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

**Dinâmica populacional em populações de abelhas Africanizadas
(*Apis mellifera* L.) no Nordeste brasileiro.**

CAROLINE JULIO MORETTI

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
2014**

CAROLINE JULIO MORETTI

**Dinâmica populacional em populações de abelhas Africanizadas
(*Apis mellifera* L.) no Nordeste brasileiro.**

Versão corrigida da 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

Orientador: Prof. Dr. Tiago Mauricio Franco.

RIBEIRÃO PRETO-SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Moretti, Caroline Julio

Dinâmica populacional em populações de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) no Nordeste brasileiro. Ribeirão Preto, 2014.

131 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Entomologia.

1. *Apis mellifera*. 2. Africanizada. 3. Morfometria.
4. DNA Mitocondrial. 5. Variabilidade.

Nome: Caroline Julio Moretti

Título: Dinâmica populacional em populações de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) no Nordeste brasileiro.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2014.

Dedico,

*Aos meus pais, Célia Moretti e Guido César
Moretti por sempre me apoiarem e proporcionarem a
realização dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

- À Deus por todas as portunidades a mim oferecidas e por me conceder Saúde e Força para torna-las realidade.
- Ao Prof. Dr. Tiago Maurício Franco, meu orientador, pela oportunidade, orientação, dedicação e confiança depositada na realização desse trabalho;
- Ao Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves e à sua esposa Neide pela oportunidade, sem eles nada disso teria sido possível.
- À Prof^a. Dr^a. Zilá Luz Paulino Simões e à Prof^a Dr^a Márcia Bitondi, meus agradecimentos por abrirem as portas de seu laboratório e me recepcionarem.
- À família Apilab pela amizade e por todos os momentos de descontração, risadas e guloseimas.
- À todos os técnicos e funcionários do Apilab, Bloco A e do Departamento de Entomologia
- As meninas, Vanessa, Juliana, Claudinéia, Daiana, Clycie e Marina pela disposição e paciência em me ajudar com a parte molecular e morfométrica e por serem minhas amigas nos momentos felizes e difíceis.
- As minhas amigas Ana Laura e Gabriela por estarem presentes em quase todos os momentos da minha vida;
- Aos meus pais, irmãos, tios, primos e avós por todo o apoio.
- Aos meus cinco cachorros por fazerem a minha vida mais bonita.
- À Grazi pela arte gráfica.
- À todos os apicultores e pesquisadores que contribuíram com o envio das amostras;
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado
- Ao Departamento de Entomologia da FFCLRP/USP

RESUMO

Em sua distribuição autóctone, as abelhas *Apis mellifera* apresentam diversas diferenciações morfológicas, comportamentais e ecológicas, que as possibilitam habitar os mais variados ambientes, apresentando grande diversidade de subespécies adaptadas a cada região. Com a introdução das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* no Brasil, em 1956, surgiram populações polí-híbridas denominadas Africanizadas, sendo que essas abelhas se tornaram interessantes para várias atividades econômicas e essenciais para a apicultura no Brasil. Um local que se apresenta como um bom candidato para o entendimento da dinâmica populacional das abelhas Africanizadas é o Nordeste brasileiro, que, recentemente, tem apresentado grandes avanços na área da apicultura. A análise do DNA mitocondrial tem se mostrado muito útil por permitir a obtenção de polimorfismos genéticos diretamente do DNA, resultando em um rápido e preciso estudo da variabilidade existente. Evidências morfométricas também têm sido utilizadas para estimar a composição genética destas abelhas. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a variabilidade de abelhas Africanizadas em diferentes localidades do Nordeste brasileiro. Foram coletadas 10 operárias por colônia em várias localidades dentro dos Estados do Rio Grande do Norte, Piauí, Alagoas, Paraíba e Sergipe. Foram feitas análises de DNA Mitocondrial do gene COI e análises do padrão de venação da asa através de Morfometria Tradicional e Geométrica utilizando as localidades e os climas das regiões amostradas como marcadores. Para as análises de morfometria foram utilizadas cinco abelhas por colônia e para a análise molecular, foi utilizada uma abelha por colônia. Foram obtidos fragmentos de 624 pb e identificados 11 diferentes haplótipos, correspondentes a 9 sítios variáveis. Os resultados das análises morfométricas e moleculares quando classificados por localidade corroboram entre si, indicando ausência de estruturação populacional na área amostrada. Essa falta de estruturação populacional provavelmente está relacionada ao alto fluxo gênico entre as populações, que tem como principal fator as altas taxas de enxameação durante os períodos de seca no Nordeste. Outros fatores que provavelmente também estão envolvidos são a apicultura migratória existente na região e, em menor escala, o comércio de compra e venda de rainhas e enxames. Os resultados da análise morfométrica usando como classificador o clima da região amostrada, mostra certa estruturação entre os três climas amostrados (Tropical, Litorâneo Úmido e Semiárido), sugerindo grupos relativamente adaptados a estas condições ambientais, apesar de haver fluxo gênico entre eles. Outra explicação para tal fato pode ser a influência do ambiente na formação das características das asas.

ABSTRACT

In its native distribution, *Apis mellifera* exhibit various morphological, behavioral and ecological differences that allow them to inhabit various environments and show great diversity of subspecies adapted to each region. With the introduction of African bees *Apis mellifera scutellata* to Brazil in 1956, emerged hybrid populations called Africanized honey bees, and, overtime, these bees have become important for various economic activities and essential for beekeeping in Brazil. A good candidate for the understanding of population dynamics on Africanized bees is the Brazilian Northeast, which recently has made great advances in the field of beekeeping. The analysis of mitochondrial DNA has proved to be very useful for allowing obtaining genetic polymorphisms directly from DNA, resulting in a fast and accurate method to studies of variability. Morphometric evidence has also been used to estimate the genetic profile of these bees. In this context, this work aims to evaluate the variability of Africanized bees in different localities of Brazilian Northeast. Ten workers per colony were collected at various locations in the states of Rio Grande do Norte, Piauí, Alagoas, Sergipe and Paraíba. Mitochondrial DNA analysis of the COI gene and analysis of the venation pattern of the wing were made through Traditional and Geometric Morphometrics using as markers the localities and climates of the sampled regions. For the analyzes of morphometry were used five bees per colony and for molecular analysis one bee colony was used. Fragments of 624 bp were obtained and 11 different haplotypes were identified, corresponding to 9 variable sites. The results of morphometric and molecular analyzes by location corroborate each other, indicating the absence of population structuration in the sampled area. This is probably related to high gene flow among populations, whose main factor is probably the high rate of swarming during periods of drought in the Northeast. Other factors are probably also involved are migratory beekeeping existing in the region and, to a lesser extent, the trade of buying and selling queens and swarms. The results of morphometric analysis using classifier as the climate of the survey area, showing some structure between the three sampled climates (Tropical, Coastal Humid and Semiarid), suggesting relatively groups adapted to these environmental conditions, although there is gene flow between them. The influence of the environment in shaping the characteristics of the wings is also a possible explanation.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material biológico	28
3.2 Análises Morfométricas	29
3.2.1 Morfometria geométrica.....	29
3.2.2 Morfometria tradicional	30
3.3.3 Análises estatísticas	31
3.3 Análises moleculares	33
3.3.1 Extração do DNA.....	33
3.3.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	34
3.3.3 Sequenciamento	34
3.3.4 Análise de dados	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Análises Morfométricas	37
4.1.1 Morfometria Geométrica.....	37
4.1.2 Morfometria Tradicional.....	70
4.2 Análises de DNA mitocondrial	96
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
6 REFERÊNCIAS.....	120

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil é considerado o país com maior número de espécies endêmicas e abriga cerca de 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial (BARREIRO & BOLZANI, 2009), sendo um dos países com maior índices de diversidades do mundo (FIORAVANTI, 2006).

Estima-se que no mundo existam mais de 20 mil espécies de abelhas e o Brasil, devido a suas proporções continentais e sua riqueza de ecossistemas, pode ser considerado privilegiado neste aspecto, uma vez que abriga cerca de ¼ destas espécies (SANTOS, 2002).

As abelhas são consideradas como os mais importantes e especializados polinizadores (DANFORTH *et al.*, 2006), realizando indispensável serviço de polinização nos ecossistemas terrestres (KLEIN *et al.*, 2007). Tal serviço é essencial na reprodução de diversas angiospermas e normalmente aumenta a produção de muitas plantações, além de manter a biodiversidade vegetal local (KLEIN *et al.*, 2007).

A relação entre os seres humanos e as abelhas é milenar, com registros ao longo de toda a história da humanidade, como pinturas rupestres que datam de 6.000 a. C., que retratam seres humanos coletando mel em colmeias (BERENBAUM, 1995). Os egípcios no ano de 2.400 a. C. já criavam abelhas em potes de barro (GUEDES, 2005), enquanto cilindros de argila crus semelhantes a colmeias tradicionais encontrados recentemente em Israel sugerem que a apicultura já era uma prática agrícola bastante elaborada há 3.000 anos (BLOCH, 2010).

Desde os primórdios desta relação, as abelhas já assumiam tamanha importância para o homem, que eram consideradas sagradas para muitas civilizações. Com o tempo, elas também assumiram grande importância econômica e foram consideradas como símbolo de poder para reis, rainhas, papas, cardeais, duques, condes e príncipes, fazendo parte de brasões, cetros, coroas, moedas e mantos reais (PEREIRA *et al.*, 2002). Na Grécia antiga tão grande era sua importância que as abelhas eram estampadas nas moedas “Tetradracme” (GONÇALVES, 1975).

Atualmente sabe-se que as abelhas são responsáveis por 70% da polinização das culturas agrícolas utilizadas no mundo, com destaque para as plantações de amêndoas onde são responsáveis por 100% da polinização e as culturas de maçãs,

cebolas, cenouras, brócolis e mirtilo em que são responsáveis por 90% da polinização, além de várias outras, como pêssego (48%), laranja (27%), algodão (16%), soja (5%) e diversas outras (MORSE & CALDERONE, 2000; JOHNSON, 2011).

No Brasil, culturas dependentes da polinização por abelhas, como melão (*Cucumis melo*), café (*Coffea arabica*), maracujá (*Passiflora edulis*), laranja (*Citrus* spp.), soja (*Glycine max*), caju (*Anacardium occidentale*), maçã (*Malus domestica*) e algodão (*Gossypium* spp.) são de extrema importância para a economia nacional, tanto por seu valor na balança comercial para exportação quanto para atender a demanda do mercado interno (FREITAS, 2005).

Outros estudos brasileiros mostram que a introdução de abelhas para a polinização direcionada em cultivos aumenta a colheita em várias outras culturas, como, por exemplo, em plantações de mamona (*Ricinus communis* L) em que a introdução de abelhas *Apis mellifera* proporcionou um aumento de 17% na produção de frutos e 30% na produção de sementes (RIZZARDO, 2012). Em pomares de acerola (*Malpighia emarginata*) a introdução da abelha *Centris analis* também proporcionou ganhos reais em produtividade, houve aumento da produção em 1,798 kg/ha (MAGALHÃES, 2013). Em plantações de laranja (*Citrus sinensis*) a introdução de abelhas Africanizadas aumentou a produção em cerca de 30% e resultou em frutos mais doces (TOLEDO *et al.*, 2013).

Esses dados mostram que é possível aumentar a produtividade e, conseqüentemente, a rentabilidade utilizando polinizadores ao invés de expandir a área plantada, podendo esta ser uma alternativa rentável para o produtor, além de ser uma opção ecologicamente mais recomendável do que o desmatamento de novas áreas para o aumento das áreas plantadas.

Justamente por causa da já descrita importância das abelhas para a manutenção dos ecossistemas e conseqüentemente para a humanidade, é que o fenômeno conhecido mundialmente como “distúrbio do colapso das colônias” (em inglês, Colony Collapse Disorder, CCD) tem causado apreensão nos últimos anos. Os relatos mais comuns são de apicultores que, ao abrir suas colmeias, encontram-nas cheias de mel, cera, e até com massiva presença de imaturos e da rainha, porém desprovidas de abelhas operárias adultas (ORTH & MATOS, 2000; JOHNSON, 2011).

Nos EUA a situação é alarmante, uma vez que foram registradas perdas de 32% das colônias de *Apis mellifera* no inverno de 2006-7, 36% no inverno de 2007-8, 29% no inverno de 2008-9, 34% no inverno de 2009-10 e 30% no inverno de 2010-11 (VANENGELSDORP *et al.*, 2007, 2010, 2012). No inverno de 2012, um terço das colônias de abelhas *Apis mellifera* morreu ou desapareceu, valor este acima do registrado no ano anterior e bem maior do que os 10% a 15% de perdas ou mortes consideradas normais durante os invernos (WALSH, 2013).

Até o momento, acredita-se que a CCD seja causada por uma combinação de diversos fatores, entre eles as alterações no agroecossistema, as diversas doenças, tais como as moscas parasitas *Apocephalus borealis* que causam desorientação e perda de equilíbrio nas abelhas parasitadas. Também pode ser considerada a nutrição das abelhas, onde um estresse nutricional devido à utilização da polinização em monoculturas pode acarretar alterações no sistema imunológico das abelhas. E principalmente aos pesticidas agrícolas da família dos neonicotinoide (DE JONG & MESSAGE, 2008; FAROOQUI, 2013).

Costa *et al.*, (2014) avaliaram a toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do melão (*Cucumis melo* L.) em adultos de *A. mellifera*. Os resultados indicaram que todos os inseticidas de alguma forma foram prejudiciais aos adultos desta abelha: Os inseticidas Tiametoxam (neonicotinoide), Abamectin, Acetamiprida (neonicotinoide), Deltametrina, Cloridrato de Cartape e Chlorfenapyr quando aplicados diretamente sobre as abelhas, foram extremamente tóxicos para adultos de *A. mellifera*, causando alta mortalidade (80% a 100%); o inseticida Pyriproxyfen causou mortalidade moderada (30%); os inseticidas Ciromazina e Flufenoxuron causaram baixa mortalidade aos adultos de *A. mellifera* (<20%). Estes resultados indicam que os inseticidas podem estar entre os principais causadores do atual desaparecimento das abelhas.

Em 1956, a subespécie africana *Apis mellifera scutellata* foi introduzida no Brasil pelo Professor Warwick Estevam Kerr. Ele trouxe 133 rainhas africanas para iniciar um programa de seleção genética em Rio Claro - SP. Apenas 48 rainhas sobreviveram a viagem para o Brasil, as quais foram introduzidas em ninhos e colocadas em quarentena no Horto Florestal de Camacua, para posterior avaliação comportamental e de produtividade. Entretanto, após algum tempo, 26 enxames, com suas respectivas rainhas, acidentalmente escaparam e iniciaram uma série de cruzamentos com as demais subespécies de abelhas melíferas de origem europeia

que haviam sido introduzidas nos séculos anteriores, principalmente *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* e *A. m. carnica*. (KERR, 1967).

Esta série de cruzamentos levou ao surgimento de populações poli-híbridas, que foram denominadas Africanizadas. Nestas abelhas predominaram as características das abelhas africanas, tais como a alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes adversos e a capacidade de reprodução com ciclo de vida mais curto que as demais subespécies aqui previamente introduzidas (GONÇALVES, 1994). Neste híbrido predominou também o comportamento enxameatório, muito comum na subespécie africana. A enxameação reprodutiva é um processo natural que permite a multiplicação e dispersão dos enxames no ambiente, esta ocorre em condições ambientais ótimas, onde o desenvolvimento da população cresce além do espaço físico do ninho. Sendo assim, grande parte das operárias junto com a rainha velha, ou com uma nova rainha, saem do ninho para procurar um novo local para a nidificação (FREE, 1980).

Além da enxameação reprodutiva existem outros tipos, como a migratória e por abandono, em que ocorre a saída em massa dos indivíduos da colônia, em resposta a algum nível de stress generalizado (HEPBURN *et al.*, 1998). Em abelhas Africanizadas, este processo acontece em maior escala quando comparado com as abelhas europeias. No Brasil, em um ano, a enxameação pode ocorrer cerca de 3 a 4 vezes, dependendo da região do ano (CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2012). Essas abelhas conseguem migrar a uma velocidade de 400-500 km por ano (SOARES, 2012). O processo de enxameação é intensificado em regiões com clima instável e com falta de alimento, como por exemplo, no Nordeste brasileiro, onde, durante a estação seca, ocorre uma escassez de pasto apícola e, conseqüentemente, de alimento para as abelhas (FREITAS, 1991; LIMA, 1995).

Estas características permitiram uma rápida ampliação da biomassa e significativo aumento populacional com ocupação de território, sendo que, em menos de 50 anos, estas abelhas ocuparam quase todos os países do continente americano, exceção feita ao Chile e o Canadá (GONÇALVES, 1994).

O Brasil, devido às suas proporções continentais apresenta ao longo de seu território diferentes zonas climáticas. Uma classificação simples e muito utilizada para os diferentes tipos de clima do Brasil é a criada por Arthur Strahler (1951) (Figura 1), que se baseia na origem, natureza e movimentação das correntes e massas de ar (Tabela 1).

Figura 1: Mapa da classificação climática de Strahler (1951) para o Brasil

Tabela 1: Climas do Brasil segundo a classificação de Arthur Strahler (1951).

Clima	Localidade	Características
Clima Litorâneo Úmido	Regiões litorâneas do Sudeste e Nordeste	Alta umidade durante todo o ano, temperaturas elevadas no verão e amenas no inverno.
Clima Equatorial	Região da Amazônia	Temperaturas elevadas durante todo o ano, alta umidade, índice pluviométrico em torno de 2.500 mm anuais.
Clima Tropical	Brasil central	Estações bem definidas, com invernos secos e verões úmidos, índice pluviométrico anual de 1.500 mm.
Clima Semiárido	Sertão Nordestino	Baixa umidade, chuvas irregulares, pluviosidade média inferior a 1.000 mm/ano, temperaturas altas durante todo o ano.
Clima Subtropical Úmido	SC, RS e a parte sul de SP e PR.	Verões quentes e úmidos e invernos frios, com Chuvas bem distribuídas durante todo o ano, o índice pluviométrico anual é inferior a 2.000 mm.

Essas diferenças no clima acabam por refletir diretamente na estrutura genética populacional dos organismos que se estabeleceram nestas regiões. Isto já foi demonstrado por alguns autores, como no trabalho de Nunes (2012) onde foi observada a formação de grupos distintos de *Apis mellifera* em diferentes regiões do Brasil. Diniz-Filho & Malaspina (1995) utilizaram morfometria tradicional e verificaram variações populacionais na distribuição da abelha Africanizada no Brasil. Tan *et al.*, (2006) demonstraram grande variedade morfológica em abelhas *A. cerana* associadas as diversidades ecológicas na China. Diniz-Filho *et al.*, (2000) observaram variações em subespécies de *Apis mellifera* entre populações locais na África referente a sua distribuição em diferentes climas.

Devido às características vantajosas, em clima tropical, da abelha Africanizada em comparação com as características das abelhas europeias, estas se tornaram interessantes para várias atividades econômicas e essenciais para a apicultura no Brasil. A importância da apicultura é conhecida já há muito tempo, especialmente pelas repercussões positivas que tem sobre a economia agrária em geral, pois, além de realizar a polinização de muitas plantas cultivadas, geram lucro com a produção de mel, geleia real, cera, própolis e pólen (TRINDADE *et al.*, 2004).

O Brasil é o 11º maior produtor mundial de mel e o 5º maior exportador. Em 2011, produziu cerca de 41 mil toneladas de mel, sendo que 16,9 mil toneladas foram produzidas pelo Nordeste que ocupou a posição de maior produtor de mel do país (Tabela 2) (SEBRAE, 2014).

Na Paraíba, apesar da região ser sacrificada pela instabilidade climática, é notável o crescimento e o espaço que a Apicultura vem ocupando no sertão deste Estado (SOUSA *et al.*, 2012). Em 2011 foram produzidas 303 toneladas de mel (IBGE, 2014). Segundo dados do IBGE 2008, o Sergipe ocupa a 21ª posição no ranking nacional e 9ª no Nordeste brasileiro. A sua produção no ano de 2011 foi de 114 toneladas de mel. O Estado do Piauí aparece nas estatísticas do IBGE como o maior produtor de mel de abelha da região do Nordeste, em 2011 produziu mais de cinco mil toneladas de mel. Em Alagoas o índice também é crescente, o Estado, que antes não aparecia nas estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2011 já se encontrava à frente do Sergipe com 213 toneladas de mel (SEBRAE, 2014). O Rio Grande do Norte apareceu como o 10º maior produtor de mel do país em 2008, uma posição acima do ranking de 2007. A região produziu mais de 900 toneladas em 2011 (SEBRAE, 2014).

Tabela 2: Produção de mel no Brasil em 2011 (SEBRAE, 2014).

Grandes Regiões e Unidades da Federação	Quantidade de mel produzido em 2011 (toneladas)
Brasil	41 578
Norte	945
Rondônia	185
Amazonas	48
Roraima	132
Pará	414
Amapá	8
Tocantins	153
Nordeste	16 910
Maranhão	1 107
Piauí	5 108
Ceará	4 165
Rio Grande do Norte	904
Paraíba	303
Pernambuco	2 350
Alagoas	213
Sergipe	114
Bahia	2 646
Sudeste	6 151
Minas Gerais	3 076
Espírito Santo	463
Rio de Janeiro	383
São Paulo	2 229
Sul	16 154
Paraná	5 179
Santa Catarina	3 990
Rio Grande do Sul	6 985
Centro-Oeste	1 415
Mato Grosso do Sul	686
Mato Grosso	379
Goiás	334

Porém, em 2012, o clima adverso impediu boas floradas e provocou uma grande perda de enxames por abandono da colmeia, situação verificada desde o Piauí até a Bahia. As perdas de enxames foram mais acentuadas para o Rio Grande do Norte (82%), Pernambuco (70%), Paraíba (80%), Ceará (75%), Piauí (70%) e Bahia (60%). (UNAMEL, 2013)

O período de chuvas no Nordeste brasileiro é normalmente distribuído no período entre os meses de fevereiro a maio, porém nessa época em 2012 ocorreu o inverso (Figura 2) A imagem evidencia claramente que neste período o índice de precipitação em todo o território do Nordeste foi classificado como Seco, Muito Seco ou Extremamente Seco (SANTOS *et al.*, 2012)

Figura 2: Classificação da precipitação no Brasil através da técnica de Quantis (Fonte: INMET, 2012.).

Segundo dados da Secretaria Nacional de Defesa Civil quase todos os município em todos os estado da região Nordeste foram afetados de alguma forma pela estiagem. A tabela a seguir (Tabela 3) mostra quantitativamente a situação de emergência em cada estado segundo dados da Defesa Civil (SANTOS *et al.*, 2012).

Tabela 3: Tabela referente à quantidade de municípios em situação de emergência por conta da estiagem no Nordeste.

Estado (UF)	Nº de municípios em situação de emergência
Alagoas	36
Paraíba	196
Piauí	178
Rio Grande do Norte	141
Sergipe	20

Entretanto, mesmo com todas as adversidades climáticas encontradas na região, seu grande potencial para a apicultura, aliado ao alto comportamento enxameatório, seja de abandono ou reprodutivo, tornam esta região um bom candidato para o entendimento da dinâmica populacional das abelhas Africanizadas.

Desde o início da expansão das abelhas Africanizadas em 1956, estas ganharam foco nas pesquisas científicas com objetivo primordial de entender sua biologia, inicialmente com o intuito de favorecer os apicultores, e, mais recentemente, compreender sua dinâmica populacional e a estruturação de sua variabilidade genética, visando á aplicação destes dados no entendimento do processo de Africanização destas abelhas no continente Americano e na utilização destes dados para a seleção de matrizes de abelhas com características desejáveis para a apicultura (FRANCOY *et al.*, 2008).

Para tal finalidade, evidências morfométricas e mitocondriais têm sido comumente utilizadas para a realização de estimativas quanto à composição genética de abelhas Africanizadas em populações da América do Sul (COLLET *et al.*, 2006).

A morfometria tradicional é caracterizada pelo estudo da variação e covariação de medidas lineares. Geralmente medidas de comprimento e largura de estruturas, além de ângulos são utilizadas (ROHLF & MARCUS, 1993). Neste

contexto, a morfometria tradicional é o estudo sobre como e quanto estas medidas variam, e de como e quão relacionadas elas estão entre si. Após a coleta dos dados, as medidas são analisadas de acordo com técnicas bem estabelecidas, como Análise de Componentes Principais, Análise de Fatores, Regressões Múltiplas e Análises Discriminantes, entre outras (MORAES, 2003).

Diversos trabalhos já foram realizados utilizando técnicas de morfometria tradicional para diferentes finalidades apresentando resultados bastante satisfatórios.

Em 1978 Ruttner *et al.*, publicou um guia de medidas de morfometria tradicional, onde descreve 40 caracteres por abelha, as análises estatísticas de seu trabalho foram realizadas utilizando 33 caracteres de 404 amostras de abelhas, seus resultados são até hoje utilizados como referencia para trabalhos de morfometria.

Amssalu *et al.*, (2004) utilizaram treze medidas morfométricas em diferentes subespécies de *A. mellifera* que revelou a existência de cinco diferentes grupos presentes em cinco ambientes ecologicamente diferentes na Etiópia (*Apis mellifera jemenitica* presente no noroeste e nas planícies áridas e semiáridas do leste; *A. m. scutellata* no oeste, sul e região central úmida do sudoeste; *Apis mellifera bandasii* nas terras altas centrais úmidas; *Apis mellifera monticola* nos planaltos montanhosos do norte e a *Apis mellifera woyi-gambell* presente no sudoeste do país). Meixner *et al.*, (2007) utilizaram 38 caracteres morfométricos para mensurar os limites de distribuição de *A. m. mellifera* na Europa Oriental. Kamel *et al.*, (2013) utilizaram 23 medidas morfológicas em *A. mellifera* para verificar alterações em alguns caracteres morfológicos de rainhas recém-emergidas, a fim de melhorar as suas características de qualidade. Meixner *et al.*, (2011) caracterizaram uma nova subespécie de *A. mellifera* (*A. m. simensis* n. ssp) ao utilizar 38 caracteres morfológicos em abelhas da Etiópia.

Apesar da consagração e efetividade da morfometria tradicional, o desenvolvimento de novas técnicas tende a enriquecer o entendimento dos organismos. Além disso, um conjunto de distâncias lineares é normalmente insuficiente para capturar a geometria do objeto original, perdendo assim alguns aspectos da forma (ADAMS *et al.*, 2004). Portanto para se compreender a complexidade do organismo estudado é sempre mais eficiente utilizar mais do que uma técnica de análise.

A morfometria geométrica se caracteriza por ser uma técnica rápida e de baixo custo e seu uso na identificação e avaliação da diversidade em populações de abelhas tem se mostrado bastante efetivas (FRANCOY & IMPERATRIZ-FONSECA, 2010). Tal metodologia é baseada no uso de marcos anatômicos homólogos nas asas anteriores, de forma que permitam identificar variações nos padrões de venação das asas entre espécies (ROHLF & MARCUS, 1993) e identificação de variações de forma nos diferentes exemplares de uma mesma espécie (ROHLF, 1998).

A vantagem do uso das coordenadas Cartesianas dos marcos anatômicos 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). Além disso, é possível, através das grades de deformação, identificar a região da asa que mais contribuiu para a discriminação (TOFILSKY, 2008).

Vários são os trabalhos realizados utilizando a morfometria geométrica como ferramenta, tanto na identificação de espécies quanto na diferenciação de grupos de uma mesma espécie, em abelhas com e sem ferrão.

No estudo de Francoy *et al.*, (2009) foram usadas características morfométricas extraídas das asas de machos e operárias de abelhas sem ferrão que se mostraram muito informativas para discriminar as cinco espécies examinadas. No trabalho de Francoy *et al.*, (2008) houve a identificação de abelhas Africanizadas e suas subespécies ancestrais. Tofilski (2008) utilizou a morfometria geométrica para discriminar 3 subespécies de *A. mellifera*. Mendes *et al.*, (2007) utilizaram a morfometria na identificação de indivíduos de diferentes populações de abelhas sem ferrão da espécie *Nannotrigona testaceicornis*.

Bonatti *et al.*, (2014) ao analisar abelhas *Melipona subnitida* no Nordeste brasileiro através da morfometria geométrica encontrou diversidade entre as regiões amostras, diversidade esta que se mostrou relacionada tanto com o ambiente em que as amostras foram coletadas quanto com a distância geográfica entre os locais de coleta. Francoy *et al.*, (2012) através de métodos morfométricos baseados em marcos anatômicos e contorno celular classificou corretamente 91% das amostras de cinco espécies de *Euglossa*. No trabalho de Grassi (2009), ao se analisar discriminação de 26 subespécies de *A. mellifera* a morfometria geométrica foi capaz de acertar 99,5% nas análises discriminantes por colônia.

Abou-Shaara (2012) conseguiu discriminar abelhas *A. m. jementica* de abelhas *A. m. carnica* na Arábia Saudita através do uso de 18 marcos anatômicos da asa anterior. Miguel *et al.*, (2010) afirma que o uso da morfometria geométrica se mostrou mais apropriado do que a análise molecular do DNA mitocondrial na identificação da presença da linhagem Africana em populações de abelhas ibéricas (*A. m. iberiensis*).

A morfometria geométrica também se mostrou muito eficiente no reconhecimento de espécies crípticas do gênero *Eubazus* e *Bombus* (VILLEMANT *et al.*, 2007; AYTEKIN *et al.*, 2007), indicando que tal técnica apresenta sensibilidade suficiente para reconhecer espécies morfologicamente similares.

A análise do DNA mitocondrial tem se mostrado muito útil por permitir a obtenção de polimorfismos genéticos diretamente do DNA, resultando em um rápido e preciso estudo da variabilidade existente (FALEIRO, 2007). As análises de DNA mitocondrial provaram ser de fácil amplificação e sequenciamento, e, com isso, vêm sendo amplamente utilizadas em estudos filogenéticos e sendo muito úteis na resolução de questões relativas à dinâmica e estrutura de populações, delimitação de espécies e subespécies (BESANSKY & FAHEY, 1997; GONÇALVES, 2010) e também na elucidação da história evolutiva dos grupos (BONATTI *et al.*, 2014).

Isso se deve, principalmente, ao fato da molécula de DNA mitocondrial apresentar algumas características peculiares e únicas como o fato de ser um genoma pequeno e circular, ser de herança materna e com ausência de recombinação, possuir poucos genes, ser um genoma compacto, que raramente possui sequências espaçadoras, sequências repetitivas, pseudogenes e íntrons. Além disso, apresenta o conteúdo gênico bastante conservado, e a ordem em que esses genes se encontram organizados no genoma costuma ser também conservada, além de possuir alta taxa evolutiva quando comparada a do genoma nuclear (ARIAS *et al.*, 2003).

O DNA mitocondrial evolui de forma mais rápida que o DNA nuclear por diversas razões, tais como, o fato da mitocôndria possuir em seu interior um ambiente corrosivo rico em compostos de oxigênio, não possuir um mecanismo de reparo eficiente, possuir sequências que acumulam mais substituições nucleotídicas, uma vez que não codificam proteínas diretamente envolvidas em sua replicação, transcrição e tradução e, finalmente, por não possuir histonas para a estocagem de seu material genético (AVISE, 2009).

O genoma mitocondrial possui de 16 a 20 quilobase (Kb) nos animais (AVISE *et al.*, 1987). Contêm 37 genes, todos envolvidos na produção de energia e no estoque de ATP na célula, sendo: dois genes para as subunidades ribossômicas (12S e 16S); três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III); um para o citocromo B; dois para as subunidades da enzima ATPase (subunidades 6 e 8); e sete para as subunidades da enzima NADH desidrogenase, o restante dos genes codificam RNAs transportadores (22 genes) (Figura 3).

Figura 3: Mapa do genoma mitocondrial de *A. mellifera* (FRANCISCO, 2012).

Dentre todos os genes mitocondriais os mais eficientes para trabalhos de filogenia têm sido os genes codificadores de proteína por não possuírem inserções/deleções (*indels*) que prejudicam o alinhamento das sequências (HEBERT *et al.*, 2003a). Padrões na curta região intergênica entre os genes mitocondriais da Citocromo Oxidase I e II provaram ser uma boa ferramenta para a caracterização de linhagens evolutivas em *A. mellifera* (FERREIRA, 2009).

Em *A. mellifera* Kandemir *et al.*, (2006) ao trabalhar com análise de restrição da região intergênica COI-COII de 334 colônias de abelhas de sete regiões geográficas diferentes da Turquia obteve sete haplótipos diferentes dentro das

linhagens A, C e O. Magnus *et al.*, (2014) obteve 23 haplótipos (linhagens A, C e O) das 247 amostras coletadas de 12 Estados nos Estados Unidos a partir da região do DNA mitocondrial COI-COII (530 a 1.230 pb).

Dentre os genes mitocondriais codificadores de proteínas, o *Citocromo Oxidase I* (COI) possui a menor taxa de evolução, sendo muito conservado em relação à evolução dos aminoácidos (SIMON *et al.*, 1994). No entanto, mostra variação suficiente para diferenciação entre as espécies a nível nucleotídeo (WAUGH, 2007).

Em 2003, uma nova abordagem utilizando a região COI para a identificação de espécies foi proposta por Hebert *et al.*, (2003) e denominada código de barras de DNA (*Barcode*). A proposta é baseada na premissa que as diferenças interespecíficas (maior que 3%) na sequência dos genes são maiores que as diferenças intraespecíficas (menor que 1% e raramente maior que 2%). A aplicação do código de barras de DNA tem provado cada vez mais ser uma poderosa ferramenta para reduzir incertezas taxonômicas (MURRAY *et al.*, 2007). O método de *Barcode* possui etapas padronizadas para todos os tipos animais, consiste no sequenciamento da curta região de aproximadamente 650 pares de bases do início do gene COI e da comparação destas sequências entre os grupos (HEBERT *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2005; HEBERT *et al.*, 2005)

Essa padronização traz vantagens para diversas áreas do conhecimento, como agricultura (identificação de pestes), biomedicina (identificação de patógenos e vetores de doenças) e ecologia (SAVOLAINEN *et al.*, 2005) Em insetos a vantagem dessa padronização é a possibilidade de identificação em qualquer estágio de vida, já que, a discriminação morfológica de espécies em insetos é bastante complexa e exige várias chaves diferentes para os diversos estágios de vida. Com o *Barcode* o processo é o idêntico para todos os estágios

Um Banco de Dados com todas as espécies que já foram sequenciadas está disponível em <http://www.barcodinglife.org/>. Existe também uma campanha global para a utilização do DNA *Barcode* em abelhas (www.bee-bol.org).

Apesar da maioria dos trabalhos de variabilidade genética com DNA mitocondrial em *A. mellifera* utilizar a região intergênia COI-COII, o gene COI também tem apresentados ótimos resultados nos estudos de variabilidade genética intraespecífica. Ferreira *et al.*, (2013) utilizaram um fragmento de 600-650-bp da região COI que revelou a presença de oito haplótipos diferentes entre as populações

da abelha solitária *Centris aenea*. No trabalho de Bonatti *et al.*, (2014) utilizando o gene COI foram encontrados nove haplótipos nas populações de *Melipona subnitida* no Nordeste brasileiro. Em *A. mellifera*, Stevanovic *et al.*, (2010) constatou que as abelhas da parte norte da Sérvia diferem das abelhas do leste, sul e sudoeste do país.

Portanto, ao considerar as diferentes realidades fito-fisiográficas presentes no Nordeste brasileiro e a importância da abelha *A. mellifera* para este local, podemos verificar a importância da avaliação da variabilidade genética das abelhas ocorrentes nesta área, uma vez que diferentes ecótipos, possivelmente importados juntamente com as abelhas originalmente trazidas para o Brasil, podem estar adaptados a estas diferentes regiões.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve por objetivo caracterizar e mapear a variabilidade genética das abelhas Africanizadas *A. mellifera* no Nordeste brasileiro, visando o entendimento de sua dinâmica populacional e a distribuição geográfica desta variabilidade com a finalidade de fornecer subsídios para sua conservação, manejo e uso sustentável.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e reconhecer a variabilidade populacional das abelhas *A. mellifera* no Nordeste brasileiro considerando suas diferentes regiões;
- Caracterizar morfometricamente estas populações, para verificação da existência de possíveis ecótipos localmente adaptados;
- Verificar a existência de diferenças entre os haplótipos mitocondriais encontrados no litoral (região mais úmida) e no interior (semi-árido).
- Entender o processo da dinâmica populacional e do fluxo gênico entre as populações, de modo a fornecer subsídios para a determinação de estratégias para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético e preservação desta espécie.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Foram coletadas amostras em apiários de abelhas Africanizadas de diferentes localidades no Nordeste brasileiro. No total foram coletadas abelhas de 124 colônias em 19 localidades, sendo 47 no Piauí, 27 no Rio Grande do Norte, 19 no Alagoas, 20 no Sergipe e 11 na Paraíba (Tabela 5). Todas as amostras foram coletadas no período de seca no ano de 2012 (entre Outubro e Dezembro), com exceção do estado da Paraíba que tiveram suas amostras coletadas em Setembro de 2012.

Além destas, foram também coletadas amostras de 37 colônias na cidade de Mossoró durante a época de chuvas na região (Março de 2013). Todas as amostras foram identificadas e acondicionadas em frascos contendo álcool absoluto até sua chegada ao laboratório, onde as amostras foram individualizadas e armazenadas a -20 °C em freezer.

Tabela 5: Localidades, coordenadas geográficas e quantidades de amostras de *Apis mellifera* coletadas.

LOCALIDADE	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	CLIMA	PLUVIOSIDADE MÉDIA	QUANTIDADE
São Raimundo Nonato (PI)	9° 0' 54" S 42° 41' 50" W	Semiárido	697 mm	14
Parnaíba (PI)	9° 6' 41" S 45° 55' 50" W	Tropical	1.064 mm	13
Bela Vista (PI)	7° 58' 58" S 41° 52' 40" W	Semiárido	847 mm	16
Isaias Coelho (PI)	7° 44' 16" S 41° 40' 45" W	Semiárido	847 mm	4
Mossoró Chuvas (RN)	5° 11' 17" S 37° 20' 39" W	Semiárido	765 mm	37
Mossoró (RN)	5° 11' 17" S 37° 20' 39" W	Semiárido	765 mm	20
Macaíba (RN)	5° 51' 36" S 35° 20' 59" W	Litorâneo Úmido	1.442 mm	2
São Paulo do Potengi (RN)	5° 53' 44" S 35° 45' 29" W	Litorâneo Úmido	1.750 mm	5
Rio Largo (AL)	9° 28' 49" S 35° 51' 29" W	Litorâneo Úmido	1.634 mm	8
Barra de Sto Antônio (AL)	9° 24' 58" S, 35° 30' 33" W	Litorâneo Úmido	1.634 mm	5
Murici (AL)	9° 18' 18" S 35° 56' 30" W	Litorâneo Úmido	1.309 mm	2
Maceió (AL)	9° 39' 59" S 35° 44' 6" W	Litorâneo Úmido	1.570 mm	1
Joaquim Gomes (AL)	9° 6' 60" S 35° 44' 15" W	Litorâneo Úmido	1.634 mm	3
Brejo Grande (SE)	10° 25' 38" S 36° 28' 12" W	Litorâneo Úmido	1.650 mm	7
São Cristóvão (SE)	11° 0' 49" S 37° 13' 21" W	Litorâneo Úmido	1.372 mm	13
Baraúna (PB)	5° 4' 14" S, 37° 37' 2" W	Semiárido	750mm	2
Cuité (PB)	6° 28' 54" S, 36° 8' 59" W	Semiárido	735 mm	2
Taperoá (PB)	13° 32' 18" S, 39° 6' 1" W	Semiárido	503 mm	5
Maturéia (PB)	7° 15' 59" S, 37° 20' 57" W	Semiárido	726 mm	1
João Pessoa (PB)	7° 6' 55" S, 34° 51' 40" W	Litorâneo Úmido	1.874 mm	1

3.2 Análises Morfométricas

Tanto para a morfometria geométrica quanto para a morfometria tradicional foram utilizadas as mesmas amostras e as mesmas quantidades.

Primeiramente foi realizada uma análise na qual as localidades de origem das amostras foram utilizadas classificador. Somente as amostras coletadas na época da seca foram analisadas, ou seja, abelhas de 124 colônias das 19 localidades. Uma análise adicional, na qual utilizamos as colônias como objeto de análise também foi realizada. Para tanto, as médias de cada medida foram obtidas de todas as abelhas de uma mesma colônia.

Os diferentes climas presentes na área amostrada também foram utilizados como classificador nas análises morfométricas. Nesta análise utilizamos exatamente as mesmas 124 amostras, porém incluímos as 37 amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas em três das quatro análises feitas, tendo sido utilizadas, portanto, 161 colônias, sendo: 101 ninhos da região do Semiárido, 47 ninhos da região classificada como Litorâneo Úmido e 13 ninhos provenientes da região Tropical.

3.2.1 Morfometria geométrica

As amostras, compreendidas por cinco operárias adultas de cada colônia amostrada, foram analisadas quanto ao padrão de venação das asas anteriores. Para tal finalidade, a asa anterior direita de cada indivíduo foi retirada com o auxílio de pinças e montada entre lâmina e lamínula.

Estas asas tiveram sua imagem capturada por uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio e foram armazenadas como arquivo digital em um computador.

Posteriormente, com a auxílio do software tpsUtil versão 1.40 (ROHLF, 2008a), foi criado um arquivo .tps a partir das imagens das asas. Este arquivo foi futuramente utilizado como banco de dados, onde as coordenadas Cartesianas de cada marco anatômico (*landmarks*) foram armazenadas. Com o auxílio do software tpsDig versão 2.12 (ROHLF, 2008b), 19 marcos anatômicos foram manualmente marcados nas junções de nervuras das células de cada asa (Figura 4).

Figura 4: Asa anterior direita de operária. Os pontos em branco representam o posicionamento dos marcos anatômico nas junções das nervuras (FRANCOY *et al.*, 2008).

3.2.2 Morfometria tradicional

Para os estudos de morfometria tradicional foram tomadas medidas lineares e angulares da asa anterior direita de cinco abelhas adultas por colônia através de uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio. As medidas foram realizadas de forma digital com o auxílio do software TSView. Os caracteres alares mensurados foram baseados no guia de medidas publicado por Ruttner e colaboradores, em 1978; foram utilizadas medidas do comprimento da asa, largura da asa e 11 ângulos (Figura 5 e 6).

Figura 5: Medidas lineares (comprimento e largura) de uma asa de *Apis mellifera* segundo o guia de medidas publicado por Ruttner em 1978.

Figura 6: Medidas dos 11 ângulos de uma asa de *Apis mellifera* segundo o guia de medidas publicado por Ruttner em 1978.

3.3.3 Análises estatísticas

As análises de morfometria geométrica que utilizaram os indivíduos como base dos testes foram realizadas pelo programa MorphoJ versão 1.03 (KLINGENBERG, 2011).

A análise no MorphoJ é baseada nas deformações parciais e nos componentes uniformes X e Y. A partir dos 19 marcos anatômicos marcados nas nervuras das asas, as imagens das asas são redimensionadas para um tamanho uniforme, sobrepostas com base em seus centróides e rotacionadas para produzirem um alinhamento ideal, onde o somatório das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos seja a menor possível, eliminando assim os efeitos de tamanho das estruturas e fazendo com que as análises fiquem baseadas exclusivamente na forma das estruturas.

A média de todas estas configurações é calculada, e o processo de rotação, sobreposição e redimensionamento é repetido, sobrepondo as formas a esta média. As deformações parciais (*partial warps*) são vetores relacionados à variação das coordenadas dos *landmarks* de cada indivíduo com a média, baseando-se na energia gasta para que esta deformação ocorra, gerando assim as grades de deformação.

Desta forma, a partir dos resíduos de Procrustes, que nada mais são do que os valores das deformações parciais na qual a informação da forma é extraída, foi gerada uma matriz de covariância e os dados obtidos foram usados como variáveis para análises multivariadas, tais como a Análise de Componente Principal (PCA), Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e a Análise da Função Discriminante (DFA).

As análises de morfometria geométrica utilizando as médias dos ninhos como base dos testes e as análises da morfometria tradicional foram realizadas pelo software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2001) com base nos valores médios das deformações parciais e dos componentes uniformes X e Y dos indivíduos pertencentes à mesma colônia. A partir destes dados também foram realizadas análises multivariadas, tais como a Análise de Componente Principal (PCA) e a Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e a Análise da Função Discriminante (DFA). Os testes de validação cruzada para todos os casos foram realizados através do software SPSS 15.0 (SPSS Inc.)

A Análise de Componente Principal é utilizada para examinar as características principais de variação na forma de uma amostra, sendo uma análise de ordenação, cujo objetivo é examinar o arranjo das amostras no morfoespaço sem considerar sua origem (KLINGENBERG, 2011).

A Análise de Variáveis Canônicas é uma função de análise multivariada com a finalidade de discriminar grupos em conjunto de dados. Através de combinações lineares é possível analisar a similaridade ou a dissimilaridade de grupos em conjunto de dados, sendo então um dos tipos mais comuns de análise em morfometria (KLINGENBERG, 2011).

A Análise da Função Discriminante é um método para obter regras de decisão ótimas para grupos distintos, é usada para se obter a probabilidade de classificação correta e incorreta entre os grupos (KLINGENBERG, 2011).

O teste de Validação Cruzada é uma análise realizada “as cegas” para se obter a probabilidade de classificação correta entre os grupos. A porcentagem da validação Cruzada é obtida dividindo-se o número de classificações corretas pelo total de indivíduos.

As distâncias de Mahalanobis entre os centróides dos grupos também foram calculadas e a partir delas foram construídos dendogramas de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* através do software MEGA versão 5.2 (TAMURA *et al.*, 2011).

Também foi realizado o teste de Mantel, com o auxílio do software TFPGA (MILLER, 1997), para verificação de correlações significativas entre as distâncias morfológicas e distâncias geográficas das localidades estudadas. A distância geográfica entre as populações, em quilômetros e em linha reta, a partir das coordenadas geográficas das cidades foi calculada utilizando a ferramenta Google Earth versão 6.1.0.5001 (GOOGLE INC., 2011). Os testes ANOVA foram feitos com o auxílio do software SigmaStat 3.5(Systat Software Inc., 2006)

3.3 Análises moleculares

Para a análise molecular todas as amostras que mostraram DNA de qualidade foram incluídas na análise, sendo estas, abelhas de 116 colônias de 19 localidades, sendo, 24 ninhos no Rio Grande do Norte (18 em Mossoró, 1 Macaíba e 3 em São Paulo do Potengi); 18 ninhos no Alagoas (8 em Rio Largo, 5 em Barra de Santo Antônio, 2 em Murici, 1 em Maceió e 2 em Joaquim Gomes); 46 ninhos no Piauí (13 em São Raimundo Nonato, 13 em Parnaíba, 16 em Bela Vista e 4 em Isaías Coelho), 11 ninhos na Paraíba (2 em Baraúna, 2 em Cuité, 5 em Taperoá, 1 em Maturéia e 1 em João Pessoa) e 19 ninhos no Sergipe (7 em Brejo Grande e 12 São Cristóvão). Na divisão por climas foram utilizadas 43 amostras do Litorâneo Úmido, 13 do Tropical e 60 do Semiárido.

3.3.1 Extração do DNA

A extração do DNA total foi realizada utilizando Chelex 100 de acordo com a metodologia proposta por WALSH *et al.*, (1991), a partir da perna de uma operária por colônia, preservada em álcool até o momento da extração. A perna de cada indivíduo foi retirada com auxílio de pinças devidamente flambadas, colocadas em tubos eppendorf individuais e levemente macerada em 400 µl de Chelex 10% e 5 µl de proteinase K 20ug/µl. Em seguida, a solução foi incubada por 30 minutos a 56°C, depois aquecida por 5 min a 99°C e então centrifugada a 14.000 rpm por 3 min.

3.3.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O DNA extraído foi submetido à PCR para amplificação de um fragmento do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase subunidade I (COI)*, utilizando o *primer* BarbeeF (5' CAA CAA ATC ATA AAA ATA TTG G -3') (FRANÇOSO & ARIAS, 2013) e o *primer* mtD9 (5' CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC 3') (SIMON *et al.*, 1994).

A reação de PCR foi realizada com 2 µl de DNA, 1 µl de *primer* FWD (10 pmol), 1 µl de *primer* REV (10 pmol), 10 µl de solução Promega PCR Master Mix 2x [*Taq* -DNA -Polymerase (0,05 unidade/µl); 2x *reaction buffer*, 400 µM de cada dNTP e 3mM MgCl₂] e 6 µl de água bidestilada e autoclavada, totalizando um volume de 20 µl.

A amplificação do locus foi feita em um termociclador *Applied Biosystems geneAmp PCR System 9700* com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 20 segundos a 40°C, 2 minutos a 64°C, seguidos de 10 minutos de extensão a 64°C. Para confirmação do sucesso de amplificação, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e observados em luz UV.

3.3.3 Sequenciamento

Após a confirmação da existência do fragmento do tamanho esperado por eletroforese em gel de agarose 1%, as reações de PCR foram purificadas utilizando *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (PROMEGA) conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Após purificação, o conteúdo de DNA das amostras foi quantificado em Nanodrop (ND 1000). Foram enviadas para sequenciamento (CREBIO) 20 microlitros de cada amostra com uma concentração mínima de 10ng/µL, conforme especificações da empresa.

3.3.4 Análise de dados

As sequências *forward* e *reverse*, geradas automaticamente, foram inspecionadas visualmente, alinhadas e, quando necessário, corrigidas manualmente no software ChromasPro version 1.6 (2012). O software DnaSP v.5.10 (LIBRADO & ROZAS, 2009) foi utilizado para separar os haplótipos e determinar o

número de sítios polimórficos, número de haplótipos e a diversidade haplotípica. A rede de haplótipos foi construída através do programa NETWORK v. 4.6 (POLZIN, 2003), utilizando-se o algoritmo *Median Joining* que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados. Também foi construído um dendograma baseado nas distâncias genéticas pelo método de *Neighbor Joining* com auxílio do programa MEGA versão 5.2 (TAMURA *et al.*, 2011). O teste de *Fst* foi executado através do software Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS

4.1 Análises Morfométricas

4.1.1 Morfometria Geométrica

A partir da anotação dos 19 marcos anatômicos nas nervuras das asas foram obtidos os valores de Procrustes, onde foi observado que os marcos anatômicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 18 e 19 variaram de forma isotrópica, sendo distribuídos circularmente em torno da média, não mostrando assim, nenhuma tendência de variação, podendo estar relacionada tanto a variação casual dos marcos anatômicos quanto a pequenas variações durante a marcação dos pontos.

Os marcos anatômicos 9, 10, 13, 14 e 15 variaram de forma alotrópica, mostrando uma tendência na variação que pode indicar a seleção de uma característica ou a associação de uma característica com outra já selecionada (Figura 7).

Figura 7: Resultados do alinhamento de Procrustes dos 19 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de operárias. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam à média. A identificação de cada marco anatômico se dá pela numeração em vermelho.

Na Análise de Componente Principal, a partir dos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 19 marcos anatômicos, foram geradas 34

medidas de deformações relativas. As 20 primeiras medidas foram superiores a um, explicando 92% da variabilidade de todo o conjunto de dados. A análise mostra o primeiro componente principal (13,45%) e o segundo componente principal (12,21%) como os principais eixos de variação na análise, seguidos dos PC3 (9,06%) e PC4 (8,14%).

Através das grades de deformação podemos observar os principais marcos anatômicos responsáveis pela mudança da forma. Dentre todas as variáveis analisadas, as coordenadas Cartesianas X15, X13 e X16 foram as que mais contribuíram para explicar a variabilidade em CV1 (Figura 8), enquanto que as coordenadas X15, X5, Y19, X11, e X12 foram as que mais contribuíram para explicar a variabilidade encontrada no segundo eixo (Figura 9).

PC1

Figura 8: Mudanças de forma observadas através da grade de deformação (*Thin-plate spline*). Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação.

PC2

Figura 9: Mudanças de forma observadas através da grade de deformação (*Thin-plate spline*). Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação.

No gráfico de dispersão, com os respectivos eixos que mais contribuíram para variação dos grupos na PCA (Figuras 10 e 11), foi observado que nenhum dos grupos analisados apresentou grandes diferenças quando analisamos os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), independentemente do classificador de marcação das elipses, seja Localidades ou Climas. O teste de Componente Principal indica a distribuição dos dados no morfoespaço, sem se importar com sua origem, diferentemente da análise de variáveis canônicas que tende a agrupar indivíduos de um mesmo conjunto, dando ênfase nas diferenças e similaridades entre as amostras dependendo o marcador morfométrico utilizado.

Figura 10: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de *Apis mellifera*, obtidas a partir das análises dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas, elipses marcadas por localidades.

Figura 11: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de *Apis mellifera*, obtidas a partir das análises dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas, elipses marcadas por Climas.

A partir destes resultados foram feitas Análises de Variáveis Canônicas utilizando como marcador morfométrico as Localidades e os Climas das regiões amostradas.

Na Análise das Variáveis Canônicas usando como classificador morfométrico as localidades amostradas, foram encontrados 11 eixos com autovalores maiores do que 0,1 e que maximizam a separação significativa dessas populações. Os quatro primeiros eixos foram responsáveis por mais da metade de toda a variabilidade de todo o conjunto de dados, contribuindo com 54,60%. O primeiro eixo foi responsável pela explicação de 24,83% de toda a variação, enquanto o segundo eixo explicou 10,94% da variabilidade dos dados, em um total de 35,78%.

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da análise das variáveis canônicas não nos permite observar diferenças entre os grupos analisados, tanto no eixo correspondente à CV1 como à CV2 (Figura 12).

Figura 12: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Segundo os valores das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides das distribuições dos grupos (Tabela 6), As populações de Mossoró (RN), Rio Largo (AL) e São Raimundo Nonato (PI) apresentaram as maiores proximidades morfológicas perante o restante das populações, enquanto que as localidades com apenas um ninho se mostram populações com maior distanciamento entre si.

Tabela 6: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações de *A. mellifera* obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas.

	Barauna	B Sto Antônio	B Vista	B Grande	Cuité	I. Coelho	J.Gomes	J. Pessoa	Macaíba	Maceió	Maturéia	Mossoró	Murici	Parnaíba	R.Largo	S. Cristovão	SP.Potengi	S.R.Nonato
Barra de Sto Antônio	3,6751																	
Bela Vista	3,4071	2,8391																
Brejo Grande	3,3046	2,4395	2,6154															
Cuité	3,8817	3,395	3,5594	2,7853														
Isaias Coelho	3,9852	3,4295	2,1694	3,1099	3,9104													
Joaquim Gomes	3,2358	2,9886	2,7198	2,9306	3,521	3,3951												
Jão Pessoa	3,2683	3,1591	2,9225	2,8955	2,877	3,4654	2,6759											
Macaíba	3,517	3,3896	2,9631	3,3087	3,4489	2,9184	2,5991	2,9074										
Maceió	4,4885	3,902	3,3796	3,457	4,1778	4,1308	3,7883	4,0182	3,7441									
Maturéia	3,3654	3,9818	3,7693	3,7964	4,2127	4,3325	3,9181	3,6947	4,465	5,22								
Mossoró	3,2193	2,6731	1,5837	2,01	3,1935	2,3011	1,9415	2,5963	2,4527	3,352	3,7559							
Murici	4,4395	3,3581	3,7702	3,4917	3,9539	4,3015	3,5108	3,5933	3,7347	4,8111	4,2068	3,3479						
Parnaíba	3,0464	2,8406	1,9151	1,9622	3,0107	2,7826	2,5408	2,5755	3,0216	3,5626	3,4866	1,6923	3,4944					
Rio Largo	3,177	1,8216	2,2842	2,1857	3,1825	3,1439	2,4407	2,8593	3,2398	3,7923	3,2799	1,9237	2,8806	2,0851				
São Cristovão	3,2151	2,5689	2,6562	1,9127	2,6917	2,9834	2,5685	2,1955	2,7966	3,8723	3,625	2,0345	3,4558	1,8014	2,2363			
SP do Potengi	3,089	2,5053	2,4268	2,5777	3,0671	2,811	2,4562	3,047	2,906	4,1727	3,5524	1,9794	3,7767	2,3007	1,9061	2,1528		
São Raimundo Nonato	2,8986	2,5755	2,0439	1,8167	2,8567	2,7301	2,5046	2,3451	2,7235	3,2754	3,691	1,7724	3,4276	1,6733	2,0078	2,2337	2,4779	
Taperoá	3,7173	2,7585	3,069	2,529	2,8379	3,3064	3,1492	2,7724	3,4586	4,1093	3,2762	2,7892	3,3764	2,6352	2,2372	2,4695	2,7605	2,4107

A partir destas distâncias (Tabela 6) foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 13), no qual foi possível perceber a inexistência de um agrupamento específico baseado em distâncias geográficas entre as localidades, corroborando com o gráfico de dispersão da Análise Canônica.

Figura 13: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera* construído pelo método de *Neighbor Joining*.

A Análise de Funções Discriminantes indicou que a maioria das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos não se apresentaram estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Tabela 7). Esta ausência de significância estatística indica que as populações são extremamente parecidas, sugerindo uma ausência de estruturação populacional entre as populações amostradas.

Tabela 7: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	Baraúna	B. Sto Antônio	B. Vista	B. Grande	Cuité	I. Coelho	J. Gomes	J. Pessoa	Macaíba	Maceió	Maturéia	Mossoró	Murici	Parnaíba	R Largo	S. Cristovão	S.P Potengi	S.R. Nonato	Taperoá
Baraúna		0,4357	0,0016	0,0688	0,9588	0,9212	0,8605	0,9873	0,9245	0,8816	0,9685	0,0003	0,8112	0,0007	0,0708	0,0025	0,935	0,0138	0,7765
Barra de Santo Antônio	21,6086		<.0001	0,0155	0,8771	0,0714	0,6892	0,9215	0,9243	0,9301	0,7978	<.0001	0,572	<.0001	0,3909	0,0006	0,1621	<.0001	0,0028
Bela Vista	4,3441	3,7001		<.0001	0,0002	0,1833	<.0001	0,0811	0,0052	0,2529	0,0442	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Brejo Grande	9,4329	3,6398	2,9511		0,2806	0,0009	0,0011	0,0602	0,067	0,1099	0,1532	<.0001	0,0017	0,0034	<.0001	0,0007	0,0009	0,0001	0,0081
Cuité	3,4191	7,7982	4,2997	5,4861		0,877	0,8105	0,9978	0,9707	0,9361	0,9728	0,0028	0,926	0,2056	0,0227	0,0198	0,8624	0,0046	0,4702
Isaias Coelho	5,5543	6,6991	2,1489	6,1538	6,4324		0,7777	0,9972	0,9788	0,8407	0,914	0,0004	0,8498	<.0001	<.0001	<.0001	0,0305	0,0059	0,0658
Joaquim Gomes	5,9859	4,7085	3,599	7,4914	6,9449	8,7027		0,9971	0,9982	0,8847	0,9791	0,1005	0,9378	0,1084	0,2903	0,0086	0,3071	<.0001	0,0073
João pessoa	2,1098	7,5105	4,3212	19,2762	1,8721	3,1326	2,6939		0,997	0,9622	0,9991	0,6425	0,9913	0,7272	0,082	0,6374	0,9553	0,4407	0,9915
Macaíba	3,9932	6,7329	3,6623	7,282	3,3998	4,182	2,6619	1,9602		0,9823	0,9372	0,0724	0,9662	0,0111	0,0107	0,0268	0,796	0,0226	0,7531
Maceió	3,7024	7,2781	3,8523	16,1058	3,516	7,2751	5,6167	2,036	2,6226		0,978	0,0917	0,9809	0,031	0,0225	0,0372	0,9623	0,0254	0,8235
Maturéia	2,5465	10,5029	4,5329	14,4983	2,8621	5,8919	3,6716	0,9892	3,4992	1,7853		0,003	0,9184	0,3583	0,2878	0,0099	0,9711	0,0088	0,9702
Mossoró	4,2101	3,0773	1,7684	2,4696	3,4574	2,822	2,31	3,0769	2,8735	3,9536	4,8437		<.0001	<.0001	0,0005	<.0001	0,0164	<.0001	<.0001
Murici	5,5285	15,3849	5,2239	12,2841	4,2439	6,9167	4,7911	2,307	3,5035	2,661	3,772	4,0535		0,0011	0,2553	0,017	0,353	0,0001	0,7413
Parnaíba	5,1952	3,5515	2,2083	2,2646	3,0859	3,8074	2,6958	3,4237	3,9472	5,2622	4,047	1,7805	4,5178		0,0027	<.0001	0,0106	<.0001	0,0001
Rio Largo	7,3109	2,3743	2,4983	3,9554	6,9817	6,7095	3,483	11,041	7,6378	14,092	8,2411	2,0063	4,8272	2,1991		<.0001	0,2459	<.0001	0,0026
São Cristovão	5,1888	2,9763	3,2742	2,5353	4,0092	3,9623	3,4127	3,7341	3,9193	5,5169	6,1183	2,2457	4,0544	2,0937	2,9264		<.0001	<.0001	0,0053
São Paulo do Potengi	6,395	3,9096	2,9632	4,6407	7,9086	8,7308	7,7969	6,3043	9,288	6,0748	5,7524	2,0904	26,051	2,526	2,6263	3,3947		<.0001	0,0449
São Raimundo Nonato	4,1329	3,5722	2,2421	2,503	3,9365	2,8821	3,9378	3,7323	3,5715	5,0364	5,4056	1,7932	4,6861	1,9384	2,4983	2,8561	3,0003		<.0001
Taperoá	9,5684	6,7376	3,9027	4,1057	18,478	8,5862	38,3418	4,5056	9,9485	9,2332	5,582	3,0126	10,205	3,1952	4,1104	2,7988	5,231	3,3913	

*Em negrito os pares de populações nas quais a distância entre os centróides foi estatisticamente significante ($\alpha = <0,05$).

O teste de validação cruzada apresentou uma taxa de acerto de 11%, indicando nenhuma ou pouca estruturação populacional, corroborando a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre as populações analisadas nas análises discriminantes e também os resultados encontrados no gráfico de dispersão.

O teste de Mantel indicou ausência de correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias morfológicas ($r = 0,10$) e estatisticamente não significativa ($P = 0,236$).

Dentro de uma colônia podemos ter diferenças entre os indivíduos, tais como, diferenças de desenvolvimento ou até mesmo mutações. A fim de amenizar estas variações entre as amostras foi feita uma análise apenas com as médias das colônias.

Para este tipo de análise é permitido utilizar apenas localidades onde foram amostrados mais de um ninho, de modo que as amostras que consistiam de abelhas com apenas um ninho foram retiradas da análise.

Na Análise de Componente Principal foram encontrados 35 eixos que maximizam a separação significativa dessas populações, sendo que os 11 primeiros apresentaram autovalores maiores que um, representando 76,4% de toda a variação. A análise mostra o primeiro componente principal (16,23%) e o componente principal (11,90%) como os principais eixos de variação na análise, seguidos dos PC3 (9,47%) e PC4 (8,56%).

No gráfico de dispersão, com os dois primeiros eixos dos componentes principais (Figura 14), foi observado que nenhum dos grupos analisados apresentou grandes diferenças visuais entre si.

Figura 14: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de *Apis mellifera*, obtidas a partir das análises dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da análise das variáveis canônicas nos permite observar uma leve diferenciação entre os grupos analisados, bem como o agrupamento dos ninhos provenientes de uma mesma localidade, tanto no eixo correspondente à CV1 como à CV2 (Figura 15).

Figura 15: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Segundo os valores das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides das distribuições dos grupos (Tabela 8), as maiores proximidades morfológicas são observadas nas populações de Mossoró (RN), São Cristóvão (AL) e São Raimundo Nonato (PI) perante o restante, assim como na análise geral, as maiores distâncias são encontradas entre localidades com poucos ninhos. Apesar de haver uma diferença entre a grandeza das distâncias de Mahalanobis fornecidas pelo MorphoJ e as fornecidas pelo Statistica a proporção é similar e são condizentes entre si.

Tabela 8: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição das populações analisadas de acordo com Análise de Variáveis Canônicas utilizando as médias dos indivíduos de mesma colônia como dados de entrada.

	S. Cristivão	B. Grande	Baraúna	Cuité	Taperoá	B. Vista	I. Coelho	S. R. Nonato	Parnaíba	Mossoró	Macaíba	SP. Potengi	Rio Largo	Murici	J. Gomes
Brejo Grande	12,52944														
Baraúna	37,19031	36,25425													
Cuité	27,24521	29,50370	49,03646												
Taperoá	25,43808	29,63895	59,44568	33,96702											
Bela Vista	33,25502	36,00820	41,69044	60,04678	56,10505										
Isaias Coelho	35,62021	45,89807	49,92188	65,17884	56,61231	17,27895									
São Raimundo Nonato	16,28476	11,84510	27,56781	30,26457	30,99943	17,62781	29,88017								
Parnaíba	14,93710	17,82075	35,50486	39,13582	37,68614	14,96944	29,83127	10,53216							
Mossoró	18,98716	17,87722	35,14930	48,15693	43,47568	12,34114	27,01485	11,27410	10,15869						
Macaíba	29,27990	35,82171	42,44920	46,75295	48,75399	41,86457	46,41817	25,03164	33,99209	23,69800					
São Paulo do Potengi	17,51215	21,00872	33,02870	39,70907	35,98269	27,71540	32,26817	18,66610	22,91044	15,35643	27,54547				
Rio Largo	24,66452	19,72459	38,79231	47,29946	27,80200	36,53103	51,53083	19,37297	27,39413	20,57763	38,51289	15,43947			
Murici	64,66144	62,24170	79,69213	75,85690	52,64813	81,57541	97,46697	57,97119	69,05204	62,87295	68,48004	66,80343	38,76928		
Joaquim Gomes	35,82407	38,41781	43,87270	63,70965	52,83899	36,17074	59,03238	28,30830	31,06926	16,36032	28,10397	29,60874	28,51082	63,28321	
Barra de Sto Antonio	25,49194	21,37139	46,21071	43,19218	31,02445	43,11888	57,53927	24,31268	34,32601	30,31574	37,90218	21,80373	10,29281	50,18816	41,28146

Um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (figura 16) foi construído a partir das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides das nuvens de distribuição dos grupos.

Figura 16: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera* construído pelo método de *Neighbor Joining*.

O teste de validação cruzada teve uma taxa de acerto de 16%, indicando nenhuma ou pouca estruturação populacional e o teste de Mantel também indicou

baixa correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias morfológicas ($r = 0,10$) e estatisticamente não significativa ($P = 0,201$).

A Análise de Funções Discriminantes indicou que a maioria das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos se apresentaram estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Tabela 9), Esta diferença para a análise anterior pode ser explicada pelo fato de localidades com amostragem de apenas um ninho terem sido excluídas desta análise, além do fato de que a análise com as médias das medidas dos indivíduos de cada ninho apresentarem maior ordem de grandeza. Entretanto, a ausência de estruturação populacional e a baixa taxa de acerto encontradas nos testes de validação cruzada demonstram a grande similaridade entre os indivíduos das diferentes populações.

Tabela 9: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	S. Cristivão	B. Grande	Baraúna	Cuité	Taperoá	B. Vista	I. Coelho	SR. Nonato	Parnaíba	Mossoró	Macaíba	SP. Potengi	Rio Largo	Murici	J. Gomes	B. Sto Antonio
S. Cristivão		0,346124	0,189662	0,571810	0,018774	0,000000	0,003474	0,004093	0,013462	0,000097	0,475615	0,220077	0,001087	0,002326	0,027024	0,018433
Brejo Grande	12,52944		0,323808	0,594674	0,025845	0,000004	0,001272	0,348770	0,042760	0,014149	0,338687	0,229013	0,083633	0,009442	0,044398	0,211516
Baraúna	37,19031	36,25425		0,506987	0,029865	0,080205	0,151835	0,528837	0,224507	0,187421	0,691093	0,558392	0,215807	0,048608	0,411879	0,158673
Cuité	27,24521	29,50370	49,03646		0,521073	0,003512	0,024741	0,403995	0,136877	0,023246	0,570491	0,316631	0,069855	0,068758	0,065201	0,221810
Taperoá	25,43808	29,63895	59,44568	33,96702		0,000000	0,000514	0,001658	0,000183	0,000004	0,117742	0,018459	0,028158	0,072817	0,007557	0,059010
Bela Vista	33,25502	36,00820	41,69044	60,04678	56,10505		0,348417	0,000286	0,003301	0,002611	0,078051	0,003949	0,000001	0,000075	0,016085	0,000011
Isaias Coelho	35,62021	45,89807	49,92188	65,17884	56,61231	17,27895		0,013790	0,016289	0,018295	0,218702	0,098865	0,000160	0,000338	0,006119	0,000418
São R. Nonato	16,28476	11,84510	27,56781	30,26457	30,99943	17,62781	29,88017		0,105075	0,013946	0,653485	0,126707	0,007899	0,005967	0,114910	0,019156
Parnaíba	14,93710	17,82075	35,50486	39,13582	37,68614	14,96944	29,83127	10,53216		0,047089	0,271872	0,036688	0,000191	0,000953	0,069532	0,000619
Mossoró	18,98716	17,87722	35,14930	48,15693	43,47568	12,34114	27,01485	11,27410	10,15869		0,673489	0,226462	0,001179	0,001640	0,684771	0,000813
Macaíba	29,27990	35,82171	42,44920	46,75295	48,75399	41,86457	46,41817	25,03164	33,99209	23,69800		0,772859	0,223185	0,129789	0,893919	0,375184
SP. do Potengi	17,51215	21,00872	33,02870	39,70907	35,98269	27,71540	32,26817	18,66610	22,91044	15,35643	27,54547		0,549372	0,010824	0,343333	0,366575
Rio Largo	24,66452	19,72459	38,79231	47,29946	27,80200	36,53103	51,53083	19,37297	27,39413	20,57763	38,51289	15,43947		0,216408	0,213573	0,926164
Murici	64,66144	62,24170	79,69213	75,85690	52,64813	81,57541	97,46697	57,97119	69,05204	62,87295	68,48004	66,80343	38,76928		0,068252	0,098947
Joaquim Gomes	35,82407	38,41781	43,87270	63,70965	52,83899	36,17074	59,03238	28,30830	31,06926	16,36032	28,10397	29,60874	28,51082	63,28321		0,059859
Barra de Sto Antonio	25,49194	21,37139	46,21071	43,19218	31,02445	43,11888	57,53927	24,31268	34,32601	30,31574	37,90218	21,80373	10,29281	50,18816	41,28146	

*Em negrito os pares de populações nas quais a distância entre os centróides foi estatisticamente significativa ($\alpha = <0,05$).

Quando comparadas as análises em nível de indivíduos e em nível de colônia, os resultados são mais satisfatórios e com maior taxa de acerto na validação cruzada para as análises feitas com as médias (FRANCOY 2007; OLESKA & TOFILSKI, 2014). Porém os resultados aqui obtidos mostram que não houve grandes diferenças entre as análises utilizando os indivíduos como base dos testes em relação à análise utilizando a média das colônias. Em ambos os casos as populações se mostraram similares e com baixa estruturação populacional. Além disso, o teste de validação cruzada mostrou apenas leve melhora quando consideramos as médias da colônia.

No trabalho de Francoy (2007) também foi observado uma falta de estruturação nas amostras quando separadas por localidades, onde localidades do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil se mostram misturadas no dendograma de proximidade morfológica.

Esta ausência de estruturação populacional das populações do Nordeste brasileiro pode ser explicada principalmente pela influência ambiental e antrópica no comportamento e na dinâmica populacional destas populações, resultando em altos níveis de fluxo gênico e miscigenação.

Essa similaridade existente pode ser explicada por diversos fatores. Devido as grandes secas no Nordeste brasileiro, todos os anos os apicultores perdem grande parte das suas colônias, que abandonam os apiários em busca de novos pastos no período de escassez de alimento (FREITAS, 2007). De acordo com Sofia e Bego (1996) as colônias de abelhas eusociais tropicais, normalmente com elevado número de indivíduos, exigem uma alta demanda de alimento ao longo do ano. Em áreas sujeitas à constantes perturbações, as abelhas devem se adequar continuamente a estas mudanças, caso contrário, ocorrerá a enxameação para áreas mais favoráveis, fato esse que é ainda mais exacerbado em abelhas Africanizadas, que tem como uma de suas características principais a enxameação reprodutiva e de abandono (ALMEIDA, 2008).

Essas altas taxas de enxameação possibilitam que essas abelhas migrem rapidamente para outras regiões, contribuindo assim para um alto fluxo gênico entre as populações, podendo este ser o principal motivo da falta de estruturação populacional encontrada em nossos resultados, uma vez que estas abelhas podem migrar a uma velocidade de 400-500 km por ano (SOARES, 2012).

Além disso, zangões de abelhas Africanizadas podem cobrir uma área de até 157 km², isto é, um raio 7 km em torno da colônia (CRISTINO, 2003). Rainhas virgens podem se dirigir para áreas de congregações de 2 km a 5 km de distância da colônia e acasalar com até 18 machos, provendo assim uma variabilidade genética considerável além da possibilidade de mistura de genes provenientes de diferentes lugares (FREE, 1980).

Outro fator que provavelmente também está envolvido é a apicultura migratória existente na região, onde os apicultores fazem a mudança de conjuntos de colmeias (apiários) de uma região para outra, acompanhando as floradas e visando à produção de mel e a prestação de serviços para a polinização, de modo a contribuir para o fluxo gênico da espécie e consequentemente a falta de estruturação da população (TRINDADE *et al.*, 2004). O comércio de compra e venda de rainhas e enxames no Nordeste brasileiro, embora em menor escala também pode estar contribuindo para a variabilidade local, já que o comportamento humano, na exploração apícola, tem grande influência sobre a distribuição populacional das abelhas (FRANCOY, 2007).

Os resultados das análises baseadas em clima são descritos a seguir.

Na Análise das Variáveis Canônicas usando como classificador morfométrico os climas, foram encontrados dois eixos que maximizam a separação significativa dessas populações. O primeiro eixo foi responsável pela explicação de 60,23% de toda a variação, enquanto o segundo eixo explicou 39,76% da variabilidade dos dados, em um total de 100%.

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da análise das variáveis canônicas nos permite observar a existência de três grupos, com clara sobreposição de parte das nuvens, tanto no eixo correspondente à CV1 como à CV2 (Figura 17).

Figura 17: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides das distribuições dos grupos foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os indivíduos pertencentes às diferentes zonas climáticas (Tabela 10) (Figura 18).

Tabela 10: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações de *A. mellifera* obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas

	Litorâneo Úmido	Tropical
Tropical	1,55	
Semiárido	1,06	1,33

Figura 18: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera*, construído com base no algoritmo *Neighbor Joining*.

Através do dendrograma de proximidade morfológica podemos perceber uma maior proximidade entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido. Proximidade essa que corrobora com a divisão geográfica encontrada no Nordeste brasileiro (Figura 1).

A Análise de Funções Discriminantes indicou que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos se apresentaram estatisticamente significantes ($P < 0,05$). Também foi possível observar que as distâncias de Mahalanobis (Tabela 11) diferem sutilmente da encontrada pela Análise de Variáveis Canônica (Tabela 10).

Tabela 11: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido
Litorâneo Úmido		<.0001	<.0001
Tropical	1,50		<.0001
Semiárido	1,03	1,39	

O teste de validação cruzada identificou corretamente 60,10% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, indicando a presença de estruturação populacional, diferente do observado nas análises anteriores, que utilizaram as localidades de origem como marcador (11% de identificação correta).

A região Tropical foi a com a menor porcentagem de acerto dentro de sua respectiva área, a maioria das amostras dessa região foram classificadas dentro da região mais próxima geograficamente, o Semiárido (Tabela 12).

Tabela 12: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

Zona Climática	Associação ao grupo prevista			Total
%	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	
Litorâneo Úmido	55,4	4	40,6	100
Tropical	29,7	15,6	54,7	100
Semiárido	22,7	4,5	72,8	100

Ao serem adicionadas, na análise, as amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas, juntamente com o restante das amostras coletadas durante a seca, foi necessário o realinhamento das amostras e uma nova Análise de Componente Principal, já que novas amostras foram adicionadas.

A partir da anotação dos 19 marcos anatômicos nas nervuras das asas foram obtidos os valores de Procrustes, onde foi observado que os marcos anatômicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 18 e 19 variaram de forma isotrópica, sendo distribuídos circularmente em torno da média enquanto que os marcos anatômicos 9, 10, 13, 14 e 15 variaram de forma mais alotrópica (Figura 19), não mostrando grandes diferenças da a análise de componente principal realizada anteriormente, na qual não haviam sido incluídas as amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas.

Figura 19: Resultados do alinhamento de Procrustes dos 19 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de operárias. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam à média.

Na Análise de Componente Principal, a partir dos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 19 marcos anatômicos, foram gerados 34 medidas de deformações relativas. As 20 primeiras medidas apresentaram valores superiores a 1, explicando 92% da variabilidade de todo o conjunto de dados. A representação gráfica mostra o primeiro componente principal (13,36%) e o segundo componente principal (12,53%) como os principais eixos de variação na análise, seguidos dos PC3 (11,06%) e PC4 (8,83%).

Através das grades de deformação, foi possível observar os marcos anatômicos que mais contribuíram pela deformação da forma. Dentre todas as variáveis analisadas, as coordenadas Cartesianas X15, X13 e X17 foram as que mais contribuíram para explicar a variabilidade em CV1 (Figura 20), enquanto que as coordenadas X15, X5, e X11 foram as que mais contribuíram para explicar a variabilidade encontrada no segundo eixo (figura 21).

PC1

Figura 20: Mudanças de forma observadas através da grade de deformação (*Thin-plate spline*). Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação.

PC2

Figura 21: Mudanças de forma observadas através da grade de deformação (*Thin-plate spline*). Cada linha começa na forma consenso, representado pelo ponto, o comprimento e a direção da reta indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação.

No gráfico de dispersão, com os respectivos eixos que mais contribuíram para variação dos grupos na PCA (Figura 22), foi observado que nenhum dos grupos analisados apresentou grandes diferenças quando analisamos os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2).

Figura 22: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de *Apis mellifera*, obtidas a partir das análises dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

Na análise das Variáveis Canônicas foram encontrados dois eixos que maximizaram a separação dessas populações. O primeiro eixo foi responsável pela explicação de 53,8% de toda a variação, enquanto o segundo eixo explicou 46,13% da variabilidade dos dados, em um total de 100%.

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da análise das variáveis canônicas indicou que a adição das amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas muda o padrão, mostrando uma maior homogeneização principalmente entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido (Figura 23).

Figura 23: Representação gráfica obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas de populações de *Apis mellifera* classificadas em relação ao clima, coletadas na época da seca mais as amostras de Mossoró coletadas na época de chuvas.

Essa maior homogeneização também pode ser observada analisando as distâncias de Mahalanobis entre os centroides das distribuições dos grupos (Tabela 13). A distância entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido diminuiu de 1,068 para 0,857 quando as amostras de Mossoró coletadas na época da chuva foram adicionadas, enquanto o dendograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 24) continuou a indicar uma maior proximidade entre as populações da região do Litorâneo Úmido e o Semiárido.

Tabela 13: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações de *A. mellifera* obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas.

	Litorâneo Úmido	Tropical
Tropical	1,5091	
Semiárido	0,8572	1,4385

Figura 24: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera* construído pelo método de *Neighbor Joining*.

Na Análise de Funções Discriminantes também foi observado que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante

	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido
Litorâneo Úmido		<.0001	<.0001
Tropical	1,5074		<.0001
Semiárido	0,8925	1,4809	

O teste de validação cruzada identificou corretamente 51,8% dos indivíduos dentro de suas respectivas zonas climáticas. Um fato que chama a atenção foi que a adição das amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas levou à diminuição da taxa de acerto do que quando comparado com as análises sem estas amostras (Tabela 15)

Tabela 15: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

Localidade	Associação ao grupo prevista			Total
	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	
%				
Litorâneo Úmido	50	21	29	100
Tropical	25	50	25	100
Semiárido	27	20,1	52,9	100

Uma análise adicional foi realizada, utilizando as amostras de Mossoró coletadas na época de chuvas como sendo um marcador diferente, assim como o Tropical, o Semiárido e o Litorâneo Úmido.

Foram encontrados três eixos que maximizam a separação significativa dessas populações. O primeiro eixo foi responsável pela explicação de 73,3% de toda a variação, enquanto o segundo eixo explicou 13,25% da variabilidade dos dados, em um total de 86,55%.

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da análise das variáveis canônicas permitiu a observação de que as amostras coletadas em Mossoró na época das chuvas, é a responsável por esta homogeneização encontrada na análise anterior, uma vez que estas amostras foram posicionadas entre os pontos da região do Litorâneo Úmido e do Semiárido (Figura 25).

Figura 25: Representação gráfica obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas de populações de *Apis mellifera* classificadas em relação ao clima, coletadas na época da seca com acréscimo das amostras de Mossoró coletadas na época de chuvas como sendo também um marcador.

Através das distâncias quadradas de Mahalanobis (Tabela 16) e da análise do dendograma de proximidade morfológica (Figura 26) foi possível observar que apesar da cidade de Mossoró se localizar no Semiárido a distância entre as amostras de Mossoró chuvas e o Litorâneo Úmido (2,0017) é menor do que a distância entre Mossoró chuvas e o Semiárido (2,4529).

Isso explica o fato da distância entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido diminuir de 1,068 para 0,857 quando as amostras de Mossoró coletadas na época da chuva são adicionadas à análise, pois como observado no gráfico de dispersão são essas amostras as responsáveis pela maior homogeneização encontrada entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido na análise mostrada anteriormente.

Tabela 16: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações de *A. mellifera* obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas.

	Litorâneo Úmido	Mossoró Chuvas	Tropical
Mossoró Chuvas	2,0017		
Tropical	1,543	2,6578	
Tropical Semiárido	1,0539	2,4529	1,3515

Figura 26: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera* construído pelo método de *Neighbor Joining*.

A Análise de Funções Discriminantes indicou que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Tabela 17).

Tabela 17: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante

	Litorâneo úmido	Mossoró chuvas	Tropical	Semiárido
Litorâneo úmido		<.0001	<.0001	<.0001
Mossoró chuvas	2,3535		<.0001	<.0001
Tropical	1,5074	2,9128		<.0001
Semiárido	1,0373	2,2155	1,3919	

O teste de validação cruzada identificou corretamente 59,7,% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, sendo que a maior taxa de acerto encontrada foi para a população de Mossoró coletada na época das chuvas, onde houve 75,4% de acerto dentro do seu grupo. Essas taxas sugerem assim como o gráfico de dispersão que essas amostras são bem diferentes do restante (Tabela 18).

Tabela 18: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

Localidade	Associação ao grupo prevista				Total
%	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	Mossoró Chuvas	
Litorâneo Úmido	47,8	3,1	38,8	10,3	100
Tropical	23,4	12,5	56,3	7,8	100
Semiárido	14,2	4,2	68,9	12,6	100
Mossoró Chuvas	14	0,6	10,1	75,4	100

Ao observar que a distância entre as amostras de Mossoró chuvas e o Litorâneo Úmido é menor do que a distância entre Mossoró chuvas e o Semiárido, foi feita uma segunda análise adicional, marcando as amostras coletadas em Mossoró na época da seca também como um marcador, a fim de entender a relação entre essas duas amostragens.

Foram encontrados quatro eixos que maximizam a separação significativa dessas populações. O primeiro eixo foi responsável pela explicação de 69,22% de toda a variação, enquanto o segundo eixo explicou 15,51% da variabilidade dos dados, em um total de 84,73%.

Os dados obtidos com esta análise adicional fornecera uma série de evidências sobre as diferentes amostragens em períodos de seca e chuva, como o fato de que as amostras de Mossoró coletadas no período da seca e na época das chuvas se localizam opostamente no gráfico de dispersão (Figura 27) e possuem a maior distância entre populações (Tabela 19).

Figura 27: Representação gráfica obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas de populações de *Apis mellifera* classificadas em relação ao clima, coletadas na época da seca com acréscimo das amostras de Mossoró coletadas na época de chuvas como sendo também um marcador.

Tabela 19: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações de *A. mellifera* obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas

	Litorâneo Úmido	Mossoró Chuvas	Mossoró	Tropical
Mossoró Chuvas	2,0471			
Mossoró	1,3316	2,9944		
Tropical	1,5415	2,6782	1,6824	
Tropical Semiárido	1,1509	2,3395	1,2993	1,3783

Apesar de Mossoró chuvas ser mais próxima das populações do Litorâneo Úmido (2,0471), esta população é a mais diferenciada de todas. A população de

Mossoró coletada durante a seca se localiza mais próxima das populações do Semiárido do que do restante ao contrário da população coletada durante a chuva que se localiza mais próximas do Litorâneo Úmido (Figura 28).

Figura 28: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera* construído pelo método de *Neighbor Joining*.

A Análise de Funções Discriminantes indicou que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Tabela 20).

Tabela 20: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante

	Litorâneo úmido	Mossoró chuvas	Mossoró seca	Tropical	Semiárido
Litorâneo úmido		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Mossoró chuvas	2,3535		<.0001	<.0001	<.0001
Mossoró seca	1,5432	3,6632		<.0001	<.0001
Tropical	1,5074	2,9128	1,9457		<.0001
Semiárido	1,1687	2,0903	1,4874	1,4851	

O teste de validação cruzada identificou corretamente 52,2% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, onde, mais uma vez, foi possível observar Mossoró chuvas com uma alta taxa de acerto dentro de seu grupo. Por outro lado, as amostras de Mossoró coletadas na época da seca apresentam 27,1% de acerto e com grande taxa de erro (34,4%) dentro do grupo Semiárido, região esta a de origem das amostras de Mossoró (Tabela 21).

Tabela 21: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

Localidade	Associação ao grupo prevista					Total
	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	Mossoró Seca	Mossoró Chuvas	
%						
Litorâneo Úmido	54	4,9	24,6	6,3	10,3	100
Tropical	28,1	17,2	35,9	10,9	7,8	100
Semiárido	16	3,8	52,1	11,3	16,9	100
Mossoró Seca	28,1	8,3	34,4	27,1	2,1	100
Mossoró Chuvas	14	0,6	9,5	0	76	100

Os resultados das análises de morfometria geométrica usando as zonas climáticas como classificador indicaram certa estruturação entre os três climas amostrados, sugerindo grupos relativamente adaptados a estas condições ambientais, apesar de haver fluxo gênico entre eles.

Souza *et al.*, (2009) verificaram, em diferentes regiões geomorfológicas da Paraíba, a existência de dois grupos distintos de *Apis mellifera*. Guler *et al.*, (2010), também utilizando amostras provenientes de diferentes regiões ecológicas, observaram alta variabilidade entre as subespécies *A. m. carnica* e *A. m. caucasica* através da morfometria geométrica da asa anterior destas abelhas.

Nunes (2012) avaliou a variabilidade de *Apis mellifera* em cinco regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste), onde foi observada a formação de grupos distintos por região, conforme a distribuição geográfica das colônias amostradas.

Nossos resultados mostram também que as amostras coletadas em Mossoró durante a época de chuvas se mostram relativamente mais próximas das amostras do Litorâneo Úmido do que com as amostras coletadas em Mossoró durante a seca.

Freitas (2007) realizou o monitoramento da chegada e saída de enxames de duas cidades do Nordeste brasileiro, uma no interior e outra no litoral do Ceará. Neste trabalho os registros de chuvas mostraram claramente que a migração das colônias de abelhas Africanizadas no Nordeste estão intimamente relacionadas com a estação do ano. Os dados do trabalho mostram que no litoral os enxames chegaram durante todo o ano, mas seu número aumentou consideravelmente durante a estação seca, mesma época em que a maioria dos enxames deixaram o interior (julho a outubro). Além disso, os dados mostram grande quantidade de muitos enxames do litoral que migraram durante a estação chuvosa, devido principalmente às grandes quantidades de chuvas no litoral entre os meses de Janeiro a Maio, mesma época em que os enxames começaram a chegar ao Interior.

Em nosso caso, as amostras coletadas durante a época de seca (Novembro) em Mossoró foram as que permaneceram em suas colônias, mesmo em condições adversas e não enxamearam como a maioria dos outros ninhos. As amostras coletadas durante a época das chuvas (Março) em Mossoró são ninhos que se estabeleceram em caixas-isca, depois que as condições voltaram a ser novamente favoráveis às abelhas, devido às chuvas. Devido ao fato das abelhas coletadas durante a época das chuvas em Mossoró serem mais próximas das abelhas do Litorâneo Úmido do que das abelhas do Semiárido aonde foram coletadas, nos leva a inferir que nossos resultados estejam refletindo o padrão de dispersão destas abelhas coletadas em Mossoró entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido.

Esta diferença entre os perfis morfométricos entre as abelhas das regiões úmidas e secas pode ser devido a existência de plasticidade fenotípica como resultado das diferenças ambientais encontradas nos diferentes climas amostrados. No trabalho de Jorge *et al.*, (2011) foram analisadas asas de borboletas *Heliconius erato* utilizando morfometria geométrica, os resultados mostram variação de tamanho e forma das asas entre os indivíduos alimentados com plantas diferentes. Estas diferenças na forma foram interpretadas como efeitos ambientais sobre o desenvolvimento dos indivíduos. Alguns fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa do ar, fornecimento de alimentos e densidade podem favorecer a existência de plasticidade fenotípica (BATISTA *et al.*, 2013). Os resultados de Batista *et al.*, (2013) indicam que as diferenças entre as asas de *Triatoma brasiliensis* podem estar relacionadas com a existência de plasticidade fenotípica, e as variações no tamanho e forma das asas podem ser associadas a diferentes ecótipos, possivelmente como resultado das condições em cada micro-habitat.

Estas diferenças encontradas entre as abelhas que resistiram a seca e não enxamearam e as abelhas que migraram com maior facilidade pode refletir também diferenças comportamentais e talvez possam ser utilizadas como fatores de seleção artificial para linhagens com baixa tendência a enxameação. Certamente que mais estudos são necessários antes deste passo da seleção, mas estes dados trazem uma interessante possibilidade de trabalhos futuros.

4.1.2 Morfometria Tradicional

Na Análise de Componentes Principais os seis primeiros eixos apresentaram autovalores maiores que um e explicaram, em conjunto, 68,23% da variabilidade dos dados, sendo 15,85% no primeiro eixo e 12,98% no segundo eixo.

A representação gráfica dos dois primeiros eixos da Análise de Componentes Principais (Figura 29) dos dados de morfometria tradicional indicou uma grande similaridade entre as populações. Foi possível observar algumas amostras coletadas nas localidades do estado da Paraíba se diferem das demais quando analisadas no primeiro eixo (PC1).

Figura 29: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de *Apis mellifera*, obtidas a partir das análises dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

A medida que mais contribuiu para distribuição das amostras no primeiro eixo foi o comprimento da asa anterior, enquanto que no segundo eixo (PC2) a medida que mais contribuiu foi o ângulo 10. A partir destes resultados foram feitos testes utilizando como marcador morfométrico as Localidades e os Climas das regiões amostradas.

As análises utilizando localidades de coleta como classificador morfométrico apresentaram 12 eixos que maximizam a separação significativa dessas populações, dentre as medidas utilizadas apenas a largura da asa anterior e o Ângulo 9 não contribuíram de maneira significativa para a separação das amostras (Tabela 22).

Tabela 22: Significâncias estatística das medidas de morfometria tradicional na separação dos grupos de acordo com a zona climática onde foram coletadas as amostras de abelhas Africanizadas (Em negrito medidas que não foram significantes na separação das amostras).

Medida	P < 0,05
Comp. Asa	0,000001
Larg. Asa	0,091324
Ang. 1	0,001922
Ang. 2	0,000199
Ang. 3	0,00329
Ang. 4	0,000076
Ang. 5	0,000001
Ang. 6	0,000224
Ang. 7	0,000001
Ang. 8	0,000001
Ang. 9	0,205521
Ang. 10	0,005287
Ang. 11	0,000001

O gráfico de dispersão da Análise de Variáveis Canônicas indicou um maior distanciamento de algumas das amostras coletadas nas localidades pertencentes ao estado da Paraíba no eixo correspondente a CV1 (Figura 30).

Figura 30: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Dentre as medidas que mais influenciaram na separação dos eixos, temos que o comprimento da asa foi à medida que mais influenciou o primeiro eixo (CV1), enquanto que a medida do Ângulo 5 foi a medida que mais influenciou o segundo eixo do gráfico (CV2).

Portanto à medida que mais influenciou no distanciamento das amostras coletadas no estado da Paraíba foi o comprimento da asa. Medidas lineares como comprimento e largura são diretamente proporcionais ao tamanho do organismo (RUTTNER, 1988). Com base nas médias, no desvio e no teste ANOVA, foi possível a visualização de que as abelhas coletadas no estado da Paraíba são maiores do que o restante (Tabela 23).

Tabela 23: Média e desvio padrão das medidas de morfometria tradicional tomadas junto aos indivíduos de abelhas Africanizadas coletados em diferentes zonas climáticas do Nordeste brasileiro. Letras iguais na mesma linha indicam diferenças estatisticamente não significantes. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

	PI	RN	AL	SE	PB
Comp.Asa	5,46 ± 0,18 a	5,29 ± 0,12 b	5,39 ± 0,11 b	5,47 ± 0,11 d	5,58 ± 0,12 e
Larg.Asa	2,78 ± 0,17 a	2,72 ± 0,08 b	2,77 ± 0,08 b	2,84 ± 0,08 d	2,86 ± 0,06 e
Ang.1	39,98 ± 4,08 a	39,92 ± 3,76 a	39,43 ± 4,71 a	39,15 ± 4,00 a	41,13 ± 4,17 a
Ang.2	92,37 ± 3,36 a	92,63 ± 3,19 b	92,13 ± 3,90 b	90,31 ± 3,31 d	86,70 ± 3,61 e
Ang.3	79,05 ± 2,79 a	79,51 ± 2,93 a	78,56 ± 3,11 a	79,47 ± 3,17 a	78,23 ± 3,71 a
Ang.4	87,90 ± 3,49 a	87,98 ± 3,07 a	88,31 ± 2,77 b	88,64 ± 3,33 c	86,61 ± 2,42 d
Ang.5	89,77 ± 4,87 a	89,78 ± 4,37 a	92,89 ± 4,42 c	92,58 ± 4,28 c	93,80 ± 4,39 c
Ang.6	89,97 ± 4,86 a	90,50 ± 4,81 a	91,10 ± 4,20 a	90,19 ± 4,19 a	89,57 ± 3,73 a
Ang.7	48,26 ± 4,62 a	48,18 ± 3,37 a	46,94 ± 3,74 c	47,52 ± 3,48 c	47,10 ± 5,63 c
Ang.8	16,2 ± 2,92 a	16,70 ± 1,90 a	17,07 ± 1,55 b	17,09 ± 1,58 b	17,32 ± 1,91 b
Ang.9	19,43 ± 7,33 a	19,00 ± 6,34 a	18,37 ± 1,48 a	17,95 ± 1,46 a	20,39 ± 13,24 a
Ang.10	101,0 ± 9,15 a	101,00 ± 7,26 a	103,45 ± 6,28 a	103,11 ± 5,22 a	99,75 ± 11,30 a
Ang.11	33,40 ± 2,63 a	34,02 ± 2,96 a	32,25 ± 2,57 c	33,31 ± 2,12 a	31,87 ± 2,39 a

Porém segundo o teste ANOVA, dentro da Paraíba, apenas as localidades de João Pessoa, Baraúna e Cuité apresentaram médias superiores com significância estatística (Tabela 24).

Tabela 24: Média e desvio padrão das medidas de morfometria tradicional tomadas junto aos indivíduos de abelhas Africanizadas coletados em diferentes zonas climáticas do Nordeste brasileiro. Letras iguais na mesma linha indicam diferenças estatisticamente não significantes. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$)

	Baraúna (PB)	Cuité (PB)	Taperoá (PB)	Maturéia (PB)	João Pessoa (PB)
Comp.Asa	5,66±0,08 a	5,63±0,09 b	5,53±0,13 a,b,c	5,56±0,10 a,b,c	5,67±0,08 c
Larg.Asa	2,86±0,04 a	2,89±0,05 b	2,84±0,06 a,b,c	2,88±0,07 a,b,c	2,93±0,04 c
Ang.1	42,20±5,11 a	40,28±3,98 a	40,72±4,02 a	41,13±5,25 a	42,54±3,27 a
Ang.2	89,08±2,83 a	84,47±4,20 a	86,82±3,58 a	87,39±3,30 a	84,80±1,47 a
Ang.3	76,33±4,20 a	78,91±3,72 a	79,24±3,76 a	75,80±2,82 a	78,44±1,80 a
Ang.4	84,17±1,87 a	88,22±2,14 a	87,19±1,72 a	85,84±3,96 a	86,29±1,81 a
Ang.5	93,41±5,56 a	93,96±4,16 a	93,38±4,56 a	93,74±2,74 a	96,10±5,19 a
Ang.6	88,89±3,77 a	89,70±3,60 a	90,56±3,76 a	88,25±3,61 a	87,64±4,03 a
Ang.7	48,44±0,70 a	47,52±2,53 a	45,78±7,39 a	49,32±3,80 a	47,62±6,74 a
Ang.8	16,78±1,41 a	18,10±2,37 a	17,41±2,12 a	17,64±1,44 a	16,32±0,89 a
Ang.9	20,23±2,06 a	17,51±1,90 a	22,94±19,63 a	17,14±1,54 a	17,84±1,71 a
Ang.10	103,9±4,62 a	100,6±4,65 a	97,71±15,97 a	98,91±5,13 a	101,02±5,46 a
Ang.11	31,33±1,05 a	32,47±2,37 a	31,55±2,59 a	33,01±3,60 a	31,99±2,01 a

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de exclusivamente as amostras da Paraíba terem sido coletadas em Setembro, época esta de enxameação no Nordeste brasileiro (BRANDEBURGO *et al.*, 1989; FREITAS, 2007), portanto, pode ter ocorrido uma amostragem de enxames de outros lugares, que devido a época de enxameação estavam nas localidades da Paraíba no momento da coleta. Além disso, as localidades que apresentaram médias superiores ao restante com significância estatística são provenientes de localidades relativamente próximas do litoral, onde João Pessoa se localiza no próprio litoral, Cuité se localiza a 110Km do litoral e Baraúna a 140Km. Estes fatos permitem a inferência de que os enxames coletados podem ser enxames pertencentes ao litoral de alguma região que não foi amostrada.

Segundo os valores das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides das distribuições dos grupos (Tabela 25), a maior proximidade morfológica é observada na população de São Cristóvão (SE), Joaquim Gomes (AL) e Bela Vista (PI), enquanto que as localidades com apenas um ninho se mostram populações com maior distanciamento entre si.

Tabela 25: Distâncias quadradas de Mahalanobis, entre os pares de populações estudadas, obtidas de acordo com Análises de Variáveis Canônicas a partir dos dados de morfometria tradicional.

	B. Grande	Cuité	Taperoá	B. Vista	I. Coelho	Parnaíba	Mossoró	Macaíba	R. Largo	Murici	J. Gomes	B.Sto Antonio	SR. Nonato	SP. Potengi	Maceió	S. Cristovão	Baraúna	Maturéia
Cuité	29.75610																	
Taperoá	21.31967	2.61459																
Bela Vista	7.29688	33.43906	23.54030															
Isaias Coelho	12.77309	51.45431	38.66604	2.48691														
Parnaíba	6.56660	58.23880	44.15566	10.52889	10.15166													
Mossoró	11.53231	71.73024	55.84118	12.26158	8.39443	1.80970												
Macaíba	6.23378	55.69862	43.32585	11.14775	12.02860	1.29150	4.19553											
Rio Largo	6.04547	57.67619	43.95480	12.12210	11.61767	0.89376	2.65817	2.60473										
Murici	8.24948	55.58163	42.24943	14.32736	15.74919	2.50563	5.32943	5.46475	2.80575									
Joaquim Gomes	7.89737	57.99140	43.75420	13.66222	13.64072	1.48130	3.27122	3.49395	1.91700	1.25632								
Barra de Sto Antonio	8.98345	66.13146	52.00387	15.46495	14.46614	2.17158	3.36031	4.11786	1.48864	3.31238	3.47172							
São R. Nonato	5.53598	56.85453	42.54672	10.83933	9.94658	1.00218	1.98831	2.82128	0.53565	3.37228	1.56133	2.28591						
SP. Potengi	9.37542	64.46149	51.34070	13.20356	11.48925	2.32961	3.20052	1.68796	2.25845	7.21570	4.82246	4.34825	2.97557					
Maceió	14.34577	73.53404	56.78442	22.41451	20.45636	4.16584	6.03280	7.61134	4.15898	4.90474	3.43142	5.08440	4.32406	9.11644				
São Cristovão	2.55351	23.63590	16.15154	4.56417	10.65195	8.73761	14.64590	7.76789	9.09206	9.91622	9.74237	12.87064	8.96651	11.18984	18.52322			
Baraúna	30.87025	7.13111	6.33410	27.75630	43.73219	56.60828	68.20219	54.20664	56.75035	56.97707	58.50995	64.00511	55.24357	63.48734	70.54066	24.89100		
Maturéia	25.44535	3.74433	4.17415	25.92242	42.56715	49.28110	62.02235	46.64622	49.18887	48.15381	50.48615	56.02894	49.18861	55.51743	62.67111	18.89232	3.22137	
João pessoa	34.91543	2.62725	5.00139	37.49487	57.06860	64.22378	78.44178	61.24911	64.81438	61.72528	63.62144	72.98716	63.39556	72.72314	77.59332	28.41279	5.58986	3.33368

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 31), no qual fica bem claro o isolamento das localidades pertencentes ao estado da Paraíba.

Figura 31: Dendrograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *A. mellifera*.

Quando estas populações foram comparadas duas a duas, na Análise de Funções Discriminantes, observamos que a maioria das distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos se apresentaram estatisticamente significantes ($P < 0,05$) (Tabela 26).

Tabela 26. Significâncias estatísticas entre as populações estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	B. Grande	Cuité	Taperoá	B. Vista	I. Coelho	Parnaíba	Mossoró	Macaíba	R. Largo	Murici	J. Gomes	B.Sto Antonio	SR. Nonato	SP. Potengi	Maceió	S. Cristovão	Baraúna	Maturéia
Cuité	0,000000																	
Taperoá	0,000000	0,321556																
Bela Vista	0,000000	0,000000	0,000000															
Isaias Coelho	0,000000	0,000000	0,000000	0,000297														
Parnaíba	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000													
Mossoró	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000												
Macaíba	0,000950	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,845356	0,014502											
Rio Largo	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,092588	0,000000	0,310191										
Murici	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,074285	0,000014	0,058332	0,065046									
Joaquim Gomes	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,276083	0,000581	0,277287	0,159847	0,903399								
Barra de Sto Antonio	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000602	0,000000	0,061263	0,072495	0,046095	0,008444							
São R. Nonato	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,002895	0,000000	0,179577	0,478391	0,007998	0,216603	0,000211						
SP. Potengi	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000364	0,000000	0,781663	0,003605	0,000008	0,000263	0,000006	0,000005					
Maceió	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,131514	0,009920	0,063166	0,164393	0,252802	0,518093	0,085219	0,106154	0,000628				
São Cristovão	0,000002	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000016	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000			
Baraúna	0,000000	0,010587	0,000804	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		
Maturéia	0,000000	0,587848	0,227181	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,717197	
João pessoa	0,000000	0,847844	0,105153	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,211042	0,831785

*Em negrito os pares de populações nas quais a distância entre os centróides não foi estatisticamente significativa ($\alpha = <0,05$).

Apesar das localidades do estado da Paraíba possuírem abelhas maiores e serem classificadas mais distante do restante no dendograma de proximidade, o teste de Mantel mostrou uma baixa correlação entre distâncias geográficas e distâncias morfológicas ($r = 0.20$) e estatisticamente não significativa ($P = 0.108$).

O teste de validação cruzada identificou corretamente 16,2% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, indicando também pouca estruturação populacional.

De modo geral os resultados da Morfometria tradicional corroboram com os resultados da morfometria geométrica, mostrando pouca ou nenhuma estruturação populacional devido aos vários fatores já abordados que levam estas abelhas a possuírem um elevado fluxo gênico.

Contudo a morfometria tradicional permitiu a observação da diferenciação de tamanho em localidades pertencentes ao estado da Paraíba, informação esta que não foi observada nas análises de morfometria geométrica, uma vez que, sem o uso do tamanho do centroide, o tamanho dos indivíduos não é considerado na análise.

Assim como na morfometria geométrica, também foram realizadas análises utilizando os climas das localidades amostradas como marcador morfométrico.

Estas análises indicaram dois eixos de separação que maximizam a separação significativa dessas populações. Dentre as medidas utilizadas, os Ângulos 1, 2, 4 e 9 não foram estatisticamente significantes para a separação das amostras (Tabela 27).

Tabela 27: Significâncias estatística das medidas de morfometria tradicional na separação dos grupos de acordo com a zona climática onde foram coletadas as amostras de abelhas Africanizadas (Em negrito medidas que não foram significantes na separação das amostras).

Medida	P <0,005
Comp. Asa	0,0280342
Larg. Asa	0,040533
Ang. 1	0,292064
Ang. 2	0,064710
Ang. 3	0,030693
Ang. 4	0,059302
Ang. 5	0,003355
Ang. 6	0,006111
Ang. 7	0,000799
Ang. 8	0,001026
Ang. 9	0,201049
Ang. 10	0,002538
Ang. 11	0,030011

Com base nas médias e no desvio padrão das amostras separadas por clima, foi possível observar diferenças estatisticamente significantes nas medidas relativas ao tamanho dos indivíduos, indicando que aqueles pertencentes ao Litorâneo Úmido são maiores do que o restante e que os provenientes do Semiárido são os menores.

Observamos a ausência de diferenças estatisticamente significantes apenas em algumas amostras do tropical, região esta que já se mostrou entre o Semiárido e o Litorâneo nas análises anteriores (Tabela 28).

Tabela 28: Média e desvio padrão das medidas de morfometria tradicional tomadas junto aos indivíduos de abelhas Africanizadas coletados em diferentes zonas climáticas do Nordeste brasileiro. Letras iguais na mesma linha indicam diferenças estatisticamente não significantes. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$)

	Litorâneo Úmido	Semiárido	Tropical
Comp.Asa	5,48 ± 0,13 a	5,41 ± 0,19 b	5,43 ± 0,12 c
Larg.Asa	2,80 ± 0,09 a	2,77 ± 0,16 b	2,75 ± 0,10 a,b
Ang.1	39,39 ± 4,28 a	40,39 ± 4,31 b	39,99 ± 4,81 c
Ang.2	91,25 ± 3,76 a	91,65 ± 3,85 a	92,48 ± 3,43 a
Ang.3	79,00 ± 3,05 a	79,15 ± 3,14 a	78,86 ± 2,35 a
Ang.4	88,52 ± 3,02 a	87,49 ± 3,30 b	88,66 ± 3,11 a
Ang.5	92,72 ± 4,43 a	89,61 ± 4,84 b	92,17 ± 3,87 a
Ang.6	90,78 ± 4,19 a	89,83 ± 4,66 a	90,65 ± 5,27 a
Ang.7	47,41 ± 3,74 a	48,33 ± 4,48 b	46,82 ± 3,86 c
Ang.8	17,16 ± 1,59 a	16,45 ± 2,74 b	16,46 ± 1,68 a
Ang.9	18,22 ± 1,48 a	19,47 ± 7,84 a	19,55 ± 10,33 c
Ang.10	103,03 ± 6,01 a	100,91 ± 8,70 a	100,40 ± 10,56 a
Ang.11	33,09 ± 2,64 a	33,15 ± 2,79 a	33,88 ± 2,24 c

Ao observar a distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da análise das Variáveis Canônicas, foi possível observar a diferenciação entre os três climas no eixo correspondente à CV1 (Figura 32).

Dentre as medidas que mais influenciaram na separação dos eixos, temos que o Comprimento da asa foi à medida que mais influenciou o primeiro eixo (CV1), enquanto que a medida do Ângulo 8 foi a medida que mais influenciou o segundo eixo do gráfico (CV2).

Figura 32: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Interessante notar que, ao observarmos apenas o segundo eixo (CV2), é possível distinguir uma oscilação da magnitude de variação de forma entre os três climas, onde o clima Semiárido apresenta uma maior variação de forma entre os indivíduos, enquanto que o clima Litorâneo Úmido apresenta uma menor variação entre os indivíduos.

O semiárido possui condições ambientais mais adversas do que o litorâneo Úmido (FREITAS, 2007), portanto as abelhas provenientes do Semiárido estão sob maiores estresses ambientais do que as abelhas provenientes do Litorâneo Úmido. DEBAT *et al.*, (2003) mostra que estresses ambientais no desenvolvimento dos indivíduos é o fator chave na forma da asa.

Como já abordado anteriormente, abelhas do semiárido são menores do que as abelhas do Litorâneo Úmido, essa diferença de tamanho pode influenciar na eficiência da manutenção da homeostase da colônia, acarretando em maiores períodos de instabilidade dentro da colônia e por fim ocasionar variações na forma das populações. Jones *et al.*, (2004) sugere que o desenvolvimento ideal para as crias de abelhas exige uma temperatura do ninho extremamente estável. Flutuações assimétricas são mais prováveis de ocorrer em organismos que se desenvolvem sob

condições de estresse, pois apresentam, de modo geral, maior dificuldade em regular seu desenvolvimento (NUNES, 2012).

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis (Tabela 29) foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 33), no qual foi possível observar um maior distanciamento entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido, diferente do encontrado na morfometria geométrica.

Tabela 29: Distâncias quadradas de Mahalanobis, entre os pares de populações estudadas, obtidas de acordo com Análises de Variáveis Canônicas a partir dos dados de morfometria tradicional.

	Litorâneo Úmido	Tropical
Tropical	4.19225	
Semiárido	16.78640	4.486611

Figura 33: Dendrograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *A. mellifera*.

A Análise de Funções Discriminantes indicou que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos se apresentaram estatisticamente significantes ($P < 0,00001$).

O teste de validação cruzada identificou corretamente 63,10% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, indicando uma estruturação bem maior do que quando separados por localidades. A maior confusão ocorreu na classificação das amostras coletadas na região Tropical, onde metade foi classificada como Semiárido e a outra metade como Litorâneo Úmido. Este fato corrobora as informações encontradas no gráfico de dispersão e no dendograma de proximidade morfológica, onde as amostras presentes no tropical estão na faixa de transição entre o Semiárido e o Litorâneo Úmido (Tabela 30).

Tabela 30: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

Localidade	Associação ao grupo prevista			Total
	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	
%				
Litorâneo Úmido	59,6	0	40,4	100
Tropical	50	0	50	100
Semiárido	20,6	1,6	77,8	100

Assim como realizado para as análises de morfometria geométrica, as amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas foram novamente adicionadas aqui, sendo portanto necessário outra Análise de Componente Principal, já que novas amostras foram adicionadas. Os seis primeiros eixos apresentaram autovalores maiores que um, explicando 68,23% da variabilidade dos dados, sendo 17,56% no primeiro eixo e 11,85% no segundo eixo.

A representação gráfica dos dois primeiros eixos da Análise de Componentes Principais (Figura 34) dos dados de morfometria tradicional indicou uma divisão em dois grupos, o que antes não era observado.

No primeiro eixo (PC1) à medida que mais contribuiu para o distanciamento das amostras foi o comprimento da asa anterior, enquanto que no segundo eixo (PC2) à medida que mais contribuiu foi o ângulo 5.

Figura 34: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de *Apis mellifera*, obtidas a partir das análises dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

A Análise de Variáveis Canônicas onde estas amostras foram incluídas indicou uma mudança no padrão de distribuição dos pontos e, assim como na análise de morfometria geométrica, foi possível observar a homogeneização das amostras do Semiárido com as restantes (Figura 35).

Foram encontrados dois eixos que maximizam a separação significativa dessas populações. Entre as medidas utilizadas, os Ângulos 1, 2, 3, 9 e 11 não contribuíram significativamente para a separação dos grupos (Tabela 31).

Figura 35: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Tabela 31: Significâncias estatística das medidas de morfometria tradicional na separação dos grupos de acordo com a zona climática onde foram coletadas as amostras de abelhas Africanizadas (em **negrito** medidas que não foram significantes na separação das amostras)

Medidas	P<0,05
Comp. Asa	0,000000
Larg. Asa	0,008615
Ang. 1	0,099851
Ang. 2	0,870183
Ang. 3	0,590827
Ang. 4	0,000367
Ang. 5	0,000000
Ang. 6	0,035940
Ang. 7	0,019021
Ang. 8	0,005920
Ang. 9	0,260849
Ang. 10	0,011125
Ang. 11	0,640207

Dentre as medidas que mais influenciaram na separação dos eixos, temos o comprimento da asa como a medida que mais influenciou o primeiro eixo (CV1), enquanto a medida do Ângulo 10 foi a que mais influenciou o segundo eixo do gráfico (CV2).

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis (Tabela 32) foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 36), no qual essa maior homogeneização também pode ser observada. A distância entre o Litorâneo Úmido e o Semiárido diminui de 16,78 para 1,33 quando as amostras de Mossoró coletadas na época da chuva são adicionadas.

Tabela 32: Distâncias quadradas de Mahalanobis, entre os pares de populações estudadas, obtidas de acordo com Análises de Variáveis Canônicas a partir dos dados de morfometria tradicional.

	Litorâneo Úmido	Tropical
Tropical	0.518858	
Semiárido	1.339449	2.164804

Figura 36: Dendrograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *A. mellifera*.

Na análise de Funções Discriminantes, também observamos que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ($P < 0,000001$).

O teste de validação cruzada identificou corretamente 60% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, assim como na morfometria geométrica aqui também podemos observar uma maior homogeneização nas classificações (Tabela 33).

Tabela 33: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

Localidade	Associação ao grupo prevista			Total
	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	
%				
Litorâneo Úmido	53,2	27,1	19,7	100
Tropical	32,3	43,5	24,2	100
Semiárido	17,3	17,5	65,2	100

Em um passo adicional, as amostras coletadas em Mossoró na época de chuvas foram tratadas como sendo um marcador, assim como o Tropical, o Semiárido e o Litorâneo Úmido. Foram encontrados três eixos que maximizaram a separação das amostras, dentre as medidas utilizadas os Ângulos 1, 2, 3 e 11 não contribuíram significativamente ($P < 0,05$) para a separação das amostras (Tabela 34).

Tabela 34: Significâncias estatística das medidas de morfometria tradicional na separação dos grupos de acordo com a zona climática onde foram coletadas as amostras de abelhas Africanizadas (em negrito medidas que não foram significantes na separação das amostras)

Medidas	$P < 0,05$
Comp. Asa	0,000000
Larg. Asa	0,000000
Ang. 1	0,126052
Ang. 2	0,177513
Ang. 3	0,381058
Ang. 4	0,000320
Ang. 5	0,000000
Ang. 6	0,070121
Ang. 7	0,000001
Ang. 8	0,000000
Ang. 9	0,002953
Ang. 10	0,217785
Ang. 11	0,506954

Assim como na morfometria geométrica, foi possível observar que as amostras coletadas em Mossoró na época das chuvas, são as responsáveis por esta homogeneização encontrada na análise anterior. Além disso, uma parte desta população se mostra diferente dos três climas amostrados no Nordeste brasileiro (Figura 37).

Figura 37: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Dentre as medidas que mais influenciaram na separação dos eixos, temos que o comprimento da asa foi a medida que mais influenciou o primeiro eixo (CV1), enquanto que a medida do Ângulo 5 foi a que mais influenciou o segundo eixo do gráfico (CV2).

Devido ao mecanismo de análise das variáveis canônicas que maximizam a separação de informação grupos, podemos observar que na análise onde somente os três tipos de climas foram incluídos ocorreu claramente a separação entre eles, porém, quando uma população diferente, como Mossoró chuvas, foi adicionada a distância entre os climas antes observadas claramente perto da distância deste novo grupo inserido se torna pequena a ponto de agrupa-los em praticamente um único grupo e deixar parte de Mossoró chuvas em outro grupo afastado.

Através das distâncias de Mahalanobis (Tabela 35) e ao observar o dendrograma de proximidade morfológica (Figura 38) foi possível constatar que apesar de Mossoró se localizar no Semiárido a distância entre as amostras de Mossoró chuvas e o Litorâneo Úmido (8.2267) é menor do que a distância entre Mossoró chuvas e o Semiárido (8.5850)

Tabela 35: Distâncias quadradas de Mahalanobis, entre os pares de populações estudadas, obtidas de acordo com Análises de Variáveis Canônicas a partir dos dados de morfometria tradicional.

	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido
Tropical	0.740017		
Semiárido	1.156860	1.45138	
Mossoró chuvas	8.226714	12.24034	8.585080

Figura 38: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera*, construído com base no algoritmo *Neighbor Joining*.

A Análise de Funções Discriminantes indicou que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,000001$).

O teste de validação cruzada identificou corretamente 59,7% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas. Nesta análise o destaque se dá para as amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas, onde houve 97,6% de acerto dentro do seu grupo (Tabela 36).

Tabela 36: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

%	Associação ao grupo prevista				Total
	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	Mossoró Chuvas	
Litorâneo Úmido	48,2	26,1	22	3,7	100
Tropical	22,6	48,4	29	0	100
Semiárido	10,4	25,6	50,3	13,6	100
Mossoró Chuvas	1,2	0	1,2	97,6	100

Assim como na morfometria geométrica, uma segunda análise adicional foi realizada, utilizando as amostras coletadas em Mossoró na época da seca também como um marcador, a fim de entender a relação entre essas duas amostragens.

Foram encontrados quatro eixos que maximizaram a separação das amostras, dentre as medidas utilizadas os Ângulos 1, 2, 3, 6, 10 e 11 não contribuíram significativamente para a separação das amostras (Tabela 37).

Tabela 37: Significâncias estatística das medidas de morfometria tradicional na separação dos grupos de acordo com a zona climática onde foram coletadas as amostras de abelhas Africanizadas (em negrito medidas que não foram significantes na separação das amostras)

Medidas	P
Comp. Asa	0,000000
Larg. Asa	0,000000
Ang. 1	0,219174
Ang. 2	0,247709
Ang. 3	0,537152
Ang. 4	0,000909
Ang. 5	0,000000
Ang. 6	0,081848
Ang. 7	0,000002
Ang. 8	0,000000
Ang. 9	0,007131
Ang. 10	0,342886
Ang. 11	0,592207

Dentre as medidas que mais influenciaram a separação das amostras nos eixos, temos que o comprimento da asa foi a medida que mais influenciou o primeiro eixo (CV1), enquanto que a medida do Ângulo 5 foi a medida que mais influenciou o segundo eixo do gráfico (CV2).

Com base nas médias e no desvio padrão das amostras separadas por clima podemos observar uma diferença significativa no tamanho dos indivíduos, com exceção das amostras coletadas em Mossoró na época da seca que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes das amostras do Tropical (Tabela 38).

É possível identificar as amostras coletadas em Mossoró na época das chuvas como sendo maiores do que o restante tanto em comprimento quanto em largura, talvez por terem sido coletadas na época de abundância de alimento, ao contrário do restante, que foi coletado na época da seca.

Porém esse não é o único fator que distancia essas amostras do restante, pois na morfometria geométrica, análise em que não consideramos o tamanho dos indivíduos, também foi possível observar o distanciamento das amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas do restante dos indivíduos.

Tabela 38: Média e desvio padrão das medidas de morfometria tradicional. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente não significantes ($P < 0,05$) entre os grupos.

	Litorâneo Úmido	Semiárido	Tropical	Mossoró Seca	Mossoró Chuvas
Comp.Asa	5,48±0,19 a	5,43±0,13 b	5,45±0,12 c,d	5,28±0,11 d	5,62±0,26 e
Larg.Asa	2,81±0,089 a	2,81±0,18 b	2,75±0,10 c,d	2,71±0,079 d	2,96±0,21 e
Ang.1	39,40±4,28 a,c,d	40,65±4,54 b,c,d,e	40,00±4,81 c,d,e	39,87±3,77 d	41,46±5,00 e
Ang.2	91,25±3,76 a,b,c,d	91,25±4,049 b,c	92,49±3,43 c	92,49±3,27 d	87,02±7,74 e
Ang.3	79,01±3,05 a,b,c,d	78,94±3,17 b,c,d	78,86±2,35 c,d	79,60±3,04 d	77,62±3,23 e
Ang.4	88,52±3,02 a,c,d,e	87,42±3,41 b,c,d,e	88,67±3,77 c,d,e	87,64±3,07 d,e	87,78±3,18 e
Ang.5	92,72±4,43 a,c,e	89,86±5,18 b,d	92,17±3,87 c,e	89,12±4,04 d	92,92±3,84 e
Ang.6	90,78±4,19 *	89,74±4,50 *	90,65±5,27 *	90,03±4,99 *	89,11±6,89 *
Ang.7	47,41±3,74 a,c,d,e	48,45±4,98 b,d,e	46,83±3,86 c,d,e	48,11±3,22 d,e	47,57±4,86 e
Ang.8	17,17±1,59 a,c	16,48±3,08 b,c,d	16,46±1,68 c,d	16,39±1,84 d	18,07±1,95 e
Ang.9	18,22±1,48 a,c,d,e	19,65±8,15 b,c,d	19,56±10,33 c,d,e	19,11±7,19 d,e	18,23±1,37 e
Ang.10	103,04±6,01 *	101,00±9,35 *	100,41±10,56 *	100,73±7,23 *	100,96±9,15 *
Ang.11	33,10±2,64 a,b,c,e	32,96±2,77 b,e	33,88±2,24 c,e	33,58±2,62 d	33,57±2,62 e

Através do gráfico de dispersão, foi possível observar que apesar das amostras de Mossoró chuvas e Mossoró seca terem sido coletadas na mesma localidade, elas se localizam em extremos opostos no gráfico. Porém, a amostra de Mossoró coletada na época da seca se localiza dentro do grupo Semiárido, enquanto que a amostra de Mossoró coletada na época das chuvas se localiza distante do grupo, ficando claro que essa população é diferenciada das demais (Figura 39).

Figura 39: Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Apis mellifera* obtidas a partir das análises de variáveis canônicas dos 19 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas

Através das distâncias quadradas de Mahalanobis e ao observar o Dendograma de proximidade morfológica também podemos observar que Mossoró Seca se posiciona ao oposto de Mossoró Chuvas, além disso, Mossoró chuvas se mostra a população mais afastada (Tabela 39) (Figura 40).

Tabela 39: Distâncias quadradas de Mahalanobis, entre os pares de populações estudadas, obtidas de acordo com Análises de Variáveis Canônicas a partir dos dados de morfometria tradicional.

	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	Mossoró Seca
Tropical	0.83			
Semiárido	1.58	2.77		
Mossoró Seca	2.21	1.04	2.90	
Mossoró Chuvas	10.17	15.17	7.47	18.54

Figura 40: Dendrograma de proximidade morfológica entre as populações de *A. mellifera*, construído com base no algoritmo *Neighbor Joining*.

A Análise de Funções Discriminantes indicou que todas as distâncias quadradas de Mahalanobis entre os centroides de distribuição dos grupos se apresentaram estatisticamente significantes ($P < 0,000001$).

O teste de Validação Cruzada identificou corretamente 53,2% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas, onde mais uma vez podemos observar Mossoró chuvas com 96,3% de acerto dentro de seu grupo se mostrando uma população bem diferente do restante. Por outro as amostras de Mossoró coletadas na época da seca apresentam apenas 11,5% de acerto e com grande taxa de erro (35,7%) dentro do grupo Semiárido, localidade essa a de origem das amostras de Mossoró (Tabela 40)

Tabela 40: Teste de validação cruzada entre os indivíduos das diferentes zonas climáticas amostradas (Em negrito a taxa de acerto dentro de cada grupo).

%	Associação ao grupo prevista					Total
	Litorâneo Úmido	Tropical	Semiárido	Mossoró Seca	Mossoró Chuva	
Litorâneo Úmido	45,4	24,8	10,6	15,6	3,7	100
Tropical	21	48,4	17,7	12,9	0	100
Semiárido	11,9	16,7	59,5	11,3	0,6	100
Mossoró Seca	11,1	35,4	35,7	11,5	6,4	100
Mossoró Chuva	1,2	0	1,2	1,2	96,3	100

Nestas análises também os resultados da morfometria tradicional corroboram com os resultados encontrados na morfometria geométrica, onde a divisão por climas se mostra a mais informativa perante a realidade do Nordeste brasileiro.

Assim como na morfometria geométrica podemos observar certa estruturação entre os três climas amostrados, sugerindo grupos relativamente adaptados a estas condições ambientais, apesar de haver fluxo gênico entre eles.

Vários outros trabalhos chegaram a resultados similares utilizando a morfometria tradicional como ferramenta para avaliar diferenças populacionais em *Apis mellifera* expostas a diferentes condições ambientais.

Gruber *et al.*, (2013) analisaram a divergência morfológica e genética de populações de abelhas *A. m. monticola* em uma região topograficamente heterogênea do Leste Africano. Os resultados mostram divergência fenotípica entre as colônias de áreas de floresta e as colônias de área de savana. Diniz-Filho *et al.*, (1995) demonstraram que as abelhas Africanizadas das regiões Sul e Sudeste do Brasil são mais parecidas com as abelhas europeias do que aquelas encontradas nas regiões Norte e Nordeste, indicando uma maior influência das abelhas africanas nas abelhas Africanizadas do Nordeste brasileiro.

COROIAN *et al.*, (2014) encontraram que a diferenciação entre duas subespécies é fortemente influenciada pelas várias zonas de temperatura na Romênia, onde a *A. m. carnica* é mais abundante nas regiões com temperatura média inferior a 9 ° C, enquanto que *A. m. macedonica* são abelhas mais frequentes em regiões com temperaturas médias acima de 9 ° C, embora ambas as subespécies existam em todas as faixas de temperaturas da Romênia.

Em nosso estudo, através da morfometria tradicional conseguimos informações extras relacionadas com o tamanho dos indivíduos, onde foi possível observar através das médias e do desvio padrão que as amostras do Litorâneo Úmido são significativamente maiores do que as amostras do Semiárido.

Isto porque diferentemente da morfometria geométrica, na tradicional são utilizadas medidas lineares e angulares, na qual medidas lineares estão mais ligadas a variações geográficas (ambientais), enquanto que as medidas angulares são neutras e mais relacionadas com informações filogenéticas e processos associados à deriva genética e migração de curta distância (DINIZ-FILHO, 1999; 2000).

Segundo Freitas (2007) durante a seca muitas colônias do Semiárido migram para áreas litorâneas onde o clima é mais ameno e muitas espécies vegetais florescem nesta época do ano. Estas floradas podem ser o fator determinante para explicar o fato das abelhas do Litorâneo Úmido serem maiores do que as do Semiárido.

No trabalho de Franco (2007) foi mostrado através da morfometria tradicional a existência de um gradiente de tamanho entre as abelhas Norte-Sul do Brasil, onde as abelhas do Nordeste eram menores em relação as abelhas do Sul e Sudeste. Nossos dados também indicam que este gradiente de tamanho existe em micro escala dentro do Nordeste brasileiro, onde abelhas do Semiárido são menores do que as abelhas do Litorâneo Úmido.

Até o presente momento, nossos dados mostram que de forma geral ambas as técnicas de morfometria apresentaram resultados satisfatórios e congruentes entre si.

Alguns estudos enfatizam que a morfometria geométrica é mais confiável na discriminação de subespécies de abelhas do que a morfometria tradicional (FRANCOY *et al.*, 2008;. TOFILSKI, 2008;. KANDEMIR *et al.*, 2011). Porém na morfometria tradicional as medições de caracteres de tamanho são altamente inter-relacionadas com os parâmetros geográficos enquanto que os ângulos são inter-relacionados com a filogenia (DINIZ-FILHO *et al.*, 1999;. RUTTNER *et al.*, 2000). Estas medidas podem ser utilizadas de forma bastante efetiva em estudos

populacionais, onde informações ecológicas são de grande valia na interpretação dos dados, justificando ainda sua utilização para o enriquecimento das análises. Os resultados deste estudo mostram claramente que ambas as técnicas apresentaram bons resultados na avaliação da variabilidade de populações de abelhas Africanizadas. Contudo devido as diferenças ambientais encontradas na região amostrada, a morfometria tradicional contribuiu com informações adicionais sobre o tamanho dos indivíduos, o que nos permitiu um melhor entendimento dos dados.

Por outro lado através da morfometria geométrica foi possível observar uma diferença na forma das asas entre as abelhas coletadas em Mossoró na época das chuvas e também das abelhas do estado da Paraíba perante as demais populações, diferença esta que vai além do tamanho dos indivíduos, sugerindo assim uma plasticidade fenotípica destas abelhas em resposta a diferentes climas. Estas informações deverão ser objeto de estudos mais aprofundados no futuro, para sua utilização em trabalhos de seleção e melhoramento genético, bem como para o melhor entendimento da biologia básica de abelhas Africanizadas e sua dinâmica populacional.

4.2 Análises de DNA mitocondrial

Depois de alinhadas e editadas as sequências, obtivemos fragmentos de 624 pb. Dentre as 116 sequências analisadas, foram identificados, ao todo, onze diferentes haplótipos, correspondentes a nove sítios variáveis (Tabela 41).

Tabela 41: Haplótipos com seus respectivos sítios variáveis e sua posição em pb dentro do fragmento do gene *COI*.

Haplótipos	34	130	177	202	245	280	334	382	523	N
H1	T	C	T	C	G	G	C	C	G	28
H2	.	T	C	.	.	A	T	.	A	33
H3	C	.	C	.	.	.	.	.	A	40
H4	.	T	.	T	.	.		T	A	3
H5	.	.	.	.	A	.		T	A	4
H6	C	.	C	.	.	.	.	T	A	1
H7	.	T	C	.	.	A	T	.	.	1
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	A	2
H9	.	T	.	.	.	.	.	.	A	2
H10	C	.	C	.	.	.	.	.	.	1
H11	.	.	C	.	.	.	.	.	A	1

A composição nucleotídica foi de A = 33,03%, C = 15,34%, G = 10,29%, T = 41,70%, onde podemos observar uma maior porcentagem de bases A e T (74,73%), o que já é o esperado para o genoma mitocondrial de insetos (CROZIER & CROZIER, 1993; SIMON, *et al.*, 1994)

Foi encontrada uma diversidade haplotípica média de 0,743 e uma diversidade nucleotídica média de 0,00504. Os valores referentes à quantidade de amostras, de sítios polimórficos, de haplótipos, de diversidade haplotípica (HD) e nucleotídica (π) por localidade estão resumidos na tabela 42.

Tabela 42: Diversidade genética das populações de *Apis mellifera* para os haplótipos do gene mitocondrial *COI*.

Localidades	Número de Sequências	Sítios Polimórficos	Haplótipos	HD	π
Bela Vista	16	9	7	0,775	0,00417
Brejo Grande	7	5	3	0,667	0,0043
Joaquim Gomes	2	4	2	0,667	0,00481
Mossoró	18	7	4	0,708	0,00492
Murici	2	5	2	1	0,00903
Parnaíba	13	8	4	0,769	0,00528
Rio Largo	8	6	3	0,464	0,00367
São Cristóvão	12	6	6	0,848	0,00539
São Paulo do Potengi	3	4	2	0,667	0,00481
São Raimundo Nonato	13	5	3	0,564	0,00315
Taperoá	5	3	2	0,4	0,00217
Isaias Coelho	4	4	1	0	0
Braúna	2	0	1	0	0
Cuité	2	5	1	0	0
Macaíba	1	3	1	0	0
Maturéia	1	5	1	0	0
João pessoa	1	5	1	0	0
Maceió	1	3	1	0	0
Barra de Sto. Antônio	5	5	1	0	0
Total	112	9	11	0,743	0,00504

Murici (AL) foi a região com maior diversidade haplotípica e nucleotídica e com haplótipos que mais divergiram entre si, enquanto os haplótipos de Taperoá (PB) foram os mais semelhantes entre si.

Em populações de *Apis cerana* da China, a diversidade haplotípica encontrada foi de 0,752 enquanto a nucleotídica foi de 0.010 (YIN & JI, 2012). Em populações nativas do Noroeste da Europa (*A. m. mellifera*) a diversidade haplotípica variou de 0,220 a 0,640 e a diversidade nucleotídica de 0,037 a 0,080 (JENSEN *et al.*, 2005). Interessante notar que ambos os casos descritos acima apresentam diversidade haplotípicas semelhante à encontrada em nossos estudos, mesmo se tratando de populações nativas, diferente do nosso caso. Já no tocante à diversidade nucleotídica as populações nativas apresentaram valores superiores aos nossos.

Segundo Nei (1978), a diversidade haplotípica considera o número e a frequência de haplótipos observados, já o índice de diversidade nucleotídica é menos influenciável pelo tamanho amostral, tornando-o neste caso mais adequado para a comparação da variabilidade genética entre populações, já que temos localidades com baixa amostragem. Os altos valores de diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica encontrados para a maioria das populações mostram indícios de que a população passou por um período de baixo tamanho efetivo seguido de um rápido crescimento, acumulando mutações. (GRAND & BOWEN, 1998), fatos estes perfeitamente condizentes com a história de introdução das abelhas Africanas no Brasil. O único fato que nos parece pouco provável aqui é o acúmulo de mutações, dada a curta história de menos de 60 anos de introdução destas abelhas aqui em território brasileiro.

Os haplótipos H1, H2 e H3 foram os mais frequentes entre as populações, sendo, pelo menos um dos três, encontrados em todas as localidades. As populações de Bela Vista (PI) e São Cristóvão (SE) foram as mais diversas com sete haplótipos cada (Tabela 43).

Foram encontrados quatro haplótipos exclusivos, sendo estes: H6 encontrado na população de Isaias Coelho (PI), H7 e H10 encontrados na população de São Cristóvão (SE) e H11 encontrado na população de Bela Vista (PI).

De acordo com a rede de haplótipos (Figura 41) e o dendograma de proximidade genética (Figuras 42 e 43), foi possível observar ausências de estruturação populacional. O teste de Mantel apresentou resultados significantes ao comparar as distâncias moleculares com as distâncias geográficas ($P = 0.0010$), porém indicou total ausência de correlação entre elas ($r = 0.0055$). Através de outro teste de Mantel foi observado uma baixa correlação entre as distâncias moleculares e as distâncias morfológicas tanto para a morfometria tradicional quanto para a morfometria geométrica ($r = 0.0044$ e $r = 0.0024$) e estatisticamente não significativa ($P = 0.478$ e 0.580) respectivamente. Estes resultados indicam que os haplótipos mitocondriais encontrados neste trabalho estão distribuídos de maneira aleatória entre as populações.

Segundo Crandall *et al.*, (1992) os haplótipos ancestrais devem ser encontrados no centro da rede, enquanto que os haplótipos mais recentes devem ser encontrados rodeando seus ancestrais através de ramificações que representam as mutações que originaram estes novos haplótipos. Porém ao observar a rede de haplótipos (Figura 41) não podemos afirmar quais haplótipos são ancestrais e quais são recentes. A frequência de cada haplótipos obtido neste trabalho pode estar sendo influenciada tanto pela amostragem aqui obtida quanto pela amostragem feita pelo Professor Warwick Estevam Kerr, quando da introdução das abelhas africanas no Brasil. O ponto vermelho denominado MV1 no centro do losango representa a posição de um possível ancestral que não foi amostrado.

Mossoró (RN), Macaíba (RN), São Paulo do Potengi (RN), Baraúna (PB), Cuité (PB), Taperoá (PB), Maturéia (PB), João Pessoa (PB), São Raimundo (PI), Parnaíba (PI), Bela Vista (PI), Isaias Coelho (PI), Rio Largo (AL), Barra de São Antônio (AL), Murici (AL), Maceió (AL), Joaquim Gomes (AL), Brejo Grande (SE), São Cristóvão (SE)

Figura 41: Rede de haplótipos para o gene COI da espécie *Apis mellifera*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos. As diferentes cores indicam a porcentagem de cada haplótipo provenientes das diferentes localidades amostradas.

Figura 42. Dendrograma de proximidade genética entre as populações de *A. mellifera*, calculado a partir das sequências obtidas para o gene *COI*. As análises foram realizadas segundo a metodologia de *Neighbor Joining*. Entre parênteses a quantidade de cada localidade dentro do respectivo haplótipo.

Figura 43. Dendrograma de proximidade genética entre os haplótipos encontrados nas populações de abelhas Africanizadas no Nordeste brasileiro. As análises foram realizadas segundo a metodologia de *Neighbor Joining*.

O Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo Kimura-dois-parâmetros (K2P) foi calculado entre os pares dos 11 haplótipos (Tabela 44). A divergência intraespecífica variou de 0,2% a 1,3%, a maior diferença foi a encontrada entre os haplótipos 5 e 7, separados por sete passos mutacionais. Estes dados corroboram com os resultados de Arias & Sheppard (1996) que ao analisarem várias subespécies de *A. mellifera*, encontraram uma diversidade intraespecífica que variou de 0,3% a 0,61%.

Segundo Hebert *et al.*, (2003b) o limiar para o diagnóstico de espécie é 3%, com exceção de espécies proximamente relacionadas. Os resultados aqui apresentados mostram que apesar de observamos até sete passos mutacionais entre os diferentes haplótipos, a maioria dos percentuais de divergência nucleotídica são inferiores a 1%, mostrando populações bem similares.

Tabela 44: Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo K2P (metade inferior da tabela) e número de passos mutacionais (metade superior da tabela), calculada entre os pares de haplótipos

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
H1		5	3	3	3	4	6	1	2	4	2
H2	0.9%		4	4	6	5	1	4	3	5	3
H3	0.5%	0.7%		4	4	1	5	2	3	1	2
H4	0.5%	0.7%	0.7%		4	5	5	2	1	5	3
H5	0.5%	1.1%	0.7%	0.7%		5	7	2	3	5	3
H6	0.7%	0.9%	0.2%	0.9%	0.5%		6	3	4	2	2
H7	0.7%	0.2%	0.9%	0.9%	1.3%	1.1%		5	4	6	4
H8	0.2%	0.7%	0.4%	0.4%	0.4%	0.5%	0.9%		1	3	1
H9	0.4%	0.5%	0.5%	0.2%	0.5%	0.7%	0.7%	0.2%		4	2
H10	0.4%	0.9%	0.2%	0.9%	0.9%	0.4%	0.7%	0.5%	0.7%		2
H11	0.4%	0.5%	0.2%	0.5%	0.5%	0.4%	0.7%	0.2%	0.4%	0.4%	

Adicionamos nesta análise uma sequência de *Apis mellifera scutellata* (número de acesso NCBI GeneBank: KJ60174.1) e uma sequência de *Apis mellifera ligustica* (número de acesso NCBI GeneBank: L06178.1).

Ao adicionarmos estes dois novos grupos, obtivemos 12 haplótipos, correspondentes a 14 sítios variáveis. A sequência de *A. m. scutellata* se agrupou no haplótipo H1, já a sequência de *A. m. ligustica* formou um novo haplótipo com 5 sítios variáveis a mais do que o restante, estando estes presentes nas posições, 25pb, 127pb, 440pb, 533pb e 535pb (Tabela 45). Ao comparar os grupos externos

com nossas amostras observamos que todas as mutações que incluem a subespécie *A. m. scutellata* foram sinônimas, ou seja, não houve modificação na sequência proteica gerada. A proximidade das sequências de nossas populações com a sequência de *A. m. scutellata* confirma a origem africana do material genético mitocondrial de nossas abelhas. Já a sequência da subespécie *A. m. ligustica* apresentou nove mutações não sinônimas onde houve modificação na sequência proteica, estando estas presentes nos sítios, 25pb, 127pb, 177pb, 245pb, 280pb, 440pb, 533pb e 535pb. Segundo Hebert *et al.*, (2003b) as modificações na sequência proteica podem indicar indivíduos pertencentes a uma categoria taxonômica mais elevada.

Porém ao observar somente nossas sequências, constatamos que dentre os nove sítios polimórficos houve modificação na sequência proteica gerada em três deles, correspondentes aos sítios 177pb, 245pb e 280pb, onde os haplótipos H1, H4, H8 e H9 apresentaram apenas mutações sinônimas, os haplótipos H3, H6, H10 e H11 apresentaram uma mutação não sinônima (Mutação 3), onde houve a troca de uma metionina por uma treonina, os haplótipos H2 e H7 apresentaram duas mutação não sinônimas (Mutação 3 e Mutação 6), na mutação 5 houve a troca de uma treonina por uma alanina, o haplótipo H5 também apresentou uma mutação não sinônima (Mutação 5), onde houve a troca de uma alanina por uma treonina.

Tabela 45: Haplótipos com seus respectivos sítios variáveis e sua posição em pb dentro do fragmento do gene *COI*. Em negrito as mutações não sinônimas. Em vermelho a denominação numérica para cada mutação não sinônima.

Haplótipos	25pb	34pb	127pb	130pb	177pb	202pb	245pb	280pb	334pb	382pb	440pb	523pb	533pb	535pb	N	Mutações não sinônimas
Mutações não sinônimas	1		2		3	4	5	6			7		8	9		
<i>A. m. ligustica</i>	T	C	C	C	T	T	G	G	C	C	T	A	C	T	1	1,2,3,4,5,6,7,8 e 9
H1	C	T	T	.	.	C	G	G	C	C	C	G	T	A	28	--
H2	C	T	T	T	C	C	.	A	T	.	C	.	T	A	33	3 e 6
H3	C	.	T	.	C	C	.	.	.	.	C	.	T	A	40	3
H4	C	T	T	T	.	.	.	.		T	C	.	T	A	3	--
H5	C	T	T	.	.	C	A	.		T	C	.	T	A	4	5
H6	C	.	T	.	C	C	.	.	.	T	C	.	T	A	1	3
H7	C	T	T	T	C	C	.	A	T	.	C	G	T	A	1	3 e 6
H8	C	T	T	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	A	2	--
H9	C	T	T	T	.	C	.	.	.	.	C	.	T	A	2	--
H10	C	.	T	.	C	C	.	.	.	.	C	G	T	A	1	3
H11	C	T	T	.	C	C	.	.	.	.	C	.	T	A	1	3

A troca entre as bases Timina e Citosina representam 71,5% das mutações encontradas, a troca entre as bases Alanina e Guanina representam 21,5%, em ambos os casos se tratam de transições (troca de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra). Resultados estes que corroboram com os dados encontrados por Arias & Sheppard, (1996) onde a troca entre Timina e Citosina foi de 85,2% e a troca entre Alanina e Guanina foi de 14,8%.

Segundo Hartl & Clark, (1997) um pequeno tamanho efetivo da população pode muitas vezes explicar o acúmulo mais rápida de mutações no genoma mitocondrial em relação ao nuclear. Jermini & Crozier, (1994) indicaram altas taxas de substituição mitocondriais e mais frequentes rearranjos gênicos em Hymenoptera, quando comparados. Pelo fato destas abelhas terem sido introduzidas no Brasil recentemente, acreditamos que estas mutações tenham ocorrido há muito mais tempo, de forma que os indivíduos portadores de tais mutações foram aleatoriamente introduzidos quando da importação das abelhas para o Brasil. Porém para a comprovação desta hipótese seria interessante uma maior amostragem do lugar de origem das abelhas *A. m. scutellata* para compararmos com os resultados aqui obtidos. Desta forma poderemos confirmar tal hipótese.

Através do dendograma de proximidade morfológica (Figura 44) também podemos observar que a sequência de *A. m. scutellata* se agrupa no Haplótipo 1 enquanto que a sequência de *A. m. ligustica* se isola em outro ramo. Alguns trabalhos já comprovaram a predominância da origem africana nas populações brasileiras de abelhas Africanizadas, principalmente no Nordeste brasileiro (FRANCOY, 2007; DINIZ-FILHO, 1995; FERREIRA, 2009).

Figura 44. Dendrograma de proximidade genética entre as populações de *A. mellifera*, calculado a partir das sequências obtidas para o gene *COL*. As análises foram realizadas segundo a metodologia de *Neighbor Joining*. Entre parênteses a quantidade de cada localidade dentro do respectivo haplótipo.

O Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo Kimura-dois-parâmetros (K2P) também foi calculado (Tabela 45). A divergência encontrada variou de 1,3% a 2,2%. Como já discutido anteriormente segundo Hebert *et al.*, (2003b) o limiar para o diagnóstico de espécie é 3%, porém valores maiores do que 2% já podem sugerir isolamento reprodutivo. O que também corrobora com o trabalho de Arias & Sheppard, (1996), onde encontraram uma diversidade interespecífica que variou de 1,22% a 2,13%. O isolamento reprodutivo neste caso se deu por razões geográficas, uma vez que *A. m. scutellata* é uma subespécie sub-Sahariana e *A. m. ligustica* uma subespécie restrita à região Mediterrânea da Europa, principalmente na Itália (RUTTNER, 1988). Quando colocadas em uma mesma região geográfica, como aconteceu no Brasil, o isolamento reprodutivo desaparece (CRISTINO, 2003; TEXEIRA, 1993).

Tabela 45: Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo K2P), calculada entre os pares de haplótipos

	<i>A.m. scutellata</i>	<i>A.m. ligustica</i>	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
<i>A.m. ligustica</i>	1.5%											
H1	0%	1.5%										
H2	0.9%	2.0%	0.9%									
H3	0.5%	1.3%	0.5%	0.7%								
H4	0.5%	1.3%	0.5%	0.7%	0.7%							
H5	0.5%	1.6%	0.5%	1.1%	0.7%	0.7%						
H6	0.7%	1.5%	0.7%	0.9%	0.2%	0.9%	0.5%					
H7	0.7%	2.2%	0.7%	0.2%	0.9%	0.9%	1.3%	1.1%				
H8	0.2%	1.3%	0.2%	0.7%	0.4%	0.4%	0.4%	0.5%	0.9%			
H9	0.4%	1.5%	0.4%	0.5%	0.5%	0.2%	0.5%	0.7%	0.7%	0.2%		
H10	0.4%	1.5%	0.4%	0.9%	0.2%	0.9%	0.9%	0.4%	0.7%	0.5%	0.7%	
H11	0.4%	1.5%	0.4%	0.5%	0.2%	0.5%	0.5%	0.4%	0.7%	0.2%	0.4%	0.4%

A partir dos resultados obtidos (Tabela 46), podemos perceber um *Fst* com valores elevados, porém ao contrario disso as análises anteriores mostram uma falta de estruturação populacional. Todas as localidades com amostragem de um ou dois ninhos apresentaram *Fst* 1, podemos sugerir aqui, que além da forma como estas abelhas foram introduzidas o que também pode estar influenciando nos valores de *Fst* é a grande quantidade de haplótipos únicos ou com poucos indivíduos,

provavelmente resultado de uma amostragem deficiente em algumas localidades. A colonização de um local por uma determinada população afeta a estrutura genética, onde efeitos de fundação durante a colonização podem aumentar os valores *Fst* (WRIGHT, 1949). Porém estes valores dependem do modo de colonização, isto é da fonte que se originam os imigrantes (SLATKIN, 1977).

Darger (2013), ao comparar abelhas Africanizadas do Brasil com abelhas Africanizadas dos Estados Unidos obteve valores de *Fst* que variaram de 0.0000 a 0.1546, sendo estes, valores muito inferiores aos aqui encontrados para populações muito mais próximas. Em espécies de abelhas nativas do continente, como, por exemplo, a espécie de abelha nativa *Melipona subnitida* podemos encontrar valores de *Fst* altos, Bonatti *et al.*, (2014) mostra valores que variam de 0,14325 a 0,78692, sugerindo que essas abelhas já podem estar em processo de diferenciação. Francisco & Arias (2009) também encontraram valores de *Fst* parecidos (de 0,1659 a 0,7266) ao analisarem abelhas nativas do Brasil (*Plebeia remota*) da região sul e sudeste.

Tabela 46: Valores de *Fst* calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares das populações de *A. mellifera* estudadas (+ estatisticamente significante; - estatisticamente não significante).

	S.R.Nonato	Parnaíba	Bela Vista	Mossoró	Macaíba	SP.Potengi	Rio Largo	B.Sto Antonio	Murici	J. Gomes	B. Grande	S. Cristivao	Barraúna	Cuité	Taperoá	Maturéia	J.Pessoa	I. Coelho
Parnaíba	0.02393	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bela Vista	0.04619	0.05524	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mossoró	0.19557	0.00582	0.01692	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Macaíba	0.19048	0.35714	0.36790	0.39940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP.Potengi	0.41030	0.08255	0.15154	0.06912	0.33333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rio Largo	0.53244	0.29098	0.37804	0.17780	0.39683	0.02668	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Barra Sto Antônio	0.74314	0.51708	0.60068	0.40739	1.000	0.39394	0.01809	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Murici	0.14258	0.10625	0.03748	0.09550	0.42857	0.16854	0.12511	0.47368	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Joaquim Gomes	0.49237	0.16115	0.26206	0.00540	0.00000	0.33333	0.22742	0.18919	0.27397	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Brejo Grande	0.31367	0.03087	0.05349	0.07903	0.51515	0.17230	0.17191	0.50355	0.03166	0.06973	-	-	-	-	+	-	-	-
São Cristivão	0.22987	0.03804	0.09330	0.02385	0.15543	0.10236	0.04200	0.29255	0.28764	0.10762	0.03541	-	-	-	+	-	-	-
Barraúna	0.51111	0.22581	0.05524	0.10728	1.000	0.33333	0.50649	1.000	1.000	0.38462	0.30556	0.03194	-	-	-	-	-	-
Cuité	0.63441	0.26923	0.43179	0.12241	1.000	0.33333	0.80952	0.00000	1.000	1.000	0.12281	0.15543	1.000	-	-	-	-	-
Taperoá	0.10555	0.06183	0.10872	0.23490	0.50000	0.48304	0.57289	0.87500	0.12656	0.56355	0.39181	0.23713	1.000	0.75000	-	-	-	-
Maturéia	0.63441	0.26923	0.43179	0.12241	1.000	0.33333	0.80952	0.00000	1.000	1.000	0.12281	0.15543	1.000	0.00000	0.75000	-	-	-
João Pessoa	0.63441	0.26923	0.43179	0.12241	1.000	0.33333	0.80952	0.00000	1.000	1.000	0.12281	0.15543	1.000	0.00000	0.75000	0.00000	-	-
Isaias Coelho	0.74314	0.51708	0.60068	0.50000	0.48304	0.80952	0.48304	0.28764	0.12281	0.15543	0.12281	0.10728	0.12241	0.60068	0.16115	0.22987	1.000	-
Maceió	0.51708	0.74314	0.56355	0.30556	1.000	1.000	0.15543	0.80952	1.000	0.38462	0.23713	0.12281	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Assim como para as análises de morfometria, os climas das regiões amostradas foram utilizados como fatores de divisão, porém, as amostras de Mossoró coletadas na época das chuvas não chegaram a ser sequenciadas, por isso não foram incluídas na análise. O número de indivíduos, de sítios polimórficos, de haplótipos e de diversidade haplotípica e nucleotídica para cada região estão resumidos na tabela 47.

Tabela 47: Diversidade genética das populações de *Apis mellifera* para os haplótipos do gene mitocondrial *COI*.

Clima	Número de Sequências	Sítios Polimórficos	Haplótipos	HD	π
Semiárido	61	9	8	0,743	0,00462
Litorâneo Úmido	42	6	6	0,639	0,00437
Tropical	13	8	4	0,764	0,00525
Total	116	9	11	0,743	0,00504

A região Tropical foi a que apresentou com maior diversidade haplotípica e nucleotídica, com haplótipos que mais divergiram entre si, enquanto os haplótipos do Litorâneo Úmido foram os mais semelhantes entre si. O Semiárido foi a região com maior quantidade de haplótipos, o que pode ser explicado devido sua maior amostragem.

Os haplótipos H1, H2 e H3 foram os mais frequentes, presentes nas três populações, os haplótipos H4, H5, H8 e H11 são haplótipos únicos do Semiárido, enquanto que os haplótipos H7, H9 e H10 foram únicos no litorâneo úmido (Tabela 48).

Tabela 48: Frequência de distribuição (%) dos haplótipos nas populações de *A. mellifera* amostradas.

	Semiárido	Litorâneo Úmido	Tropical
H1	32,30%	9,30%	36,40%
H2	14,00%	53,50%	18,20%
H3	37,10%	27,90%	36,40%
H4	4,80%	0,00%	0,00%
H5	4,80%	0,00%	0,00%
H6	1,60%	0,00%	9,00%
H7	0,00%	2,30%	0,00%
H8	3,20%	0,00%	0,00%
H9	0,00%	4,60%	0,00%
H10	0,00%	2,30%	0,00%
H11	1,60%	0,00%	0,00%

De acordo com a rede de haplótipos (Figura 45) e o dendrograma de proximidade genética (Figura 46) não foi possível observar uma agrupação lógica.

Figura 45: Rede de haplótipos para o gene *COI* da espécie *Apis mellifera*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos.

Figura 46. Dendrograma de proximidade genética entre as populações de *A. mellifera*. As análises foram realizadas segundo a metodologia de *Neighbor Joining*.

A fim de se conhecer a estruturação genética, foram calculados os valores de F_{st} entre os pares dos climas das regiões amostradas (Tabela 49). Os resultados aqui apresentados são mais condizentes com o observado em outros marcadores, mostrando baixa estruturação populacional. Estes resultados corroboram com a discussão anterior relacionada com a baixa amostragem de algumas localidades para explicar a alta estruturação encontrada no teste F_{st} anterior onde utilizamos as localidades como divisor.

Tabela 49. Valores de F_{st} calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares das populações de *A. mellifera* estudadas (+ estatisticamente significante; - estatisticamente não significante).

	Semiárido	Litorâneo Úmido	Tropical
Semiárido	0.00000	+	+
Litorâneo Úmido	0.19523	0.00000	+
Tropical	0.05232	0.16245	0.00000

Porém, mesmo assim ainda existe uma grande diferença amostral quando consideramos os climas das regiões amostradas, portanto nossos resultados são apenas inferências que ainda precisam ser confirmadas com a análise de um maior número de colônias. Além disso, como já discutido pelo fato destas abelhas terem sido introduzidas no Brasil, seria interessante uma maior amostragem do lugar de origem das abelhas *A. m. scutellata* para compararmos com os resultados aqui obtidos.

Conclusões e Considerações Finais

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho aqui apresentado avaliou a variabilidade genética e morfológica das abelhas Africanizadas no Nordeste brasileiro, o que permitiu a realização de um diagnóstico mais completo do atual status da variabilidade das abelhas *Apis mellifera* no Nordeste brasileiro. Com base em nossos resultados podemos concluir que:

- O resultado das análises Morfométricas utilizando Localidades como classificador mostram populações morfometricamente muito similares, sugerindo alto fluxo gênico e ausência de estruturação entre as populações amostradas;
- Os Climas das localidades amostradas se mostraram classificadores morfométricos mais eficientes para o entendimento da estruturação populacional das abelhas Africanizadas no Nordeste brasileiro do que classificadores políticos como as localidades;
- O resultado das análises morfométricas, utilizando climas como classificador morfométrico, indicou certa estruturação entre os três climas amostrados, sugerindo grupos relativamente adaptados a estas condições ambientais, apesar de haver fluxo gênico entre eles;
- Os resultados mostram também que as amostras coletadas em Mossoró durante a época de chuvas se mostram relativamente mais próximas das amostras do litorâneo úmido do que com as amostras coletadas em Mossoró durante a seca, enquanto que estas se mostram mais próximas do Semiárido;
- Abelhas do Semiárido são menores e possuem maior variação na forma do que as abelhas do Litorâneo Úmido;
- De forma geral, ambas as técnicas de morfometria apresentaram resultados satisfatórios e congruentes entre si;
- Através da morfometria geométrica foi possível sugerir a existência de plasticidade fenotípica destas abelhas em resposta a diferentes climas;
- Nossa amostragem revelou, através da análise molecular, uma alta variabilidade genética (11 haplótipos);

- Através da análise do DNA mitocondrial não foi possível agrupar os indivíduos por localidades ou climas, indicando que a estrutura populacional construída a partir deste gene não é influenciada por este marcador;
- Através do uso de grupos externos, ocorreu o agrupamento de nossas amostras junto a abelha africana *Apis mellifera scutellata*, confirmando as origem materna dos enxames de abelhas Africanizadas;
- Nossos dados mostraram que as abelhas *Apis mellifera* da região do Nordeste brasileiro estão sob influencia ambiental e antrópica, o que vem resultando em altos níveis de fluxo gênico e miscigenação de haplótipos.

Referências

6 REFERÊNCIAS

- ABOU-SHAARA, H. F.; AL-GHAMDI, A. A. (2012). Studies on wings symmetry and honey bee races discrimination by using standard and geometric morphometrics. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 28, n. 3, p. 575-584.
- 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.
- ALMEIDA, G. F. *et al.*, (2008). INDUÇÃO A ENXAMEAÇÃO POR TEMPERATURA EM ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L.) COM AUXÍLIO DE REGISTRADORES AUTOMÁTICOS (APIDÔMETROS) DE ATIVIDADE DE VÔO.
- 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**, v. 5, n. 3, p. 557-566.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D.O. (2003) DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. "In" **Apoidea Neotropica**: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure (Eds. G.A.R. Melo e I. Alves-dos-Santos I.), p. 305-309, UNESC, Criciúma.
- AVISE, J. C. *et al.*, (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489-522.
- AVISE, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15.
- AYTEKIN A.M, TERZO M, RASMONT P AND ÇAGATAY, N. (2007). Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). **Ann. Soc. Entomol. Fr.** **43**: 95-102.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. (2009) .Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688.
- BATISTA, V, S, P *et al.* (2013). Ecotope effect in *Triatomabrasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) suggests phenotypic plasticity rather than adaptation. *Medical and Veterinary Entomology* (2013) 27, 247–254 doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01043.x

BERENBAUM, M. R. (1995). Bugs in the System: Insects and their Impact on Human Affairs. Cambridge.

BESANSKY, N. J.; FAHEY, G. T. (1997). Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae) **Molecular Biology and Evolution** **14**, p. 442-454.

BLOCH, G.; FRANCOY, T. M.; WACHTEL, I. ; PANITZ-COHEN, N. ; FUCHS, S. ; MAZAR, A. (2010). Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 11240-11244.

BONATTI, V., SIMÕES, Z. L. P., FRANCO, F. F., & FRANCOY, T. M. (2014). Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. **Naturwissenschaften**, *101*(1), 17-24.

BRANDEBURGO, MAM; GONÇALVES, L. S. (1989). A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). **Revista Brasileira de Biologia**, p. 1035-1038.

CHROMASPRO version 1.6 (2012), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.

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**, p. 329–335.

COROIAN, CRISTIAN O. *et al.*, (2014). Climate rather than geography separates two European honeybee subspecies. **Molecular ecology**, v. 23, n. 9, p. 2353-2361.

CORREIA-OLIVEIRA,E. M. (2012). Manejo da agressividade de abelhas africanizadas, Piracicaba, ESALQ/USP, Divisão de biblioteca, p.38, **seria produtor rural** N.33

COSTA, E. M., ARAUJO, E. L., MAIA, A. V., SILVA, F. E., BEZERRA, C. E., & SILVA, J. G. (2014). Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, *45*(1), 34-44.

CRANDALL, K. A.; SING, C. F. *et al.* (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619-33.

CRISTINO, A. S. (2003). Aspectos reprodutivos envolvidos no processo de africanização das abelhas *Apis mellifera* no Brasil. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, v. 133, n. 1, p. 97-117.

DANFORTH, B.N.; SIPES, S.; FANG, J.; BRADY, S.G. (2006). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103**: 15118–15123.

DARGER, K. (2003). Determining low levels of Africanization in unmanaged honey bee colonies using three diagnostic techniques. 2013. Tese de Doutorado. University of Delaware.

DEBAT, V., BÉAGIN, M., LEGOUT, H., & DAVID, J. R. (2003). Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*, **57**(12), 2773-2784.

DE JONG, D.; MESSAGE, D. (2008). New and exotic disease threats for Brazilian bees. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8, Ribeirão Preto, SP, **Anais 2008**. CD-ROM

DINIZ-FILHO, J. A. F., & Malaspina, O. (1995). Evolution and population structure of Africanized honey bees in Brazil: evidence from spatial analysis of morphometric data. **Evolution**, 1172-1179.

DINIZ-FILHO, J. A. F., Fuchs, S., & Arias, M. C. (1999). Phylogeographical autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Heredity**, **83**(6), 671-680.

DINIZ-FILHO, JOSÉ A. F., *et al.*, (2000). Spatial analysis of morphological variation in African honeybees (*Apis mellifera* L.) on a continental scale. **Apidologie**, v. 31, n. 2, p. 191-204.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567.

FALEIRO, F. (2007). Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. **Planaltina-DF: Embrapa Cerrados**, p. 102.

FAROOQUI, T. (2013). A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. **Neurochemistry international**, 62(1), 122-136.

FERREIRA, K. M. *et al.* (2009). Cytochrome-b variation in *Apis mellifera* samples and its association with COI–COII patterns. **Genetica** **135**, p. 149–155.

FERREIRA, V. S., AGUIAR, C. M. L., OLIVEIRA, E. J. F., COSTA, M. A., SANTOS, G. M. M., & SILVA, J. G. (2013). Mitochondrial DNA variability in populations of *Centris aenea* (Hymenoptera, Apidae), a crop-pollinating bee in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 12(1), 830-837

FIORAVANTI, C. (2006). Olhar amplo sobre a biodiversidade, Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), **Litokromia**, 45p.

FRANCISCO, F. D. O.; ARIAS, M. C. (2009). Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. **Apidologie**, v. 41, n. 2, p. 216-224.

FRANCISCO, F.O (2012). Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA mitocondrial e microsatélite. Dissertação de Mestrado

FRANÇOSO, E.; ARIAS, M. C. (2013). Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. **Molecular ecology resources**, v. 13, n. 5, p. 844-850.

FRANCOY, T. M. (2007). Variabilidade genético-morfológica em populações neotropicais de *Apis mellifera*. **Tese de doutorado**, apresentada à FFCLRP USP, Ribeirão Preto.

FRANCOY, T. M. *et al.*, (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 488-494.

FRANCOY, T. M. *et al.*, (2009). Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. **Genetics and Molecular Research** **8**, p. 207-214.

FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (2010). A Morfometria Geométrica De Asas E a Identificação Automática De Espécies De Abelhas. **O ecologia Australis**, v. 14, n. 01, p. 317-321.

FRANCOY, T., M.; DE FARIA FRANCO, F.; ROUBIK, D. W. (2012). Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of Euglossa (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Apidologie**, v. 43, n. 6, p. 609-617.

FREE, J. B. (1980). A organização social das abelhas (Apis), in **Temas de Biologia**, V. 13; EPU/EDUSP, São Paulo, 79 p.

FREITAS, B. M. (1991). Potencial da caatinga para a produção de pólen e néctar para exploração apícola. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 140 p.

FREITAS, B. M. (2005a). Crop pollination in Brazil – a stock taking. Rome: FAO. 61p.

FREITAS, B. M. (2007). Absconding and migratory behaviors of feral Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in NE Brazil. **Acta Sci. Biol. Sci. Maringá**, v. 29, n. 4, p. 381-385.

GOOGLE INC. Google Earth (software), 2011. Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: Janeiro 2014

GONÇALVES, L. S. (1994). A influência do comportamento das abelhas africanizadas na produção, capacidade de defesa e resistência à doenças. **Anais do I Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto**; p. 69-79.

GONÇALVES, L. S. (1975). A abelha, símbolo do bem estar. Anais do 3 congresso Brasileiro de Apicultura. Piracicaba p. 43-53

GONÇALVES, P. H. P. (2010). Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas. p. 148 (Magister Scientiae). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil.

GRANT, W. A. S.; BOWEN, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 415-426.

GRASSI, M. L. (2009). Discriminação morfométrica de 26 subespécies de *Apis mellifera* L. E abelhas Africanizadaspor técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e sistema ABIS de identificação de espécies. Tese de doutorado apresentada à FFCLRP USP, Ribeirão Preto, 121p.

GRUBER, Karl *et al.*, (2013). Distinct subspecies or phenotypic plasticity? Genetic and morphological differentiation of mountain honey bees in East Africa. **Ecology and evolution**, v. 3, n. 10, p. 3204-3218.

GUEDES, P. (2005) As abelhas no mundo: Mais antigas que o homem. O Mundo das Abelhas. São Paulo.

GÜLER, A., BEK, Y., & GUVEN, H. (2010). The Importance of Morphometric Geometry on Discrimination of Carniolan (*Apis mellifera carnica*) and Caucasian (*A. m. caucasica*) Honey Bee Subspecies and in Determining Their Relationship to Thrace Region Bee Genotype. **Journal of the Kansas Entomological Society**, 83(2), 154-162.

HARTL DL, CLARK AG. (1997). Principles of Population Genetics. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl_1, p. S96-S99.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. (2003b). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321.

HEBERT, P. D., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S., & FRANCIS, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS biology**, 2(10), e312.

HEBERT, P. D., & GREGORY, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic biology**, 54(5), 852-859.

HEPBURN, H. R. *et al.*, (1998). Population structure and the interface between *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata*. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 333-346.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009. **IBGE** – Produção Pecuária Municipal. www.sidra.ibge.gov.br. Acesso variado, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Anomalias de Precipitação – Método dos Quantis. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/quantis>>. Acesso em: 3 de Setembro de 2012.

JERMIIN, L. CROZIER, R. H. (1994). The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. **Journal of Molecular Evolution**, v. 38, n. 3, p. 282-294.

JENSEN, ANNETTE B. *et al.*, (2005). Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 1, p. 93-106.

JOHNSON, R. (2011). Honey bee colony collapse disorder. DIANE Publishing.

JONES JC, MYERSCOUGH MR, GRAHAM S, OLDROYD BP (2004). Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science* 305:402–404. DOI 10.1126/science.1096340

JORGE, LEONARDO R. *et al.*, (2011). Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 102, n. 4, p. 765-774.

KANDEMIR, I., KENCE, M., SHEPPARD, W. S., & KENCE, A. (2011). Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations. **Turkey.Journal of apicultural research**, 45(1), 33-38.

KAMEL, S. M., OSMAN, M. A. M., MAHMOUD, M. F., MOHAMED, K. M., & ABD ALLAH, S. M. (2013). Morphometric study of newly emerged unmated queens of honey bee *Apis mellifera* L. in Ismailia Governorate, Egypt. **Arthropods**, 2(2).

KERR, W.E. (1967). The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal** 39 (2), p. 3-5.

KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**, 274: 303–313.

KLINGENBERG, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 2, p. 353-357.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5 (2009). A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452.

LIMA, A. O. N. (1995). Pólen coletado por abelhas africanizadas em apiário comercial na caatinga cearense. **Dissertação de Mestrado**.

MAGALHÃES, C. B.; FREITAS, B. M. (2013). Introducing nests of the oil-collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini) for pollination of acerola (*Malpighia emarginata*) increases yield. **Apidologie**, v. 44, p. 234-239.

MAGNUS, R. M., TRIPODI, A. D., & SZALANSKI, A. L. (2009). Mitochondrial DNA Diversity of Honey Bees (*Apis mellifera*) from Unmanaged Colonies and Swarms in the United States. **Biochemical Genetics**, 1-13.

MEIXNER, M. D.; WOROBIK, 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.

MEIXNER, M. D., LETA, M. A., KOENIGER, N., & FUCHS, S. (2011). The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*—*Apis mellifera simensis* n. ssp. **Apidologie**, 42(3), 425-437.

MENDES, M. F. M. *et al.*, (2007). Intra-populational variability of *Nannotrigonatestaceicornislepeletier*, (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis variabilidade intra-populacional *Nannotrigonatestaceicornis*. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 147 – 152.

MIGUEL, I. *et al.* (2010). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. **Apidologie**.

MILLER, M. P. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA): A windows program for the anasylis of allozyme and molecular population genetic data.

MORAES, D. A. (2003). A Morfometria Geométrica e a sua “Revolução na Morfometria”: localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim**, v. Ano III, n. 3

MURRAY, T. E. *et al.* (2007). Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 653-666.

MORSE, R. A., & CALDERONE, N. W. (2000). The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. **Bee Culture**, 128(3), 1-15.

NEI M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89:583-590.

NUNES, L. A. (2012). Estruturação populacional, variações fenotípicas e estudos morfométricos em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) no Brasil (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

OLEKSA, A., & TOFILSKI, A. (2014). Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie*, 1-12.

ORTH, A. I.; MATOS, J. Z. (2000). O declínio dos polinizadores no mundo: recomendações para reverter o quadro atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis.

PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L. O. (2002). Embrapa Produção de mel. Embrapa. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br>

POLZIN, T. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, v. 31, n. 1, p. 12-20.

RIZZARDO, R. A. G. ; MILFONT, M. O. ; SILVA, E. M. S. ; FREITAS, B. M. (2012). *Apis mellifera* pollination improves agronomic productivity of anemophilous castor bean (*Ricinus communis*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 605-608, 2012

ROHLF, F.J.; MARCUS, L.F. (1993). A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution** 8, p.129–132.

ROHLF, F. J. (1998). On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. **Systematic biology**, v. 47, n. 1, p. 147-58; discussion 159-67.

ROHLF, F. J. (2008a). **tpsUtil**. New York - USA: Departament of Ecology and Evolution, State University of New York.

ROHLF, F. J. **tpsDig**. (2008b). New York - USA: Departament of Ecology and Evolution, State University of New York.

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.

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.

SANTOS, I. A. (2002). A vida de uma abelha solitária. ***Revista Ciência Hoje*** n.179.

SANTOS, E, *et al.* (2012). A seca no nordeste no ano de 2012: relato sobre a estiagem na região e o exemplo de prática de convivência com o semiário no distrito de iguaçu/canindé-ce. ***Revista Geonorte***, Edição Especial 2, V.1, N.5, p.819 – 830, 2012

SAVOLAINEN, V., COWAN, R. S., VOGLER, A. P., RODERICK, G. K., & LANE, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. ***Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences***, 360(1462), 1805-1811.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **SEBRAE** 2014- Setor Apicultura, disponível: <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura>, acesso variado em 2014.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H. & FLOOK, P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. ***Annals of the Entomological Society of America***, v.87, n.6, p. 651-701.

SLATKIN, Montgomery. (1997). Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. ***Theoretical population biology***, v. 12, n. 3, p. 253-262.

SOARES, A. E. E. (2012). Abelhas africanizadas no brasil: do impacto inicial às grandes transformações in *Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC – São Luís, MA – Julho/2012*

SOFIA, S.E.; BEGO, R.L. (1996). As abelhas da família Apidae em suas visitas às flores do Campus da USP, Ribeirão Preto, SP. In: **ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, 2, 1996, Ribeirão Preto. Anais. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

SOUSA, L.C.F.S *et al.*, (2012). Cadeia produtiva da apicultura: cooapil – cooperativa da micro-região de catolé do rocha – pb. **INTESA** (Pombal – PB – Brasil) v.5, n.1, p. 16 - 24 janeiro/dezembro de 2012, disponível: <http://www.revista.gvaa.com.br>

SOUZA, D. L., EVANGELISTA-RODRIGUES, A., RIBEIRO, M. N., PADILLA-ÁLVAREZ, E. S. L. F., & PEREIRA, E. W. E. (2009). Análise morfométrica entre *Apis mellifera* na mesorregião do sertão paraibano. *Archivos de zootecnia*, 58(221), 65-71.

SPSS INC. **SPSS Base 7.0 for Windows user's guide**. Prentice Hall, 1996.

STATSOFT, Inc. STATISTIC (data analysis software system) version 7. www.statsoft.com

STEVANOVIC, J., STANIMIROVIC, Z., RADAKOVIC, M., & KOVACEVIC, S. R. (2010). Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. **Russian Journal of Genetics**, 46(5), 603-609.

STRAHLER, A.H.(1951). *Physical geography*. New York: John Wiley & Sons.

SYSTAT SOFTWARE, Inc. (2006). *SigmaPlot 10 user's manual*.

TAMURA, K. *et al.*, (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739.

TAN, Ken *et al.*, (2006). Gigantism in honeybees: *Apis cerana* queens reared in mixed-species colonies. **Naturwissenschaften**, v. 93, n. 7, p. 315-320.

TEIXEIRA, M. V. (1993). Aspectos comportamentais e fatores que influenciam na fecundação natural de rainhas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), em Região Neotropical. Dissertação (Mestrado) — FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 1993. 124 p.

TOFILSKI, A. (2008). Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 558-563.

TOLEDO, V., RUVOLOTAKASUSUKI, M. C. C., BAITALA, T. V., Costa-Maia, F. M., Pereira, H. L., Halak, A. L., Malerbo-Souza, D. T. (2013). Pollination by honeybees (*Apis mellifera* L.) in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Agraria Paranaensis**, 12(4), 236-246.

TRINDADE, M. S. *et al.*, (2004) Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN.

UNAMEL (2013). União Nordestina de Apicultura e Meliponicultura.

VANENGELSDORP, D; UNDERWOOD, R; CARON, D; HAYES, J Jr (2007) An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal** 147: 599-603.

VANENGELSDORP, D; HAYES, J Jr; UNDERWOOD, R M; PETTIS, J S (2010) A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 7-14. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.03>

VANENGELSDORP, D., CARON, D., HAYES, J., UNDERWOOD, R., HENSON, M., RENNICH, K., PETTIS, J. (2012). A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership.

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

WALSH. B. (2013). "The Plight of the Honeybee." TIME.com. N.p., n.d. Web. 15 Sept. 2013

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-13.

WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R., & HEBERT, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 360(1462), 1847-1857.

WAUGH, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays : News and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 29, n. 2, p. 188-97.

WRIGHT, S. (1949). The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323-354.

YIN, L.; JI, T. (2012). Genetic diversity of the honeybee *Apis cerana* in Yunnan, China, based on mitochondrial DNA. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 12, n. 2, p. 2002-2009.