

O APICULTOR[®]



REVISTA DE APICULTURA

ISSN - 0873-2981 • ANO 28 N.º 106 - Out./ Dez. 19 - €7,00 (iva incl.) Periodicidade Trimestral

- Impacte do EPIK na abelha do mel
- Genoma mitocondrial sobre a distribuição geográfica da diversidade genética da abelha ibérica
- Projeto BEEHAPPY
- Apicultores e agricultores juntos para a sustentabilidade da polinização
- Coexistências
- Consultório apícola

PORTUGUESE
BEEKEEPING
MAGAZINE

O que nos diz o genoma mitocondrial sobre a distribuição geográfica da diversidade genética da abelha ibérica?



Dora Henriques e M. Alice Pinto

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

Email: apinto@ipb.pt e dorasmh@gmail.com

O ADN mitocondrial (ADNmt) é o material genético de um organelo celular designado mitocôndria, o qual é muito importante para a produção de energia nas células. Tal como o ADN que se encontra no núcleo das células (ADN nuclear), o ADNmt é constituído pelos nucleótidos A, T, C e G. Nos animais, a mitocôndria é transmitida intacta pela mãe para os seus filhos e filhas, sendo, por isso, o ADNmt usado para compreender a história materna. Nas abelhas, esta herança uni-parental significa que todos os indivíduos de uma colónia partilham o mesmo ADNmt e que basta examinar um indivíduo (obreira, um zangão ou mesmo a rainha) para identificarmos o ADNmt de toda a colónia. O ADNmt de uma colónia que descende de uma rainha ibérica (*Apis mellifera iberiensis*) é muito diferente de uma colónia que descende (há uma, duas ou muitas gerações) de uma rainha italiana (*Apis mellifera ligustica*), por exemplo, e basta analisarmos um indivíduo da colónia para conhecermos sua origem.

Até há pouco tempo, devido a limitações tecnológicas, a identificação materna das abelhas baseava-se na análise da variação genética (originada

por mutações) de pequenos fragmentos do ADNmt. No entanto, com a recente revolução nas tecnologias de sequenciação (conhecida em Inglês por “Next Generation Sequencing” ou “High Throughput Sequencing”), são cada vez mais comuns, e mais baratos, os estudos que examinam o genoma mitocondrial completo (=mitogenoma), permitindo um grau de resolução jamais conseguido com a sequenciação clássica (designada por método de Sanger) de pequenos fragmentos do ADNmt.

O mitogenoma da abelha melífera, publicado pela primeira vez em 1993 (Crozier & Crozier 1993), contém 16 343 pares de nucleótidos que correspondem a 37 regiões distintas designadas por genes, das quais 13 codificam proteínas (Figura 1). Para além dos genes, o mitogenoma contém várias regiões intergénicas não codificantes, uma das quais tem sido utilizada em todo o mundo, incluindo na Península Ibérica (Chávez-Galarza *et al.* 2017), na identificação e estudo da diversidade genética da abelha melífera. Esta região situa-se entre os genes que codificam para o ARN de transferência da leucina (tRNA^{leu}) e o citocromo oxidase 2 (COX2).

A região intergénica tRNA^{leu}-COX2 é uma região não codificante muito variável (porque sofreu muitas mutações ao longo do tempo) que permite distinguir as diferentes linhagens de abelhas. Neste momento encontram-se descritas 31 subespécies de abelha melífera, as quais estão agrupadas em quatro linhagens principais: A-Africana, M- Europeia Ocidental, C-Europeia Oriental e O-Médio Oriente. A variação da região tRNA^{leu}-COX2 permite não só distinguir as diferentes linhagens como também as diferentes sublinhagens Africanas A_I, A_{II}, A_{III} e Z (Alburaki *et al.* 2011; Franck *et al.* 2001). Porém, apesar de ser muito variável, esta região não permite distinguir as 31 subespécies de abelhas.

Os numerosos estudos genéticos da região intergénica tRNA^{leu}-COX2 que têm sido conduzidos na Península Ibérica (Cánovas *et al.* 2008; Franck *et al.* 1998; Miguel *et al.* 2007; Pinto *et al.* 2013; Pinto *et al.* 2012, Chávez-Galarza *et al.* 2017) mostram a coexistência de duas linhagens mitocondriais: na metade nordeste predomina a linhagem M (Europeia) e na metade sudoeste predomina a linhagem A (Africana; Figura 2). Enquanto os estudos anteriores

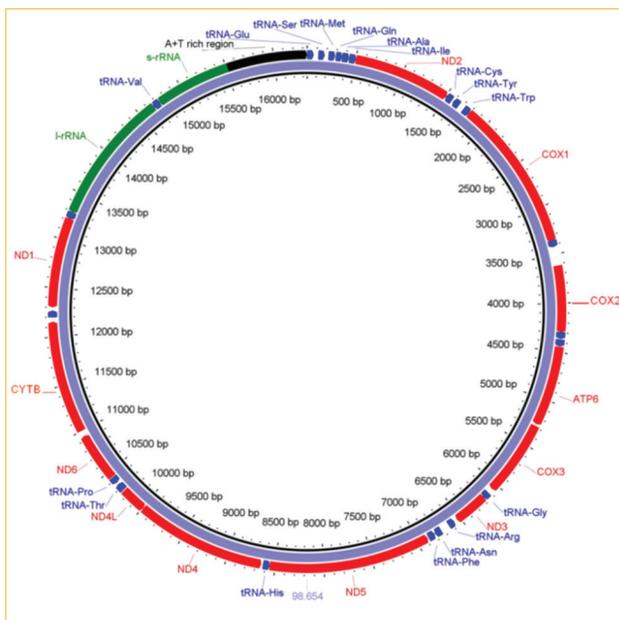


Figura 1 - Representação esquemática do mitogenoma da abelha melífera.

O que nos diz o genoma mitocondrial

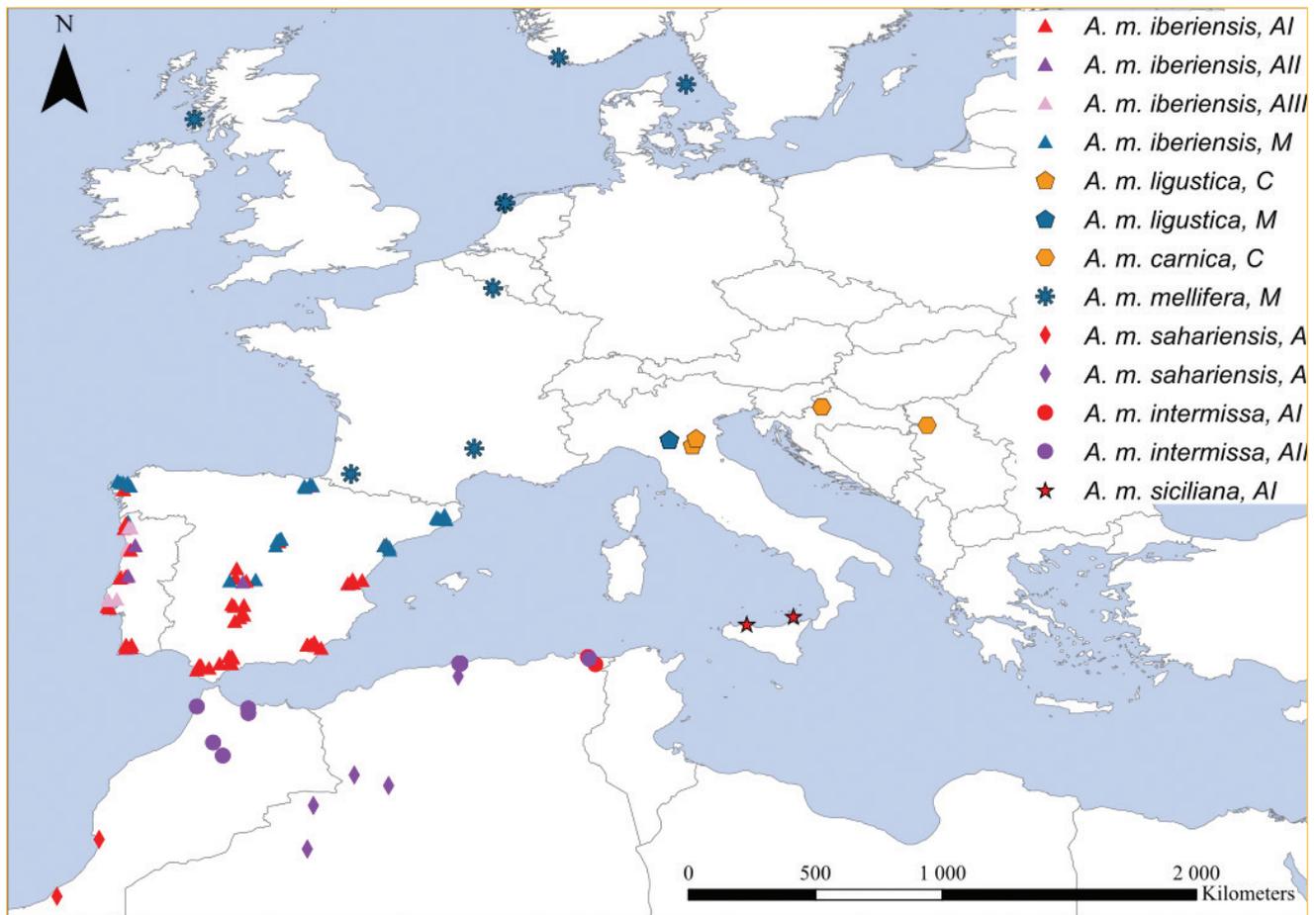


Figura 2 - Localização geográfica das 7 subespécies amostradas neste estudo. Cada símbolo representa uma subespécie e cada cor uma linhagem (A, M, C) ou sublinhagem Africana (AI, AII, AIII), identificada usando a região tRNA^{leu}-COX2.

se basearam na análise da região tRNA^{leu}-COX2, neste artigo apresentam-se sumariamente os resultados da sequenciação do mitogenoma da abelha ibérica. Este estudo foi publicado recentemente na revista científica internacional *Apidologie* (Henriques *et al.* 2019) e constitui a mais completa descrição da variação genética à escala do mitogenoma jamais realizada para uma subespécie de abelha melífera.

Neste artigo compara-se o padrão de diversidade genética da abelha ibérica inferido com o mitogenoma e a região tRNA^{leu}-COX2 (Chávez-Galarza *et al.* 2017). Para tal, sequenciou-se o mitogenoma de 87 indivíduos da abelha ibérica e 36 indivíduos representando 6 subespécies pertencentes às linhagens A, M e C (Figura 2), os quais nos permitem perceber como é que a abelha ibérica se relaciona com outras subespécies. A análise das sequências do mitogenoma dos 123 indivíduos revelou a existência de 645 mutações distribuídas pelas diferentes regiões ou genes (Tabela 1). Os genes com maior número de mutações foram o COX1 (73) e o ND4 (67), sendo que estes também são os maiores genes do mitogenoma.

Os 123 indivíduos foram também identificados, tendo como base a região tRNA^{leu}-COX2, de acordo com a linhagem (A, M ou C) e os Africanos

de acordo com a sublinhagem (A_I, A_{II} e A_{III}). A distribuição geográfica dos 123 indivíduos por linhagem/sublinhagem mostra a predominância da linhagem A na metade sudoeste da Península Ibérica e da linhagem M na metade nordeste (Figura 2). Em relação à linhagem Africana, existe uma diferenciação determinada pela sublinhagem A_{II} entre a Península Ibérica, onde esta é rara (6%), e o Norte de África, onde esta é muito comum (79%). Para além da sublinhagem A_{II}, estão presentes na Península Ibérica as sublinhagens A_I, por toda a metade sudoeste (55%), e a A_{III}, confinada ao norte de Portugal (10%).

A análise do mitogenoma dos 123 indivíduos mostra a existência de 9 grupos genéticos que têm uma concordância geográfica (Figura 3) mas que não são indicativos da subespécie, o que significa que mesmo usando toda a informação contida no ADNmt não é possível distinguir as diferentes subespécies de abelha melífera só com a componente materna. O mitogenoma é concordante com a região tRNA^{leu}-COX2 em relação ao padrão de diversidade genética na Península Ibérica (a coexistência das linhagens M e A com orientação nordeste-sudoeste). No entanto, o mitogenoma mostra que apesar de serem subespécies diferentes, os indivíduos do Norte de África (*Apis*

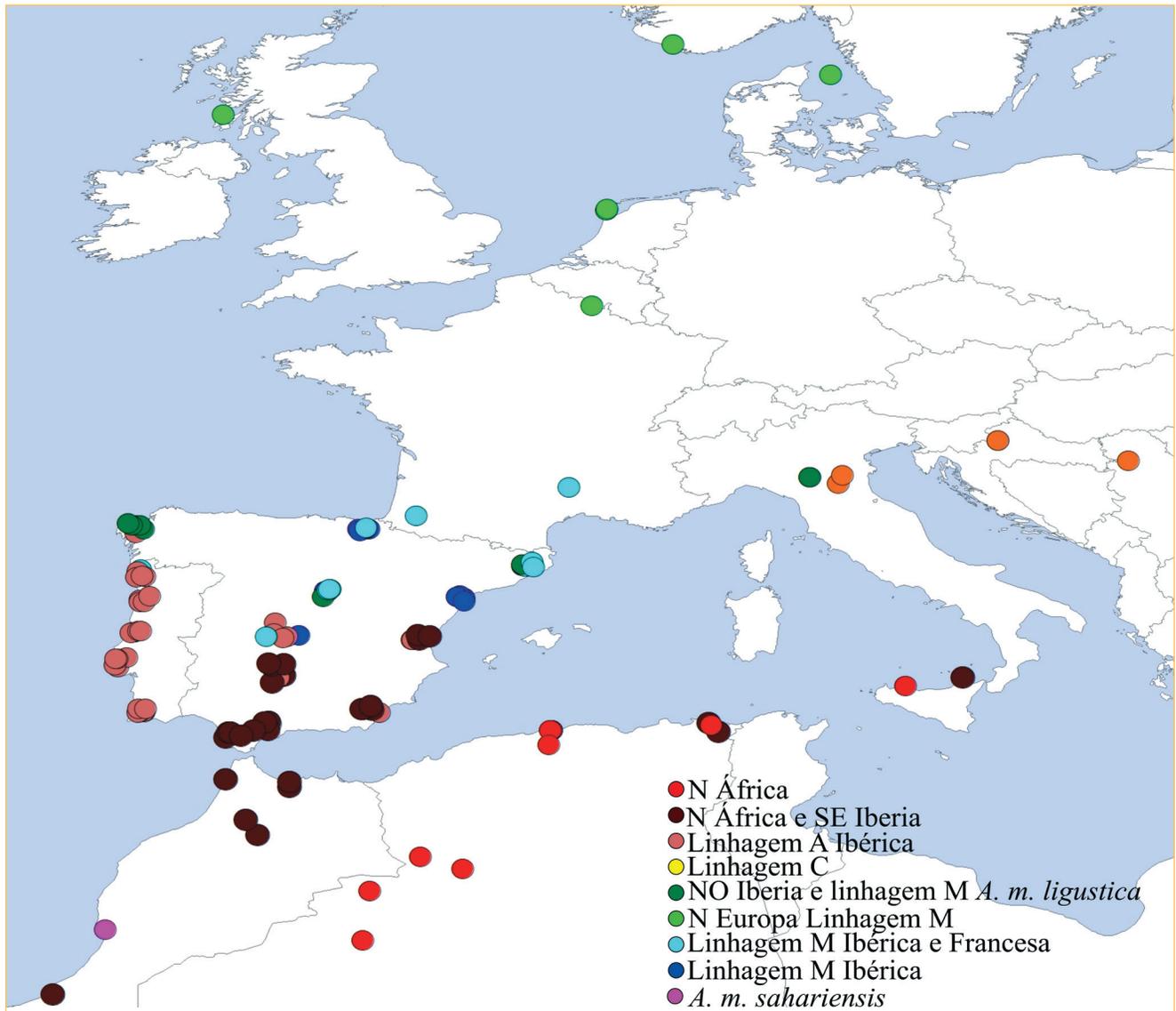


Figura 3 - Localização geográfica dos 9 grupos genéticos inferidos pelo mitogenoma.

mellifera intermissa) perto do estreito de Gibraltar e do Sul de Espanha (*A. m. iberiensis*) estão no mesmo grupo genético (assinalados a castanho na Figura 3) e o mesmo acontece com os indivíduos do Norte de Espanha (*A. m. iberiensis*) e do Sul de França (*Apis mellifera mellifera*; assinalados a azul-turquesa na Figura 3), sugerindo que existe uma história comum recente entre estas subespécies.

Este estudo mostra que (i) nem a região tRNA^{leu}-COX2 nem o mitogenoma permitem identificar as colónias ao nível da subespécie, mas tão só ao nível da linhagem, e que (ii) os padrões geográficos de diversidade inferidos pela região tRNA^{leu}-COX2 não correspondem exatamente aos inferidos pelo mitogenoma. Assim, é necessário ter em conta que as inferências sobre a história evolutiva da abelha podem estar incompletas quando apenas se usam dados da região tRNA^{leu}-COX2. No entanto, é expectável que se continue a usar esta região, pois é mais barato sequenciá-la do que todo o mitogenoma.

Além disso, existem numerosos estudos com esta região do ADNmt em populações de abelhas de todo o mundo, o que permite uma fácil comparação de dados e compreensão de processos recentes à escala mundial (por exemplo origem geográfica das abelhas introduzidas nas Américas ou rotas comerciais de abelhas na Europa).

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de inúmeros apicultores, técnicos de associações e de investigadores de diferentes instituições nacionais e estrangeiras na amostragem dos 123 indivíduos. Os mitogenomas foram sequenciados na Universidade de Purdue, EUA. A análise dos dados foi efetuada usando o suporte computacional do Instituto Politécnico de Bragança facilitado por José Rufino Amaro. Dora Henriques é suportada pelo projeto BEEHAPPY que é financiado

O que nos diz o genoma mitocondrial

Gene	Tamanho	Mutações	%
ND2	1002	45	4,5
COX1	1566	73	4,7
COX2	678	26	3,8
ATP8	159	9	5,7
ATP6	681	31	4,6
COX3	780	28	3,6
ND3	354	20	5,6
ND5	1665	63	3,8
ND4	1344	67	5,0
ND4L	264	12	4,6
ND6	504	26	5,2
CYTB	1152	58	5,0
ND1	918	48	5,2
ls-rRNA	1371	33	2,4
s-rRNA	786	25	3.18

Tabela 1 - Informação sobre a variação encontrada ao longo do mitogenoma. O tamanho (em pares de nucleótidos) e o número de mutações são apresentados para cada gene com um tamanho >78.

por Fundos FEDER através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização - COMPETE 2020 e por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-029871.

Referências Bibliográficas

Alburaki, M., Moulin, S., Legout, H., Alburaki, A., Garnery, L. (2011). Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42(5), 628.

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.

Chávez-Galarza, J., Garnery, L., Henriques, D., Neves, C.J., Loucif-Ayad, W., Jonhston, J.S., Pinto, M.A. (2017) Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNA^{leu}-cox2 intergenic region *Apidologie*. 48, 533–544.

Crozier, R.H., Crozier, Y.C. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera* -Complete sequence and genome organization *Genetics*. 133, 97–117

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

Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., Cornuet, J.M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* *L Experientia* 49:1016–1021.

Henriques, D., Chávez-Galarza, J., Quaresma, A., Neves, C. J., Lopes, A. R., Costa, C., Costa, F., Rufino, J., Pinto, M. A. (2019). From the popular tRNA^{leu}-COX2 intergenic region to the mitogenome: insights from diverse honey bee populations of Europe and North Africa. *Apidologie*, 50(2), 215-229.

Meixner, M.D., Pinto, M.A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., Fuchs, S. (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* J. Apic. Res. 52: 4, 1–28.

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 re-colonization routes in the western Europe *Apidologie*. 38, 141–155.

Pinto, M. A., Henriques, D., Guedes, H., Munoz, I., Azevedo, J., De la Rúa, P. (2013) Maternal diversity patterns of Ibero-Atlantic populations reveal further complexity of Iberian honeybees *Apidologie*. 44, 430–439.

Pinto, M.A., 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.



www.apisland.pt

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