

# COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTROGRESSÃO DA LINHAGEM C NA ABELHA NEGRA (*Apis mellifera mellifera*) ESTIMADOS USANDO MICROSSATÉLITES E SNPS SELECIONADOS PELO CRITÉRIO DE PROXIMIDADE

Helena Ferreira<sup>1</sup>, Dora Henriques<sup>2</sup>, Laura Jara<sup>3</sup>, Julio Chávez-Galarza<sup>2</sup>, Pilar de la Rúa<sup>3</sup>, Maria Alice Pinto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal. [helenamf@live.com.pt](mailto:helenamf@live.com.pt)

<sup>2</sup> Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, Bragança 3201-855, Portugal

<sup>3</sup> Área de Biología Animal, Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia 30010, España.

## Introdução

A distribuição natural da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) abrange a África, a Europa e o Médio Oriente. Na Europa estão presentes duas 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 agrupa duas subespécies: a abelha negra (*A. m. mellifera*), a norte dos Pirenéus, e a abelha ibérica (*A. m. iberiensis*), na Península Ibérica. Durante as últimas décadas a actividade apícola tem moldado o padrão de diversidade de *A. m. mellifera* através da introdução de *A. m. ligustica* e *A. m. carnica* na Europa ocidental, o qual em algumas regiões tem levado praticamente à extinção da subespécie nativa.

Para evitar o desaparecimento de *A. m. mellifera*, diversos programas de conservação têm sido implementados no norte da Europa, sendo que o cálculo da taxa de introgressão usando marcadores moleculares é crucial na monitorização das populações protegidas. A maioria dos estudos têm utilizado microssatélites e mtDNA. No entanto, os SNPs apresentam vantagens em relação aos microssatélites, tais como: uma boa cobertura do genoma, dados de maior qualidade, e facilidade de automatização usando tecnologias de alta capacidade. Diversos estudos mostram que os microssatélites têm maior poder discriminatório, sendo necessários 100 SNPs para se ter a mesma informação de 10-20 microssatélites. O objectivo do presente trabalho é comparar as taxas de introgressão estimadas usando os 12 microssatélites e três conjuntos de SNPs.

## Amostras

Um total de 77 indivíduos de *A. m. mellifera* foram amostrados na França (18), Dinamarca (10), Holanda (15), Suíça (6), Escócia (10), Noruega (10) e Inglaterra (8). A colecção de referência da linhagem C era constituída por 19 indivíduos de *A. m. carnica* amostrados na Croácia e Sérvia e 17 de *A. m. ligustica* amostrados na Itália.

## Genotipagem

Os SNPS foram genotipados usando o GoldenGate® Assay e o software Genome Studio da Illumina.

Os 12 microssatélites (A8, A7, Ap43, A113, Ap55, B124, A79, A88, Ac011, Ap 224, Ap249, Ap274) foram obtidos através de duas reacções multiplex PCR. Os produtos de PCR foram visualizados usando BI-3730. Os alelos foram identificados usando o GeneMapper v3.7.

## Conjunto de Dados

De um total de 1536 SNPs, 353 eram monomórficos (2% *cut-off*). Assim, foram utilizados 1183 SNPs nas análises.

As posições genómicas de todos os loci foram obtidas usando o BLAST, tendo como base o genoma da abelha *Assembly 4.5*. Os níveis de introgressão foram primeiramente estimados usando todos os SNPs e os 12 microssatélites.

Posteriormente, para o poder discriminatório entre os SNPs e os microssatélites ser aproximadamente o mesmo usaram-se dois conjuntos de SNPs, um contendo 60 e outro 120 loci, tendo sido usados os SNPs localizados na proximidade dos microssatélites.

## Análise da Introgressão

Os níveis de introgressão por indivíduo foram inferidos usando o STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) com as seguintes configurações:

- Modelo *Admixture*
- Frequência alélica correlacionada
- 250 000 *burn-in* steps
- Iterações 750 000 MCMC
- 20 corridas
- K=2 clusters

O CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson e Rosenberg 2007) foi usado para alinhar e calcular o "coeficiente de similaridade simétrica" das 20 corridas. Os resultados obtidos no CLUMPP foram usados na construção dos gráficos usando o DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004).

## Resultados e Discussão

Na Fig. 1 é possível observar que os níveis de introgressão são bastante variáveis de indivíduo para indivíduo e de população para população. As populações que apresentam indivíduos com maior proporção da linhagem C (amarelo) são França e Inglaterra (Fig. 1).

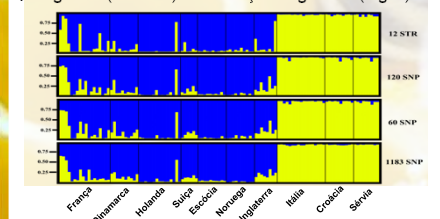


Fig. 1 Estimativa da introgressão (Q) da linhagem-C para os 77 indivíduos amostrados na Europa ocidental usando conjuntos de dados de 12 microssatélites, 120 SNPs, 60 SNPs e 1183 SNPs

A distância média dos 10 SNPs mais próximos aos microssatélites é de 10.14 cM e dos 5 SNPs mais próximos é de 5.57 cM. Os microssatélites que contêm os SNPs mais próximos são A8 (4.54 cM:10 SNPs) e Ac011 (2.62 cM:5 SNPs), já o que apresenta os SNPs mais distantes é o A79 (24.12 cM:10 SNPs). Apenas 4 SNPs estão a menos de 1 cM dos microssatélites, o que mostra que em geral os SNPs não representam as mesmas zonas genómicas dos microssatélites (Fig. 2).

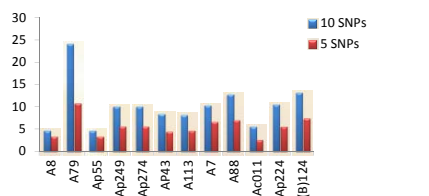


Fig. 2 Distância média dos 10 SNPs (azul) e 5 SNPs (vermelho) em relação aos 12 microssatélites utilizados

Tendo o conjunto de 12 microssatélites como referência verificou-se que existem mais de 42 indivíduos para cada conjunto de dados com desvios inferiores a 0.05. No entanto, há alguns indivíduos que têm desvios superiores a 0.20 (Tabela 1). O desvio máximo foi encontrado para um indivíduo de Inglaterra com um valor superior a 0.57 para todos os conjuntos de dados (Tabela 1).

Tabela 1 Indivíduos com desvios superiores a 0.20.

ind	1183 SNP	120 SNP	60 SNP
Inglaterra 1	0.2167	0.2107	0.2096
Inglaterra 2	0.2116		
Inglaterra 3		0.2814	0.2372
Inglaterra 6	0.2592	0.4162	0.3922
Inglaterra 8	0.5702	0.5722	0.5852
França 2	0.2744		
França 3	0.3062		
França 8	0.4113	0.3193	0.2945
França 10	0.3034	0.3504	0.3684
França 15	0.4337	0.2932	0.224
Holanda 14	0.2027		
Suíça 2		0.2155	

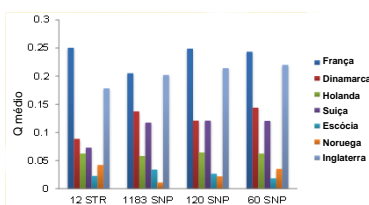


Fig. 3. Média Q para as 7 populações de *A. m. mellifera* usando diferentes conjuntos de dados

Ao analisar a média Q para 7 populações de *A. m. mellifera* para os diferentes conjuntos de dados, verifica-se que as maiores diferenças são entre o conjunto de dados 12 microssatélites e 1183 SNP. As populações que apresentam maiores diferenças são França, Dinamarca e Suíça.

Enquanto o conjunto de 12 microssatélites apresenta maiores valores de Q médios para França, o conjunto de 1183 SNPs apresenta maiores valores para a população da Dinamarca e Suíça (Fig. 3).

## Conclusão

As estimativas de introgressão obtidas com microssatélites diferem das obtidas usando os SNPs, o que se pode dever ao facto de em geral os SNPs não se encontrarem na mesma zona genómica dos microssatélites.

Existem mais de 50% de indivíduos que têm um desvio inferior a 0.05. No entanto, mais de 10 indivíduos apresentam desvios superiores a 0.20 havendo um indivíduo de Inglaterra com um valor superior a 0.5.

Apesar das diferenças encontradas, os resultados obtidos com o conjunto de 12 microssatélites é mais similar aos obtidos com os conjuntos de 120 e 60 SNPs do que aos obtidos com 1183 SNPs.

### Referências

- Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801-1806.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 157:945-959.
- Rosenberg NA. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4:137-138.

### Agradecimentos

Andrew Abrahams, Bjørn Dahle, Gabriele Soland, Gilles Pier, Lionel Garmery, Raïssal Dall'olio, Romeu Van der Zee, Saïd Abdoullatif, Santiago Saenz, Wanda Louci e Per Kogger que forneceram as amostras. A extração de DNA e a genotipagem de SNPs foi realizada por Colette Abbey. Um agradecimento especial a Dr Claire Gill que facilitou a a genotipagem de SNPs e ajudou com a análise. Julio Chávez-Galarza e Dora Henriques são financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através das bolsas SFRH/BD/68682/2010 e SFRH / BD / 84195 / 2012, respectivamente. Esta investigação foi financiada por Fundação para a Ciência e Tecnologia and COMPETE/RENU através do projecto PTDC/BIABEC/099640/2008.



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia