

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Discriminação morfométrica de 26 subespécies de *Apis mellifera* L. e abelhas
Africanizadas por técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e
sistema ABIS de identificação automática de espécies**

Marina Lopes Grassi

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Discriminação morfométrica de 26 subespécies de *Apis mellifera* L. e abelhas
Africanizadas por técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e
sistema ABIS de identificação automática de espécies**

Marina Lopes Grassi

Orientador: Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

**AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

GRASSI, MARINA LOPES

Discriminação morfométrica de 26 subespécies de *Apis mellifera* L. e abelhas Africanizadas por técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e sistema ABIS de identificação automática de espécies. Marina Lopes Grassi; Orientador: Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves – Ribeirão Preto, 2009.

121p.:40il.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP – Departamento de Biologia.

1. *Apis mellifera*. 2. Morfometria Tradicional. 3. Morfometria Geométrica. 4. J-ABIS. 5. Subespécies.

Dedico,

Aos meus amados pais **Marilena e Jonas**,
por serem os meus maiores MESTRES.
pela tão grande dedicação, contribuindo ativamente para que eu realize
todos os meus sonhos, e principalmente por todo o AMOR e carinho
insubstituível.

A minha amada irmã **Mariana (Mari)**,
por me incentivar, apoiar, aconselhar em tudo, e por todo sincero e
desinteressado amor despendido.

A minha **Vó** amada,
por estar sempre curiosa querendo escutar sobre as abelhinhas;
por toda a admiração e o tão grande e sincero amor;
pelas palavras de incentivo.

Ao meu AMOR e melhor AMIGO **Emílio (Mi)**,
por estar ao meu lado SEMPRE, mesmo que virtualmente;
por acreditar em mim até quando eu desacredito;
por compartilhar momentos bons e ruins, pensando sempre positivamente;
por ser o meu porto-seguro e companheiro em TUDO.
Tudo isso seria impossível sem o seu apoio e carinho !!!

**Obrigada por tudo !!!
Amo muito vocês!!!!**

Agradeço,

À **Deus** por me conceder vida, saúde e força para aproveitar as oportunidades colocadas em meu caminho, pela minha família e amigos que são os mais valiosos bens que possuo;

Ao **Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves** pela oportunidade de realizar um sonho, pela confiança, pela orientação, pelo exemplo de vida e por todos os ensinamentos, auxílio e disponibilidade. E principalmente pela estimada amizade durante esses anos. Serei sempre grata!!!

Ao querido AMIGO **Prof. Dr. Tiago Maurício Francoy**, por todos os ensinamentos, conselhos, correções, apoio, pelo tempo despendido e principalmente pela grande amizade. Muito Obrigada!!!

À **Profa. Dra. Zilá L.P. Simões** e ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo**, coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, pelos auxílios prestados sempre que necessário, pelos conselhos, conversas e pela ótima convivência;

Ao **Prof. Dr. David De Jong**, pelas idéias e colaboração em meu trabalho, pelas divertidas conversas recheadas de risadas, pela sincera amizade e agradável convivência durante esses anos;

Aos técnicos **João José dos Santos, Jairo de Souza, Roberto Mazzuco, Pedro de Assis Caetano** e em especial ao **Adelino Penatti** e **Luiz Roberto Aguiar** pelo auxílio prestado em todas as ocasiões e principalmente pela grande amizade e momentos de alegria durante todos esses anos. Vocês são ótimos!!!

As secretarias do Programa de pós-graduação em Entomologia, **Renata Andrade Cavallari** e **Vera** pela amizade, pela imensa ajuda e esclarecimento em todos os casos de dúvidas e imensa paciência despendida;

À minha querida e velha AMIGA **Vanessa de Andrade Bugalho**, por estar sempre ao meu lado rindo ou chorando (queixinho e chorinho), compartilhando os bons e maus momentos. Pela amizade sincera e desinteressada, por fazer mesmo os momentos chatos virarem motivo de piada. Você é muito especial e necessária!!!

As minhas mais novas e também queridas amigas **Daiana Almeida e Camila Maia**, pela divertidíssima convivência, pela sincera amizade e por estarem sempre prontas a ajudar, amparar e aprontar...rs! Muito obrigada pela maravilhosa convivência!!!

À **Gesline Fernandes de Almeida**, pelo grande e inesquecível exemplo de vida, por todos os ensinamentos, pelo carinho, respeito e principalmente pela amizade. Você é uma vencedora, te amo Nega!

Aos amigos **Michelle Manfrini Morais e Rogério Ap. Pereira**, pelos preciosos ensinamentos, pela divertida convivência, pela amizade e carinho dedicado;

Aos meus amigos do **Apilab**: Aline Patrícia Turcato, Clycie Aparecida, Fabrício Capelari, Matheus de Oliveira Bazoni, pela cumplicidade, alegria e apoio em todos os momentos;

Aos amigos do **bloco A**: Adriana Mendes, Alexandre Cristiano, Aline Makert, Amanda Freire de Assis, Ana Durvalina Bontorim, Ana Maria Bonetti, Ana Paula Farnesi, Ana Rita T. O. Baptistela, Anete Lourenço, Carlos Lobo, Camila, Érika Tanaka, Francis de Moraes, Ivan Akatso, Michele Prioli, Moisés Elias, Mônica Florecki, Omar Martinez, Paulo Emílio Alvarenga, Pedro Roberto Prado, Rodrigo Dallacqua, Sérgio Azevedo, Umberto Moreno e Weyder Cristiano. Por de alguma forma terem feito parte da minha vida durante esta trajetória. Obrigada!!!

À **Marcela B. Laure e Vera Lúcia Figueiredo** pelo carinho e amizade sempre dedicados, e pelos auxílios prestados durante meu trabalho;

As minhas queridas amigas da faculdade **Marina M. Trivelloni, Mayara Bittar, Roberta Vecchi O. Mazzucato, Sandra Mara Baptista, Vivian Soatto** por todo o incentivo, torcida, carinho e pela GRANDE AMIZADE. Vocês são muito importantes para mim!

À minha amiga de SEMPRE **Paula L. Mello**, por mesmo quando distante, estar sempre presente. Por todo o carinho, paciência e pela indescritível amizade de tantos anos. Você é muito especial!!!

Aos meus queridos sogros **Valdir Sella e Irani S. Sella**, por toda a admiração, incentivo, conselhos e carinho. Amo vocês!!!

Aos meus queridos cunhadinhos (cuk's) **Lis, Paulinho e Clau** pelo carinho e incentivo durante todos os momentos. Obrigada por fazerem parte da minha vida!!!

Aos meus **Tios e Primos**, por sempre quererem saber um pouquinho sobre as abelhinhas, por estarem sempre torcendo e incentivando o meu trabalho. Amo todos vocês!!!

À **CAPES**, pelo suporte financeiro;

Ao **Departamento de Biologia** da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto;

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A Bailarina

Toquinho

Um, dois, três e quatro,
Dobro a perna e dou um salto,
Viro e me viro ao revés
e se eu caio conto até dez.

Depois, essa lenga-lenga
Toda recomeça.
Puxa vida, ora essa!
Vivo na ponta dos pés.

Quando sou criança
Viro orgulho da família:
Giro em meia ponta
Sobre minha sapatilha.

Quando sou brinquedo
Me dão corda sem parar.
Se a corda não acaba
Eu não paro de dançar.

Sem querer esnobar
Sei bem fazer um grand écart.
E pra um bom salto acontecer
Me abaixo num demi plié.

Sinto de repente
Uma sensação de orgulho
Se ao contrário de um mergulho
Pulo no ar num gran jeté.

Quando estou num palco
Entre luzes a brilhar,
Eu me sinto um pássaro
A voar, voar, voar.

Toda bailarina pela vida vai levar
Sua doce sina de dançar, dançar, dançar...

Resumo

Discriminação morfométrica de 26 subespécies de *Apis mellifera* L. e abelhas Africanizadas por técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e pelo sistema ABIS de identificação automática de espécies

Devido a sua ampla distribuição geográfica as abelhas *Apis mellifera* apresentam inúmeras diferenciações morfológicas, comportamentais e ecológicas, que as possibilitam habitar os mais variados ambientes, com grande diversidade de subespécies adaptadas a cada região. Devido ao intenso cruzamento entre as subespécies, e a conseqüente hibridização, como ocorreu com as abelhas africanizadas, a identificação destas abelhas se tornou ainda mais difícil, fato que levou os pesquisadores a procurarem métodos de identificação mais eficientes. Com esse objetivo decidimos avaliar algumas técnicas conhecidas de morfometria. Assim, utilizamos morfometria tradicional em 15 medidas na asa anterior direita de operárias, determinadas por Ruttner em 1978, morfometria geométrica, mediante a utilização de pacotes de *softwares* disponíveis na internet, e também o sistema ABIS (*Automatic Bee Identification System*) de identificação, para a análise quanto à geometria do formato das nervuras das asas. Para as análises de morfometria geométrica e pelo sistema ABIS, utilizamos 19 marcos anatômicos. Fotos de asas de 26 subespécies de abelhas *Apis mellifera* nos foram cedidas pelo Prof. Dr. Stefan Fuchs, da J.W.Goethe-Universität Frankfurt, Alemanha. Para o preparo das fotos de asas de abelhas africanizadas foram coletadas amostras de abelhas no Brasil. Aplicamos análises estatísticas discriminante lineares, utilizando medidas individuais e média de medidas por colônia (*softwares* STATISTIC 6.0 e SPSS 15.0). As distâncias quadradas de Mahalanobis entre os grupos foram calculadas, e também construímos árvores de proximidades morfológicas com o auxílio do *software* MEGA versão 2.1. Nossos dados evidenciaram que nos trabalhos envolvendo diferenciação de subespécies recomenda-se, para a análise, a média de cada medida tomada por colônia, ao invés de medidas de indivíduo. A morfometria tradicional apresentou a menor taxa de acerto em todas as análises e foi a metodologia mais trabalhosa e demorada. A morfometria geométrica, apresentou elevadas taxas de acerto nas análises discriminantes realizadas por colônia (99,5%), mostrando-se excelente também na diferenciação das abelhas africanizadas, porém ao observarmos as análises de validação cruzadas realizadas por indivíduos, esta taxa decaiu bastante (62,4%). As três técnicas utilizadas para a análise de medidas de asas foram eficazes na classificação das subespécies, porém ao observarmos apenas a análise de validação cruzada por indivíduo, o Sistema ABIS foi o mais eficiente, com taxa de acerto de 78%, sendo que ao incluirmos as abelhas africanizadas a taxa aumentou para 82%. Porém este sistema não permite o acesso aos dados brutos, e opera apenas com este tipo de análise. As técnicas morfométricas aplicadas confirmaram resultados obtidos anteriormente por outros autores que usaram análises morfométricas tradicionais das várias partes do corpo da abelha, bem como trabalhos envolvendo técnicas com marcadores moleculares como microssatélite, DNA mitocondrial, isoenzimas e etc. Nos dendogramas de proximidade morfológica entre as subespécies nossos dados confirmaram em grande parte a classificação feita por Ruttner em 1978. Em todas as nossas análises, as abelhas africanizadas apareceram solitárias em um ramo. Os gráficos de dispersão das amostras analisadas permitiram a visualização de distintos grupos e corroboraram também, em parte, a filogenia proposta por Arias e Sheppard em 1996. Pelo sistema ABIS, as análises de validação cruzada apresentaram os melhores resultados, levando menos de um

minuto para identificar cada indivíduo, podendo inclusive ser utilizado para insetos não sociais. No entanto, no estudo de abelhas sociais a morfometria geométrica foi a mais indicada, principalmente por ter apresentado ótimas taxas de acerto nas análises envolvendo média de medidas por colônia, ser de acesso livre, não necessitar de muito equipamento e ser de fácil utilização. Este método possibilita, com bastante confiabilidade, a identificação de abelhas de várias colméias, em apenas um dia, diferentemente dos métodos tradicionais que requerem muito mais tempo e trabalho para a análise, como por exemplo os métodos com técnicas moleculares, que, apesar de fornecerem excelentes resultados, envolvem altos investimento e pessoal especializado.

Abstract

Morphometric discrimination of 26 subspecies of *Apis mellifera* L. and of Africanized honey bees by traditional and geometric morphometrics techniques and with the Automatic Bee Identification System - ABIS

The various populations of honey bees, *Apis mellifera*, diverge widely behaviorally and ecologically, with a great diversity of subspecies adapted to each region. Due to intense interaction between subspecies, and resulting hybridization, as occurred with Africanized bees, the identification of bee subspecies is difficult, a fact that has led researchers to seek more efficient methods of identification. To this end we decided to compare some known morphometric techniques. Thus, We used 15 measures of the worker's right forewing, specified by Ruttner in 1978 for the traditional morphometric analysis. For geometric morphometry, we using software packages freely available via internet, as well as the Automatic Bee Identification System (ABIS) for geometric shape analysis of wing veins. The same 19 anatomical landmarks were used for geometric morphometric and ABIS system analyses. Forewing photos of 26 *Apis mellifera* subspecies were provided by Prof. Dr. Stefan Fuchs of the J.W. Goethe Universität, Frankfurt, Germany. Africanized bee samples were collected in Brazil, and the right forewings were photographed and mounted on microscope slides. We applied linear discriminant statistical analysis, using individual measures and average measures per colony (*softwares* STATISTIC 6.0 and SPSS 15.0). We also calculated the Mahalanobis distances between the groups and prepared dendograms, using MEGA version 2.1 software. Based on our data, we recommend using mean measures per colony rather than individual measures. Traditional morphometrics was least successful in discriminating subspecies and was also the most laborious and time consuming. Geometric morphometrics at the colony level was highly accurate in discriminating subspecies (99.5%), and also was excellent in identifying Africanized bees; however, when cross-validation was done by individual, the correct identification rate dropped considerably (to 62.4%). The three techniques used to analyze wing vein anatomy were effective in the classification of subspecies, but when individual bees were analyzed, the ABIS system was the most effective, with a success rate of 78%; when we included Africanized bees, the rate increased to 82%. However the ABIS system does not allow access to the raw data, and operates only with this type of analysis. These morphometric techniques gave results similar to those obtained by other researchers who used traditional morphometric analysis of various bee body parts; the results were also similar to those found with molecular markers, such as microsatellites, mitochondrial DNA, and allozymes. In the dendograms of morphological proximity, our data were quite similar to the classification made by Ruttner in 1978. In all analyses, the Africanized bees appeared in a separate branch. In the dispersion graphs, we visualized the subspecies grouped according to their evolutionary branches, agreeing in part with the phylogeny proposed by Arias and Sheppard in 1996. Cross-validation analysis gave the best results with the ABIS system; it took less than a minute to identify each individual. This technique can also be used for non-social bees. However, for comparing social bees, we found geometric morphometry to be the most appropriate technique. It gives high rates of success in the analysis of colony samples, it is free access, it does not require much equipment and it is easy to use as well. This method allows, with considerable confidence, the identification of several colonies of bees per day, unlike other methods, such as molecular techniques, which require much time and effort for analysis, high investment and considerable specialized training.

Lista de abreviaturas

- AF** = Abelha africanizada
AD = *Apis mellifera adami*
ADI = *Apis mellifera adansonii*
AN = *Apis mellifera anatoliaca*
AR = *Apis mellifera armeniaca*
CA = *Apis mellifera capensis*
CAR = *Apis mellifera carnica*
CAU = *Apis mellifera caucasica*
CE = *Apis mellifera cecropia*
CY = *Apis mellifera cypria*
IB = *Apis mellifera iberica*
INT = *Apis mellifera intermissa*
JE = *Apis mellifera jemenitica*
LA = *Apis mellifera lamarckii*
LI = *Apis mellifera ligustica*
LIT = *Apis mellifera litorea*
MA = *Apis mellifera macedonica*
MED = *Apis mellifera meda*
MAJ = *Apis mellifera major*
ME = *Apis mellifera mellifera*
MO = *Apis mellifera monticola*
RU = *Apis mellifera ruttneri*
SA = *Apis mellifera sahariensis*
SC = *Apis mellifera scutellata*
SI = *Apis mellifera sicula*
SY = *Apis mellifera syriaca*
UN = *Apis mellifera unicolor*

Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de abreviaturas.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Morfometria.....	7
1.1.2. Morfometria Tradicional.....	12
1.1.3. Morfometria Geométrica.....	14
1.1.4. Sistema ABIS de identificação.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Material biológico.....	31
3.2. Estrutura analisada.....	33
3.2.1. Preparação das asa.....	33
3.3. Morfometria Tradicional.....	34
3.4. Morfometria Geométrica.....	36
3.5. J- ABIS.....	38
3.6. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Morfometria Geométrica.....	42

4.1.1. Análise por colônia.....	42
4.1.2. Análise por indivíduo.....	59
4. 2. Morfometria Tradicional.....	67
4.2.1. Análise por colônia.....	67
4.2.2. Análise por indivíduo.....	81
4. 3. Sistema ABIS de identificação.....	90
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	102



As abelhas *Apis mellifera*, apresentam uma ampla distribuição geográfica, ocupando um habitat bastante variado, sendo que sua distribuição vai desde a África meridional, se estende pela savana, floresta tropical, deserto e clima moderado do mediterrâneo, até atingir o limite de sua expansão, o norte da Europa e a Escandinávia meridional (Ruttner, 1988).

Acredita-se que a sua origem foi no oriente médio (Ruttner, 1975) no sudeste da Ásia, Índia (Rothenbuhler, 1979; Dietz, 1982) ou África. Independente de sua origem estas abelhas se distribuíram por toda a Europa, África e Ásia Ocidental onde se diferenciaram em mais de 26 raças geográficas reconhecidas (Ruttner, 1992; Sheppard *et al.* 1997; Sheppard e Meixner, 2003). A diferenciação destas subespécies tem sido atribuída à fragmentação sofrida durante o Período Pleistoceno em decorrência das glaciações (Culliney, 1983). Três das principais raças que adentraram a Europa durante este período foram *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera ligustica* (Sheppard & Mcpherson, 1986).

Devido a imensa variedade de habitats ocupados, condições climáticas e flora, podemos encontrar esta grande diversidade de subespécies, cada uma com características distintas adaptadas a cada região (Figura 1) (Louveaux, 1966). Com o passar do tempo, resultando de uma deliberada importação de abelhas pelos primeiros colonizadores europeus e posteriormente pelos criadores de abelha durante a colonização

do Novo Mundo, subespécies europeias foram introduzidas em diversas partes do mundo, como nos Estados Unidos em 1622 (Engel *et al.*, 2009), na Austrália em 1822 (Hopkins, 1886) e no Brasil em 1839 (Nogueira-Neto, 1972) iniciando um grande e rápido processo de hibridização (Sheppard & Mcpherson, 1986).

No Brasil, o ápice deste processo de hibridização, ocorreu logo após o ano de 1956 quando devido à baixa produtividade das abelhas europeias, algumas rainhas de abelhas da África do Sul foram introduzidas pelo geneticista Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, objetivando o aumento da produtividade de mel no país (Kerr, 1957). Após um incidente, estas rainhas juntamente com suas colônias enxamearam e iniciaram um rápido processo de hibridização (Kerr, 1967), com as abelhas de origem europeia (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera caucasica*) que já haviam sido introduzidas anteriormente no país (Nogueira-Neto, 1972 e Gonçalves, 1994). A partir destes cruzamentos, originaram abelhas polihíbridas, as quais apresentavam características predominantes da subespécie africana (*Apis mellifera scutellata*), sendo denominadas abelhas africanizadas (Gonçalves, 1974). Estas abelhas se adaptaram facilmente ao novo ambiente, iniciando um rápido processo de expansão e conquista de novos territórios (Figura 2) (Taylor, 1977).

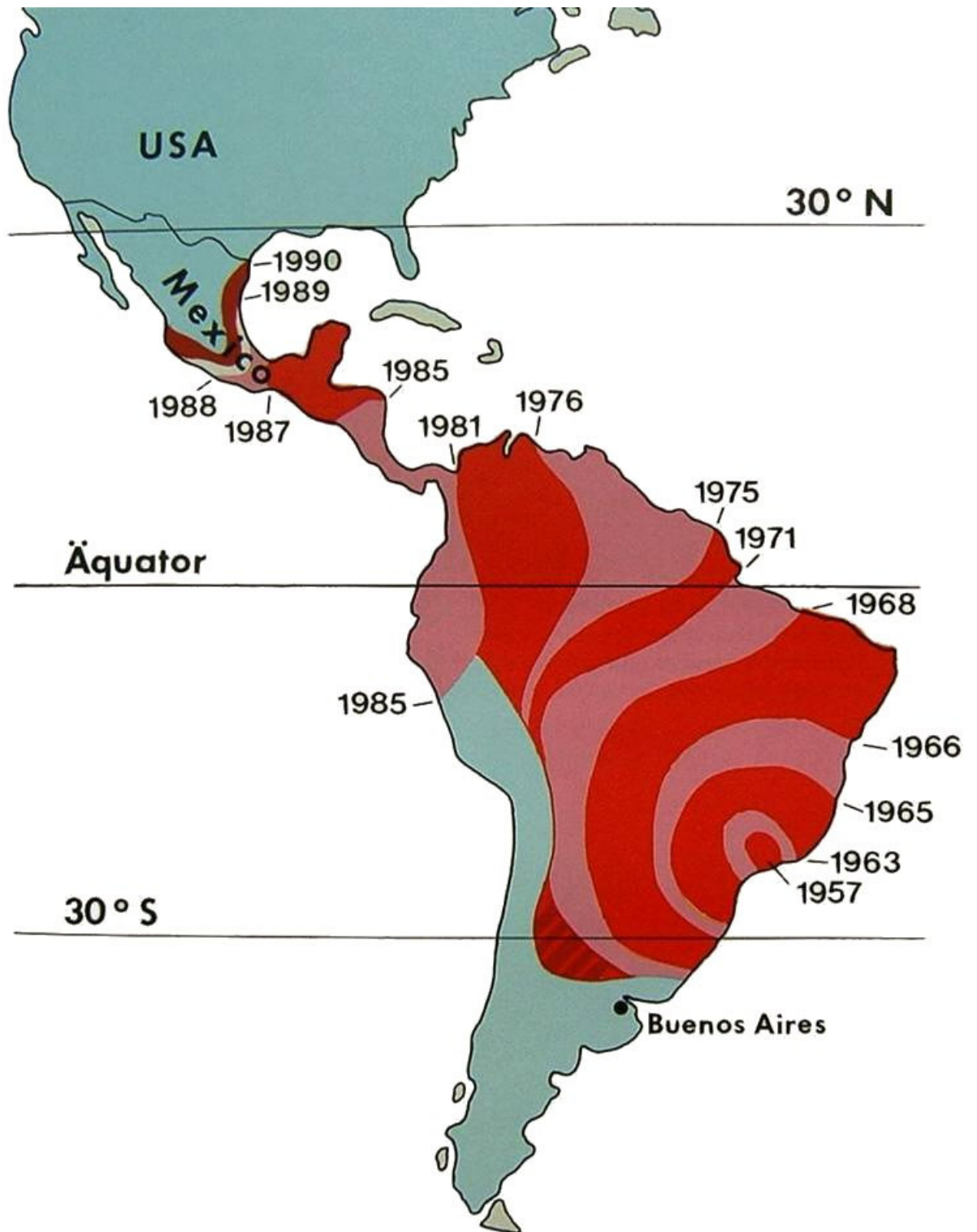


Figura 2: Expansão das abelhas africanizadas adentrando o continente americano (Ruttner , 1992).

Neste período a busca por técnicas que possibilitassem a diferenciação das subespécies de *Apis mellifera*, e principalmente a identificação das abelhas africanizadas se intensificaram. Vários métodos foram desenvolvidos para este fim, incluindo análises de isoenzimas (Contel *et al.*, 1977; Del Lama *et al.*, 1988), polimorfismo do DNA mitocondrial (Hall & Muralidharam, 1989; Smith *et al.*, 1989; Sheppard *et al.*, 1991a, b; Segura, 2000), hidrocarbonetos cuticulares (Francis *et al.*, 1985), e DNA nuclear (Hall, 1988; Clarke *et al.*, 2002; Whitfield *et al.*, 2006). No entanto estas técnicas bioquímicas e moleculares requerem pessoal altamente treinado e especializado, reagentes caros e laboratórios equipados.

Métodos de morfometria têm sido amplamente usados na identificação das diferentes subespécies de *Apis mellifera*, e em especial na identificação de abelhas africanizadas, neste ultimo caso sendo utilizado como método oficial devido ao seu baixo custo (Francoy *et al.*, 2008), fácil aplicação e resultados confiáveis.

A identificação por métodos morfométricos pode também ser feita a partir da utilização de apenas medidas de asa, como pode ser observado no trabalho de Francoy (2006a) onde medidas de apenas uma célula radial da asa (Figura 3) apresentou resultados bastante satisfatórios, demonstrando assim a possibilidade de identificação de subespécies de *Apis mellifera*, inclusive abelhas africanizadas, com taxa de acerto em torno de 99% na

identificação, sendo que existe a possibilidade ainda destas medidas poderem ser tomadas automaticamente (Tofilski, 2007; Steinhage *et al.*, 2007).

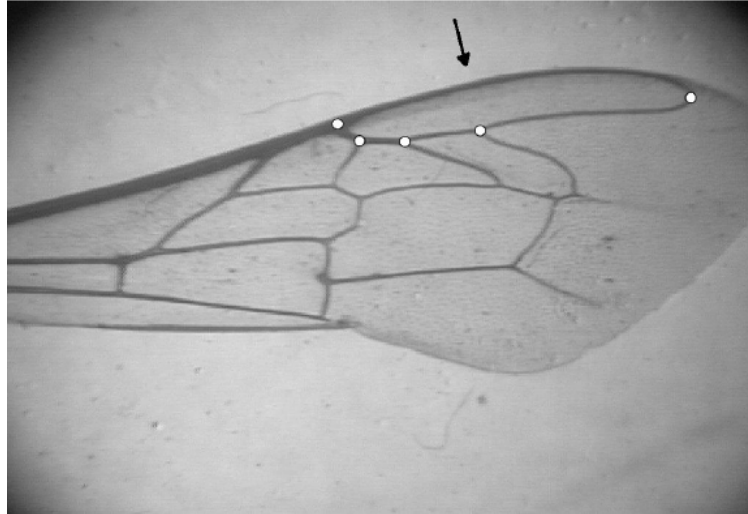


Figura 3: Pontos marcados na célula radial de asa de operária, para realização de identificação proposta por Francoy *et al.*, 2006a.

1. 1 Morfometria

Há muito tempo, existe um interesse em se diferenciar e classificar as diferentes subespécies de abelhas melíferas. Em 1906, H. Von Buttel-Reepen (apud Ruttner, 1988), tentou organizar estas subespécies usando uma nomenclatura trinomial, constituída de gênero, espécie e localidade de ocorrência da abelha, porém este tipo de identificação se apresentou bastante impreciso, visto que utilizava como critério de classificação, apenas as variáveis cor e tamanho. Assim sendo, ocorreram casos em que as abelhas amarelas classificadas como italianas encontradas na Europa central,

também eram encontradas na Ilha de Rodes, na Grécia e no norte da África (Ruttner, 1978).

Logo após, em 1916, Cochlov (apud Ruttner, 1988) realizou os primeiros trabalhos com morfometria tradicional, onde utilizou três colônias, com no mínimo 100 abelhas cada, para seis diferentes raças geográficas de *Apis mellifera*, sendo que estas foram analisadas quanto ao comprimento da probóscide. Já Michailov (1924, 1926); Alpatov (1929, 1935) e Skorikov (1929) (apud Ruttner, 1988) realizaram uma série de trabalhos, com a constatação de um aumento no comprimento médio da probóscide das populações do norte para o sul das planícies Russas.

Posteriormente novos conjuntos de características foram introduzidos por Goetze (1940 apud Ruttner, 1988) como comprimento de pêlos e venação da asa, sendo que ambos se mostraram muito eficientes para discriminar as subespécies de *A. mellifera*.

Em 1970, Gonçalves realizou no Brasil, o primeiro trabalho em grande escala com morfometria de abelhas africanizadas no qual após uma série de cruzamentos e retrocruzamentos entre *A. m. ligustica* e *A. m. scutellata*, foram extraídas medidas de várias partes do corpo das abelhas européia, africanizada e seus híbridos. Estes dados demonstraram uma dominância em termos genético-morfológicos das abelhas africanizadas sobre as abelhas européias. Até este momento, as análises estatísticas realizadas em cima dos

dados levavam em consideração somente uma variável por vez, sendo então chamadas de morfometria univariada. DuPraw (1964, 1965a,b), iniciou o uso de análises estatísticas multivariadas, como Análises de Componentes Principais e Análises Discriminantes, sendo que este novo método apresenta muitas vantagens sobre a morfometria univariada, pois pode-se trabalhar com a co-variação de várias medidas de uma só vez e gerar equações de classificação, facilitando assim a identificação. Outra grande inovação proposta pelo mesmo autor foi o uso de medidas que sejam independentes de tamanho, como ângulos entre as junções de nervuras da asa. Esta proposta colabora para eliminar diferenças morfológicas geradas por variações ambientais ou interferência de doenças ou parasitóides entre outras que podem causar diferenças não genéticas no tamanho dos organismos (Francoy, 2007). Logo após, Ruttner (1975, 1976, entre outros) realizou uma série de trabalhos que apresentaram seu ponto alto na publicação de um guia de medidas necessárias para a discriminação das subespécies de *Apis mellifera* (Ruttner *et al.*, 1978). Neste trabalho, o autor propõe 40 medidas de diversas partes do corpo das operárias, que deveriam ser tomadas de pelo menos 20 abelhas por colméia de determinada população para que se pudesse ter uma boa confiabilidade na indicação da procedência destas abelhas.

Já Daly & Balling (1978), que visavam à discriminação de abelhas européias e africanizadas, propuseram um conjunto de 25 medidas de diversas partes do corpo das abelhas, alcançando resultados altamente confiáveis. Vale ressaltar aqui que a diferenciação entre estes dois grupos é bem menos complexa do que a de todas as subespécies, como proposto por Ruttner e colaboradores (1978).

Posteriormente, Dally e colaboradores (1982), desenvolveram um sistema de medidas acoplado a um microcomputador, o que tornava a tomada de dados e o restante das análises muito mais fáceis e rápidas. Em 1986, Rinderer e colaboradores, desenvolveram o FABIS (Fast Africanized Bee Identification System), sendo este um sistema de identificação rápida, com alta taxa de acerto (99% ou mais), que possibilitava seu uso em campo, necessitando da medição de algumas partes do corpo da abelha, como: asas anteriores, fêmur e trocanter.

Em 1988, Ruttner e colaboradores publicaram grandioso trabalho de biogeografia onde foram propostas as linhagens evolutivas de *Apis mellifera*, que foram divididas em três ramos evolutivos. O ramo A, formado pelas subespécies da África (*A. m. lamarckii*, *A. m. jemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor* e *A. m. capensis*), o ramo M, incluindo as subespécies do Norte da Europa (*A. m. mellifera*), Espanha e Portugal (*A. m. iberica*), e Norte da África (*A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis* e

A. m. major), e um ramo com as subespécies da Europa Ocidental, Norte do Mediterrâneo, e Oriente Médio, o qual foi subdividido em 1992, em dois grupos, sendo eles, o ramo C, formado pelas subespécies da Itália (*A. m. ligustica*), da Áustria e Iugoslávia (*A. m. carnica*), Norte da Grécia e Bulgária (*A. m. macedonica*), Sul da Grécia (*A. m. cecropia*), e Sicília (*A. m. sicula*), e o ramo O, formado por um grupo basal da espécie, que inclui as subespécies presentes nas Montanhas Caucásicas (*A. m. caucasica*), Armênia (*A. m. armeniaca*), Irã (*A. m. meda*), Iraque, Síria (*A. m. siriaca*) e Turquia (*A. m. anatoliaca*), Chipre (*A. m. cypria*) e Ilha de Creta na Grécia (*A. m. adami*) (Tabela 1). Posteriormente estas linhagens foram confirmadas por diversos trabalhos envolvendo outros marcadores como microsatélite (Estoup *et al.*, 1995), DNA mitocondrial (Arias & Sheppard, 1996; Franck *et al.*, 2000) e mutações pontuais (Whitfield *et al.*, 2006). Mais recentemente, uma nova subespécie foi descrita, *Apis mellifera ruttneri*, localizada na ilha de Malta (Sheppard *et al.*, 1997). Dados morfológicos e filogenéticos suportam associação das subespécies das ilhas do Mediterrâneo, com as do norte da África (*Apis mellifera intermissa*) (Sheppard *et al.*, 1997).

Tabela 1: Classificação das 25 subespécies de *Apis mellifera* em seus ramos evolutivos (Ruttner, 1988 e 1992)

Ramo A	Ramo M	Ramo C	Ramo O
<i>A. m. lamarckii</i>	<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. ligustica</i>	<i>A. m. caucasica</i>
<i>A. m. jemenitica</i>	<i>A. m. iberica</i>	<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. armeniaca</i>
<i>A. m. litorea</i>	<i>A. m. intermissa</i>	<i>A. m. macedonica</i>	<i>A. m. meda</i>
<i>A. m. scutellata</i>	<i>A. m. sahariensis</i>	<i>A. m. cecropia</i>	<i>A. m. anatoliaca</i>
<i>A. m. monticola</i>	<i>A. m. major</i>	<i>A. m. sicula</i>	<i>A. m. syriaca</i>
<i>A. m. adansonii</i>			<i>A. m. cypria</i>
<i>A. m. unicolor</i>			<i>A. m. adami</i>
<i>A. m. capensis</i>			

1. 1. 2 Morfometria Tradicional

A morfometria tradicional é caracterizada pelo estudo da variação e covariação de medidas de distância, entre pares de pontos, geralmente comprimento e largura de estruturas e, em algumas vezes proporções e ângulos também podem ser utilizados (Rohlf & Marcus, 1993). Ou seja, a morfometria tradicional é o estudo de como e quanto estas medidas variam, e de como e quanto estão relacionadas entre si.

Inicialmente, os estudos da variação da forma eram feitas através de comparações de várias medidas, uma a uma. No entanto, devido aos organismos serem multidimensionais, notou-se que mesmo várias medidas que descreviam qualquer estrutura não eram suficientes para descrever a forma como um todo (Adams *et al.*, 2004). A partir deste momento começaram a surgir todos os métodos multivariados usados atualmente, que

levam em consideração, simultaneamente, os diferentes níveis de variação e covariação entre as medidas.

Devido à crescente facilidade de acesso às técnicas computacionais, as técnicas multivariadas tradicionais têm sido amplamente usadas em estudos de ecologia, sistemática e evolução, e incluem técnicas bem estabelecidas, como Análise de Componentes Principais, Análise de Fatores, Regressões Múltiplas e Análises Discriminantes, entre outras (Moraes, 2003). No entanto, um conjunto de distâncias lineares é normalmente insuficiente para capturar a geometria do objeto original. Sendo assim, alguns aspectos da forma são perdidos (Adams *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos já foram realizados utilizando técnicas de morfometria tradicional para diferentes finalidades (Ftayeh *et al.* 1994; Steele *et al.*, 1998; Ruttner *et al.*, 2000; Radloff & Hepburn, 2000 e Amssalu *et al.*, 2004). Em 1997, Kauhausen-Keller e colaboradores, através da análise de componentes principais, estudaram 252 amostras de 21 subespécies de *Apis mellifera*, as quais foram coletadas de 15-20 operárias por colônia em diferentes localizações geográficas. Foram analisadas 34 características morfométricas, de acordo com o banco de dados de abelhas criado pelo Prof. Dr. F. Ruttner do Instituto de Pesquisas da J.W.Goethe-Universität de Frankfurt em Oberursel, Alemanha (Ruttner *et al.*, 1978). Pela primeira vez, o resultado foi apresentado em forma de uma figura tridimensional, parecida

com um tripé, gerada a partir de computador. Nesta figura, cada ramo apareceu distinto e cada haste representou uma das quatro regiões principais de distribuição das abelhas *Apis mellifera* (África tropical, Mediterrâneo Ocidental e Norte Europeu, Mediterrâneo Central e Sudeste Europeu, e Oriente Médio).

Já em outro trabalho (Meixner *et al.*, 2007) a técnica de morfometria tradicional foi utilizada para analisar a variabilidade da subespécie *A. m. mellifera* no leste Europeu. Para isso, foram coletadas 136 amostras em diferentes localidades (Polônia, Belarus e Ucrânia), as quais tiveram 38 características mensuradas de acordo com o método descrito por Ruttner (1988). Este estudo permitiu pela primeira vez uma análise morfométrica mais abrangente das abelhas *A. m. mellifera* do leste europeu, confirmando a presença destas abelhas na Polônia e Belarus, e contribuindo com novas informações sobre sua extensão e a relação destas com as subespécies adjacentes da região.

1. 1. 3 Morfometria Geométrica

Outro método que recentemente tem apresentado um avanço significativo em relação à análise estatística das formas, é a Morfometria Geométrica (MG) (Bookstein, 1991). Esta é uma ferramenta muito útil para detectar variações morfológicas, as quais mesmo quando mínimas

frequentemente são indetectáveis por estudos de morfometria tradicional, assim como ferramentas de morfometria clássica (Villemant *et al.*, 2007).

Esta nova abordagem morfométrica começou a ser mais utilizada no final dos anos 80 (Adams *et al.*, 2004), refletindo o resultado da busca dos pesquisadores em morfologia quantitativa por métodos que unissem o caráter geométrico das formas biológicas e a possibilidade de um tratamento estatístico da variação (Zelditch *et al.*, 2004). Iniciando desta forma, uma nova área de pesquisa situada entre a biologia, a estatística e a geometria (Monteiro & Dos Reis, 1999).

A análise realizada por técnicas de morfometria geométrica, esta baseada em uma teoria bem estabelecida (Kendall *et al.*, 1999), onde ao invés de distâncias e ângulos, são usadas as coordenadas cartesianas dos pontos, denominados marcos anatômicos (*landmarks*). A vantagem do uso de coordenadas em relação a medidas lineares, é que estas incluem informação sobre as posições relativas, e deste modo permitem a reconstrução da forma estudada (Rohlf & Marcus, 1993).

Esta metodologia envolve uma série de técnicas que visam descrever e representar a geometria das formas estudadas. Sendo que uma ferramenta bastante utilizada é o “Espaço da forma de Kendall”, que se baseia em um espaço matemático multidimensional curvo, no qual cada forma existente no mundo real é representada por um ponto (Rohlf, 1996).

No espaço da forma de Kendall, as distâncias são geodésicas, chamadas de distâncias de Procrustes, ao invés de distâncias lineares ou euclidianas. Neste espaço multidimensional, a distância entre dois pontos representa, portanto o quão diferente estas formas são, baseado em informações de quão distante as formas estão entre si. Resumindo, as Distâncias de Procrustes são uma maneira de medir a diferença morfológica entre duas formas.

Para análise estatística da Distância de Procrustes, usa-se uma projeção do Espaço da Forma de Kendall para um espaço euclidiano tradicional, para ilustrar a idéia é comparável com a projeção de uma imagem 3D em um plano. Os pontos no espaço da forma de Kendall podem ser projetados em um espaço linear, tangente ao espaço da forma, de modo que distâncias lineares entre pares de pontos correspondam a projeções das Distâncias de Procrustes originais. A variação das formas no mundo real, por maior que seja, ocupa sempre um espaço pequeno no Espaço da Forma de Kendall, sendo que as projeções no espaço linear podem ser consideradas boas estimativas das Distâncias de Procrustes (Monteiro & Dos Reis, 1999).

Como o Espaço da Forma de Kendall é curvo, na medida em que as formas se afastam do ponto de tangência entre os dois espaços, as projeções tendem a se aproximar no espaço linear. Portanto, é

recomendável que o ponto de tangência entre os dois espaços seja definido como sendo a média de todas as formas observadas, de modo que esta forma média estivesse o mais eqüidistante de todas as formas estudadas e as variações fossem as menores possíveis (Rohlf, 1998). Para isso, utiliza-se a Configuração de Consenso, que corresponde à média de todas as formas, tendo sido retiradas as diferenças decorrentes de orientação, posição e tamanho, através de uma sobreposição por quadrados mínimos generalizada, ou sobreposição de Procrustes (Rohlf, 1999). Primeiramente, para retirar o efeito do tamanho, todas as configurações são padronizadas para mesma medida geral de tamanho, sendo que desta maneira qualquer diferença observada possa ser atribuída unicamente à forma. Esta transformação é feita com uma medida geral multivariada de tamanho, chamada de Tamanho de Centróide. O centróide equivale ao ponto médio das coordenadas analisadas, sendo que, o Tamanho de Centróide corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada ponto de referência e o centro de massa. Calcula-se o Tamanho de Centróide de cada indivíduo e estes são igualados (Monteiro & Dos Reis, 1999).

Posteriormente, é feita a sobreposição de Procrustes através do seguinte processo interativo: uma das formas é escolhida aleatoriamente, e todas as demais são rodadas, transladadas e redimensionadas de modo que

seus centróides se sobreponham, seus Tamanhos de Centróide sejam iguais e que as Distâncias de Procrustes entre elas sejam minimizadas. A média de todas estas configurações é calculada, e o processo de rotação, sobreposição e redimensionamento é repetido, sobrepondo as formas a esta média. A configuração assim calculada é então chamada de Referência, Configuração Tangente, ou Configuração de Consenso. As demais formas são então comparadas entre si através desta configuração de referência (Rohlf & Marcus, 1993).

Outro método bastante empregado é o de flexão das placas finas (Bookstein, 1989), utilizado para avaliar as mudanças em pontos de referência. Esta função está baseada em um modelo físico, onde uma placa de metal de espessura desprezível permite descrever as diferenças entre duas conformações de pontos como uma deformação contínua. Na realidade é como se tivéssemos duas placas de metal, onde em uma estivessem marcados pontos de referência e na outra os pontos da forma a ser estudada, possibilitando assim fazer a comparação das formas.

Esta comparação ocorre de maneira que a placa que contém os pontos da forma a ser comparada sofre uma deformação fazendo com que estes pontos se encaixem sobre os pontos presentes na placa de referência, possibilitando a quantificação das diferenças entre as formas, de modo que

as formas parecidas usam menos força, formas diferentes usam mais força na deformação (Monteiro & Dos Reis, 1999). Desta maneira, é possível descrever quantitativamente as diferenças entre duas formas através de grades de deformação semelhantes às descritas por Thompson (1917).

Um método bastante útil para descrever as mudanças na forma de um conjunto de organismos é a Análise das Deformações Relativas (Rohlf, 1993), que se baseia no uso dos parâmetros das Funções de Flexão de Placas Finas. Desta forma, a partir da Configuração de Referência é construída uma matriz denominada Matriz de Energia da Deformação, que contém todas as distâncias entre os pares de pontos de referência utilizados. Esta matriz é decomposta de modo a gerar duas outras matrizes de valores particulares, chamadas de matriz de autovalores e a matriz de autovetores, onde cada valor da primeira matriz corresponde a um vetor da segunda matriz.

Posteriormente é realizada a projeção de cada amostra analisada nas Deformações Principais, resultando em escores, que descrevem o peso de cada deformação principal para transformar a configuração de referência na configuração destes indivíduos, e o conjunto destes escores forma a matriz de pesos, W . Os vetores de escores são chamados de Deformações Parciais (Bookstein, 1991), porque cada um descreve uma porção da

variação total, ou ainda, são uma característica de cada amostra (indivíduo).

A projeção das coordenadas de cada indivíduo nas deformações principais gera vetores chamados de Deformações Parciais, que são uma característica de cada indivíduo, assim como as Deformações Principais eram características da referência. Ou seja, os elementos na matriz W descrevem cada exemplar como uma combinação linear das Deformações Principais. A Análise das Deformações Relativas equivale a realizar uma Análise de Componentes Principais sobre a matriz W .

Os novos autovetores gerados deste modo são chamados de Deformações Relativas, e estes descrevem os eixos ortogonais de maior variação da forma a partir das deformações parciais. Assim, é possível capturar e representar a maior parte da variação ao longo de alguns poucos eixos, reduzindo o número de dimensões sem perder a maior parte da informação.

Esta metodologia já é bastante utilizada para abelhas do gênero *Apis*, no entanto, atualmente tem sido amplamente utilizada também para abelhas sem ferrão, apresentando bons resultados, solucionando até problemas taxonômicos como o observado em *bombus* (Aytekin *et al.*, 2007). Também tem sido aplicada na análise de mudanças no perfil de algumas

populações de abelhas africanizadas com o decorrer do tempo (Francoy *et al.*, 2009b).

O estudo da morfologia da asa tem apresentado ótimos resultados também na identificação de diferentes subespécies e espécies de abelhas (Schroder *et al.*, 1995; Steinhage *et al.*, 2001; Drauschke *et al.*, 2007; Francoy *et al.*, 2008). Isto pode ser observado em trabalho realizado recentemente por Francoy e colaboradores (2009a) onde foram analisados o desenho da venação da asa de machos e operárias de cinco espécies de abelha sem ferrão (*Nanotrigona testaceicornis*, *Mellipona quadrifasciata*, *Friesiomelitta varia*, *Scaptotrigona aff. depilis* e *Plebeia remota*). Neste trabalho, foi possível concluir que a forma da asa entre operárias e machos da mesma espécie é mais parecida do que a forma da asa dos indivíduos do mesmo sexo de espécies diferentes. A forma da asa de operária e macho, quando analisados separadamente, é suficiente para diferenciar as 5 subespécies mencionadas acima. Desta forma programas computacionais de diferenciação de espécie se constituem em uma ferramenta importante no auxílio de estudos de conservação e manutenção da biodiversidade.

Esta técnica também foi testada por Francisco e colaboradores (2008) para a análise das asas de Meliponini, de duas populações de *Plebeia remota* pertencentes a diferentes biomas. Estas populações foram discriminadas e mantiveram seus padrões, indicando uma ausência de fluxo

gênico entre os dois grupos, mesmo quando as duas populações foram colocadas artificialmente em simpatria por mais de 10 anos. Assim, a técnica de morfometria geométrica baseada em análises de deformações relativas se mostrou eficiente na discriminação de grupos de meliponíneos. Esta técnica também se mostrou eficiente na discriminação de espécies do gênero *Plebeia* (Silva, 2006), em subespécies de abelhas *Apis mellifera* (Francoy *et al.*, 2006 b), em populações de *Nannotrigona testaceicornis* (Mendes *et al.*, 2007) e de abelhas africanizadas (Francoy, 2007) .

Outro trabalho envolvendo técnicas de morfometria geométrica da asa foi realizado recentemente (Bischoff *et al.*, 2009) com 228 espécimes de abelhas polinizadoras de abóbora (*Peponapis pruinosa*) coletadas em 15 pontos entre Mississipi e Ontário. Estas populações foram analisadas visando avaliar a hipótese de sua origem e possível rota de expansão após a dispersão de sua hospedeira floral (Curcubita). Para isso foram marcados na asa anterior direita 23 marcos anatômicos, e o resultado foi analisado por estatística multivariada. Os resultados suportam a hipótese de que as abelhas polinizadoras da abóbora (*squashbee*) da América do Norte se originaram no ocidente.

Também, já tem sido demonstrado que espécies de diferentes tipos de inseto podem ser identificadas com base exclusiva em morfologia de asa. Alguns estudos tem focado este tipo de informação para discriminar grupos

intra-específicos como populações e subespécies (Gaston & O'Neill, 2004; Tofilski, 2004; Steinhage *et al.*, 2007). Após a constatação de que características extraídas da venação das asas são suficientes para discriminar espécies entre os insetos, vários estudos passam a utilizar este método, como podemos observar em Villemant e colaboradores (2007), onde foram realizadas análises de morfometria geométrica em espécies irmãs do gênero *Eubazos* (Hymenoptera, Braconidae) parasitóide de besouros da casca de coníferas do gênero *Pissodes* (Coleoptera, Curculionidae). Neste estudo, obteve-se taxa de acerto na classificação das fêmeas de 98,6% e nos machos de 93,1%, utilizando-se apenas medidas de asa, sendo que em estudos preliminares só foram obtidas taxas de acerto similares quando se utilizou em conjunto análises de isoenzima e várias análise de variação canônica, incluindo diversas medidas morfométricas. A morfometria geométrica também foi eficiente na divisão destes insetos em quatro grupos, confirmando a divisão feita previamente mediante outras análises. Desta forma este resultado foi comparado com estudos prévios realizados envolvendo morfometria tradicional, análise de isoenzimas, acasalamentos cruzados e observações a respeito da biologia. Ainda, ao comparar as medidas necessárias para as técnicas de morfometria clássica, a mensuração da venação de asa gasta menos tempo, é mais confiável de forma que requer menos conhecimento da taxonomia dos braconídeos.

1. 1. 4 Sistema ABIS de identificação

Devido ao baixo número de taxonomistas ativos atualmente (Drauschke, *et al.*, 2007), a identificação das espécies de praticamente todos os grupos animais fica bastante comprometida. Assim, visando disponibilizar uma ferramenta de fácil utilização e que apresente resultados de alta confiabilidade, foi desenvolvido um sistema semi-automático de obtenção de medidas, classificação e identificação de espécies denominado ABIS (*Automatic Bee Identification System*) (Schroder *et al.*, 1995; Steinhage *et al.*, 1997).

Este sistema de identificação possui padrões rígidos de reconhecimento de formas e trabalha com base em um banco de dados, montado com indivíduos previamente identificados (Francoy, 2007). O banco de dados é montado com pelo menos 30 indivíduos por espécie, subespécie ou população estudada, sendo que após este procedimento, a identificação se torna bastante rápida.

A automatização do sistema ABIS foi apresentada em 2001 por Steinhage e colaboradores. Neste trabalho, o uso do *software* foi facilitado e a classificação das amostras tornou-se ainda mais precisa. As melhorias proporcionadas no programa foram, a detecção automática dos pontos de junção de nervuras e marcação automática dos marcos anatômicos

(*landmarks*) utilizados na análise, além da utilização de análises discriminantes não lineares de kernel (KDA), que se dobram no espaço. Assim, houve uma melhora na classificação dos grupos estudados, possibilitando uma taxa de acerto de até 99,8% nas classificações dos indivíduos dentro de suas respectivas espécies. Isto foi observado mesmo quando os grupos utilizados na análise apresentavam grandes similaridades, como no caso das abelhas dos gêneros Europeus de *Colletes*, *Andrena* e *Bombus* (Schroder *et al.*, 2006).

Juntamente com os métodos morfométricos (tradicional e geométrico), este programa tem apresentado bastante eficiência na identificação de abelhas, possibilitando também a diferenciação de amostras de abelhas africanizadas, conforme observado em experimento realizado por Drauschke e colaboradores no ano de 2007. No experimento em questão o sistema ABIS foi testado com abelhas africanizadas e subespécies de *Apis mellifera* obtendo um ótimo resultado, atingindo 94% de acerto nas taxas de classificação, utilizando apenas a análise de características das asas.

Em trabalho realizado para a identificação de quatro subespécies de abelha *Apis mellifera* (*Apis mellifera scutellata*, *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera carnica*) e abelhas africanizadas, tanto a análise utilizando o sistema ABIS, quanto a morfometria geométrica, levaram

menos de cinco minutos para a análise de cada imagem, e apresentaram taxa superior a 99% de acerto na identificação (Francoy *et al.*, 2008).

Devido o sistema morfométrico ABIS ser um *software* que foi desenvolvido para uma finalidade muito específica, que é a identificação de espécies de abelhas a partir dos padrões de venação das asas anteriores, o sistema não permite aos usuários o acesso aos dados brutos, mostrando somente o procedimento de análise e o resultado final.



Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Devido à contínua busca por métodos de identificação de espécies e subespécies que reúnam características como, fácil aplicação, baixo custo e sobretudo, que apresentem resultados confiáveis e satisfatórios. Ojetivamos com este trabalho comparar as diferentes metodologias morfométricas e suas taxas de acerto na identificação e classificação das 26 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas dentro de seus respectivos grupos. Para tanto, foram testadas as técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e sistema ABIS de identificação, aplicadas apenas em medidas extraídas das asas anteriores das abelhas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as asas anteriores de 26 subespécies de *Apis mellifera* e amostras de abelha africanizada por meio de três diferentes metodologias morfométricas (Morfometria Tradicional, Morfometria Geométrica e ABIS);
- Comparar as três diferentes metodologias morfométricas quanto à sua eficiência na identificação de 26 subespécies de *Apis mellifera* e amostras de abelha africanizada baseada somente em características das asas anteriores, bem como o tempo necessário para execução e precisão dos resultados;
- Comparar os dendogramas de proximidade morfológica das subespécies de *Apis mellifera*, gerados a partir das distâncias produzidas pelas análises de morfometria tradicional e morfometria geométrica.



Materiais e Métodos

3.1 Material biológico

Foram analisadas amostras das 26 subespécies (Tabela 2) de *Apis mellifera* e abelha africanizada, através do uso de técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e pelo sistema ABIS de identificação. As fotografias digitais das asas anteriores das 26 subespécies de *Apis mellifera* foram cedidas pelo Prof. Dr. Stefan Fuchs, da J.W.Goethe-Universität Frankfurt, Alemanha. Estas amostras de asas são provenientes dos indivíduos utilizados como representantes puros das subespécies de *Apis mellifera*. Também utilizamos amostras de asas de abelhas africanizadas coletadas no estado de Sergipe, em Aracaju – Brasil.

TABELA 2: Subespécies e número amostral de colméias e indivíduos analisados por MG=morfometria geométrica (mesmo número para o ABIS) e MT= morfometria tradicional.

Subespécie	Nº de colméias	Nº de indiv. MG	Nº de indiv. MT
Africanizada	10	49	49
<i>Apis mellifera adami</i>	5	45	52
<i>Apis mellifera adansonii</i>	12	113	131
<i>Apis mellifera anatoliaca</i>	5	50	9
<i>Apis mellifera armeniaca</i>	6	59	56
<i>Apis mellifera capensis</i>	3	30	38
<i>Apis mellifera carnica</i>	15	150	227
<i>Apis mellifera caucasica</i>	11	120	116
<i>Apis mellifera cecropia</i>	9	89	85
<i>Apis mellifera cypria</i>	4	40	49
<i>Apis mellifera iberica</i>	2	20	18
<i>Apis mellifera intermissa</i>	6	59	73
<i>Apis mellifera jemenitica</i>	14	133	121
<i>Apis mellifera lamarckii</i>	7	70	59
<i>Apis mellifera ligustica</i>	11	110	108
<i>Apis mellifera litorea</i>	6	55	52
<i>Apis mellifera macedonica</i>	2	20	18
<i>Apis mellifera major</i>	1	10	0
<i>Apis mellifera meda</i>	8	79	78
<i>Apis mellifera mellifera</i>	13	139	131
<i>Apis mellifera monticola</i>	8	79	68
<i>Apis mellifera ruttneri</i>	5	49	48
<i>Apis mellifera sahariensis</i>	2	20	20
<i>Apis mellifera scutellata</i>	11	119	114
<i>Apis mellifera sicula</i>	1	10	0
<i>Apis mellifera syriaca</i>	9	86	137
<i>Apis mellifera unicolor</i>	7	69	64

3. 2 Estrutura analisada

Buscando formas de otimizar o processo de identificação das amostras, optamos por trabalhar unicamente com medidas de asa, visto que esta estrutura é especialmente apropriada para estudos morfológicos (Nunes *et al.*, 2007). Além de ser facilmente mensurada, sabe-se que em abelhas do gênero *Apis*, a herdabilidade, no sentido restrito (proporção da variância genética aditiva sobre a variância total), para esse caráter usualmente é alta, próxima de 1, sofrendo pouca variação do ambiente (Diniz-Filho & Bini, 1994).

3. 2. 1 Preparação das asas

Todos as operárias de abelhas africanizadas estudadas tiveram sua asa anterior direita retirada com o auxílio de pinças, foram umedecidas em álcool 70% e água e posteriormente com o auxílio de um pincel número dois estas asas foram montadas entre duas lâminas de microscopia seladas com massa de modelar, previamente identificada com o nome da subespécie e o número da abelha (Figura 4). As asas foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio e armazenadas de modo digital.



Figura 4: Lâminas seladas com massa de modelar, contendo as asas direita previamente identificadas de operárias de *Apis mellifera*.

3.3 Morfometria Tradicional

As análises de morfometria tradicional foram realizadas de acordo com as medidas de asas propostas por Ruttner (1988), sendo estas (Figura 5):

- Comprimento da asa anterior (**FL**);
 - Largura da asa anterior (**FB**);
 - Distância **a** da veia cubital;
 - Distância **b** da veia cubital;
 - 11 ângulos de venação da asa* (Figura 6);
- * (Ângulos nº 21= A4, 22=B4, 23=D7, 24=E9, 25=G18, 26=I10, 27=I16, 28=K19, 29=L13, 30=N23, 31=O26);

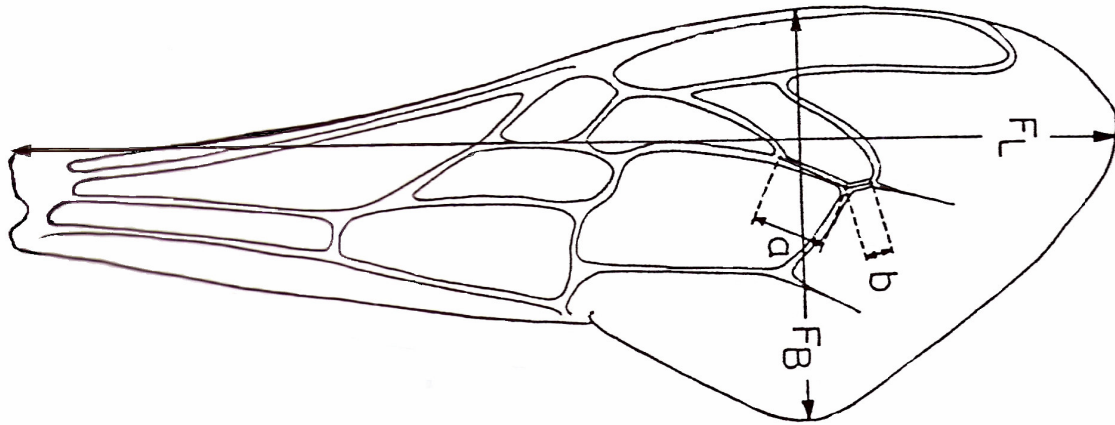


Figura 5: Ilustração das medidas utilizadas na análise de asa através da técnica de morfometria tradicional, onde **a** e **b** representam as distâncias da veia cubital, **FL** representa o comprimento da asa e **FB** a largura (Ruttner,1988)

Estas medidas foram realizadas com o auxílio do software SigmaScan 5.0 (SPSS Inc.).

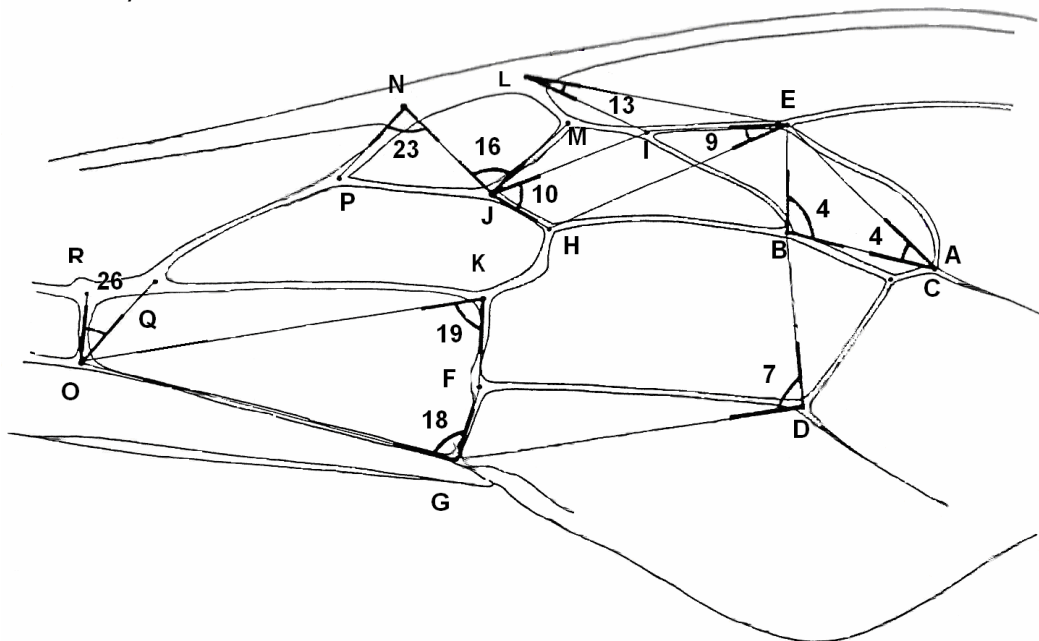


Figura 6: Ilustração dos 11 ângulos utilizadas na análise de asa através da técnica de morfometria tradicional (Ruttner, 1988).

3. 4 Morfometria Geométrica

Para análise de morfometria geométrica das asas, foram utilizados *software* que se encontram disponíveis gratuitamente na internet (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>). Estas asas foram analisadas quanto à geometria do formato de suas nervuras. Para isso foram marcados manualmente 19 marcos anatômicos (Figura 7) nas junções de nervuras das asas anteriores com o auxílio do *software* tpsDig2 versão 2.04 (Rohlf, 2005a) e foram analisadas quanto a sua forma com o auxílio do *software* tpsRelw versão 1.42 (Rohlf, 2005b).

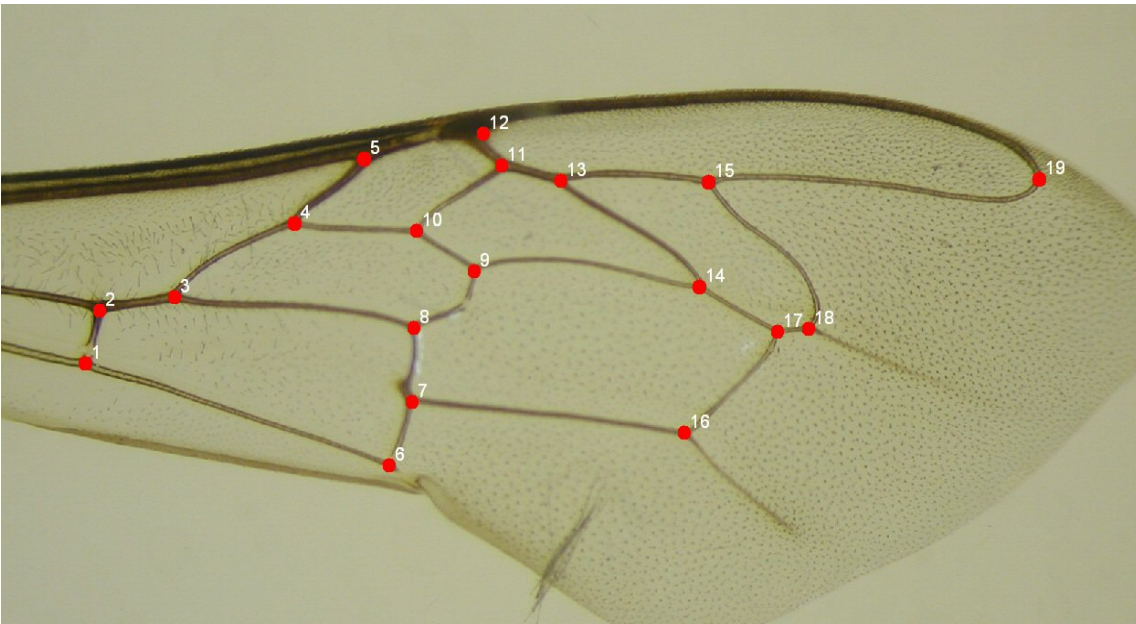


Figura 7: Asa anterior de operária de *Apis mellifera* com os 19 pontos homólogos marcados (Francoy, 2007).

Metodologicamente, as análises em morfometria geométrica compreendem três fases (Bookstein, 1996):

1º Fase: Conversão dos marcos anatômicos digitalizados de cada organismo em um único ponto no espaço da forma de Kendall, e posteriormente, a projeção destes pontos no espaço linear tangente. No espaço da forma de Kendall, a configuração de marcos anatômicos de cada organismo estudado é centralizada, de modo que o centróide (ponto médio ou centro de massa) de cada configuração de marcos anatômicos coincida com a origem do sistema cartesiano. Em seguida, cada configuração de marcos anatômicos homólogos é escalonada, onde o tamanho é definido em termos de centróide da configuração. O tamanho do centróide é definido como a raiz quadrada do somatório do quadrado das distâncias de cada um dos marcos anatômicos até o centróide. A última transformação é a remoção dos efeitos de orientação, onde todas as configurações são rotacionadas, com a finalidade de minimizar a soma das distâncias quadráticas entre os marcos anatômicos homólogos (distância de Procrustes) de um par de espécimes (Figura 8). Esse mesmo procedimento foi feito para todas as asas na amostra.

2º Fase: Realização da análise multivariada no espaço linear tangente.

3º Fase: Retorno ao espaço curvo de Kendall, exibindo os resultados das análises multivariadas através de métodos gráficos com a finalidade de permitir a visualização, interpretação e compreensão do fenômeno.

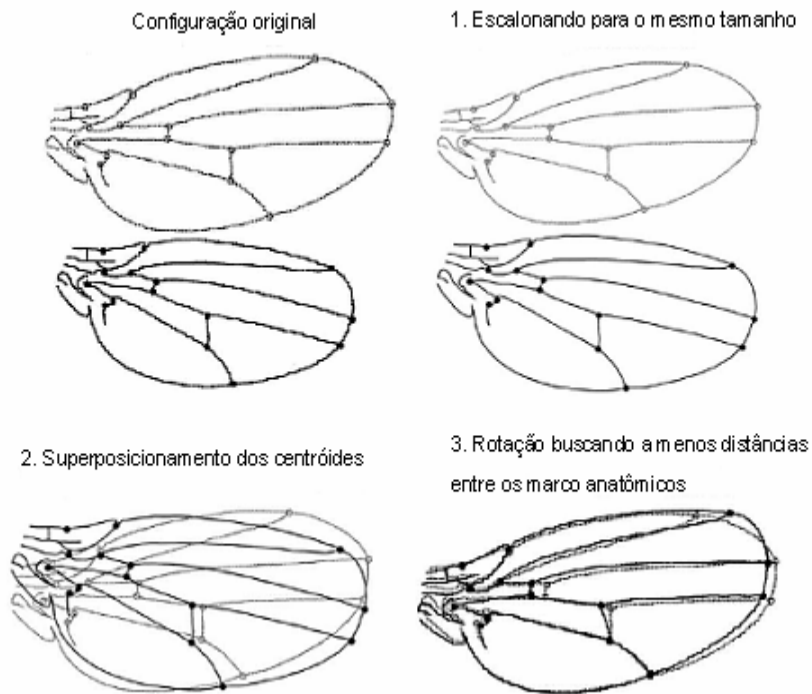


Figura 8 :Seqüência de padronização das asas para o mesmo tamanho e alinhamento dos marcos anatômicos para a análise de MG (Asas de *Drosophila*, Zelditch *et al.* 2004).

3. 5 J-ABIS

O Sistema ABIS (Automatic Bee Identification System) consiste em um *software* de identificação automática, que trabalha com dados morfométricos extraídos dos padrões de nervação das asas anteriores de abelhas. Devido o programa ter sido criado para um fim muito específico (identificação de abelhas), o mesmo não permite ao usuário o acesso aos dados brutos, apresentando somente o procedimento de análise e o resultado final.

Na análise realizada pelo sistema morfométrico ABIS, foram utilizados os mesmos 19 marcos anatômicos escolhidos para análise de morfometria geométrica.

Para iniciar o uso do programa, é necessária a criação de um banco de dados utilizando-se no mínimo 30 indivíduos por grupo a ser estudado, o qual posteriormente será utilizado na identificação das amostras. Após a elaboração deste banco de dados, o sistema está apto para iniciar os testes, a análise e posterior classificação, que ocorrem da seguinte maneira:

- Análise automatizada das imagens das asas anteriores das abelhas, resultando na completa rede de venação das asas;
- Análise estatística, que pode ser Análise Discriminante de Fisher (LDA) ou Análises Discriminantes Não-Lineares de Kernel (KDA) (Roth & Steinhage, 1999);
- Apresentação dos resultados em forma de tabela de classificação e gráficos de dispersão;

3. 6 Análise Estatística

Os dados de morfometria tradicional e morfometria geométrica foram processados mediante análises discriminante lineares nos *softwares* STATISTIC 6.0 (Statsoft, 2001) e SPSS 15.0 (SPSS Inc.) As distâncias quadradas de Mahalanobis entre os grupos foram calculadas, e também construímos

árvores de proximidades morfológicas com o auxílio do *software* MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Os dados do sistema morfométrico ABIS, são apresentados em forma de tabela de classificação e gráficos de dispersão, no entanto, devido o programa ser totalmente automático, não é permitido o acesso aos dados brutos extraídos das asas, o que impossibilita uma análise mais detalhada, como por exemplo, dos parâmetros que mais diferenciam os grupos.

Este programa realiza dois tipos de análises estatísticas, análise discriminante linear e análise discriminante não linear, sendo que neste trabalho apenas a análise não linear foi utilizada, uma vez que trabalhos anteriores (Francoy *et al.*, 2008) comprovaram ser esta análise mais adequada e eficiente.



Resultados e Discussão

4.1 Morfometria geométrica

4.1.1 Análise por colônia

A partir dos 19 marcos anatômicos de cada asa de operária analisada, foram geradas 34 medidas de deformações relativas (segundo a fórmula: $k = 2n - 4$, sendo que k é igual ao número total de deformações relativas e n é igual ao número de marcos anatômicos).

De acordo com as análises discriminantes, das 34 medidas geradas, 31 contribuíram significativamente ($<0,05$) para a discriminação dos grupos (Wilk's $\lambda = 0,00000001$; $p = 0,00001$), apresentando 99,5% de taxa de acerto na classificação (Tabela 3). Ao introduzir amostras de abelhas africanizadas (AF), a taxa de acerto não foi alterada (Tabela 4). Durante estas análises apenas uma amostra da subespécie *A. m. jemenitica* foi identificada erroneamente, como *A. m. litorea*.

Utilizando a classificação proposta por Ruttner (1988), onde as subespécies de *A. mellifera* foram classificadas em quatro ramos evolutivos, ramo M (Oeste e Norte da Europa), ramo C (Europa Ocidental), ramo O (Oriente próximo e Ásia Central) e ramo A (África), a qual é bastante fundamentada, visto que muitos outros trabalhos foram realizados, envolvendo diferentes marcadores como análises de microssatélite (Estoup *et al.*, 1995), DNA mitocondrial (Arias & Sheppard, 1996; Franck *et al.*, 2000)

e mutações pontuais (Whitfield *et al.*, 2006), sendo que todos confirmaram a existência das linhagens evolutivas previamente descritas por Ruttner, mediante apenas estudos morfométricos de caracteres morfológicos. Este erro pode ter ocorrido devido ambas as subespécies estarem geograficamente bem próximas, compartilhando características morfológicas e principalmente por compartilharem o mesmo ramo evolutivo (ramo A), sendo evolutivamente bem próximas.

Tabela 3: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise discriminante da média das medidas por colônia das 26 subespécies de *Apis mellifera*. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ADI	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
AN	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
AR	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CA	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
CAR	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
CAU	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
CE	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
CY	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
INT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
JE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92,9	0	0	7,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
LA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
LI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
LIT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
MA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
MAJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MED	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	8
ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	14
MO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	8
RU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	5
SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	2
SC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	12
SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	1
SY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	9
UN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	7

99,5%

Os testes de validação cruzada de acordo com as equações geradas a partir das análises discriminantes apresentaram êxito de 77,4% na classificação das colônias como pertencentes aos seus respectivos grupos (Tabela 5). Destas amostras analisadas, 95,5% foram classificadas dentro de seu respectivo ramo evolutivo. Ao introduzir amostras de abelhas africanizadas apesar da taxa de acerto ser um pouco superior, 78,8% (Tabela 6), o valor da classificação das subespécies dentro de seu respectivo ramo evolutivo decaiu para 95%. Nesta análise apenas uma colônia de abelha africanizada foi identificada como sendo da subespécie *A. m. scutellata*. Este resultado é de certa forma já esperado, devido a grande quantidade de caracteres morfológicos e genéticos compartilhados por estas abelhas. Tendo em vista que esta subespécie é uma das que deram origem ao polihíbrido denominado abelha africanizada.

Em ambas as análises, as subespécies pertencentes ao ramo C se destacaram por obterem 100% de acerto na classificação dentro de seu respectivo ramo evolutivo. Já a subespécie *A. m. sahariensis* obteve 100% de suas colméias classificadas como pertencentes ao ramo A. Os valores referentes a taxa de acerto nas análises discriminante e de validação cruzada, foram obtidos a partir da divisão do número de classificação e identificação correta das subespécies pelo número total de colônias.

No gráfico de dispersão (Figura 9), elaborado a partir da posição relativa dos centróides das distribuições das subespécies, utilizando apenas dados de deformações relativas, observamos o agrupamento das subespécies de *Apis mellifera* nos quatro ramos evolutivos.

Tabela 5: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada da média de medidas por colônias das 26 subespécies de *Apis mellifera*. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em letras colorida as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	80	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ADI	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	12
AN	0	0	60	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	5
AR	0	0	0	83,3	0	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CA	0	33,3	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0	0	3
CAR	0	0	0	0	0	86,6	0	6,7	0	0	0	0	0	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
CAU	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
CE	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
CY	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	2
INT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
JE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64,3	7,1	0	14,3	0	0	0	0	7,1	0	7,1	0	0	0	0	14
LA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
LI	0	0	0	0	0	9,1	0	9,1	0	0	0	0	0	81,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
LIT	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
MA	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
MAJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	1
MED	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	87,5	0	0	0	0	0	0	0	0	8
ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	14
MO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	0	0	0	0	62,5	0	0	25	0	0	0	8
RU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	5
SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	50	0	0	0	2
SC	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	16,7	0	8,3	41,7	0	0	0	12
SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88,9	0	9
UN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	7	

77,4%

Tabela 6: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada da média de medidas por colônias das 26 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em letras colorida as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AF	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	80	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ADI	0	83,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	8,33	0	0	0	12
AF	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10
AN	0	0	0	60	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	5
AR	0	0	0	0	83,3	0	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CA	0	33,3	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0	0	3
CAR	0	0	0	0	0	0	86,7	0	6,7	0	0	0	0	0	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
CAU	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
CE	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
CY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	2
INT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83,3	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
JE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64,3	7,1	0	14,3	0	0	0	0	7,14	0	7,14	0	0	0	0	14
LA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
LI	0	0	0	0	0	0	9,1	0	9,1	0	0	0	0	0	81,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
LIT	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	0	6
MA	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
MAJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MED	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	8
ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	13
MO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	8
RU	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	5
SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	2
SC	0	18,2	0	0	0	9,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,1	0	0	0	0	9,09	0	9,09	45,5	0	0	0	11
SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88,9	0	9
UN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	7	

78,2%

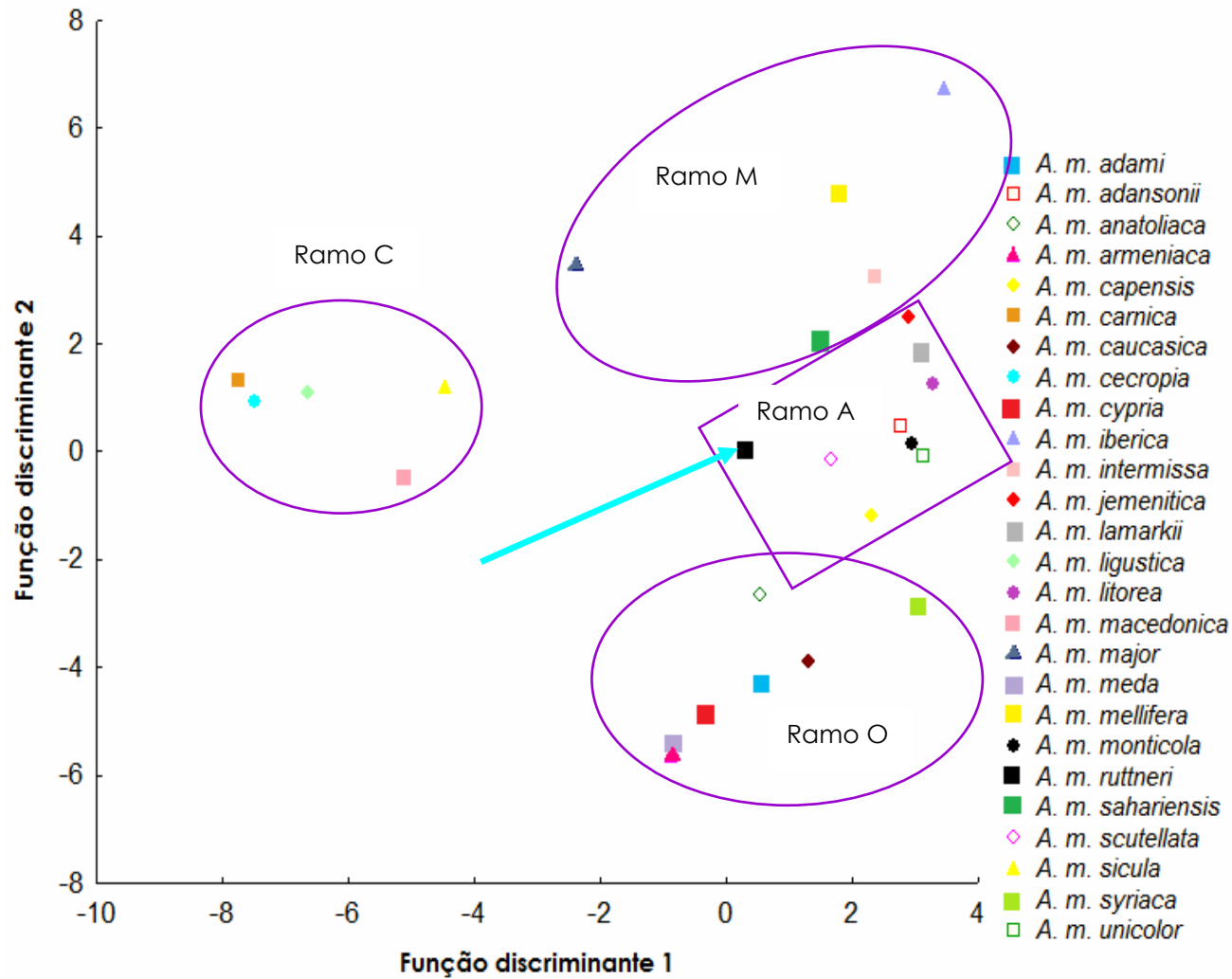


Figura 9: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 26 subespécies de *Apis mellifera*, analisadas quanto à média dos indivíduos provenientes da mesma colônia. Dentro dos balões os ramos evolutivos em destaque (seta) a subespécie *A. m. ruttneri*.

Um grupo mais afastado, deslocado para a direita em relação a função discriminante 1 formado pelas subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. cecropia*, *A. m. macedonia* e *A. m. sicula*, que compõem o ramo C. Na parte superior em relação a função discriminante 2, e deslocado para a esquerda em relação a função discriminante 1, encontramos as subespécies pertencentes ao ramo M, *A. m. mellifera*, *A. m. iberica*, *A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis* e *A. m. major*, sendo que esta última se localizou mais distante do grupo. Dentro deste grupo, ainda conseguimos visualizar a formação de dois subgrupos, um representado pelas subespécies localizadas no Norte da África, *A. m. intermissa* e *A. m. sahariensis* e o outro pelas subespécies, *A. m. iberica* e *A. m. mellifera* localizadas no Oeste do Mediterrâneo e no Norte da Europa, concordando com a classificação feita por Ruttner (1978). Abaixo deste grupo visualizamos as subespécies, *A. m. lamarckii*, *A. m. jemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor* e *A. m. capensis*, que compõe o ramo A. Finalizando, observamos as subespécies *A. m. caucasica*, *A. m. armeniaca*, *A. m. meda*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. adami*, *A. m. cypria* e *A. m. syriaca*, que constituem o ramo O. Ruttner (1988) menciona em seu livro, que amostras da subespécie *A. m. syriaca*, quando observada em gráficos formados a partir de análise multivariada (Análise de Componentes Principal), apresentam-se na periferia do grupo oriental, em direção as raças africanas. Nossos

resultados, apesar de serem gerados a partir de análise discriminante, apresentam esta mesma característica atribuída a subespécie *A. m. syriaca*. A subespécie *A. m. ruttneri* ficou mais próxima das abelhas pertencentes ao ramo A. Por esta subespécie ter sido descoberta mais recentemente (Sheppard *et al.*, 1997), ela não está incluída em nenhum ramo evolutivo.

Quando introduzimos amostra de abelha africanizada (Figura 10), ainda foi possível visualizar os quatro ramos evolutivos, e as abelhas africanizadas ficaram bastante próximas das subespécies do ramo O, em especial *A. m. adami*, *A. m. anatoliaca* e *a. m. caucasica*.

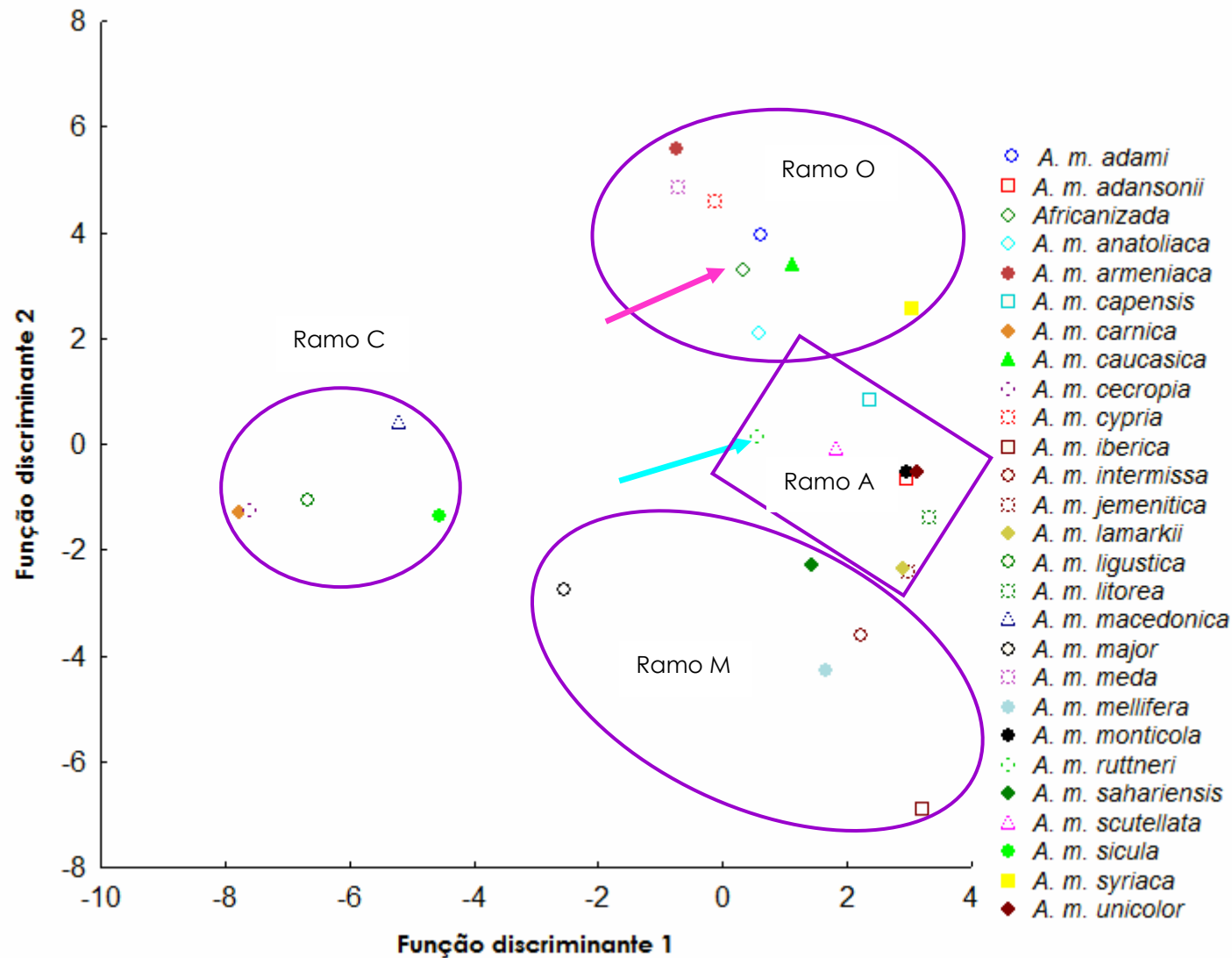


Figura 10: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 26 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas, analisadas quanto à média dos indivíduos provenientes da mesma colônia. Dentro dos balões os ramos evolutivos em destaque (seta azul) a subespécie *A. m. ruttneri* e (seta rosa) abelha africanizada.

O posicionamento das abelhas africanizadas próximas às subespécies do ramo O, contraria a maior parte dos trabalhos já realizados. Nestes trabalhos foram utilizados diversos tipos de marcadores moleculares, como isoenzimas (Lobo *et al.*, 1989; Del Lama *et al.*, 1990; Sheppard *et al.*, 1991b; Rotta, 1999) DNA mitocondrial (Sheppard *et al.*, 1991a; Rotta, 1999; Diniz *et al.*, 2003; Collet *et al.*, 2006) microssatélite (Clarke *et al.*, 2001) e mutações pontuais de DNA nuclear (Whitfield *et al.*, 2006). E verifica-se em todos o agrupamento das abelhas africanizadas juntamente com as abelhas do ramo A, em especial a subespécie *A. m. scutellata*.

Este posicionamento inesperado das abelhas africanizadas próximas as subespécies do ramo O ao invés das abelhas africanas, em especial *A. m. scutellata*, pode ter ocorrido segundo Rinderer e colaboradores (1990) por estas abelhas terem um perfil morfométrico diferente da subespécie *A. m. scutellata*. Ou mesmo devido a variações genético-morfológicas, ocorridas no decorrer do tempo, como observado por Francoy (2007, 2008 e 2009).

Através das distâncias quadradas de Mahalanobis, foi construído um dendograma de proximidade morfológica entre as subespécies (Figura 11), onde visualizamos no ramo mais basal, a presença das subespécies que formam o ramo evolutivo C e, logo acima, um ramo formado unicamente pela subespécie *A. m. major*, que nos gráficos de dispersão também

apareceu mais isolada. Em outra ramificação logo acima, visualizamos as subespécies do oeste do mediterrâneo e Norte europeu, integrantes do ramo M, *A. m. mellifera* e *A. m. iberica*. Mais acima, em outra ramificação encontramos *A. m. unicolor*, representante do ramo A. É possível que esta subespécie apareça sozinha por se localizar em uma ilha (Madagascar), isoladas de contato com outras colônias. Desta forma, não apresenta contato sexual com outras subespécies, o que impossibilita interferência de outro material genético, sofrendo então um possível efeito de *inbreeding*, o que pode influenciar nos padrões de venação das asas.

Mais acima, temos uma ramificação, formada pelas subespécies integrantes do ramo O, (*A. m. cyprica*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. armeniaca*, *A. m. adami*, *A. m. meda*) e a subespécie *A. m. caucasica*, a qual no passado foi agrupada junto com subespécies do ramo C, em dendograma formado a partir de dados de DNA mitocondrial (Cornuet *et al.*, 1991). Logo após, observamos em um mesmo ramo as subespécies *A. m. intermissa* e *A. m. ruttneri*, corroborando com trabalho de Sheppard e colaboradores (1997), no qual a subespécie *A. m. ruttneri* foi diferenciada como uma raça geográfica (localizada na ilha de Malta) a partir de análises discriminantes morfológicas. De acordo com este trabalho (Sheppard *et al.*, 1997), análises de DNA mitocondrial e características comportamentais, suportam uma relação bem mais estreita de *A. m. ruttneri* com a subespécie *A. m. intermissa* do Norte da África, do que com

subespécies Européias. Finalmente encontramos outro ramo formado pelas subespécies que constituem o ramo A, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. adansonii*, *A. m. jemenitica*, *A. m. monticola*, *A. m. capensis*, *A. m. lamarkii*, bem como *A. m. sahariensis* (ramo M) e *A. m. syriaca* (ramo O).

Ao introduzir amostra de abelha africanizada (Figura 12) na análise, observamos a mesma distribuição apresentada anteriormente na Fig. 11, porém com a presença das abelhas africanizadas em um ramo solitário. Estas abelhas apareceram como grupo irmão de todas as subespécies dos ramos A e O, sem apresentarem qualquer relação com as subespécies européias.

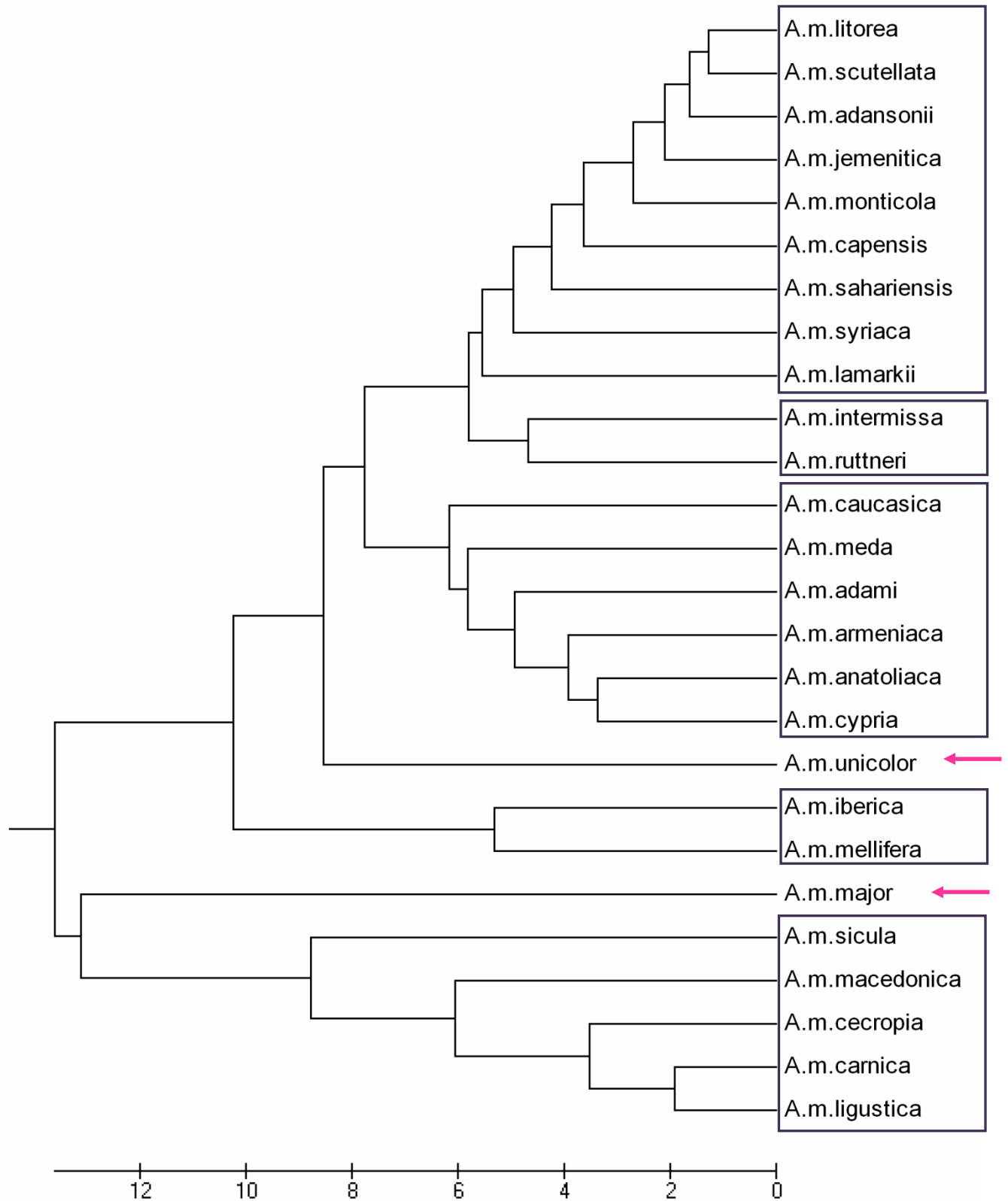


Figura 11: Dendrograma de proximidade morfológica das 26 subespécies de *Apis mellifera*. Características de todos os indivíduos foram utilizadas como base de dados.

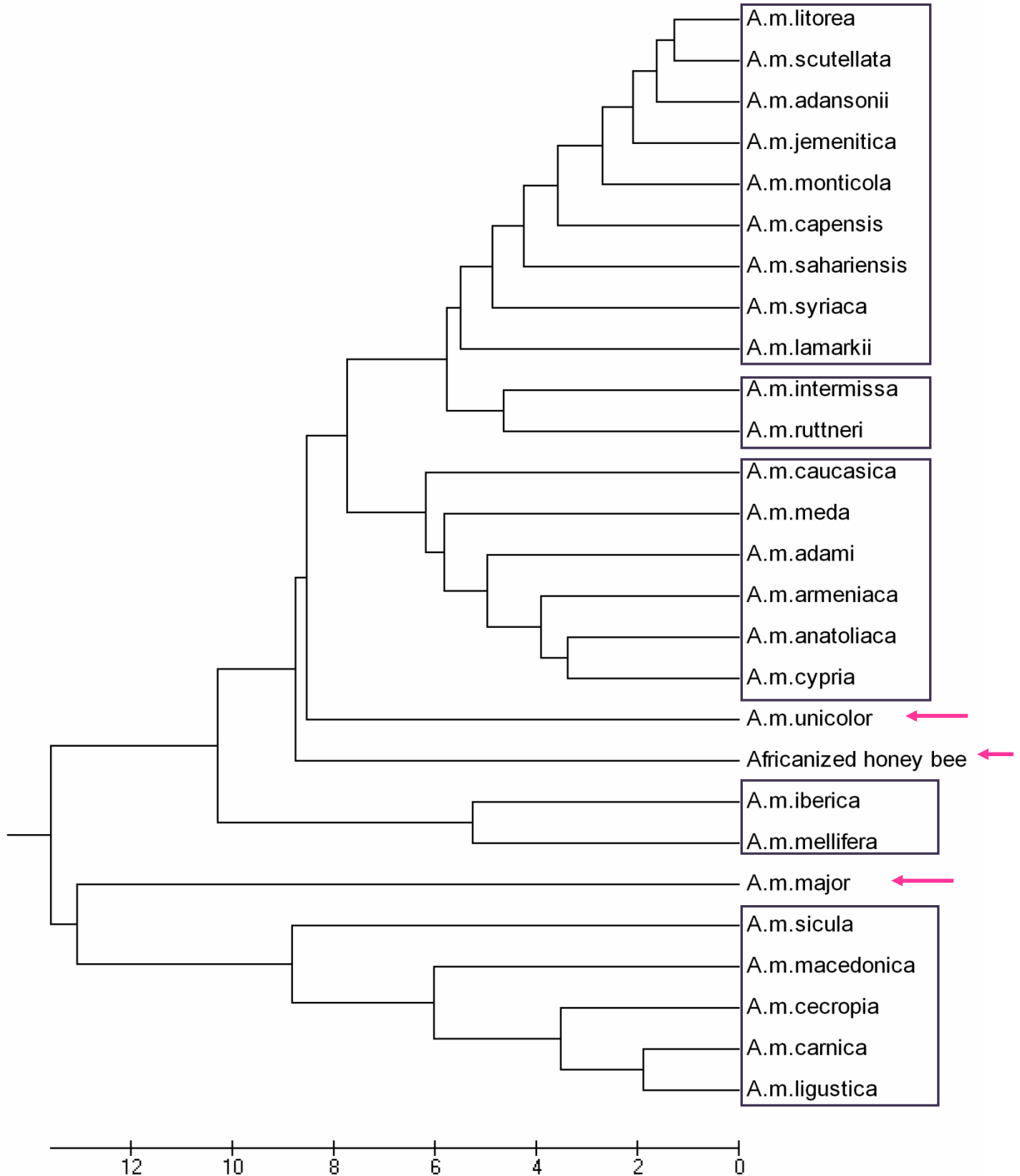


Figura 12: Dendrograma de proximidade morfológica das 26 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Características de todos os indivíduos foram utilizadas como base de dados.

4.1.2 Análise por indivíduo

Na análises discriminantes realizada por indivíduos, todas as 34 medidas geradas contribuíram significativamente ($<0,05$) para a discriminação dos grupos (Wilk's $\lambda = 0,003$; $p = 0,00001$), apresentando 69,7% de taxa de acerto na classificação (Tabela 7), sendo este um valor relativamente baixo. Nesta análise, apesar de ter ocorrido erro na classificação de todas as subespécies, estas foram classificadas com taxa de acerto de 89,7% dentro de seus respectivos ramos evolutivos. Ao acrescentar amostras de abelhas africanizadas (Tabela 8), a taxa de acerto foi razoavelmente menor, 69,3% (Wilk's $\lambda = 0,003$; $p = 0,00001$), sendo que 89,4% dos indivíduos foram classificados corretamente dentro de seu ramo evolutivo.

Nos testes de validação cruzada de acordo com as equações geradas a partir das análises discriminantes, apresentaram êxito de 62,4% de acerto na classificação das asas como pertencentes aos seus respectivos grupos (Tabela 09). Ao acrescentar amostras de abelha africanizada (AF) a taxa de acerto não foi alterada (Tabela 10). Nas análises realizadas envolvendo indivíduos, os resultados obtidos na taxa de acerto foram baixos, independente da presença ou não de amostras de abelhas africanizadas, sendo que a maior parte das amostras ainda foram classificadas fora de seu ramo evolutivo.

Tabela 7: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise discriminante por indivíduo das 26 subespécies de *Apis mellifera*. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	75,6	4,9	7,3	2,4	0	0	4,9	0	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	0	0	0	0	0	0	41
ADI	0,9	58,4	0,9	0	2,7	0	0,9	0	0,9	0	1,8	7,1	0,9	0	1,8	0	0	0,9	2,7	3,5	0,9	0,9	11,5	0	2,7	0,9	113
AN	4	10	62	4	0	0	4	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	4	0	2	0	50
AR	1,7	3,4	1,7	62,7	0	1,7	6,8	0	1,7	0	0	1,7	0	0	0,0	1,7	0	6,8	0,0	0	1,7	0	3,4	1,7	1,7	1,7	59
CA	0	13,3	3,3	0	40	0	3,3	0	0	0	0	3,3	3,3	0	3,3	0,0	0	3,3	6,7	0	3,3	0	13,3	0	0	3,3	30
CAR	0	0	0	0	0	75,3	0	9,3	0	0	0,7	0	0	12,7	0	1,3	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	150
CAU	0	0,8	1,7	0,8	0	0	90,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	3,3	0	0	120
CE	0	0	0	0	0	21,3	0,0	75,3	0	0	0	0	0	1,1	0	1,1	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	89
CY	0	0	5	10	0	2,5	5	0	50	0	2,5	2,5	0	2,5	0	0	0	7,5	2,5	0	0	0	5,0	0	5	0	40
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0,0	0	0	0	20
INT	0	5,1	1,7	0	0	0	1,7	0	0	1,7	57,6	0	6,8	3,4	3,4	0	0	0	5,1	1,7	5,1	0	0	0	5,1	1,7	59
JE	0	7,5	0	0	0,8	0	0,8	0	0,8	0	3	59,4	3,8	0	1,5	0	0	0,8	0	4,5	0	2,3	7,5	0	6	1,5	133
LA	1,4	4,3	0	0	0	2,9	0	0	1,4	0	1,4	2,9	72,9	0	0	0	0	0	5,7	0	2,9	0	0	0	4,3	0	70
LI	0	0	0	0,9	0	12,7	0	1,8	0	0	0	0	0	83,6	0	0	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	110
LIT	0	20	0	0	3,6	0	1,8	0	0	0	0	14,5	1,8	0	32,7	0	0	0	0	7,3	0	0	12,7	0	1,8	3,6	55
MA	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
MAJ	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
MED	0	0	0	1,3	0	0	2,5	0	3,8	0	0	1,3	0	0	0	0	0	83,5	0	0	1,3	1,3	1,3	0	1,3	2,5	79
ME	0,7	0	0,7	0	0,7	0	0	0	0	0,7	0,7	1,4	0,7	0,7	0	0	0	0,7	89,9	0	0,7	0	2,2	0	0	0	139
MO	0	1,3	1,3	0	0	0	2,5	0	0	0	0	7,6	3,8	0,0	1,3	0	0	0	2,5	55,7	1,3	0	17,7	0	1,3	3,8	79
RU	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4,1	0	2	0	2	0	0	2	2	0	79,6	0	6,1	0	0	0	49
SA	0	10	0	0	0	5	0	0	0	0	5	5	5	0	5	0	0	5	5	0	0	35	15,0	0	0	5	20
SC	0	7,6	2,5	0	2,5	0,8	0,8	0	0,8	0	0,8	10,9	0,8	0	5	0	0	4,2	4,2	4,2	3,4	0,8	45,4	0	2,5	2,5	119
SI	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	90	0	0	10
SY	0	2,3	0	0	0	0	1,2	0	1,2	0	0	9,3	4,7	0	1,2	0	0	3,5	0	0	0	0	2,3	0	73,3	1,2	86
UN	0	0	1,4	1,4	0	0	0	0	4,3	0	0	1,4	0	0	0	0	0	0	2,9	1,4	0,0	0	2,9	0	0	84,1	69

69,7%

Tabela 8: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise discriminante por indivíduo das 26 subespécies de *Apis mellifera* e abelha africanizada. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AF	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	77,8	4,4	0	6,7	2,2	0	0	4,4	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0	45
ADI	0,9	56,6	1,8	0,9	0	2,7	0	0,9	0	0,9	0	1,8	7,1	0,9	0	1,8	0	0	0,9	2,7	3,5	0,9	0,9	11,5	0	2,7	0,9	113
AF	0	4,1	83,7	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	2	0	49	
AN	6	10	0	58	6	0	0	4	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	4	0	2	0	50
AR	1,7	3,4	0,0	1,7	62,7	0	1,7	6,8	0	1,7	0	0	1,7	0	0	0	1,7	1,7	6,8	0	0	0	0	3	1,7	1,7	1,7	59
CA	0	13,3	3,3	3,3	0	40	0	3,3	0	0	0	3,3	3,3	0	3,3	0	0	3,3	6,7	0	3,3	0	10	0	0	3,3	30	
CAR	0	0	0	0	0	0	74,7	0	9,3	0	0	0,7	0	0	13,3	0	1,3	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	150
CAU	0	0,8	0	1,7	0,8	0	0	90,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	3,3	0	0	0	120
CE	0	0	0	0	0	0	20,2	0,0	76,4	0	0	0	0	0	1,1	0	1,1	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	89
CY	0	0	0	5	10	0	5	5	0	47,5	0	2,5	2,5	0	2,5	0	0	0	7,5	2,5	0	0	0	5	0	5	0	40
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	20
INT	0	5,1	0	1,7	0	0	0	1,7	0	0	1,7	57,6	0	6,8	3,4	3,4	0	0	0	5,1	1,7	5,1	0	0	0	5,1	1,7	59
JE	0	7,5	0	0,8	0	0,8	0	0,8	0	1,5	0,0	3,0	57,9	3,8	0	1,5	0	0	0,8	0	4,5	0	2,3	6,8	0	6,8	1,5	133
LA	1,4	4,3	1,4	0	0	0	2,9	0	0	0	0	1,4	4,3	74,3	0	0	0	0	0	4,3	0	2,9	0	0	0	2,9	0	70
LI	0	0	0,9	0	0,9	0	12,7	0	1,8	0	0	0	0	0	83,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	110
LIT	0	21,8	0	0	0	3,6	0	1,8	0	0	0	0	16,4	1,8	0	30,9	0	0	0	0	7,3	0	0	10,9	0	1,8	3,6	55
MA	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
MAJ	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
MED	0	0	1,3	0	1,3	0	0	2,5	0	3,8	0	0	0	0	0	1,3	0	0	82,3	0	0	1,3	1,3	1,3	0	1,3	2,5	79
ME	0,7	0	0	0,7	0	0,7	0	0	0	0	0,7	0,7	1,4	0,7	0,7	0	0	0	0,7	89,9	0	0,7	0	2,2	0	0	0	139
MO	0	1,3	0	1	0	0	0	2,5	0	0	0	0	7,6	3,8	0	1,3	0	0	0	1,3	57	1,3	0	17,7	0	1,3	3,8	79
RU	0	0	6,1	0	0	2,0	0	0	0	0	0	4,1	0	2	0	2	0	0	0	2	0	77,6	0	4,1	0	0	0	49
SA	0	10	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	5	5	0	5	0	0	5	5	0	0	35	15,0	0	0	5	20
SC	0	7,6	1,7	2,5	0	2,5	1,7	0,8	0	1,7	0	0,8	10,1	0,8	0	5	0	0	4,2	4,2	3,4	3,4	0,8	43,7	0	2,5	2,5	119
SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	90	0	0	10
SY	0	3,5	0	0	0	0	0	1,2	0	2,3	0	0	10,5	4,7	0	2,3	0	0	3,5	0	0	0	0	2,3	0	68,6	1,2	86
UN	1,4	0	0	0	1,4	0	0	0	0	4,3	0	0	1,4	0	0	0	0	0	0	2,9	1,4	0	0	2,9	0	0	84,1	69

69,3%

Tabela 9: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada dos indivíduos das 26 subespécies de *Apis mellifera*. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	61,0	4,9	12,2	2,4	0	0	4,9	2,4	4,9	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	2,4	0	0	0	0	0	2,4	0	41
ADI	0,9	54,0	2,7	0	2,7	0	0,9	0	0,9	0	1,8	7,1	1,8	0	1,8	0	0	0,9	2,7	3,5	0,9	0,9	12,4	0	3,5	0,9	113
AN	6	14	46	6	0	0	8	0	4	0	2	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	4	0	2	0	50
AR	3,4	3,39	3,4	55,9	0	1,7	8,5	0	3,4	0	0	1,7	0	0	0	1,7	0	6,8	0	0	1,7	0	3,4	1,7	1,7	1,7	59
CA	0	20	3,3	0	26,7	0	3,3	0	0	0	0	3,3	3,3	0	3,3	0	0	3,3	6,7	0	6,7	3,3	13,3	0	0	3,3	30
CAR	0	0	0	0	0	72	0	10,7	0	0	1,3	0	0	14	0	1,3	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	150
CAU	0	0,8	2,5	5	0	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	3,3	0	0,8	0	120
CE	0	0	0	0	0	22,5	0	73,0	0	0	0	0	0	2,2	0	1,1	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	89
CY	0	0	5	12,5	0	5	5	0	32,5	0	2,5	5	0	2,5	0	0	0	10	2,5	0	0	0	5	0	12,5	0	40
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	65	5	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	20
INT	0	5,1	1,7	0	0	0	1,7	0	0	1,7	54,2	0	6,8	3,4	3,4	0	0	0	6,8	1,7	5,1	0	0	0	6,8	1,7	59
JE	0	7,5	0,8	0	1,5	0	0,8	0	1,5	0	3,8	51,9	3,8	0	2,3	0	0	0,8	0,8	4,5	0	2,3	8,3	0	7,5	2,3	133
LA	1,4	4,3	0	0	0	2,9	0	0	1,4	0	1,4	5,7	70	0	0	0	0	0	5,7	0	2,9	0	0	0	4,3	0	70
LI	0	0	0	1,8	0	17,3	0	3,6	0	0	0	0	0	75,5	0	0	0	0,9	0	0	0	0	0	0,9	0	0	110
LIT	0	25,5	0	0	3,6	0	3,6	0	0	0	0	18,2	1,8	0	16,4	0	0	0	0	7,3	0	1,8	16,4	0	1,8	3,6	55
MA	0	0	0	0	0	10	0	15	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
MAJ	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
MED	0	0	1,3	1,3	0	0	2,5	0	3,8	0	0	1,3	1,3	0	0	1,3	0	77,2	0	0	3,8	0	2,5	0	1,3	2,5	79
ME	0,7	0	0,7	0	0,7	0	0	0	0	0,7	2,2	1,4	1,4	0,7	0	0	0	0,7	87,8	0	0,7	0	2,2	0	0	0	139
MO	0	1,3	1,3	0	0	0	2,5	0	0	0	0	7,6	6,3	0	1,3	0	0	0	2,5	51,9	1,3	0	17,7	0	1,3	5,1	79
RU	0	0	0	0	2,0	0	2,0	0	0	0	6,1	0	2,0	0	2,0	0	0	2,0	4,1	0	69,4	0	8,2	2,0	0	0	49
SA	0	10	0	0	0	5	0	0	0	0	5	10	5	0	5	0	0	5	10	0	0	25	15	0	0	5	20
SC	0,8	8,4	2,5	0	2,5	1,7	0,8	0	1,7	0	0,8	12,6	0,8	0	5,9	0	0	4,2	4,2	5,0	3,4	1,7	37,0	0	2,5	3,4	119
SI	0	0	10	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	20	0	0	0	0	40	0	0	10
SY	0	3,5	0	0	0	0	2,3	0	3,5	0	0	11,6	7,0	0	2,3	0	0	3,5	0	0	0	0	2,3	0	62,8	1,2	86
UN	0	0	1,4	1,4	0	0	0	0	4,3	0	0	2,9	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	0	0	4,3	0	0	76,8	69

62,4%

Tabela 10: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada dos indivíduos das 26 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AF	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MAJ	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SI	SY	UN	N
AD	64,4	4,4	0	8,9	4,4	0	0	4,4	2,2	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	2,2	0	0	0	2,2	0	2,2	0	45
ADI	0,9	51,3	2,7	2,7	0	2,7	0	0,9	0	0,9	0	1,8	7,1	1,8	0	1,8	0	0	0,9	2,7	3,5	0,9	0,9	12,4	0	3,5	0,9	113
AF	0	4,1	77,6	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	4,1	0	0	0	0	4,1	0	2	0	49
AN	6	14	0	46	6	0	0	8	0	4	0	2	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	4	0	2	0	50
AR	3,4	3,4	0	3,4	55,9	0	1,7	8,5	0	3,4	0	0	1,7	0	0	0	1,7	1,7	6,8	0	0	0	0	3,4	1,7	1,7	1,7	59
CA	0	20	3,3	3,3	0	23,3	0	3,3	0	0	0	0	3,3	3,3	0	3,3	0	0	3,3	6,7	0	6,7	3,3	13,3	0	0	3,3	30
CAR	0	0	0	0	0	0	71,3	0	10,7	0	0	1,3	0	0	14,7	0	1,3	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	150
CAU	0	0,8	0	2,5	5	0	0	85,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	3,3	0	0	0	120
CE	0	0	0	0	0	0	22,5	0	71,9	0	0	0	0	0	3,4	0	1,1	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	89
CY	0	0	2,5	5	12,5	0	5	5	0	32,5	0	2,5	5	0	2,5	0	0	0	10	2,5	0	0	0	5	0	10	0	40
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	65	5	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	20
INT	0	5,1	0	1,7	0	0	0	1,7	0	0	1,7	52,5	1,7	6,8	3,4	3,4	0	0	0	6,8	1,7	5,1	0	0	0	6,8	1,7	59
JE	0	7,5	0	0,8	0	1,5	0	0,8	0	1,5	0	3	54,1	3,8	0	2,3	0	0	0,8	0,8	4,5	0	2,3	7,5	0	6,8	2,3	133
LA	1,4	4,3	1,4	0	0	0	2,9	0	0	1,4	0	1,4	5,7	70	0	0	0	0	0	5,7	0	2,9	0	0	0	2,9	0	70
LI	0	0	0,9	0	1,8	0	16,4	0	4,5	0	0	0	0	0	75,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	0	110
LIT	0	23,6	0	0	0	3,6	0	3,6	0	0	0	0	20	1,8	0	18,2	0	0	0	0	7,3	0	1,8	14,5	0	1,8	3,6	55
MA	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	20
MAJ	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
MED	0	0	1,3	1,3	1,3	0	0	2,5	0	3,8	0	0	0	0	0	1,3	1,3	0	77,2	0	0	2,5	1,3	2,5	0	1,3	2,5	79
ME	0,7	0	0	0,7	0	0,7	0	0	0	0	0,7	2,9	1,4	1,4	0,7	0	0	0	0,7	87,1	0	0,7	0	2,2	0	0	0	139
MO	0	1,3	0	1,3	0	0	0	2,5	0	0	0	1,3	6,3	6,3	0	1,3	0	0	0	2,5	51,9	1,3	0	17,7	0	1,3	5,1	79
RU	0	0	6,1	0	0	2	0	2	0	0	0	6,1	0	2	0	2	0	0	0	6,1	0	65,3	0	6,1	2	0	0	49
SA	0	10	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	10	5	0	5	0	0	5	10	0	0	25	15	0	0	5	20
SC	0,8	8,4	1,7	2,5	0	3,4	1,7	0,8	0	1,7	0	0,84	11,8	0,8	0	5,9	0,8	0	4,2	4,2	5	3,4	1,7	33,6	0	3,4	3,4	119
SI	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	20	0	0	0	0	40	0	0	10
SY	0	3,5	0	0	0	0	0	1,2	0	3,5	0	0	12,8	7,0	0	2,3	0	0	3,5	0	0	0	0	2,3	0	62,8	1,2	86
UN	1,4	0	0	0	1,4	0	0	0	0	4,3	0	0	2,9	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	0	0	4,3	0	0	76,8	69

62,4%

A partir da análise de discriminantes canônicas das 34 medidas de deformações relativas, foi possível observar que nos gráficos de dispersão (Figura 13), que as subespécies não ficaram tão bem agrupadas de acordo com seus ramos evolutivos. Foi possível visualizar apenas o grupo formado pelas subespécies do ramo C. As abelhas da subespécie *A. m. ruttneri* ficaram localizadas próximas a subespécie *A. m. intermissa*, mais uma vez corroborando com trabalho realizado por Sheppard e colaboradores (1997). Diferente do verificado na análise realizada utilizando a média de todas as colônias para cada subespécie observado na Figura 9. Ao introduzir amostras de abelhas africanizadas (Figura 14), visualizamos uma distribuição similar das subespécies à observada na análise anterior (Figura 13), com uma única diferença, que foi a inclusão das abelhas africanizadas próxima as subespécies *A. m. intermissa*, *A. m. ruttneri* e *A. m. cypria*.

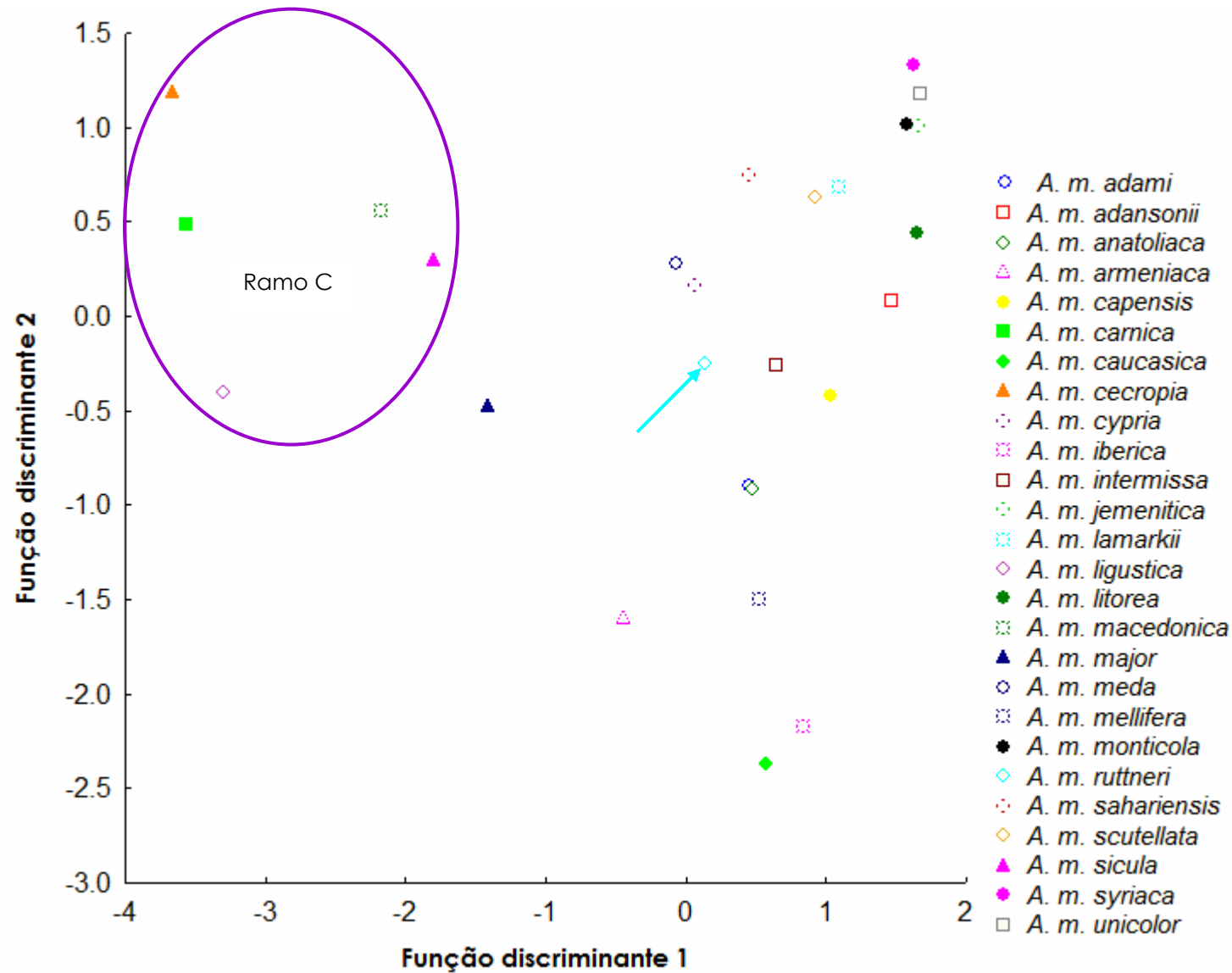


Figura 13: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 26 subespécies de *Apis mellifera*, a partir da análise de indivíduos. Dentro do balão as subespécies pertencentes ao ramo C e em destaque (seta azul) a subespécie *A. m. ruttneri*.

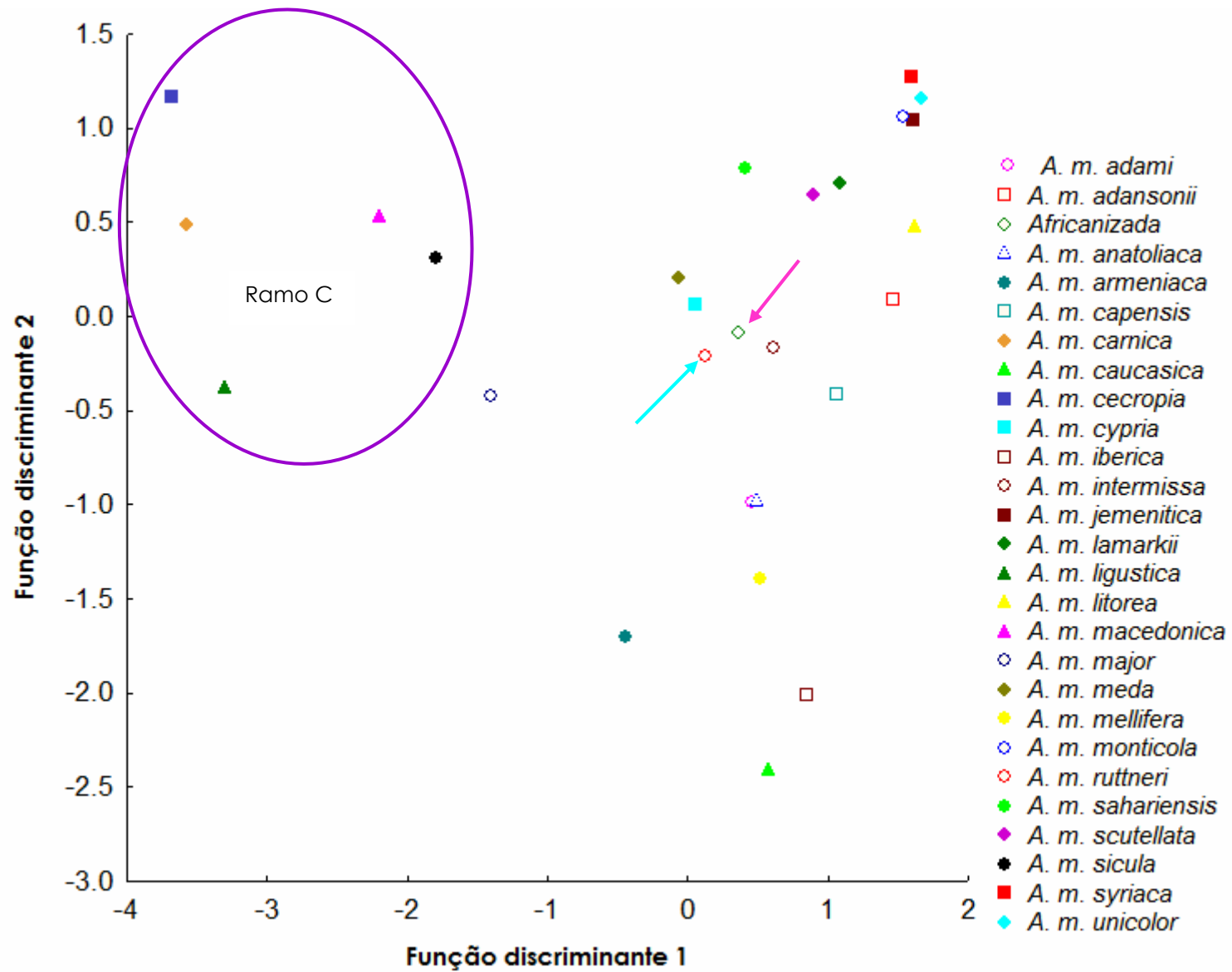


Figura 14: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 26 subespécies de *Apis mellifera*, a partir da análise de indivíduos. Dentro do balão as subespécies pertencentes ao ramo C, em destaque (seta azul) a subespécie *A. m. ruttneri* e (seta rosa) a abelha africanizada.

Ao analisar os resultado da classificação das subespécies de *Apis mellifera* fornecidos pelos testes de validação cruzada, observamos a grande diferença apresentada na taxa de acerto quando trabalhamos com medidas referentes à média da colônia observado nas tabelas 5 e 6, e quando trabalhamos com medidas individuais observado nas tabelas 9 e 10. De acordo com Ruttner (1988), as subespécies não são formada por um grupo de indivíduos uniformes, mas sim por uma grande variedade de populações, as quais estão expostas a diferentes e diversos processos evolutivos. Desta forma para estabelecer características morfológicas de uma subespécie, devemos trabalhar com média de colônia, pois assim eliminamos parte da variabilidade intracolônia que passa a ser aleatória e não medidas de indivíduos. Outro fator observado, é que a presença de amostra de abelhas africanizadas nestas análises, em relação à taxa de acerto, foi indiferente, praticamente não alterando o resultado final da classificação das subespécies dentro de seu respectivo ramo evolutivo.

4.2 Morfometria Tradicional

4.2.1 Análise por colônia

Para realizar a análise estatística, a partir de medidas de morfometria tradicional, foi necessária a mensuração de comprimento e largura da asa anterior, tamanho das veias cubitais a e b, além da medida de mais 11 ângulos formados entre as nervuras das asas. Porém algumas das

subespécies de *Apis mellifera* (*A. m. major* e *A. m. sicula*) foram excluídas destas análises, por terem apenas uma colônia amostrada impossibilitando a execução da análise discriminante. Desta forma apenas 24 das 26 subespécies foram utilizadas nesta análise.

Das 15 medidas analisadas, 11 contribuíram significativamente ($<0,05$) nas análises discriminantes para a discriminação dos grupos (Wilk's $\lambda = 0,0008$; $p = 0,00001$), apresentando 74,5% de taxa de acerto na classificação (Tabela 11). Nesta análise, a taxa de acerto foi relativamente baixa, visto que das 24 subespécies, apenas oito apresentaram resultado superior a 80% na identificação dentro de seu respectivo grupo. Ao introduzirmos amostras de abelhas africanizadas (AF), a taxa de acerto na identificação das amostras dentro de sua respectiva subespécie foi de 76,6% (Tabela 12) (Wilk's $\lambda = 0,0007$; $p = 0,00001$), sendo que das 25 amostras analisadas, 15 apresentaram taxa de acerto inferior ou igual a 80%, e na maior parte dos casos as amostras foram identificadas erroneamente, inclusive em relação ao seu ramo evolutivo, como podemos observar (Tabela 12) no caso de *A. m. syriaca* pertencente ao ramo O, que foi identificada como uma subespécies pertencente ao ramo A, sendo que ao incluirmos amostras de abelhas africanizadas, a taxa de acerto (76,6%) foi pouco maior que na análise anterior (74,5%).

Nos testes de validação cruzada de acordo com as equações geradas a partir das análises discriminantes houve êxito de 57,7% na classificação das amostras como pertencentes as suas respectivas subespécies (Tabela 13). Embora uma grande parte das subespécies tenham sido classificadas erroneamente estas apresentaram taxa de acerto de 87,2% na classificação dentro de seu ramo evolutivo. Ao acrescentar amostras de abelhas africanizadas esta taxa aumentou para 88,7% de acerto dentro do ramo evolutivo. Já a classificação dentro da respectiva subespécie foi de 58,7% (Tabela 14).

Tabela 13: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada por média das colônias de 24 subespécies de *Apis mellifera*. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em letras colorida as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SY	UN	N
AD	0	0	60	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	5
ADI	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	7,1	0	7,1	0	0	0	0	0	14,3	0	0	7,1	7,1	7,1	14
AN	20	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	5
AR	0	0	0	50	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	6
CA	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	5
CAR	0	0	0	0	0	83,3	0	4,2	4,2	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
CAU	16,7	0	0	0	0	0	50	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	8,3	0	0	12
CE	0	0	0	0	0	33,3	0	44,4	0	0	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0	0	0	11,1	0	0	9
CY	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	25	0	4
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
INT	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
JE	7,7	7,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53,8	0	0	7,7	0	0	0	0	0	0	0	15,4	7,7	13
LA	0	12,5	0	0	12,5	0	0	0	0	0	0	0	62,5	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	8
LI	0	0	0	0	0	45,5	0	0	0	0	0	0	0	54,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
LIT	0	33,3	0	0	16,7	0	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	6
MA	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
MED	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	9
ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	14
MO	0	14,3	0	0	0	0	14,3	0	0	0	0	0	14,3	0	0	0	0	0	28,6	0	14,3	14,3	0	0	7
RU	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	60	0	0	0	0	5
SA	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
SC	0	16,7	0	0	8,3	0	8,3	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	8,3	0	12
SY	6,3	6,3	0	0	0	0	0	6,3	0	0	0	31,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	31,3	6,3	16
UN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14,3	0	85,7	7

57,7%

Tabela 14: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada das médias de colônias de 24 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em letras colorida, as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral).

	AD	ADI	AF	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SY	UN	N
AD	0	0	0	60	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	5
ADI	0	57,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,1	0	0	0	0	0	14,3	0	0	7,1	7,1	7,1	14
AF	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10
AN	20	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	5
AR	0	0	0	0	50	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	6
CA	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0	5
CAR	0	0	0	0	0	0	83,3	0	4,2	4,2	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
CAU	16,7	0	0	0	0	0	0	41,7	0	0	8,3	0	0	0	0	8,3	0	0	0	8,3	0	0	8,3	8,3	0	12
CE	0	0	0	0	0	0	33,3	0	44,4	0	0	0	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0	0	11,1	0	0	9
CY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	25	0	4
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
INT	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
JE	7,7	7,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53,8	0	0	7,7	0	0	0	0	0	0	0	15,4	7,7	13
LA	0	12,5	0	0	0	12,5	0	0	0	0	0	0	0	62,5	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	8
LI	0	0	0	0	0	0	45,5	0	0	0	0	0	0	0	54,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
LIT	0	33,3	0	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	6
MA	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
MED	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88,9	0	0	0	0	0	0	0	9
ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	14
MO	0	0	14,3	0	0	0	0	14,3	0	0	0	0	0	14,3	0	0	0	0	0	28,6	0	14,3	14,3	0	0	7
RU	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	60	0	0	0	0	5
SA	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
SC	0	16,7	0	0	0	8,3	0	8,3	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	8,3	0	12
SY	6,25	6,25	0	0	0	0	0	0	6,3	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5	37,5	6,3	16
UN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14,3	0	85,7	7	

58,7%

No gráfico de dispersão das subespécies (Figura 15), elaborado a partir das posições relativas dos centróides das distribuições dos grupos, podemos visualizar a presença dos quatro ramos evolutivos, sendo que semelhante ao observado na análise de morfometria geométrica, as subespécies representantes do ramo C, se organizaram mais afastadas das demais amostras em relação a função discriminante 1. Na parte superior do gráfico em relação a função discriminante 2, estão localizadas as subespécies *A. m. mellifera*, *A. m. intermissa* e *A. m. iberica*, formando o ramo M. Logo abaixo, estão as subespécies componentes do ramo A, juntamente com elas estão as subespécie *A. m. sahariensis* (ramo M) e *A. m. ruttneri*. Abaixo, no centro em relação a função discriminante 1, estão as subespécies que compõem o ramo O. Ao acrescentarmos amostras de abelhas africanizadas (AF), observamos a mesma disposição das subespécies. A única mudança observada foi a inclusão das abelhas africanizadas (Figura 16) que se localizaram juntamente com as amostras integrantes do ramo A, próxima das subespécies, *A. m. lamarckii* e *A. m. ruttneri*. O posicionamento das abelhas africanizadas no gráfico de dispersão (Figura 16) próximo as subespécies pertencentes ao ramo A (*Apis m. scutellata*, *Apis m. unicolor*, *Apis m. adansonii*, *Apis m. capensis*, *Apis m. litorea*, *Apis m. monticola*, *Apis m. lamarkii* e *Apis m. jemenitica*), corrobora com o trabalho de Arias & Sheppard (1996), tendo em vista que estas abelhas correspondem a um polihíbrido entre várias subespécies no qual

as características africanas são predominantes, embora alguns trabalhos (Francoy *et al.*, 2007, 2008, 2009) demonstrem a ocorrência de variação no perfil genético-morfológico e nossos dados fornecidos a partir da análise de morfometria geométrica também demonstrem um outro agrupamento, como já mencionamos anteriormente.

Através das distâncias quadradas de Mahalanobis, construímos dendograma de proximidade morfológica (Figura 17), onde observamos um ramo mais distante formado pelas subespécies *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. cecropia* e *A. m. macedonica* integrantes do ramo C, no ramo seguinte, estão todas as outras 20 subespécies, agrupadas da seguinte forma: em um ramo mais distante temos as subespécies *A. m. iberica* e *A. m. mellifera*, que compõem um subgrupo dentro do ramo M, formado pela abelhas localizadas no Oeste do Mediterrâneo e no Norte da Europa. Outro ramo é formado pelas subespécies *A. m. litorea*, *A. m. adansonii*, *A. m. syriaca*, *A. m. scutellata*, *A. m. lamarckii* e *A. m. jemenitica*, representantes do ramo A, com exceção de *A. m. syriaca*, que pertence ao ramo O. O segundo se fragmenta de maneira que as subespécies *A. m. montico*, *A. m. sahariensis*, *A. m. unicolor*, *A. m. intermissa* e *A. m. capensis* fiquem agrupadas. No próximo ramo, temos a subespécie *A. m. ruttneri* isolada, e por último temos um ramo formado pelas subespécies *A. m. meda*, *A. m. armeniaca*, *A. m. cypria*, *A. m. caucasica*, *A. m. anatoliaca* e *A. m. adami*, todas integrantes do ramo O. Ao incluirmos amostras de

abelhas africanizadas na análise (Figura 18), observamos as mesmas características de agrupamento apresentada no dendograma da análise anterior, porém a novidade é a inserção das abelhas africanizadas que se localizou em um ramo individual, ao lado do ramo formado pelas subespécies *A. m. litorea*, *A. m. adansonii*, *A. m. syriaca*, *A. m. scutellata*, *A. m. lamarckii* e *A. m. jemenitica*. Nossos dados corroboram em partes com a filogenia proposta por Arias e Sheppard (1996), construída a partir de dados de seqüência de DNA mitocondrial, onde as subespécies *A. m. adansonii* e *A. m. scutellata* aparecem agrupadas com abelhas africanizadas. Também concordam com o agrupamento formado pelas subespécies integrantes do ramo C, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* e *A. m. macedonica*. Porém se contrapõe ao agrupamento apresentado por Arias e Sheppard (1996) para o ramo M, onde as subespécies *A. m. iberica*, *A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis* e *A. m. sicula*, aparecem agrupadas, sendo que em nossos dados, apenas *A. m. mellifera* e *A. m. iberica* aparecem juntas.

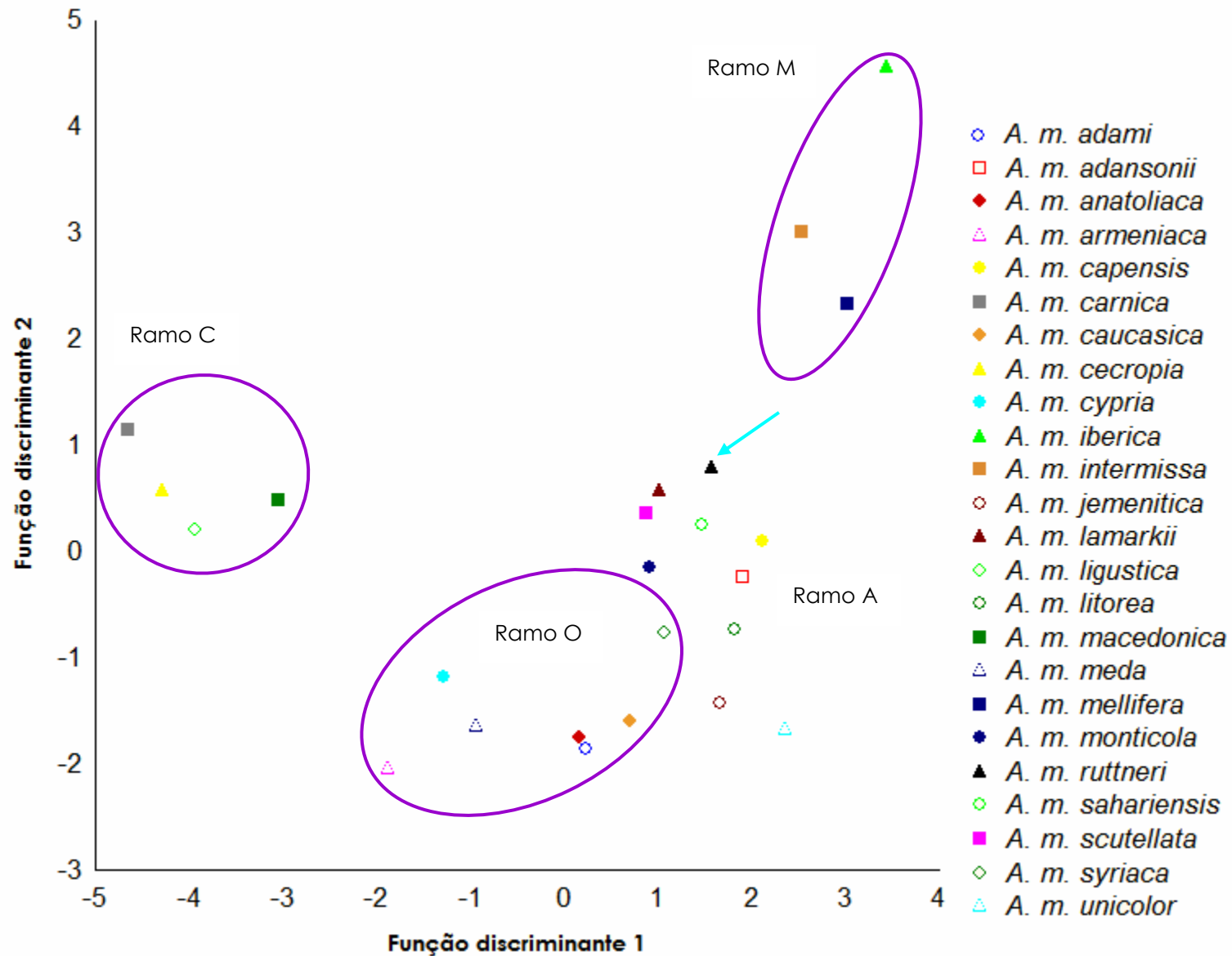


Figura 15: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas de 24 subespécies de *Apis mellifera*, analisadas quanto à média dos indivíduos provenientes da mesma colônia. Em destaque os grupos representando os quatro ramos evolutivos e a seta indica a subespécie *A. m. ruttneri*.

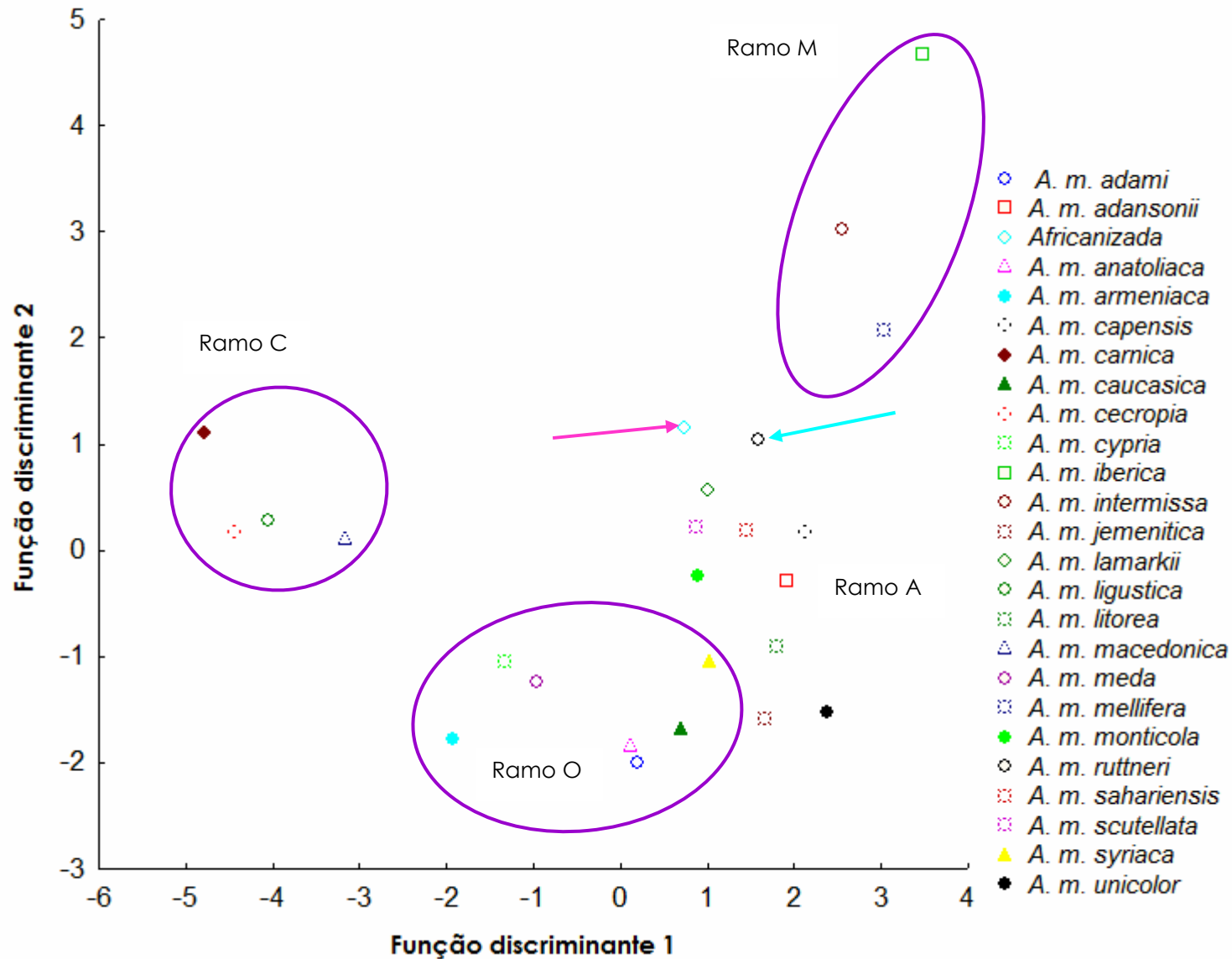


Figura 16: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 24 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas, analisadas quanto à média dos indivíduos provenientes da mesma colônia. Em destaque os grupos formando os quatro ramos evolutivos e as setas indicam as subespécies *A. m. ruttneri* (azul) e abelhas africanizadas (rosa).

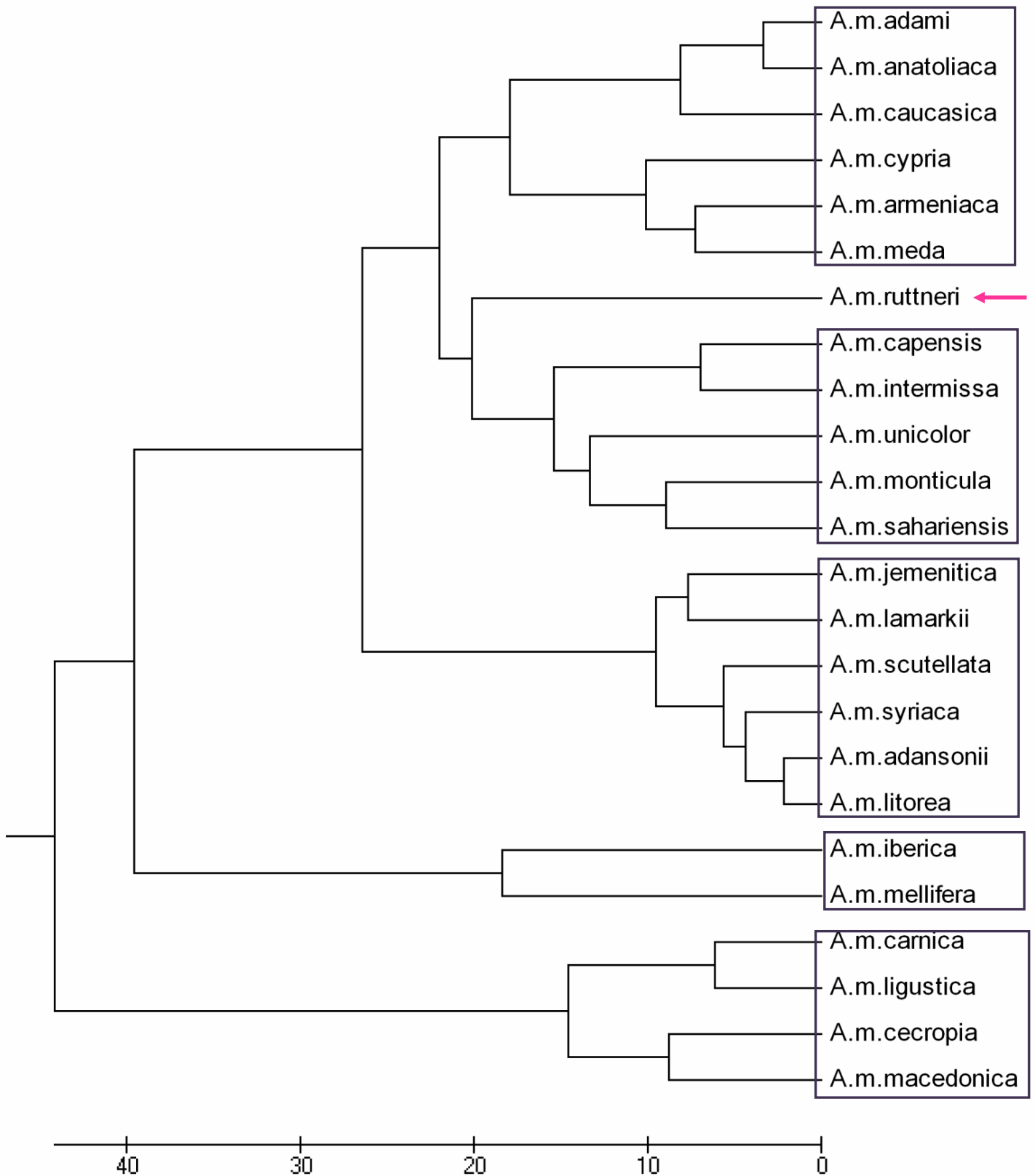


Figura 17: Dendrograma de proximidade morfológica de 24 subespécies de *Apis mellifera*. Características de todos os indivíduos foram utilizadas como base de dados.

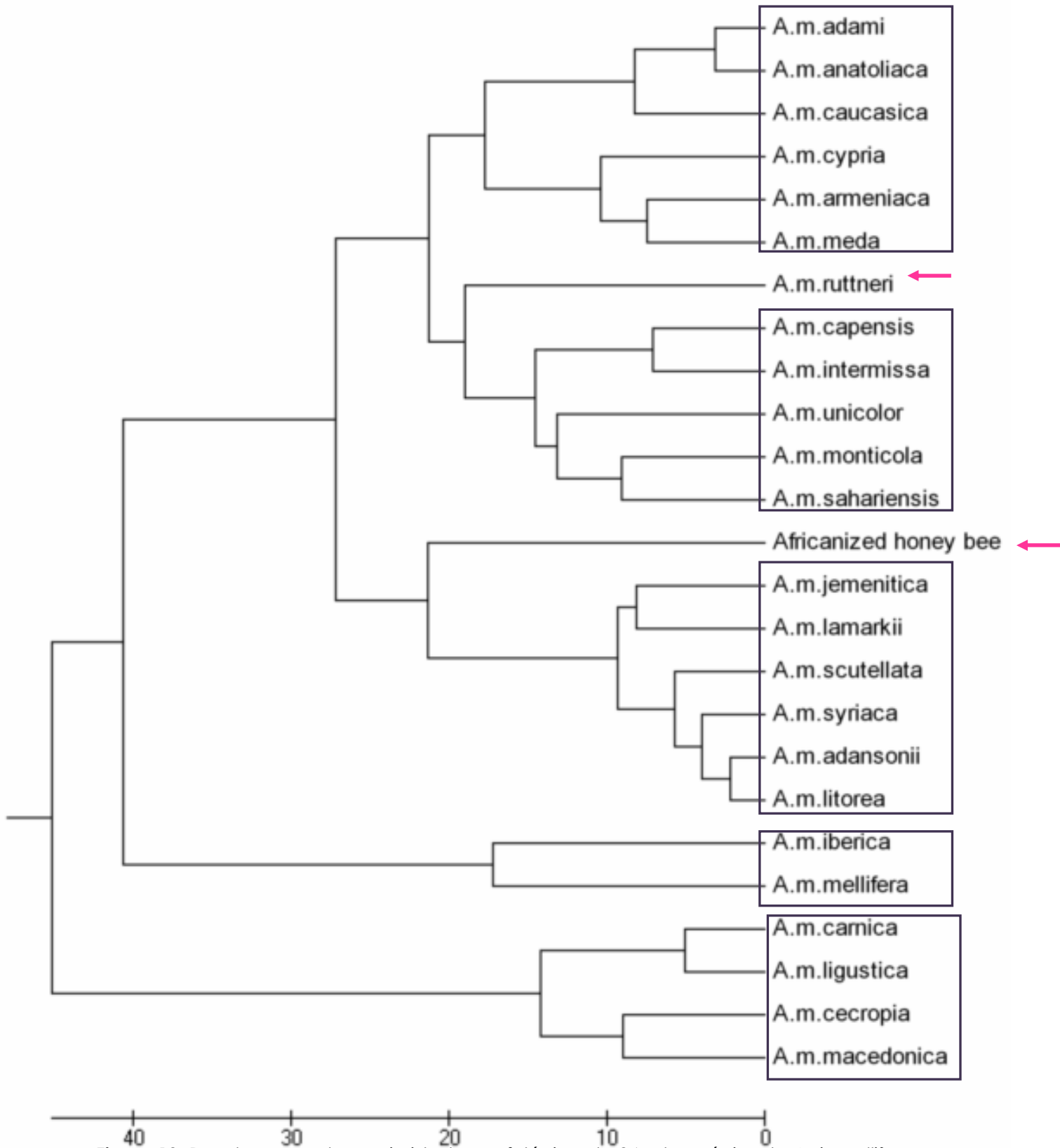


Figura 18: Dendrograma de proximidade morfológica de 24 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Características de todos os indivíduos foram utilizadas como base de dados.

4.2.2 Análise por indivíduo

De acordo com as análises discriminantes, das 15 medidas analisadas, 11 contribuíram significativamente ($<0,05$) para a discriminação dos grupos (Wilk's $\lambda = 0,1234060$; $p = 0,0001$), apresentando 27,5% de taxa de acerto na classificação (Tabela 15). Sendo que na análise em questão, apenas uma subespécie (*A. m. carnica*) apresentou taxa de acerto superior a 80%. Também observamos que duas subespécies (*A. m. litorea* e *A. m. macedonica*) apresentaram taxa de acerto igual a zero, e as outras subespécies, embora ocorra algum nível de acerto na classificação, estas tiveram grande parte de suas amostras identificadas como subespécies diferentes e ainda pertencentes a ramos evolutivos diferentes, apresentando taxa de acerto de apenas 60,6% para a classificação dentro do respectivo ramo evolutivo. Ao acrescentarmos amostra de abelhas africanizadas (AF) (Tabela 16) na análise, observamos um pequeno aumento na taxa de acerto, que foi de 35,5% (Wilk's $\lambda = 0,1222$; $p = 0,00001$), apesar de esta ainda ser considerada baixa. Ainda observamos que apenas uma subespécie (*A. m. carnica*) apresentou taxa de acerto superior a 80%, como visto na análise anterior. Também observamos que duas subespécies (*A. m. litorea* e *A. m. anatoliaca*) apresentaram taxa de acerto igual a zero, e as outras subespécies, tiveram grande parte de suas amostras identificadas como subespécies diferentes e ainda pertencentes a ramos evolutivos diferentes, sendo que a taxa de

acerto para a classificação correta dentro dos respectivos ramos evolutivos foi de apenas 57,7%.

Nos testes de validação cruzada de acordo com as equações geradas a partir das análises discriminantes, houve êxito de 32,1% de acerto na classificação das asas como pertencentes aos seus respectivos grupos (Tabela 17), ao acrescentar amostras de abelhas africanizadas (AF), obtivemos êxito de 32,7% na taxa de acerto (Tabela 18). Estes valores são considerados bastante baixos, assim como o valor da taxa de acerto na análise discriminante.

Tabela 15: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise discriminante por indivíduo de 24 subespécies de *Apis mellifera*. Em lilás, estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em roxo as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral).

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SY	UN	N
AD	7,7	11,5	0	1,9	0	3,8	9,6	0	3,8	0	0	13,5	1,9	0	0	3,8	7,7	11,5	0	0	0	0	21,2	1,9	52
ADI	0	25,2	0	1,5	1,5	0,8	9,2	0	1,5	0	4,6	9,2	3,1	0	0	0	5,3	11,5	3,1	5,3	0,8	3,1	9,2	5,3	131
AN	5,3	1,8	5,3	0	0	0	19,3	1,8	1,8	0	1,8	7	3,5	0	0	0	12,3	10,5	1,8	0	0	1,8	22,8	3,5	57
AR	0	5,4	0	33,9	1,8	7,1	7,1	1,8	3,6	0	0	3,6	0	10,7	0	0	10,7	0	1,8	5,4	1,8	1,8	3,6	0	56
CA	0	13,2	0	0	10,5	10,5	5,3	0	0	2,6	5,3	5,3	2,6	0	0	0	5,3	0	0	5,3	0	10,5	13,2	10,5	38
CAR	0	0	0	0,9	0	80,6	0	7,5	0	0	1,3	0	0	4,4	0	0	1,3	0,4	0	0,4	0	1,3	1,3	0,4	227
CAU	0,9	6,9	0	6	0	0,9	31	0	0,9	0	0	12,9	1,7	1,7	0,9	0	3,4	12,1	3,4	0,9	0	2,6	7,8	6	116
CE	0	0	0	0	0	61,2	0	31,8	0	0	0	2,4	0	2,4	0	1,2	0	1,2	0	0	0	0	0	0	85
CY	8,2	4,1	2	2	0	12,2	4,1	0	12,2	0	2	4,1	6,1	0	0	0	8,2	4,1	2	0	0	4,1	22,4	2	49
IB	0	5,6	0	0	0	0,0	0	0	0	27,8	16,7	0	0	0	0	0	0	44,4	0	5,6	0	0	0	0	18
INT	0	5,5	0	0	0	4,1	0	0	1,4	1,4	47,9	1,4	5,5	0	0	0	1,4	15,1	0	4,1	0	4,1	8,2	0	73
JE	1,7	10,7	2,5	3,3	0	0,8	5	1,7	0	0	3,3	28,9	2,5	0	1,7	0	5,8	8,3	0,8	1,7	0	0	18,2	3,3	121
LA	0	10,2	0	3,4	0	6,8	3,4	0	1,7	0	11,9	10,2	16,9	1,7	0	0	5,1	8,5	1,7	3,4	0	8,5	5,1	1,7	59
LI	0,9	1,9	0,9	2,8	0	58,3	0	1,9	0,9	0	0,9	0	0,9	19,4	0	0	4,6	0	1,9	2,8	0	0,9	0	0,9	108
LIT	0	15,4	0	0	0	1,9	1,9	0	3,8	0	1,9	19,2	1,9	0	0	0	5,8	5,8	1,9	7,7	0	1,9	17,3	13,5	52
MA	5,6	0	0	0	0	55,6	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	0	5,6	11,1	0	18
MED	1,3	5,1	0	9	0	1,3	5,1	0	0	0	1,3	7,7	2,6	7,7	0	0	47,4	2,6	0	3,8	0	0	3,8	1,3	78
ME	0,8	4,6	0	0	0	1,5	1,5	0	0	0,8	6,1	3,1	3,1	0	0	0	0,8	62,6	0,8	0	0,8	3,8	6,1	3,8	131
MO	1,5	13,2	0	4,4	0	8,8	7,4	1,5	1,5	0	1,5	7,4	2,9	0	2,9	0	7,4	5,9	16,2	2,9	0	2,9	11,8	0	68
RU	0	4,2	0	4,2	0	4,2	2,1	0	0	2,1	4,2	2,1	4,2	0	0	0	6,3	4,2	0	56,3	0	4,2	2,1	0	48
SA	0	25	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	10	15	10	0	5	15	0	5	20
SC	0,9	15,8	0	0,9	0,9	4,4	9,6	3,5	0,9	1,8	7,0	4,4	2,6	2,6	0	0	0	12,3	4,4	0,9	0	9,6	14	3,5	114
SY	2,2	8,8	0	0	0,7	2,9	5,8	0	2,2	0,0	5,8	9,5	0,7	0,7	0	0	2,9	10,9	0,7	1,5	0	6,6	32,8	5,1	137
UN	0	6,3	0	0	1,6	0	7,8	0	0	0	1,6	7,8	0	0	0	0	4,7	6,3	0	0	0	3,1	10,9	50	64

27,5%

Tabela 16: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise discriminante por indivíduo de 24 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Em destaque na cor lilás, estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em roxo, as subespécies que apresentaram taxa de acerto igual a zero, e em negrito na parte inferior esquerda, o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral).

	AD	ADI	AF	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SY	UN	N
AD	7,7	11,5	0	0	1,9	0	3,8	9,6	0	3,8	0	1,9	13,5	1,9	0	0	3,8	7,7	11,5	0	0	0	0	19,2	1,9	52
ADI	0	24,4	3,1	0	1,5	1,5	0,8	9,2	0	1,5	0	4,6	9,2	3,1	0	0	0	5,3	11,5	3,1	3,8	0,8	3,1	9,2	4,6	131
AF	0	16,3	34,7	0	4,1	0	0	6,1	0	0	0	12,2	2	0	0	0	0	10,2	6,1	0	0	0	4,1	2,0	2	49
AN	0	0,0	11,1	0	0	0	0	22,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,1	33,3	0	0	0	0	22,2	0	9
AR	0	5,4	0	0	33,9	1,8	8,9	7,1	0	3,6	0	0	1,8	0	10,7	0,0	0	12,5	0	1,8	5,4	1,8	1,8	3,6	0	56
CA	0	13,2	2,6	0	0	10,5	10,5	5,3	0	0	2,6	5,3	2,6	2,6	0,0	2,6	0	5,3	0	0	2,6	0	10,5	13,2	10,5	38
CAR	0	0	0	0	0,9	0	81,1	0	7,5	0	0	1,3	0	0	4	0	0	1,3	0,4	0	0,4	0	1,3	1,3	0,4	227
CAU	0,9	6,0	0,9	0	6	0	0,9	31	0	0,9	0	0	12,9	1,7	1,7	0,9	0	3,4	12,1	3,4	0,9	0	2,6	7,8	6	116
CE	0	0	0	0	0	0	58,8	0	32,9	1,2	0	0	2,4	0,0	2,4	0	1,2	0	1,2	0	0	0	0,0	0,0	0	85
CY	8,2	4,1	2,0	0	2	0	12,2	2	0	12,2	0	2	4,1	6,1	0	0	0	8,2	4,1	2	0	0	4,1	24,5	2	49
IB	0	5,6	5,6	0	0	0	0	0	0	0	27,8	11,1	0	0	0	0	0	0	44,4	0	5,6	0	0	0	0	18
INT	0	5,5	1,4	0	0	0	4,1	0	0	1,4	1,4	47,9	1,4	5,5	0	0	0	1,4	15,1	0	2,7	0	4,1	8,2	0	73
JE	1,7	10,7	1,7	0	3,3	0	0,8	5	1,7	0	0	3,3	28,1	2,5	0	1,7	0	6,6	9,1	0,8	1,7	0	0	19	2,5	121
LA	0	10,2	1,7	0	1,7	0	6,8	3,4	0	1,7	0	11,9	8,5	16,9	1,7	0	0	6,8	8,5	1,7	3,4	0	8,5	5,1	1,7	59
LI	1,9	1,9	0,0	0	3,7	0	58,3	0	1,9	0,9	0	0,9	0	0,9	19,4	0	0	4,6	0	0,9	2,8	0	0,9	0,0	0,9	108
LIT	0	15,4	1,9	0	1,9	0	1,9	1,9	0	1,9	0	1,9	19,2	1,9	0	0	0	3,8	5,8	1,9	7,7	0	1,9	17,3	13,5	52
MA	5,6	0	0	0	0	0	50	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	5,6	0	0	0	5,6	11,1	0	18
MED	1,3	2,6	5,1	0	10,3	0	1,3	3,8	0	0	0	1,3	7,7	2,6	7,7	0	0	44,9	2,6	0	3,8	0	0	3,8	1,3	78
ME	0,8	3,8	0,8	0	0	0	1,5	1,5	0	0	0,8	6,1	3,1	3,1	0	0	0	0,8	62,6	0,8	0,8	3,8	6,1	3,8	131	
MO	1,5	8,8	5,9	0	2,9	0	8,8	7,4	1,5	1,5	0	1,5	7,4	2,9	0	2,9	0	7,4	5,9	16,2	2,9	0	2,9	11,8	0	68
RU	0	4,2	2,1	0	4,2	0	4,2	2,1	0	0	0	4,2	2,1	2,1	0	0	0	6,3	4,2	0,0	58,3	0	4,2	2,1	0	48
SA	0	25	5	0	5	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	10	15	5	0	5	15	0	5	20
SC	0,9	15,8	1,8	0	0,9	0,9	4,4	9,6	3,5	0,9	1,8	7,0	4,4	2,6	2,6	0	0	0	12,3	3,5	0,9	0	9,6	14	2,6	114
SY	2,2	8,0	0,7	0	0	0,7	2,9	5,8	0	2,2	0	5,8	9,5	0,7	0,7	0	0	2,9	10,9	0,7	1,5	0	6,6	32,8	5,1	137
UN	0	6,3	0	0	0	1,6	0	7,8	0	0	0	1,6	7,8	0,0	0,0	0	0	4,7	6,3	0	0	0	3,1	10,9	50	64

35,5%

Tabela 17: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada dos indivíduos de 24 subespécies de *Apis mellifera*. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em letras colorida, as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral).

	AD	ADI	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SY	UN	N
AD	3,8	11,5	1,9	1,9	0	3,8	9,6	0	3,8	0	1,9	13,5	1,9	0	0	3,8	7,7	11,5	0	0	0	0	21,2	1,9	52
ADI	0	22,1	0	1,5	1,5	0,8	9,2	0	1,5	0	4,6	9,2	3,1	0	0,8	0	5,3	12,2	3,1	5,3	1,5	3,1	9,2	6,1	131
AN	5,3	1,8	3,5	0	0	0	19,3	1,8	1,8	0	1,8	7,0	3,5	0	0	0	12,3	10,5	1,8	0	0	1,8	24,6	3,5	57
AR	0	5,4	0	26,8	1,8	7,1	7,1	1,8	5,4	0	0	3,6	0	10,7	0	0	16,1	0	1,8	5,4	1,8	1,8	3,6	0	56
CA	0	13,2	0	0	7,9	10,5	5,3	0	0	2,6	7,9	5,3	2,6	0	0	0	5,3	0	0	5,3	0	10,5	13,2	10,5	38
CAR	0	0	0	0,9	0	80,6	0	7,0	0	0	1,3	0	0	4,4	0	0	1,3	0,4	0,4	0,4	0	1,3	1,3	0,4	227
CAU	0,9	6,9	0,9	6,0	0	0,9	25,9	0	0,9	0	0,9	14,7	1,7	1,7	0,9	0	3,4	12,1	3,4	0,9	0	2,6	9,5	6	116
CE	0	0	0	0	0	64,7	0	28,2	0	0	0	2,4	0	2,4	0	1,2	0	1,2	0	0	0	0	0	0	85
CY	8,2	4,1	2,0	2,0	0	12,2	4,1	0	10,2	0	2,0	4,1	6,1	0	0	0	8,2	4,1	2,0	0	0	4,1	22,4	4,1	49
IB	0	5,6	0	0	0	0	0	0	0	22,2	22,2	0	0	0	0	0	0	44,4	0	5,6	0	0	0	0	18
INT	0	5,5	0	0	0	5,5	0	0	1,4	1,4	42,5	1,37	5,5	0	0	0	1,4	15,1	0	4,1	0	6,8	9,6	0	73
JE	1,7	11,6	2,5	3,3	0	0,8	5,8	1,7	0	0	3,3	22,3	2,5	0	1,7	0	6,6	9,1	0,8	1,7	0	0,8	20	4,1	121
LA	0	10,2	0	3,4	0	6,8	3,4	0	1,7	0	11,9	10,2	16,9	1,7	0	0	5,1	8,5	1,7	3,4	0	8,5	5,1	1,7	59
LI	0,9	1,9	0,9	2,8	0	60,2	0	2,8	1,9	0	0,93	0	0,9	14,8	0	0	4,6	0	1,9	2,8	0	0,9	0,9	0,9	108
LIT	0	15,4	0	1,9	0	1,9	1,9	0	3,8	0	1,92	19,2	1,9	0	0	0	3,8	5,8	1,9	7,7	0	1,9	17,3	13,5	52
MA	5,6	0	0	0	0	55,6	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	0	5,6	11,1	0	18
MED	1,3	5,1	0	9,0	0	1,3	6,4	0	0	0	1,3	7,7	2,6	7,7	0	0	46,2	2,6	0	3,8	0	0	3,8	1,3	78
ME	0,8	4,6	0	0	0	1,5	1,5	0	0	0,8	6,1	3,1	3,1	0	0	0	0,8	61,8	0,8	0,8	0,8	3,8	6,1	3,8	131
MO	1,5	14,7	0	4,4	0	8,8	7,4	1,5	1,5	0	1,5	7,4	2,9	0	2,9	0	7,4	5,9	15	2,9	0	2,9	11,8	0	68
RU	0	6,3	0	4,2	0	4,2	2,1	0	0	2,1	4,2	2,1	4,2	0	0	0	8,3	4,2	0	52,1	0	2,1	4,2	0	48
SA	0	30	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	10	15	10	0	0	15	0	5	20
SC	0,9	15,8	0	0,9	0,9	4,4	9,6	3,5	0,9	1,8	7	4,4	2,6	2,6	0	0	0	12,3	4,4	0,9	0	8,8	14,9	3,5	114
SY	2,2	8	0,7	0	0,7	2,2	5,8	1,5	2,2	0	5,8	9,5	0,7	0,7	0	0	2,9	11,7	0,7	1,5	0,7	6,6	30,7	5,1	137
UN	0	6,3	0	0	1,6	0	7,8	0	0	0	1,6	9,4	0	0	0	0	4,7	6,3	0	0	0	3,1	10,9	48	64

32,1%

Tabela 18: Classificação das amostras em porcentagem dentro de suas respectivas subespécies gerada a partir da análise de validação cruzada dos indivíduos de 24 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas. Em destaque estão os valores das classificações corretas das amostras dentro de sua respectiva subespécie, em letras colorida, as subespécies que apresentaram zero na taxa de acerto, e em negrito na parte inferior esquerda o valor da taxa de acerto. (N= tamanho amostral)

	AD	ADI	AF	AN	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	IB	INT	JE	LA	LI	LIT	MA	MED	ME	MO	RU	SA	SC	SY	UN	N
AD	5,8	11,5	0	0	1,9	0	3,8	9,6	0	3,8	0	1,9	13,5	1,9	0	0	3,8	7,7	11,5	0	0	0	0	21,2	1,9	52
ADI	0	21,4	3,1	0	1,5	1,5	0,8	9,2	0	1,5	0	4,6	9,2	3,1	0	0,8	0	5,3	12,2	3,1	3,8	1,5	3,1	9,2	5,3	131
AF	0	18,4	30,6	0	4,1	0	0	6,1	0	0	0	12,2	2,0	0	0	0	0	12,2	6,1	0	0	0	4,1	2,0	2,0	49
AN	0	0	11,1	0	0	0	0	22,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,1	33,3	0	0	0	0	22,2	0	9
AR	0	5,4	0	0	26,8	1,8	8,9	7,1	0	5,4	0	0	1,8	0	10,7	0	0	17,9	0	1,8	5,4	1,8	1,8	3,6	0	56
CA	0	13,2	2,6	0	0	7,9	10,5	5,3	0	0	2,6	7,9	2,6	2,6	0	2,6	0	5,3	0	0	2,6	0	10,5	13,2	10,5	38
CAR	0	0	0	0	0,9	0	80,6	0	7	0	0	1,3	0	0	4,4	0	0	1,3	0,4	0,4	0,4	0	1,3	1,32	0,4	227
CAU	0,9	6,0	0,9	0	6,0	0	0,9	27,6	0	0,9	0	0	13,8	1,7	1,7	0,9	0	3,4	12,1	3,4	0,9	0	2,6	10,3	6,0	116
CE	0	0	0	0	0	0	62,4	0	29,4	1,2	0	0	2,4	0	2,4	0	1,2	0	1,2	0	0	0	0	0	0	85
CY	8,2	4,1	2,0	0	2,0	0	12,2	2,0	0	10,2	0	2,0	4,1	6,1	0	0	0	8,2	4,1	2,0	0	0	4,1	24,5	4,1	49
IB	0	5,6	5,6	0	0	0	0	0	0	0	22,2	16,7	0	0	0	0	0	0	44,4	0	5,6	0	0	0	0	18
INT	0	6,8	1,4	0	0	0	5,5	0	0	1,4	1,4	41,1	1,37	5,5	0	0	0	1,4	15,1	0	4,1	0	5,5	8,2	1,4	73
JE	1,7	11,6	1,7	0	3,3	0	0,8	6,6	1,7	0	0	3,3	23,1	2,5	0	1,7	0	7,4	9,1	0,8	1,7	0	0	19,8	3,3	121
LA	0	10,2	1,7	0	1,7	0	6,8	3,4	0	1,7	0	11,9	8,5	15,3	1,7	0	0	6,8	8,5	1,7	5,1	0	8,5	5,1	1,7	59
LI	1,9	1,9	0	0	3,7	0	60,2	0	2,8	1,9	0	0,9	0	0,9	14,8	0	0	4,6	0	0,9	2,8	0	0,9	0,9	0,9	108
LIT	0	15,4	1,9	0	1,9	0	1,9	1,9	0	1,9	0	1,9	19,2	1,9	0	0	0	3,8	5,8	1,9	7,7	0	1,9	17,3	13,5	52
MA	5,6	0	0	0	0	0	55,6	0	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	0	5,6	11,1	0	18
MED	1,3	2,6	6,4	0	10,3	0	1,3	6,4	0	0	0	1,3	7,7	2,6	7,7	0	0	41	2,6	0	3,8	0	0	3,8	1,3	78
ME	0,8	3,8	0,8	0	0	0	1,5	1,5	0	0	0,8	6,1	3,1	3,1	0	0	0	0,8	61,8	0,8	0,8	0,8	3,8	6,1	3,8	131
MO	1,5	10,3	5,9	0	2,9	0	8,8	7,4	1,5	1,5	0	1,5	7,4	2,9	0	2,9	0	7,4	5,9	14,7	2,9	0	2,9	11,8	0	68
RU	0	4,2	2,1	0	4,2	0	4,2	2,1	0	0	2,1	4,2	2,1	2,1	0	0	0	8,3	4,2	0	54,2	0	4,2	2,1	0	48
SA	0	30	5	0	5	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	10	15	5	0	0	15	0	5	20
SC	0,9	15,8	1,8	0	0,9	0,9	4,4	9,6	3,5	0,9	1,8	7,0	4,4	2,6	2,6	0	0	0	12,3	3,5	0,9	0	8,8	14,9	2,6	114
SY	2,2	7,3	0,7	0	0	0,7	2,9	5,8	0,7	2,2	0	5,8	9,5	0,7	0,7	0	0	2,9	12	0,7	1,5	0,7	6,6	30,7	5,1	137
UN	0	6,3	0	0	0	1,6	0	7,8	0	0	0	1,6	9,4	0	0	0	0	4,7	6,3	0	0	0	3,1	10,9	48,4	64

32,7%

Já no gráfico de dispersão (Figura 19), mais uma vez visualizamos um grupo mais afastado, deslocado para a esquerda em relação a função discriminante 1, formado pelas subespécies (*A. m. carnica*, *A. m. cecropia*, *A. m. ligustica* e *A. m. macedonica*) representantes do ramo C, na parte superior direita em relação a função 1, visualizamos subespécies (*A. m. iberica*, *A. m. mellifera* e *A. m. intermissa*) do ramo M. Mais abaixo temos um grupo formado pelas subespécies dos ramos A e O, apresentando uma tendência a separação. Neste grande grupo, próximo da subespécie *A. m. syriaca*, encontramos a subespécie pertencente ao ramo M, *A. m. sahariensis*. A subespécie *A. m. ruttneri*, também apareceu neste grupo, próxima das subespécies *A. m. adami* e *A. m. monticola*. Ao introduzirmos amostras de abelhas africanizadas (Figura 20) na análise, o gráfico de dispersão se manteve praticamente o mesmo, sendo que a única alteração foi a presença das abelhas africanizadas ao lado da subespécie *A. m. ruttneri*, junto com o grupo formado pelas subespécies dos ramos A e O, porém mais próxima das subespécies do ramo O, assim como o observado na análises de morfometria geométrica.

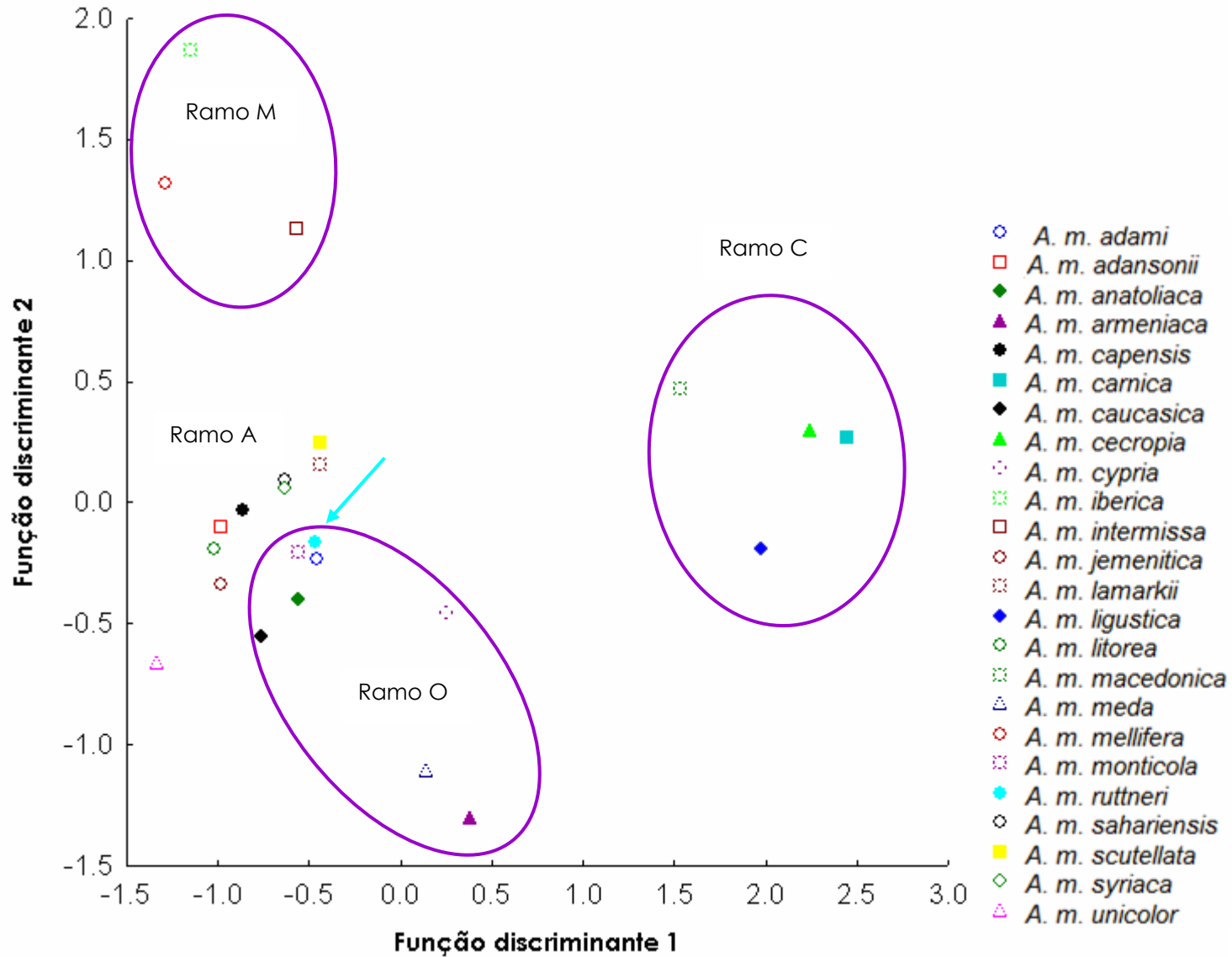


Figura 19: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 24 subespécies de *Apis mellifera*, analisadas quanto aos indivíduos. Em destaque os grupos formados pelos quatro ramos evolutivos e a seta indica a subespécies *A. m. ruttneri* (azul).

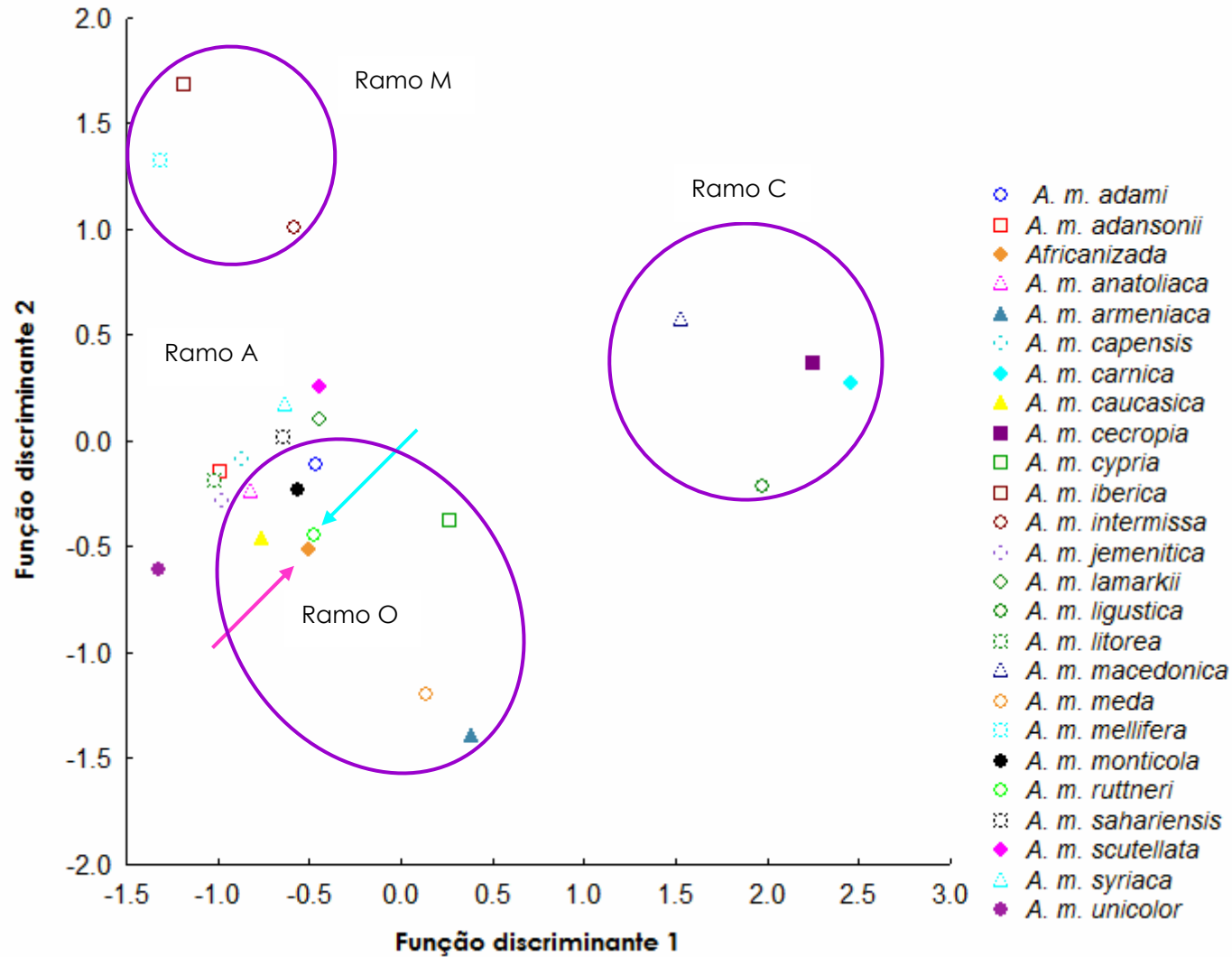


Figura 20: Representação gráfica da análise de discriminantes canônicas das 24 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas, analisadas quanto aos indivíduos. Em destaque os grupos formados pelos quatro ramos evolutivos e as setas indicam as subespécies *A. m. ruttneri* (azul) e abelhas africanizadas (rosa).

4.3 Sistema ABIS de identificação

O ABIS é essencialmente um programa de identificação de espécies e subespécie de abelhas totalmente automatizado, que trabalha com medidas de morfometria tradicional como, distâncias, ângulos e curvaturas (Drauschke *et al.*,2007). Estas medidas podem ser estudadas mediante análises discriminantes lineares e análises discriminantes não lineares. Em nossos estudos usamos só as análises não lineares, por estas apresentarem melhor poder de discriminação (Francoy, 2007), proporcionando resultados bem mais satisfatórios.

Este *software* trabalha exclusivamente com a análise de medidas de asas, e precisa seguir padrões rígidos de reconhecimento de formas. Exatamente pelo motivo da rigidez das formas a serem analisadas, alguns grupos de abelhas ficam excluídos das análises realizadas com o ABIS, entre elas abelhas sem ferrão. Em vista que a redução da venação das asas anteriores é uma sinapomorfia dos Meliponini e a segunda célula discoidal é aberta o que impossibilita a análise destas asas no ABIS.

Para nossas análises, utilizamos os mesmos 19 marcos anatômicos usados para a análise de morfometria geométrica. Como já mencionamos anteriormente, para o funcionamento do programa, é necessário construir previamente um banco de dados com no mínimo 30 indivíduos por amostra (Schroder *et al.*,2006). Caso o número amostral seja inferior, a análise não se realiza.

Dentre as 26 subespécies de *Apis mellifera*, cinco (*A. m. iberica*, *A. m. macedonica*, *A. m. major*, *A. m. sicula* e *A. m. sahariensis*) possuem tamanho menor que o mínimo necessário, ficando fora da análise. Desta forma, durante a análise com o sistema ABIS de identificação, trabalhamos apenas com 21 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas.

Ao analisarmos os resultados do teste de validação cruzada não linear observamos 78% de taxa de acerto (Tabela 19), sendo que dentre as 21 subespécies estudadas nesta análise, 10 foram identificadas com taxa de acerto superior à 80%, com destaque para *A. m. caucasica* com 99,3% e *A. m. ruttneri* com 96,7% de êxito na identificação.

A subespécie *A. m. litorea*, apresentou baixo índice de acerto (32,5%) na classificação, sendo que 25% de suas amostras de asas foram classificada erroneamente como *A. m. adansonii* e 30% como *A. m. jemenitica*, isto possivelmente esta relacionado com o fato destas subespécies pertencerem ao mesmo ramo evolutivo (ramo A) compartilhando diversas características morfológicas. A taxa de acerto das subespécies dentro de seu respectivo ramo evolutivo foi de 91,5% demonstrando o alto nível de caracteres morfológicos compartilhados dentro destes grupos.

Ao incluirmos amostras de abelhas africanizadas na análise de validação cruzada, a taxa de acerto foi ainda maior, alcançando 82% (Tabela 20), de forma que dentre as 22 amostras analisadas (21 subespécies e abelha africanizada), 13 apresentaram taxa de acerto superior a 80%, e ainda 93% das amostras estudadas foram corretamente classificadas dentro de seu ramo evolutivo. A subespécie *A. m. caucasica* foi identificada com 99% de taxa de acerto, e quando ocorreu erro ela foi identificada como pertencente a subespécie *A. m. meda*, sendo que ambas pertencem ao mesmo ramo evolutivo, logo compartilham além de a mesma origem evolutiva, diversas características genético-morfológicas. Outro resultado bastante animador é que pela primeira vez neste trabalho, em análise realizada por indivíduo as abelhas africanizadas foram identificadas com 100% de êxito.

Corroborando com nossos resultados, Francoy e colaboradores (2008), utilizando métodos de morfometria geométrica e o sistema ABIS, para identificar as abelhas africanizadas obtiveram resultados bastante animadores, como erro de apenas 0,08% na identificação feita pelo sistema ABIS, e 0,8% quando utilizando morfometria geométrica. Sendo que em ambos os casos, as amostras identificadas erroneamente foram classificadas como *A. m. scutellata*. Fazendo um paralelo entre estes métodos utilizados na análise com outros comumente usados na identificação de abelhas africanizadas como o USDA-ID (Rinderer *et*

Tabela 20: Taxa de acerto em porcentagem na classificação de 21 subespécies de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas através da análise de validação cruzada não linear.

	AD	LA	ADI	LI	LIT	MED	ME	MO	RU	SC	AN	SY	UN	AFR	AR	CA	CAR	CAU	CE	CY	INT	JE	N
AD	57,5	0	0,8	0	0	17,5	0	3,3	0	3,3	5	0	0	0	5,8	0	0	1,7	0	0	5	0	120
LA	0	83	2,8	0	0	0	0	2,2	0	6,1	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,9	180
ADI	0	0	84,8	0	1,9	0,4	0	1,1	0	3	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	7,4	270
LI	0	0	0	89,8	0	2,1	0	0,9	0	1,7	0	0	0	0	0,9	0	3,8	0	0,9	0	0	0	235
LIT	0	0	20	0	33,3	0	0	0	0	10,8	0	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31,7	120
MED	0	0	1,7	0	0	94	0	0	0	0	0	0	1,1	0	2,8	0	0	0	0	0	0	0	180
ME	0	0	0	1,4	0	0	91,4	1	0	4,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	210
MO	0	0	6,7	0	0	0,5	0	81,7	0	9,4	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0	180
RU	0	0	0	0	0	0	0	0	96,7	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	120
SC	0	2,5	8	1,3	0	4,2	0,4	2,5	0	75	0	2,1	0	0	0,4	0,8	0	0	0	1,7	0	1,3	240
AN	0	0	0	0,7	0	6	0	2,7	0	2	80,7	0	0	0	2,7	0	0	5,3	0	0	0	0	150
SY	2,8	0,5	1,7	0	5	1,7	0	0	0	8,3	0,5	73,9	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0,5	3,3	180
UN	0	1,3	4	0	0,7	0,7	0	0	0	8	0	0	84	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	150
AFR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	270
AR	0	0	0	0	0	20,9	0	0	0	1,7	3,3	0	0	0	70,9	0	0	3,3	0	0	0	0	120
CA	5	0	6,7	0	0	6,7	0	0	0	15	0	0	0	0	3,3	56,7	0	6,7	0	0	0	0	60
CAR	0	0	0	16	0	1,2	0	0,8	0	0,8	3,7	0	0	0	0	0	75,7	1,2	0,4	0	0	0	243
CAU	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	300
CE	0	0	0	2,9	0	1,9	2,4	0	0	1,9	1	0	0	0	0	0	14,5	0	75,4	0	0	0	207
CY	1,1	0	0	0	0	26,7	0	11,1	2,2	12,2	8,9	0	4,4	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0	90
INT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,3	1,3	0,7	0	0	2,7	0	0	0	0	0	88	0	150
JE	0	2	4	0	1,7	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91	300

82%

al.,1993), o qual necessita de diversas medidas do corpo e requer um procedimento bastante demorado, constatamos que os métodos aqui abordados são extremamente mais viáveis, primeiramente por serem fáceis de usar e rápidos, de forma que a análise utilizando a morfometria geométrica demora cerca de cinco minutos por asa já com o ABIS leva cerca de um minuto por asa. Além de oferecerem resultados altamente confiáveis, e ainda no caso da morfometria geométrica, se trata de um *software* de acesso livre.

Devido o sistema morfométrico ABIS ser um *software* que foi desenvolvido para uma finalidade muito específica que é a identificação de espécies de abelhas a partir dos padrões de venação das asas anteriores, o sistema não permite aos usuários o acesso aos dados brutos, mostrando somente o procedimento de análise e o resultado final.

O uso de técnicas morfométricas e do sistema ABIS de identificação oferece muitas vantagens, visto que ambos são métodos de fácil execução, além de gerarem resultados altamente satisfatórios e se tratarem de técnicas bem mais rápidas e com custos reduzidos. Isto é facilmente observado ao se comparar estes mecanismos de análise com outros métodos de identificação, como os moleculares. No caso de análises morfométricas, mesmo pessoas não especializadas, como os próprios apicultores ou pesquisadores em laboratórios menos equipados,

podem fazer uso da tecnologia. Assim, não necessita de grandes e equipados laboratórios, podendo analisar seus exemplares mesmo em campo, sendo estes métodos práticos e aplicáveis com vantagens bastante consideráveis.



Conclusões e Considerações Gerais

A partir das análises realizadas em nosso trabalho, podemos fazer as seguintes conclusões e considerações:

- ❖ Em trabalhos envolvendo diferenciação de subespécies, ou até mesmo populações por medidas morfométricas, é importante que se utilize para análise, a média de cada medida tomada do grupo, ao invés de trabalhar com medidas de indivíduos. Este procedimento deve ser tomado, devido à grande variação encontrada entre os indivíduos de uma mesma colônia, minimizando assim, essa variação.
- ❖ A técnica de morfometria tradicional, quando utilizada apenas na análise de medidas de asa, se apresentou eficiente na identificação das subespécies, porém a taxa de acerto foi a menor em comparação com as outras análises realizadas. Esta metodologia também foi considerada a mais trabalhosa e demorada. Ao acrescentarmos amostras de abelhas africanizadas na análise de validação cruzada realizada por colônia, a taxa de acerto aumentou, e estas amostras foram classificadas com 90% de acerto. Porém na análise de validação cruzada realizada por

indivíduo, a taxa de acerto na identificação das abelhas africanizadas decaiu para 30,6%.

- ❖ A técnica de morfometria geométrica teve um ótimo funcionamento na diferenciação das subespécies de *Apis mellifera*, obtendo 99,5% de taxa de acerto na classificação realizada mediante análise discriminante a partir da média dos grupos. Ao realizarmos análise de validação cruzada, a taxa de acerto foi inferior, sendo que a queda é ainda mais proeminente quando a análise de validação cruzada é realizada por indivíduos. Ao acrescentarmos amostras de abelhas africanizadas, nos testes de validação cruzada, a taxa de acerto se mantém a mesma ou se torna maior.

- ❖ O Sistema ABIS de identificação trabalha exclusivamente com análise de validação cruzada de indivíduos. Desta forma este foi o programa que atingiu a melhor taxa de acerto mediante este critério de análise, sendo que ao acrescentarmos amostras de abelhas africanizadas, estas foram identificadas com 100% de taxa de acerto. Este também foi o programa mais rápido e prático de utilizar. Porém este programa não é de livre acesso e só

funciona para espécimes que possuam asas com venação fechada;

- ❖ Apesar de a morfometria geométrica ter apresentado taxa de acerto menor que o sistema ABIS mediante a análise de validação cruzada por indivíduo, esta metodologia apresenta resultados muito bons em análise realizada a partir da média das medidas, sendo de grande aplicação para estudos envolvendo insetos sociais. Também foi uma técnica de fácil aplicação e rápida. Outro benefício desta técnica é utilizar *softwares* de livre acesso, possibilitando o seu uso para qualquer interessado.
- ❖ Quanto ao grupo de insetos não sociais que apresentam asas com tipo de venação fechada a utilização do sistema ABIS de identificação é o mais recomendado.
- ❖ As técnicas morfométricas aplicadas na análise de medidas de asa, foram eficientes na classificação das subespécies, apresentando resultados satisfatórios e confirmando resultados obtidos anteriormente por outros autores sobre trabalhos envolvendo a análise morfométrica de diversas partes do corpo da abelha, assim como trabalhos utilizando marcadores

moleculares, como microssatélite, DNA mitocondrial, isoenzimas entre outros.

- ❖ Os dendogramas de proximidade morfológica agruparam as subespécies corroborando, na maioria das vezes com a proposta de Ruttner (1988).
- ❖ Os gráficos de dispersão das 24 subespécies e das abelhas africanizadas (análise de discriminantes canônicas) na análise de morfometria tradicional permitiram a visualização dos distintos grupos em seus ramos evolutivos e corroboraram em parte a filogenia proposta por Arias & Sheppard (1996).



Referência bibliográfica

- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J. & SLICE, D. E. 2004. Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the "Revolution". *Italian Journal of Zoology* **71**: 5-16.
- AMSSALU, B.; NURU, S. A.; RADLOF, S. E. & RANDALL, H. 2004. Multivariate morphometric analysis of honeybees (*Apis mellifera*) in the Ethiopian region. *Apidologie* **35**: 71-81.
- ARIAS, M. C. & SHEPPARD, W. S. 1996. Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular Phylogenetics and evolution* **5**: 557-566.
- AYTEKIN, A. M.; TERZO, M.; RASMONT, P. & ÇAGATAY, N. 2007. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de la Société Entomologique de France* **43**: 95-102.
- BISCHOFF, I.; SCHRÖDER, S. & MISOF, B. 2009. Differentiation and Range Expansion of North American Squash Bee, *Peponapis pruinosa* (Apidae: Apiformes) Populations Assessed by Geometric Wing Morphometry. *Annals of the Entomological Society of America* **102** (1): 60-69.

BOOKSTEIN, F. L. 1989. Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations, *IEEE trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **11**: 567-585.

BOOKSTEIN, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data. Cambridge: Cambridge.

BOOKSTEIN, F. L. 1996. Applying landmark methods to biological outline data. *Proceedings in Image Fusion and Shape Variability Techniques* (ed. by K. V. Mardia, C. A. Gill & I. L. Dryden), pp. 59-70. University of Leeds Press, Leeds.

CLARKE, K. E.; OLDROYD, B. P.; JAVIER, J.; QUEZADA-EUAN, G. & RINDERER, T. E. 2001. Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* **10**: 1347-1355.

CLARKE, K. E.; RINDERER, T.E.; FRANCK, P.; QUEZADA-EUAN, J. G., *et al.* 2002. The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution* **56**: 1462-1474.

- COLLET, T.; FERREIRA, K. M.; ARIAS, M. C.; SOARES, A. E. E. & DEL LAMA, M. A. 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity* **97**: 329-335.
- CONTEL, E. P. B.; MESTRINER, M. A. & MARTINS, E. 1977. Genetic-Control and Developmental Expression of Malate-Dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics* **15**: 859-876.
- CORNUET, J. M. & GARNERY, L. 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and it's phylogeographic implications. *Apidologie* **22**: 627-642.
- CULLINEY, T. W. 1983. Origim and evolutionary history of the honeybees *Apis*. *Bee World* **64**: 29-38.
- DALY, H. V. & BALLING, S. S. 1978. Identification of Africanized honeybees in the Western Hemisphere by discriminat analysis. *Journal of the Kansas Entomological Society* **51**: 857-869.
- DALY, H. V.; HOELMER, K.; NORMAN, P. & ALLEN, T. 1982. Computer assisted measurement and identification of honey bees. *Annals of the Entomological Society of America* **75**: 591-594.

DEL LAMA, M. A.; FIGUEIREDO, R. A.; SOARES, A. E. E. & DEL LAMA, S. N. 1988. Hexoquinase polymorphism in *Apis mellifera* and its use for africanized honeybee identification. *Revista Brasileira de Genetica* **11**: 287-297.

DEL LAMA, M. A.; LOBO, J. A.; SOARES, A. E. E. & DEL LAMA, S. N. 1990. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honey bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie* **21**: 271-280.

DIETZ, A. 1982. *Honey bees*. In: *Social Insects*. Vol. III, edited by H. H. Herman, 323-360. Academic Press, New York.

DINIZ-FILHO, J. A. F. & BINI, L. M. 1994. Space-free correlation between morphometric and climatic data: a multivariate analysis of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) in Brazil. *Global Ecology and Biogeography Letters* **4**: 195-202.

DINIZ, N. M.; SOARES, A. E. E.; SHEPPARD, W. S. & DEL LAMA, M. A. 2003. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* **26**: 47-52.

DRAUSCHKE, M.; STEINHAGE, V.; POGODA, A.; MULLER, S.; FRANCOY, T. M. & WITTMANN, D. 2007. Reliable Biometrical Analysis in Biodiversity Information Systems. pp.25-36 in Fred, A. & Jain, A. K. eds. *Proceedings of the 7th International Workshop on Pattern Recognition in Information Systems – PRIS 2007*, Funchal, Portugal.

DUPRAW, E. J. 1964. Non-Linear Taxonomy. *Nature* **202**: 849-852.

DUPRAW, E. J. 1965a. Non-Linnean taxonomy and the systematics of honeybees. *Systematic Zoology* **1**: 41 - 24.

DUPRAW, E. J. 1965b. The recognition and handling of honeybee specimens in non- Linnean taxonomy. *Journal of Apicultural Research* **4**: 71 - 84.

ENGEL, M. S., HINOJOSA-DÍAZ, I. A. & RASNITSYN, P. 2009. A honey Bee from the Miocene of Nevada and the Biogeograph of *Apis* (Hymenoptera: Apidae: Apini). *Proceedings of the California academy of sciences* **60 (3)**: 23-38.

- ESTOUP, A.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. & CORNUET, J. M. 1995. Microsatellite Variation in Honey-Bee (*Apis-Mellifera* L) Populations - Hierarchical Genetic-Structure and Test of the Infinite Allele and Stepwise Mutation Models. *Genetics* **140**: 679-695.
- FRANCIS, B. R.; BLANTON, W. E. & NUNAMAKER, R. A. 1985. Extraxtable surface hydrocarbons of workers and drones of the genus *Apis*. *Journal of Apicultural Research* **24**: 13-26.
- FRANCISCO, F. O.; NUNES-SILVA, P.; FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ARIAS M. C. & MORGAN, E. D. 2008. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Insect Society* **55**: 231-237.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. & CORNUET, J. M. 1998. The origin of west European subspecies of honeybee (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* **52**: 1119-1134.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. & CORNUET, J. M. 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* **31**: 167-180.

FRANCOY, T. M. 2007. Variabilidade genético-morfológica em populações Neotropicais de *Apis mellifera*. (Doutoramento). Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto. 158p.

FRANCOY, T. M.; GONCALVES, L. S. & WITTMANN, D. 2006b. Changes in the patterns of wing venations of Africanized honey bees over time. *Anais do VII Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto. 173-177p.

FRANCOY, T. M.; PRADO, P. P. R.; GONCALVES, L. S.; COSTA, L. D. & DE JONG, D. 2006a. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie* **37** :91-97.

FRANCOY, T. M.; SILVA, R. A. O.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2009a. Gender identification of Five genera of stingless bees (Apidae: Meliponini) based on wing morphology. *Genetics and Molecular Research* **8 (1)**: 207-214.

FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MULLER, S.; STEINHAGE, V.; BESERRA-LAURE, M. A.; DE JONG, D. & GONCALVES, L. S. 2008. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie* **39**: 488-494.

FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; STEINHAGE, V.; DRAUSCHKE, M.; MÜLLER, S.; CUNHA, D. R.; NASCIMENTO, A. M.; FIGUEIREDO, V. L. C.; SIMÕES, Z. L. P.; DE JONG, D.; ARIAS, M. C. & GONÇALVES, L. S. 2009b. Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. *Genetics and molecular research* **8 (2)**:709-17.

FTAYEH, A.; MEIXNER, M. & FUCHS, S. 1994. Morphometrical investigation in Syrian honeybees. *Apidologie* **25**: 396-401.

GASTON, K. J. & O'NEIL, M. A. 2004. Automated species identification: why not? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **359**: 655-667.

GONÇALVES, L. S. 1970. Análise genética do cruzamento entre *Apis mellifera* ligustica e *Apis mellifera* adansonii. Escolha e análise genética de caracteres morfológicos da cabeça e do tórax. (Doutoramento). Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto. 141p.

GONÇALVES, L. S. 1974. The introduction of the African bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. *American Bee Journal*, **114** (11): 414, 415, 419 p.

GONÇALVES, L. S. 1994. Africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. II. Capítulo 4 do livro *Venenos animais. Uma visão integrada*. Editora de Publicações Científica Ltda. EPUC. São Paulo, p. 49-63.

HALL, H. G. 1988. Distinguishing African and European honeybees using nuclear DNA restriction fragment polymorphisms. *Florida Entomologist* **71**: 294-299.

HALL, H. G. & MURALIDHARAM, K. 1989. Evidence from mitochondrial DNA that African honeybee spread as continuous maternal lineages. *Nature* **339**: 211-213.

HOPKINS, I. 1886. *Illustrated Australasian Bee Manual*. 3rd edition. Auckland, New Zealand.

KAUHAUSEN-KELLER, D.; RUTNER, F. & KELLER, R. 1997. Morphometric studies on the microtaxonomy of the species *Apis mellifera* L. *Apidologie* **28**: 295-307.

KENDALL, D. G.; BARDEN, D.; CARNE, T. K. & LE, H. 1999. *Shape and shape theory*, John Wiley & Sons, Chichester.

KERR, W. E. 1957. Introdução de abelhas africanas no Brasil. *Brasil Apícola*. **3**: 211-213.

KERR, W. E. 1967. The history of the introduction of africanized bees to Brazil. *South African Bee Journal* **39**: 3-5.

KUMAR, S.; TANURA, K.; JAKOBSEN, I. B. & NEI, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

LOBO, J. A.; DEL LAMA, M. A. & MESTRINER, M. A. 1989. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.) *Evolution* **43**: 794-802.

LOUVEAUX, J. 1966. Les modalités de l'adaptation des Abeilles (*Apis mellifera* L.) au milieu naturel. *Annals Abeille* **9**: 323-350.

MEIXNER, M. D.; WOROBİK, M.; WILD, J.; FUCHS, S. & KOENIGER, N. 2007. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe – morphometric variation and determination of its range limits. *Apidologie* **38**: 191-197.

MENDES, M. F. M.; FRANCOY, T. M.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2007. Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Bioscience Journal* **23**:147-152.

MONTEIRO, L. & DOS REIS, S. F. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Holos Editora. 188 pp.

MORAES, D. A. 2003. A morfometria geométrica e a sua "Revolução na Morfometria": localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. *Boletim, ano III, nº 3*.2003.

NOGUEIRA-NETO, P. 1972. Notas sobre a historia da apicultura brasileira. In: CAMARGO, J. M. F. (Ed.) *Manual de Apicultura: Agrônômica* Ceres, p. 17-32.

NUNES, L. A.; PINTO, M. F. F. C.; CARNEIRO, P.; PEREIRA, D. G. & WALDSCHMIDT. 2007. Divergencia genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. *Bioscience Journal, Uberlandia* **23**: 1-9.

RADLOFF, S. & HEPBUM, R. 2000. Population structure and morphometric variance of the *Apis mellifera scutellata* group of honeybees in Africa. *Genetics and Molecular Biology*, **23 (2)**: 305-316.

RINDERER, T. E. 1986. Africanized Bees -an Overview. *American Bee Journal* **126**: 98-&

RINDERER, T. E.; BUCO, S. M.; RUBINK, W. L.; DALY, H. V.; STELZER, J. A.; RIGGIO, R. M. & BAPTISTA, F. C. 1993. Morphometric Identification of Africanized and European honey bees using large reference populations. *Apidologie* **24**: 569-585.

RINDERER, T. E.; DALY, H. V.; SYLVESTER, H. A.; COLLINS, A. M.; BUCO, S. M.; HELLMICH, R. L. & DANKA, R. G. 1990. Morphometric Differences among Africanized and European honey bees and Their F1 Hibrids (Hymenoptera, Apidae) *Annals of the Entomological Society of America* **83**: 346-351.

ROHLF, F. J. 1993. *Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings*. Madrid: Museo de Ciencias Naturales. Pp.131-159.

ROHLF, F. J. 1996. Morphometric spaces, shape components and the effect of linear transformations. In: MARCUS, L. F.; CORTI, M.; LOY, A.; NAYLOR, G. & SLICE, D. (Ed.) *Advances in Morphometrics*. New York: Plenum Publishing Corp. p. 117-130.

ROHLF, F. J. 1998. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Systematic Biology* **47**: 147-158.

ROHLF, F. J. 1999. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of classification* **16**: 197-223.

ROHLF, F. J. 2005a. tpsDig, versão 2.04. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.

ROHLF, F.J. 2005b. tpsRelw, versão 1.42. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.

ROHLF, F. J. & MARCUS, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 129-132.

ROTH, V. & STEINHAGE, V. 1999. Nonlinear Discriminant Analysis Using Kernel Functions. *Boletim informativo da Universitat Bonn*. Bonn.

ROTHENBUHLER, W. C. 1979. Semidomesticated insects: honeybee breeding. pp. 84-92. In: Genetics in Relation to Insect Management, M. A. Hoy and J. J. McKelvey, Jr., Eds., Rockefeller Found. Press, New York.

ROTTA, I. T. 1999. Análise aloenzimática, morfométrica e de padrões do DNA mitocondrial das abelhas Africanizadas do Brasil. Tese apresentada a Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 114p.

RUTTNER, F. 1975. *Races of bees*. In *The hive and the honeybee*, ed. C. P. Dadant, pp. 19-38. Hamilton, 111., Dadant.

RUTTNER, F. 1976. African races of honeybees. *Proc. Int. Beekeep Congr* **25**: pp. 325- 344.

RUTTNER, F. 1988. *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Berlin: Springer. 284 p.

RUTTNER, F. 1992. *Naturgeschichte der Honigbienen*. Ehrenwirth, Verlag, Munich, Germany.

RUTTNER, F.; ELMI, M. P. & FUCHS, S. 2000. Ecoclines in the Near East along 36° N latitude in *Apis mellifera* L. *Apidologie*. **31**: 157-165.

RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L. & LOUVEAUX, J. 1978. Biometrical-Statistical Analysis of the Geographic Variability of *Apis-Mellifera* L. 1. Material and Methods. *Apidologie* **9**: 363-381.

SCHRÖDER, S.; DRESCHER, W.; STEINHAGE, V. & KASTENHOLZ, B. 1995. An Automated Method for the Identification of Bee Species (Hymenoptera: Apoidea). Proc. Intern. Symp. on Conserving Europe's Bees: *Int. Bee Research Ass. & Linnean Society*. pp. 6-7.

SCHRÖDER, S.; WITTMANN, D.; DRESCHER, W.; ROTH, V.; STEINHAGE, V. & CREMERS, A. B. 2006. The new key to bees: Automated Identification by image analysis of wings. In: KEVAN, P. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Ed.). *Pollinating Bees. The conservation link between agriculture and nature*. pp. 229-236.

SEGURA, J. A. L. 2000. Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 317-322.

SHEPPARD, W. S.; ARIAS, M. C.; GRECH, A. & MEIXNER, M. D. 1997. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie* **28**: 287-293.

SHEPPARD, W. S. & MCPHERON, B. A. 1986. Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. *Apidologie* **17**: 21-32.

SHEPPARD W. S. & MEIXNER, M. D. 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie* **34**: 367-375.

SHEPPARD, W. S.; RINDERER, T. E.; MAZZOLI, J. A.; STELZER, J. A. & SHIMANUKI, H. 1991a. Gene flow between African and European – derived honey bee populations in Argentina. *Nature* **349**: 782-784.

SHEPPARD, W. S.; SOARES, A. E. E.; DE JONG, D. & SHIMANUKI. 1991b. Hibrid status of honey bee population near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie* **22**: 643-652.

SILVA, R. A. O. 2006. A morfometria geométrica e a diferenciação de espécies do gênero *Plebeia* (Apidae, Meliponini). Monografia apresentada à FFCLRP USP, Ribeirão Preto. 42 p.

SMITH, D. R.; TAYLOR, O. R. & BROWN, W. M. 1989. Neotropical African bees have African mitochondrial DNA. *Nature* **339**: 213-215.

STATSOFT, Inc. STATISTIC (data analysis software system) version 6. www.statsoft.com.2001.

STEELE, G. R.; VILLET, M. H.; RADLOFF, S. E. & HEPBURN, H. R. 1998. Clinal morphometric variation in wild honey bees (Hymenoptera: Apidae) in South Africa. *Diversity and Distributions*, **4**: 17-25.

STEINHAGE, V.; ARBUCKLE, T.; SCHRÖDER, S.; CREMERS, A. B. & WITTMANN, D. 2001. ABIS: Automated Identification of Bee Species. *BIOLOG Workshop, German Programme on Biodiversity and Global Change, Status Report* pp. 194-195.

STEINHAGE, V.; KASTENHOLZ, B.; SCHRÖDER, S. & DRESCHER, W. 1997. A Hierarchical Approach to Classify Solitary Bees Based on Image Analysis. XIX DAGM-Symposium. Braunschweig: *Springer*. **157**: 419-426.

STEINHAGE V.; SCHRODER S.; LAMPE K. & CREMERS A. B. 2007. Automated extraction and analysis of morphological features for species identification in: MacLeod. N. (Ed.). Automated object

identification in systematics: theory, approaches, and applications, CRC Press, Boca Raton, Florida.

TAYLOR, O. R. 1977. The past and possible future spread of Africanized honey bees in the Americas. *Bee World*. **58**: 19-30.

THOMPSON, D'A. W. 1917. *On growth and form*. Cambridge University Press, Cambridge. 346 pp.

TOFILSKI, A. 2004. DrawWing, a program for numerical description of insect wings. *Journal of Insect Science* **4**: 1-5.

TOFILSKI, A. 2007. Automatic measurements of honeybee wings, in: MacLeod, N. (Ed.). Automated object identification in systematics: theory, approaches, and applications, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 289-298.

VILLEMANT C.; SIMBOLOTI, G. & KENIS M. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*. **32**: 625-634.

WHITFIELD, C. W.; BEHURA, S. K.; BERLOCHER, S. H.; CLARK, A. G.; JOHNSTON, J. S.; SHEPPARD, W. S.; SMITH, D. R.; SUAREZ, A. V.; WEAVER, D. & TSUTSUI, N. D. 2006. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* **314**: 642-645.

ZELDITCH, M. L., SWIDERSKI, D. L., SHEETS, H. D., FINF, W. L. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: A primer*, Elsevier Academic Press, London.