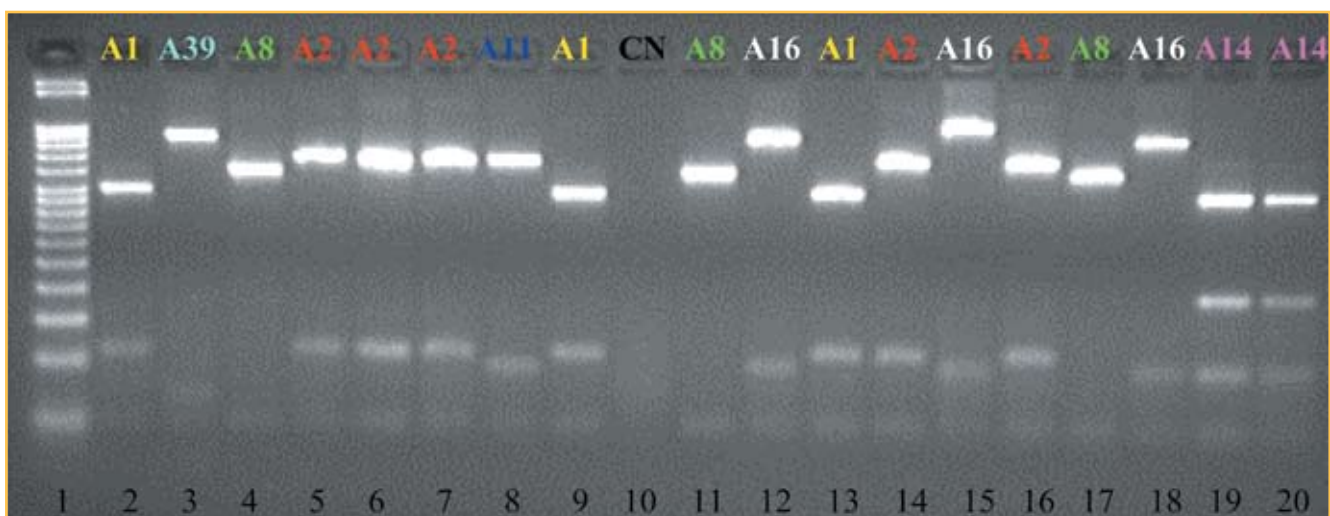


Figura 2 – Gel de agarose mostrando o padrão de bandas exibido por 18 colónias. Coluna 1: marcador de referência; colunas 2 a 9: ADN das colónias (coluna 2 mostra colónia com ADN tipo A1); coluna 10: controlo negativo; colunas 11 a 20: ADN das colónias (coluna 20 mostra colónia com ADN tipo A14).

Abelha Melífera em Portugal Continental

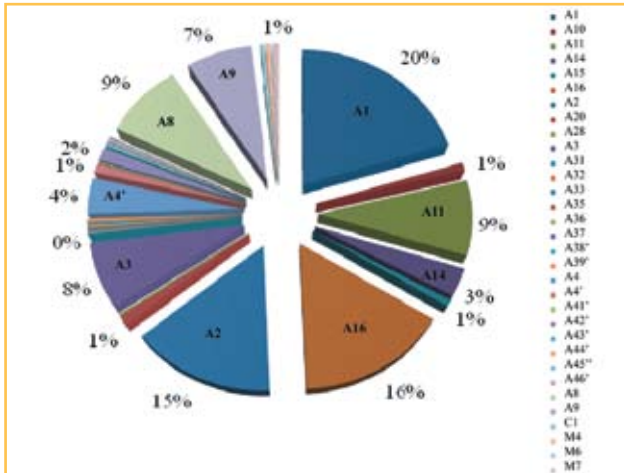


Figura 4 – Distribuição percentual dos 32 tipos de ADN mitocondrial detetados em Portugal continental.

A distribuição geográfica dos tipos de ADN (Figura 5) mostra que a composição das populações do sul de Portugal é muito diferente do norte. Enquanto o tipo A1 (representado a azul mais escuro) é o mais comum no sul, nas populações mais a norte (Trás-os-Montes e Minho) é o A16 (representado a castanho) que predomina. É de salientar que esta composição é bastante distinta daquela que tem sido documentada para as populações Africanas de Espanha. Neste País, o tipo A2 é de longe o mais difundido e o A16 é muito raro (Franck et al. 1998; Miguel et al. 2007; Cánovas et al. 2008).

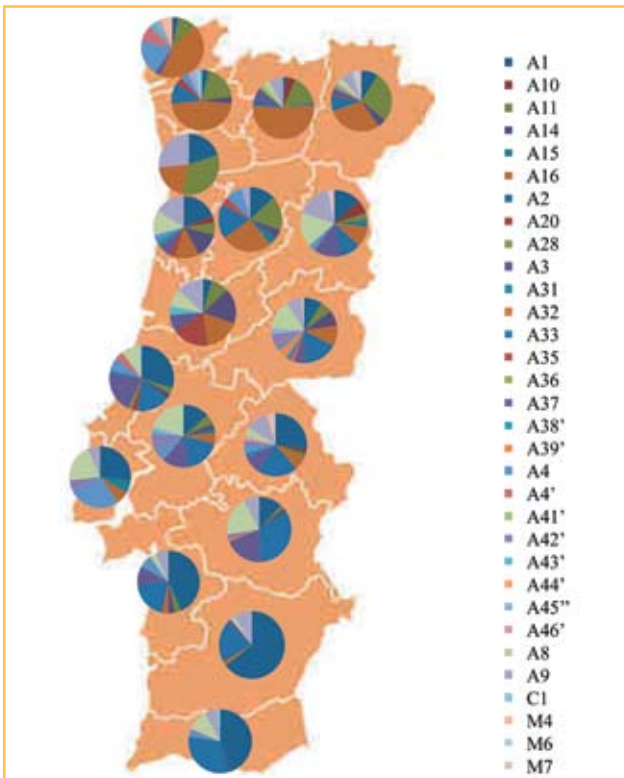


Figura 5 – Distribuição espacial dos 32 tipos de ADN mitocondrial em Portugal continental.

Na Figura 6 está representada a distribuição geográfica da diversidade genética. Os valores de diversidade (intervalo de variação entre 0 e 1) são em geral elevados e semelhantes aos que têm sido reportados para Espanha (Cánovas et al. 2008). É de realçar, porém, uma tendência de maior diversidade materna no norte do que no sul de Portugal.

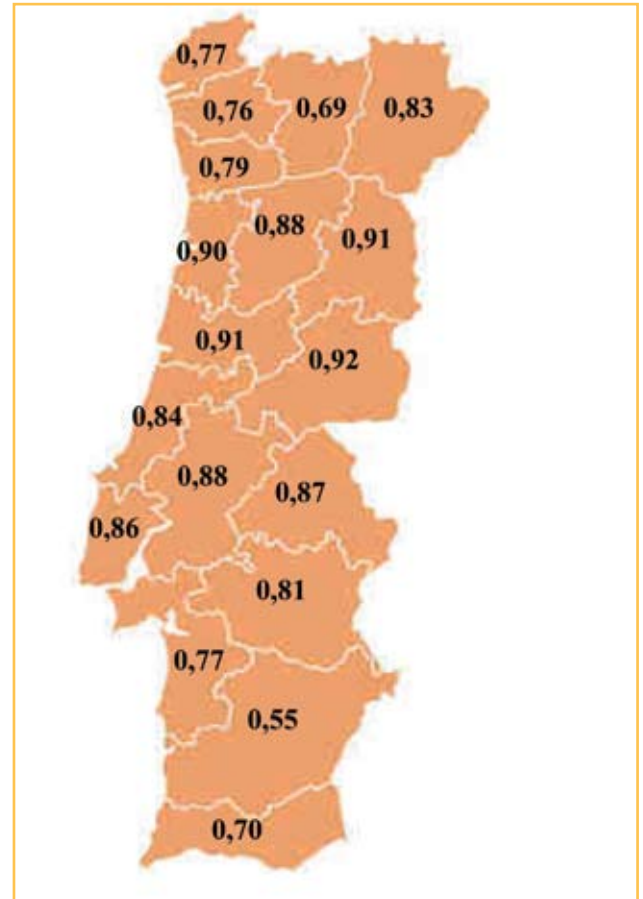


Figura 6 – Distribuição espacial da diversidade materna em Portugal continental.

Com base na arquitetura genética do fragmento de ADN mitocondrial a linhagem Africana divide-se em três sub-linhagens: A_I, A_{II} e A_{III} (Franck et al. 1998). O Quadro I inclui os tipos de ADN mitocondrial encontrados em Portugal continental e respetiva atribuição de sub-linhagem. A classificação dos tipos de ADN mitocondrial por sub-linhagem revelou que a sub-linhagem A_I é a mais frequente em Portugal continental (Figura 7). Porém, quando se representa espacialmente a distribuição das sub-linhagens (Figura 8) verifica-se que a A_I predomina no sul de Portugal mas no norte é substituída pela A_{III}. Este padrão, que é único à escala da Península Ibérica, é surpreendente pois apesar da reduzida dimensão do país e do movimento de colónias, devido por exemplo à compra de rainhas, verifica-se que as populações de abelhas em Portugal se encontram fortemente estruturadas.

Abelha Melífera em Portugal Continental

Para além do norte de Portugal continental, a sub-linhagem A_{III} , também conhecida como sub-linhagem Atlântica, é dominante nas ilhas dos Açores, Madeira e Canárias (De la Rúa et al. 1998, 2006). Na restante área de distribuição da linhagem Africana (Espanha e África) a sub-linhagem A_{III} é praticamente inexistente (Franck et al. 2001; Miguel et al. 2007; Cánovas et al. 2008).

Quadro I – Tipos de ADN mitocondrial encontrados em Portugal e sub-linhagem correspondente.

Sub-linhagem	Sub-linhagem	Sub-linhagem
A_I	A_{II}	A_{III}
A1	A8	A11
A2	A9	A14
A3	A10	A15
A4		A16
A4'		A20
A28		A31
A46'		A32
		A33
		A35
		A36
		A37
		A38'
		A39'
		A41'
		A42'
		A43'
		A44'
		A45''

Sumarizando, neste estudo destacam-se os seguintes aspetos:


1. As populações de abelhas de Portugal continental possuem uma elevada diversidade mitocondrial fundamentalmente de origem Africana;

2. Em contraste com as populações de abelha ibérica do norte de Espanha, em Portugal as abelhas com ADN mitocondrial do tipo Europeu (linhagem M) são raras;

3. Em consonância com os resultados documentados para Espanha e em contraste com os dos países do norte da Europa, a poluição genética derivada de abelhas da linhagem C (italiana ou carniola) é negligenciável em Portugal;

4. As populações de abelhas em Portugal continental formam um gradiente norte-sul com predominância de abelhas A_{III} no norte e A_I no sul. Este padrão é único em toda a Península Ibérica revelando a singularidade das populações de abelha do canto Atlântico.

O presente estudo sugere que as populações de abelhas de Portugal representam um importante componente da diversidade da subespécie *A. m. iberiensis*. Apesar desta diversidade materna ser fundamentalmente de origem Africana, a abelha ibérica tem características próprias (reveladas pela morfologia e marcadores do ADN nuclear) que a distinguem profundamente das subespécies Africanas, tanto do norte de África (por exemplo da *A. m. intermissa*) como da África subsahariana (por exemplo da *A. m. scutellata*, a subespécie que deu origem à abelha Africanizada que hoje coloniza uma boa parte da América do Sul e da América do Norte). Esta diversidade única representa um importante legado, que tem sido moldado pela natureza, e também pelos humanos, nos últimos milhares de anos, o qual merece e deve ser preservado pois constitui um recurso fundamental à sustentabilidade da atividade apícola.



Principal empresa exportadora de mel Português

SE É APICULTOR CONTACTE-NOS.
VALORIZAMOS A QUALIDADE DO SEU MEL!

Zona Industrial da Feiteirinha Lt 27 8670-440 Aljezur info@apisland.pt +351 961 968 344

Abelha Melífera em Portugal Continental

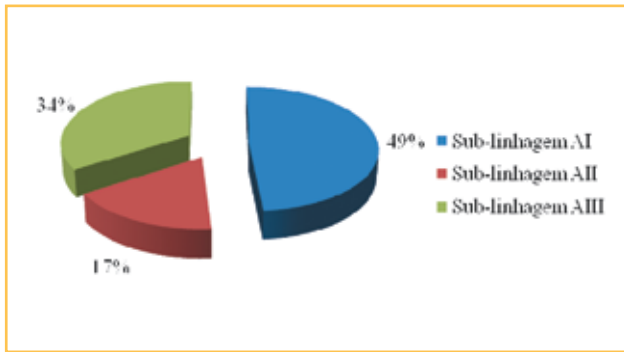


Figura 7 – Distribuição percentual das três sub-linhagens Africanas em Portugal continental.

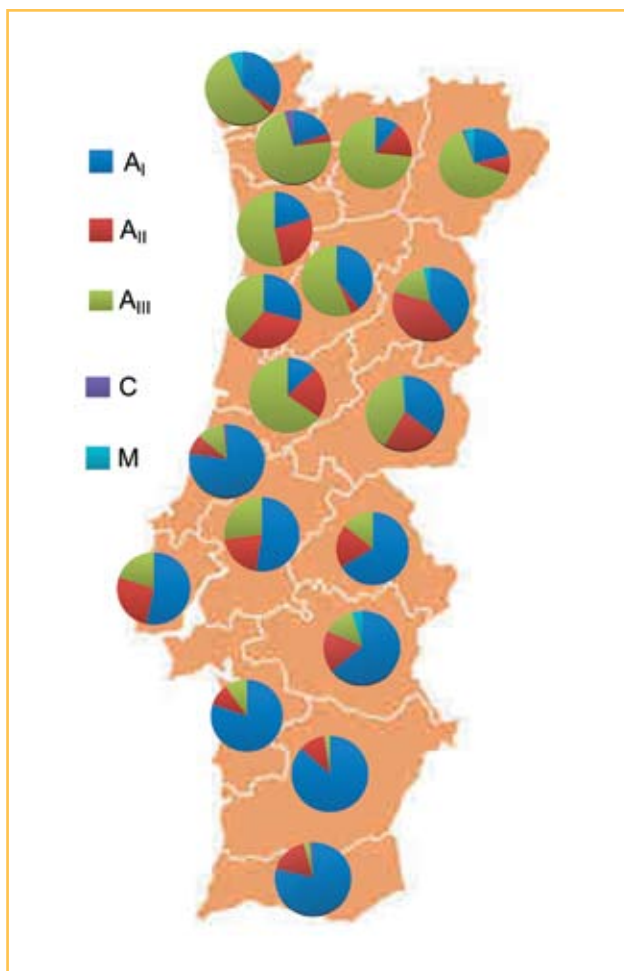


Figura 8 – Padrão de diversidade materna em Portugal continental.

NOTA DE RODAPÉ

As pessoas que estiverem interessadas em conhecer o tipo de ADN mitocondrial das suas amostras (analisadas neste estudo) devem enviar *email* a Maria Alice Pinto (apinto@ipb.pt) a solicitar essa informação.



Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de inúmeras pessoas, a quem se agradece profundamente.

Indica-se (por ordem alfabética do primeiro nome) a extensa lista de pessoas que contribuíram com amostras: Amílcar Fernandes, Anabela Mendes (Associação de Apicultores da Região de Leiria), Ana Belo (Laboratório de Alcains, DRAPC), Ana Paula (Direção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo), Bruno Martins (Associação Apicultores da Região de Leiria), Dulce Alves (Apilegre), Francisco Campos, Joana Godinho (Instituto Nacional de Recursos Biológicos), José Pires (Instituto Politécnico de Viana do Castelo), José Figueira (Montimel), Jorge Guerra (Divisão de Intervenção Veterinária de Viseu), Magda Tavares (Capolib), Manuel Jardim (Associação de Apicultores de Terras de Antuã), Manuel Merca, Maria José Valério (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária), Mário Armada Nunes (Divisão de Intervenção Veterinária de Braga), Marta Rebelo (Associação de Apicultores do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina), Miguel Maia (Sicolmeia), Mónica Lopes (Associação de Produtores Florestais de Montemuro e Paiva), Nair Rodrigues (Direção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo), Nuno Salvador (Núcleo de Intervenção Veterinária de Penafiel), Osvaldo Silva (Apiguadiana), Paula Sançana (Lousãmel), Paulo Varela (MontermorMel), Ricardo Pereira, Rosário Silva (Melgarbe), Rui Poitier (Direção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo), Sância Pires (Laboratório de Patologia Apícola da ESAB-AAPNM), Sandra Dinis (Ribaflo-Associação Florestal das Terras de Ribadouro), Telma Marreiros (Direção de Serviços de Veterinária da Região do Algarve), Teresa Rodrigues (Montimel) e Tomé Genebra (Direção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo).

Àqueles que por lapso não constam desta lista, as nossas maiores desculpas e sincero agradecimento pela colaboração.

Agradece-se a Andreia Brandão, Inês Moura e Larissa Souza pela ajuda no laboratório e a Júlio Chavez-Galarza pelo mapa da Figura 1.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER, através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE, e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projeto PTDC/BIA-BEC/099640/2008, e pelo Programa Apícola Nacional 2010 (Medida 6A).

Abelha Melífera em Portugal Continental



Referências Bibliográficas

Cánovas F., De la Rúa P., Serrano J., Galián J. (2008) Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae), *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 46, 24-30.

De la Rúa P., Serrano J., Galián J. (1998) Mitochondrial DNA variability in the Canary islands honeybees (*Apis mellifera* L.), *Mol. Ecol.* 7, 1543-1547.

De la Rúa P., Galián J., Pedersen B. V., Serrano J. (2006) Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores, *Apidologie* 37, 699-708.

Engel M. S. (1999) The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae, Apis), *J. Hym. Res.* 8:165-196.

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

Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B. P., Hepburn H. R., Solignac M., Cornuet J. M. (2001) Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity* 86, 420-430.

Garnery L., Mosshine E. H., Oldroyd B., P., Cornuet J. M. (1995) Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations, *Mol. Ecol.* 4, 465-471.

Meixner M., Leta A. L., 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., Iriondo M., Garnery L., Sheppard W. S., Estonba A. (2007) Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial recolonization routes in the western Europe, *Apidologie* 38, 141-155.

Pinto M. A., Munoz I., Chavez-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. Berlin, Springer.

Sheppard W., Meixner M. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honeybee subspecies from Central Asia, *Apidologie* 34: 367-375.

Smith D. R., Palopoli M. F., Taylor B. R., Garnery L., Cornuet J. M., Solignac M., Brown W. M. (1991) Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*), *J. Hered.* 82: 96-100.



Amilcar & Morgado, Lda.

Tratamento e Comercialização de Mel e Produtos Apícolas

Grande Variedade
de Embalagens de Vidro, Cápsulas
e Embalagens de Cartão.

Produção, Compra e Venda:

Mel, Pólen, Geleia Real,

Colmeias Povoadas,

Material Apícola e

Embalagens de Vidro p/ Mel

Rua Nova do Pinheiral, nº 3-5

6355-060 FREINEDA

(Vilar Formoso) PORTUGAL

e_mail: amilcarmorgado@sapo.pt

<http://www.amilcarmorgado.com>

Tels. 271 513 675 / 271 513 718

Fax 271 513 700