

16
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ESTUDIO ELECTROFORETICO DE DOS ENZIMAS (MDH Y HK) EN Apis mellifera
DURANTE EL PROCESO DE AFRICANIZACION.

T E S I S

Que para obtener el titulo de

B I O L O G A

P R E S E N T A

MARIA CONCEPCION BASTIDA GASCA

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pag.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1 Antecedentes	3
2.2 Antecedentes en México	5
2.3 Métodos de identificación	7
3. OBJETIVOS	13
4. METODOLOGIA	14
4.1 Trabajo de campo	14
4.1.1 Area de estudio	14
4.1.2 Muestreo	16
4.2 Trabajo de laboratorio	17
4.2.1 Técnica de electroforesis	17
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSION	28
7. COMENTARIOS FINALES	44
8. APENDICE 1	46
9. APENDICE 2	48
10. APENDICE 3	53
11. BIBLIOGRAFIA	56

1. RESUMEN

A partir de 1986, la abeja africanizada comenzó a colonizar México y con ello se empezaron a realizar trabajos en cuanto al proceso de africanización dentro de diferentes zonas del país. Este ha sido definido como la invasión de colonias silvestres (enjambres) africanizadas, y la posterior hibridización con colonias residentes (colmenas y enjambres) de origen europeo, dando como resultado que las características africanas predominen sobre las europeas.

Un sin número de trabajos han hecho evidente que las frecuencias alélicas de dos enzimas, malato deshidrogenasa (MDH) y hexoquinasa (HK) difieren significativamente entre las poblaciones de abejas europeas y africanizadas, lo cual determina que estas enzimas pueden ser utilizadas como marcadores genéticos y proveer una herramienta para establecer como se van dando los procesos de africanización en diferentes ambientes.

En este contexto fué realizado este estudio, en el cual se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de las enzimas MDH y HK en colonias de abejas de seis apiarios experimentales. Estos apiarios se encuentran localizados en un transecto altitudinal que va de los 20 msnm a 1950 msnm desde el Puerto de Veracruz hasta Xalapa. El muestreo se realizó en dos periodos de tiempo, noviembre de 1988 y mayo a julio de 1989.

Los resultados muestran que las frecuencias alélicas para MDH y HK en los apiarios de Xalapa se presentan en un patrón semejante a las de origen europeo de otras zonas del Continente Americano y México. Sin embargo, las características genéticas y de comportamiento en el apiario localizado 480 msnm sugieren que tal vez existe una incipiente africanización.

En contraposición, el apiario localizado a 1920 msnm, cuyas características genéticas y de comportamiento son claramente europeas, se propone como un sitio poco probable de africanización como resultado de la posible existencia de una barrera climática para la colonización de abejas africanizadas.

Por otro lado, se decidió utilizar los datos electroforéticos de MDH, como una introducción hacia la genética de poblaciones en abejas por medio de la determinación de algunos parámetros de estructura genética como estadísticos de Wright y distancia genéticas de Nei, así como Equilibrios de Hardy-Weinberg e índices de fijación.

2.- INTRODUCCION

La rápida y amplia colonización de las abejas africanizadas en la mayor parte de América del Sur, América Central y actualmente en México, a partir del escape de 26 colonias de abejas africanas (Apis mellifera scutellata Lep.) en 1957 (Kerr, 1967) ha sido uno de los eventos biológicos que ha llamado la atención en los últimos años.

El proceso de africanización definido como la invasión de colonias silvestres africanizadas, las cuales se hibridizan con colonias de origen europeo (enjambres y colmenas), donde las características de las colonias africanizadas predominan sobre las europeas determinan una oportunidad única para caracterizar las diferencias genéticas entre estas dos poblaciones antes de la hibridización y posteriormente documentar los cambios genéticos como resultado de su interacción en diferentes ambientes. Para ello el uso de marcadores enzimáticos a través de la técnica de electroforesis determina una herramienta importante en este tipo de estudios.

En numerosos trabajos se han encontrado dos marcadores enzimáticos: malato deshidrogenasa (MDH) y hexoquinasa (HK) cuyas frecuencias alélicas son diferentes entre las poblaciones de abejas europeas y africanizadas (Sylvester, 1976, 1985 y Del Lama, 1988 entre otros). Es por ello que una caracterización genética de MDH y HK se hace indispensable para establecer como se van dando los cambios genéticos en una zona con la llegada de la abeja

africanizada.

2.1 Antecedentes

Las abejas mieleras (Apis mellifera, L.) son nativas del área del Mediterraneo y se distribuyen ampliamente tanto en zonas témp-ladas como tropicales encontrándose en Europa, Asia y Africa donde se han reconocido 24 subespecies las cuales presentan una gran varibilidad morfológica y de conducta (Ruttner, 1988). Esta especie fue introducida a América con fines productivos, a través de importaciones de subespecies europeas (A. m. mellifera L. y A. m. ligustica Spin.) desde el siglo XVIII (Calkins, 1974). Las características de las abejas europeas son: facilmente manejables, producen 1-2 enjambres por año, poco agresivas, pero en las regiones tropicales son poco productivas. En 1956, una variedad de abejas de Africa (A. m. scutellata Lep.) fué introducida a Brasil con el propósito de producir una linea híbrida de abejas que tuviera las características de manejo de las subespecies europeas, pero adaptada a zonas tropicales como las de Africa (Kerr, 1967). Las abejas africanas son muy productivas en los trópicos, sin embargo son de difícil manejo debido a que son propensas a tener una conducta defensiva severa, enjambran y emigran con facilidad dando como consecuencia que este tipo de abejas sean indeseables para los apicultores (Page, 1989). En 1957, 26 enjambres africanos escaparon accidentalmente de un apiario experimental cerca de Río Claro, Edo. de Sao Paulo, Brasil donde estaban en cuarentena, estas abejas se reprodujeron en el

medio circunvecino e iniciaron una dispersión constante (SARH, 1986). Actualmente los descendientes de estas abejas africanas han colonizado exitosamente la mayor parte del América del Sur y América Central y se están dispersando a través de México.

Se han desarrollado diferentes puntos de vista acerca de como esta población predominantemente africana puede llegar a establecerse en una zona, particularmente en áreas donde se han mantenido abejas europeas por más de 200 años; y como las características africanas se mantienen en una región donde la descendencia reproductiva de las 26 reinas originales, debieron haberse entrecruzado por azar con abejas europeas (Rinderer, 1986 y Taylor, 1985). Rinderer en 1986 propone que el proceso de africanización implicó desde su inicio y continua siendo un proceso de hibridización entre las abejas europeas de colmenas con las abejas africanas. Por ello estas abejas constituyen un híbrido y deben ser llamadas africanizadas. Por otro lado Taylor (1985) opina que la población africana ha permanecido distinta de la población europea durante su dispersión a través de mecanismos de aislamiento reproductivo; Taylor et al. (1989); Hall y Muralidharan (1989) sostienen que las abejas europeas no han contribuido significativamente al acervo génico africano y por lo tanto deben ser llamadas abejas africanas.

Para los fines prácticos de este estudio, la distinción entre las poblaciones híbridas resultantes del entrecruzamiento de abejas europeas con africanas y las poblaciones de Africa, denominaremos africanizadas a las poblaciones que se han venido desplazando a

través del Continente Americano.

Son cuatro las características más notables de las abejas africanizadas: su eficiente comportamiento defensivo, alta producción de enjambres reproductivos, un desarrollado comportamiento evasivo o migratorio que impulsa a la colonia a abandonar su nido cuando las condiciones ambientales le son desfavorables (p. ej. disminución en la disponibilidad de recursos) o cuando es atraída por fuentes distantes ricas en alimento; y por último, una alta capacidad de los enjambres a viajar grandes distancias (Michener, 1975).

2.2 Antecedentes en México

La introducción de Apis mellifera a México fué de Florida a finales del siglo XVIII, la subespecie introducida fué A. m. mellifera. A partir de entonces fueron traídas otras variedades como A. m. ligustica y A. m. carnica (Labougle y Zozaya, 1986).

El rápido desplazamiento de la abeja africanizada (debido principalmente a su capacidad de reproducción y conducta enjambradora) ha sido a razón de 300-400 km por año (Taylor, 1977). De esta forma se estimó que llegarían a México entre 1985-1987 (Taylor, 1985). Los primeros enjambres de abejas africanizadas fueron capturados en septiembre de 1986 (Fierro et al., 1987) por la región costera de Chiapas. A partir de entonces han continuado su desplazamiento hacia el interior del país principalmente a través de las costas. Actualmente las abejas africanizadas han colonizado la mayor parte del sur de México.

Hacia el Golfo de México las abejas africanizadas arribaron al Estado de Veracruz en octubre de 1987 e invadieron la zona de Xalapa desde noviembre de 1988 (SARH, no publ.), alcanzando la el Estado de Tamaulipas en 1989. A lo largo del Pacífico el desplazamiento de estas abejas ha sido reportado hasta el Estado de Colima en 1990 (Labougle en prensa). Para el Centro de México, la colonización ha alcanzado el Distrito Federal desde marzo de 1991 (González, 1991).

2.3 Métodos de identificación

La invasión de abejas africanizadas ha hecho necesario utilizar métodos objetivos que permitan distinguir abejas europeas y africanizadas con el objeto de determinar como se van dando los procesos de africanización en las distintas zonas del Continente Americano además de monitorear y documentar su movimiento en éste. Los criterios más usados para distinguir las abejas africanizadas de las europeas son:

a) Conducta y observaciones de campo

La observación directa de características en el nido, principalmente de agresividad, forma de vuelo, tendencia a correr sobre el panal al contacto con humo, almacenamiento de miel, áreas de cría, así como tamaño y color de las obreras, son tomadas en cuenta en la identificación de una colonia como africanizada o europea (Tabla 1).

b) Medición del tamaño de las celdillas de abejas obreras

Rinderer et al. (1986), encontraron que la medición de la distancia transversal que ocupan en el panal 10 celdillas de cría de abejas obreras es diferente para las europeas y africanizadas. En abejas europeas esta distancia fluctúa entre 5.0 y 5.5 cm, donde los promedios de tres medidas varían entre 5.2 (± 0.02) y 5.3 (\pm

Tabla 1 .- Características del nido de abejas europeas y africanizadas.

Característica	Europea	Africanizada
Agresividad	Poca	Mucha
Vuelo	Menos preciso, salen y regresan al nido caminando algunos centímetros fuera de la entrada.	Muy preciso, salen y entran del nido volando
Almacenamiento de miel	Mucho	Poco
Area de cría	Limitada al centro del panal	Mayor área, hasta las orillas del panal
Tamaño	Grandes	Menor tamaño
Color	Claro	Obscuro

0.02) cm. En contraste, las mediciones hechas en celdillas de abejas africanizadas fluctúa entre 4.5 y 5.0 cm., encontrándose que los promedios de tres mediciones están entre 4.8 (± 0.02) y 4.9 (± 0.02) cm. Este método es comúnmente utilizado como diagnóstico en la determinación de africanización de colonias de abejas europeas. El método consiste en medir 10 celdillas del centro del panal, a partir de la pared exterior de la primera celdilla hasta el interior de la décimo primera celdilla (Fig. 1).

c) Análisis morfométrico

Haciendo uso del análisis discriminante, Daly y Balling (1978) desarrollaron un método que permite una identificación confiable de colonias de abejas africanizadas y europeas con un margen de error del 0.505% al 4.46%, utilizando la medición de 25 caracteres físicos de las abejas comprendidos en las siguientes partes del cuerpo: ala anterior derecha, ala posterior derecha, tercer esternito abdominal y la pata posterior derecha.

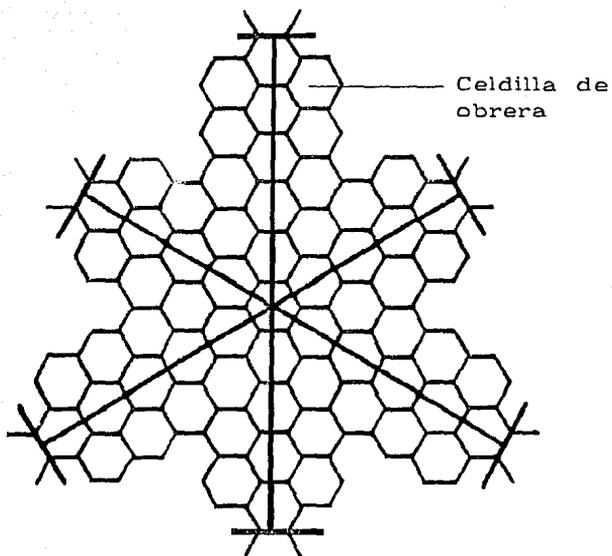


Figura 1.- Medicion de celdillas.

d) Análisis electroforético

Desde que la técnica de electroforesis llegó a ser de uso común en genética de poblaciones, fué aplicada en abejas, particularmente del género Apis (Mestriner, 1969). Estos trabajos se han visto incrementados en número en los últimos años para entender la dinámica del proceso de africanización y encontrar un marcador genético que permita discriminar entre abejas africanizadas y europeas.

Los primeros trabajos en genética de abejas por medio de la electroforesis, se realizaron con el objeto de conocer la variación durante el desarrollo ontogenético, como entre las diferentes razas de abejas mieleras (Mestriner, 1969; Mestriner y Contel, 1972; Sylvester, 1976; Martins et al., 1976; Contel et al., 1977). En general se han encontrado niveles muy bajos de variabilidad a nivel de enzimas del metabolismo básico, Sylvester (1976) reporta un locus polimórfico (MDH) y una heterocigocidad de 1% en 39 loci estudiados en Apis mellifera. Este es un valor muy bajo considerando la gran variación morfológica y de comportamiento en las abejas mieleras y el polimorfismo encontrado en otros invertebrados (Selander, 1986). Estos niveles bajos de variación genética en abeja han sido atribuidos, por una parte, a la haplo-diploidía y por otra a la conducta social de las abejas, que se refleja en la regulación de las condiciones del medio dentro del nido (temperatura, humedad, disponibilidad de recursos etc.); ello trae como consecuencia que los estados inmaduros en una

colonia perciba el medio como de "grano fino" (Levins 1968 en Sylvester 1985).

De todas las enzimas exploradas electroforéticamente sólo siete han sido polimórficas - fosfoglucomutasa (PGM), malato deshidrogenasa (MDH), hexoquinasa (HK), esterasa (EST), alcohol deshidrogenasa (ADH), málica (ME) y una proteína general (P3) - (Mestriner, 1969; Sylvester, 1976; Mestriner y Contel, 1972; Martins et al., 1976; Del Lama et al., 1985; Sheppard y Berlocher, 1984; Del Lama et al., 1988). De éstas, MDH, HK, PGM y ADH difieren de manera significativa entre las poblaciones de abejas europeas y africanizadas. El locus MDH-1 es considerado como el más útil para caracterizar éstas poblaciones de abejas. Sylvester (1985) resume las frecuencias para este locus con tres alelos en las distintas subespecies de abejas melíferas. Estos resultados se presentan en la Tabla 2 junto con los trabajos más recientes con MDH en abejas melíferas.

Por otro lado, recientemente fué descubierto un locus para HK importante en los estudios de poblaciones de abejas europeas y africanas (Del Lama et al., 1988). Este locus fué encontrado polimórfico con dos alelos, el alelo F (alelo rápido) y el S (alelo lento) en las abejas africanizadas de Brasil; mientras que en las poblaciones europeas de distintos continentes los individuos son homócigos para el alelo F generalmente (Tabla 3).

Debido a las diferencias encontradas en MDH y HK entre las dos poblaciones de abejas, se hace evidente la utilidad de estas enzimas como marcadores genéticos que nos permitan caracterizar a

Tabla 2.- Frecuencias alélicas de MDR reportadas para *Apis mellifera* (Sylvester, 1985).

Autor	Sitio	Tipo de abejas*	Número de colonias	Malato deshidrogenasa (MDR)		
				A	B	C
Sylvester (1976)	E.U.	I	24	0.20	0.11	0.70
	Brasil	Az	34	0.84	0.16	0.01
	Colombia	E	13	0.24	0.37	0.39
	Trinidad	E	10	0.37	0.13	0.50
Contel et al. (1977)	Brasil	I	34	0.14	0.15	0.71
	Brasil	Az	78	0.77	0.20	0.03
Gartside (1980)	Australia	Cn	9	0.37	0.32	0.31
	Australia	Cc	2	0.2	0.1	0.7
	Australia	I	4	0.2	0.1	0.7
	Australia	F	4	0.3	0.5	0.2
Nunamaker (1980)	Brasil	Az	4	0.7	0.2	0.1
	Brasil	Az	6	0.992	0.008	
	Sudafrica	A	18	1.0	---	---
	Sudafrica	Ac	2	0.4	0.3	0.3
Nunamaker y Wilson (1981)	Sudafrica	A	10	1.0	---	---
Wilson (1981)	Brasil	Az	12	0.93	0.03	0.04
Cornuet y Louveaux (1981)	Italia	I	8	0.25	---	0.75
	Francia	M	14	---	1.0	---
Badino et al. (1983)	Italia	I	412	0.21	0.03	0.77
	Francia	M	-	---	1.00	---
Sheppard y Berlocher (1984)	Noruega	M	6	0.11	0.85	0.04
Sheppard y Berlocher (1985)	Italia	I	5	0.30	0.06	0.64
Spivak (1988)	C. Rica	E	9	0.33	0.12	0.55
	Veracruz	E	20	0.28	0.15	0.57
	Istmo	E	18	0.09	0.19	0.72
	Chiapas	E	18	0.15	0.31	0.054
Lobo et al. (1989)	Brasil (N) ?		107	0.87	0.12	0.01
	Brasil (C) ?		93	0.77	0.12	0.04
	Brasil (S) ?		39	0.74	0.25	0.01
	Uruguay ?		51	0.31	0.64	0.05
Labougle et al. (1989)	Veracruz	Az	13	0.85	0.08	0.07
	Oaxaca	Az	33	0.81	0.13	0.06
Brizuela 1989 (en prep.)	Veracruz	Az	46	0.70	0.15	0.15
Taylor 1988 (com. pers)	Xalapa	E	47	0.22	0.115	0.665

* A=Africana (*A. m. scutellata*), Ac=(*A. m. capensis*), E=Europea, Az=Africanizada, Cc=Caucasiana (*A. m. caucasica*), Cn= Carniola (*A. m. carnica*), F=enjambres silvestres, I= Italianas (*A. m. ligustica*), M=*A. m. mellifera*.

Tabla 3.- Frecuencias alélicas de HK-1 reportadas para Apis mellifera

Autor	Sitio	Tipo de abejas*	Número de colonias	Hexoquinasa (HK-1)	
				F	S
Del Lama <u>et al.</u> (1988)	Brasil	Az	182	0.450	0.550
	Italia	I	15	1.00	
		Cn	12	1.00	
	E.U.	I	7	1.00	
	México	E	8	1.00	
Spivak (1988)	C. Rica	E	9	0.8	0.2
	Veracruz	E	20	0.99	0.01
	Istmo	E	18	0.94	0.06
	Chiapas	E	18	0.94	0.06
Labougle <u>et al.</u> (1989)	Veracruz	Az	4	0.56	0.44
	Oaxaca	Az	33	0.54	0.46
Brizuela (en prep.)	Veracruz	Az	46	0.6	0.4
Taylor 1988 (comm. pers.)	Xalapa	E	47	1.00	

* E=Europea, Az=Africanizada, Cn= Carniola (A. m. carnica),
I= Italianas (A. m. ligustica).

las abejas durante los procesos de africanización.

Así mismo, los marcadores enzimáticos han sido utilizados ampliamente en diversas áreas como: estudios taxonómicos y filogenéticos (Awise, 1974; Buth, 1984), estudiar los procesos de especiación (Ayala, 1975), mejoramiento genético de especies cultivadas (Brown, 1978).

Recientemente, los marcadores genéticos han demostrado ser de gran utilidad en estudios de genética de poblaciones para ver el efecto de las fuerzas evolutivas como deriva génica, mutación, migración, selección natural y sistemas reproductivos sobre la estructura genética de las poblaciones (Hedrick, 1983; Brown et al. 1975; Richardson et al., 1986). En este trabajo se decidió explorar en este campo con las poblaciones de abejas *A. mellifera* a partir de los datos electroforéticos obtenidos con MDH de los apiarios de Xalapa, Veracruz. Cabe aclarar que este tipo de estudios involucra un diseño específico de trabajo además de la utilización de un mayor número de marcadores enzimáticos.

La electroforesis en gel es un método que permite estimar la variabilidad genética en las poblaciones naturales mediante el examen de las variantes proteicas elaboradas por los distintos individuos. La electroforesis en general es definida como "la migración de partículas bajo la influencia de un campo eléctrico" (Richardson et al., 1986). Así, durante la electroforesis, cada proteína se desplaza (migra) en un sentido y a una velocidad que dependen de su carga eléctrica neta así como de su peso molecular

y forma. Siendo las proteínas un producto primario de los genes, la variación en una proteína dada generalmente representa variación en el DNA que codifica para las proteínas. De este modo, la movilidad electroforética de proteínas provee indirecta información del DNA y por lo tanto de los distintos alelos (formas alternas de un gen) que codifican para una proteína dada. Así, si dos individuos de la misma especie tienen proteínas homólogas que migran a diferentes distancias durante la electroforesis, se concluye que estos individuos tienen diferentes alelos en el locus que codifica para esa proteína (Powell, 1975). Alternativamente, si las enzimas de diferentes individuos tienen equivalentes migraciones en el gel, entonces se asume que las secuencias codificadas del DNA fueron las mismas (Gottlieb, 1981; Hedrick, 1983; Richardson et al., 1986).

3. O B J E T I V O S

OBJETIVO:

Evaluar el grado de africanización de abejas en apiarios de la zona de Xalapa con base en estimaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas de dos enzimas (MDH y HK) por medio de la técnica de electroforesis en gel de almidón.

Adicionalmente se pretende hacer una exploración preliminar de la genética de las poblaciones de abejas mieleras. Para este fin se plantearon los siguientes objetivos:

A. Evaluar si las frecuencias genotípicas de MDH se encuentran en Hardy-Weinberg y estimar el índice de Fijación en diferentes apiarios de Xalapa.

B. Obtener estimadores preliminares de la estructura genética de las poblaciones de Apis mellifera con base en la enzima MDH utilizando los estadísticos F de Wright y las distancias genéticas de Nei.

4.- METODOLOGIA

4.1 TRABAJO DE CAMPO

4.1.1 Area de estudio

Para la realización de este trabajo, se muestrearon abejas de seis apiarios experimentales, establecidos a lo largo de un transecto que va desde la costa cerca del Puerto de Veracruz hasta las montañas cercanas a Xalapa en el Estado de Veracruz, México en un rango altitudinal de los 20 - 1950 msnm (Fig. 2). Los apiarios fueron establecidos a principios de 1988 y se ubican en sitios diferentes en cuanto a vegetación, clima, altitud y de acuerdo a su ubicación geográfica han sido denominados de la siguiente manera (Tabla 4): (1) Soledada de Doblado, (2) Tamarindo, (3) Cerro Gordo, (4) El Lencero, (5) Conafrut y (6) La Joya, donde la diferencia altitudinal más grande es de 1930 msnm entre los apiarios La Joya y Soledad de Doblado.

Así mismo las distancias geográficas entre los apiarios son dados en la Tabla 5 donde la mayor distancia geográfica se encuentra entre el apiario de Soledad de Doblado y Tamarindo mientras que los apiarios más cercanos son El Lencero y Conafrut.

Las características de precipitación y temperatura son registradas para dos zonas (García, 1988) las cuales se localizan muy cerca de los apiarios. En la Fig.3 (A) la estación de Xalapa que corresponde a los apiarios localizados a mayor altitud: El

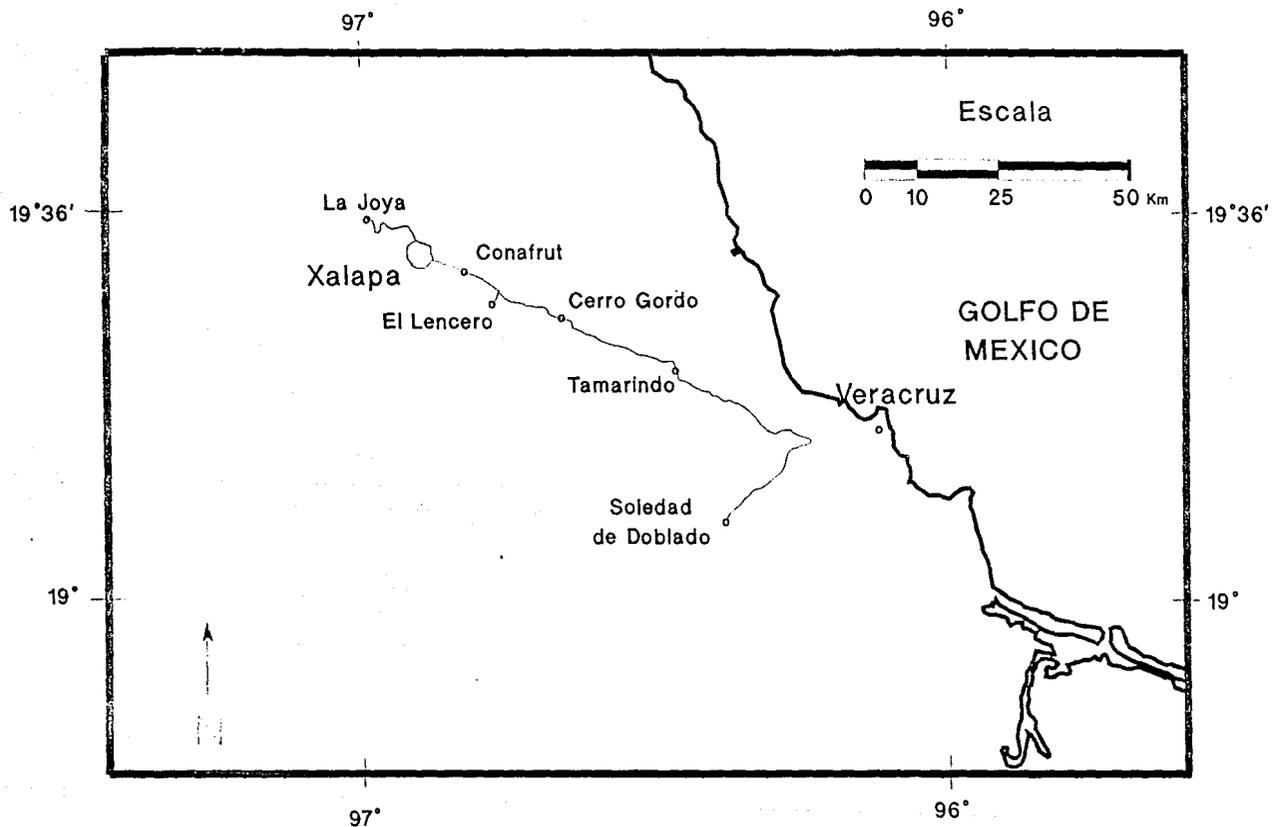


Figura 2.- Localización geográfica del área de estudio.

(INEGI-SPP, 1985)

Tabla 4.- Características de los apiarios

Apiario	Vegetación	Altitud
1) Soledad de Doblado	Zona de pastizal	20 msnm
2) Tamarindo	Selva baja caducifolia	100 msnm
3) Cerro Gordo	Selva baja caducifolia	480 msnm
4) El Lencero	Huerto	920 msnm
5) Conafrut	Huerto	1180 msnm
6) La Joya	Bosque de Pino-Encino	1950 msnm

Tabla 5.- Distancia geográfica
entre apiarios.

APIARIOS	DISTANCIA (Km)
1-2	34
2-3	25
3-4	12.5
4-5	7.5
5-6	20

Lencero (4), Conafrut (5) y La Joya (6), mientras que la estación de Palo Gacho (B) corresponde a los apiarios que se encuentran en las altitudes bajas: Soledad de Doblado (1), Tamarindo (2) y Cerro Gordo (3). Como se observa en estos diagramas en las dos zonas la mayor precipitación se encuentran entre los meses de mayo a septiembre donde los datos de precipitación media anual para Xalapa es de 1493.2 mm mientras que en la zona de Palo Gacho es de 1156.5 mm. La temperatura en la zona de Xalapa a lo largo del año oscila entre los 14.9 y 20.4 °C con una temperatura media anual de 18 °C. Para la zona de Palo Gacho la temperatura a lo largo del año oscila entre los 22.3 y 29.2 °C con una temperatura media anual de 25.9 °C.

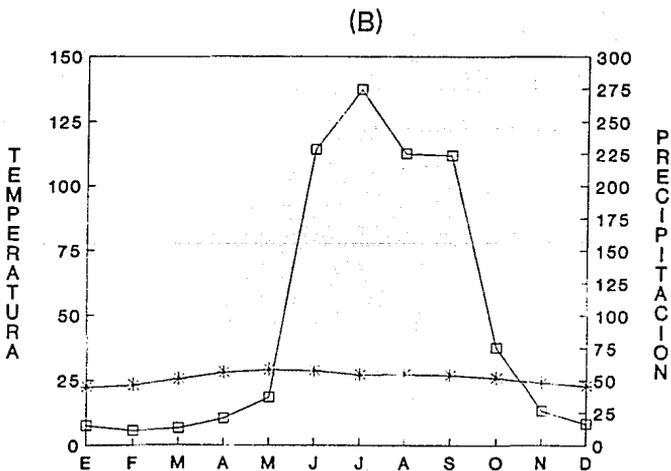
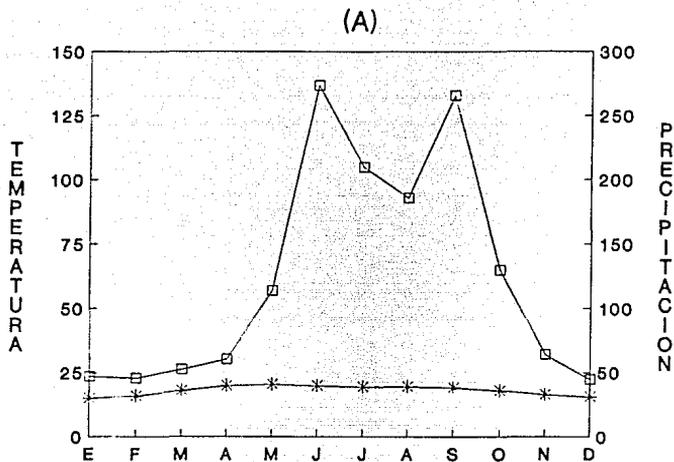


Figura 3.- Diagramas ombrotérmicos de (A) Xalapa (EST.30-049)
y (B) Palo-Gacho (EST.30-086).

4.1.2 Muestreo

Por considerar un periodo de tiempo razonable para que pudiera haber un cambio en las frecuencias alélicas de MDH y HK en las poblaciones de abejas de la zona con la invasión de la abeja africanizada (Fierro et al., 1988), durante este trabajo se realizaron dos muestreos, el primero en el mes de noviembre de 1988 denominado como tiempo 1 (T1) y el segundo de mayo-julio de 1989 denominado tiempo 2 (T2). Este segundo muestreo sólo fué realizado en los apiarios de Tamarindo, Cerro Gordo y La Joya debido a que estos apiarios se localizan en una altitud baja, media y alta respectivamente.

Cada apiario consta de un promedio de 30 colmenas o colonias, la colecta se realizó tomando 10 colmenas al azar de cada apiario. De cada colmena se tomaron aproximadamente 25 abejas obreras adultas del centro de los bastidores, para así asegurar que pertenecieran a la población de la colmena muestreada. Se realizaron dos tipos de muestreo, uno de ellos consistió en colocar las 25 abejas de cada colmena en frascos de plástico de 100 ml para ser congeladas en hielo azul; el segundo consistió en colocar a las abejas en jaulas para reina (aproximadamente 12 abejas por jaula), las cuales fueron alimentadas con una mezcla de azúcar glass y miel ("candy") para mantenerlas vivas hasta ser almacenadas a temperatura adecuada. Tanto los frascos como las jaulas para reina, fueron previamente etiquetados con los siguientes datos: apiario, fecha y No. de colmena.

Al término de la colecta las abejas fueron transportadas y almacenadas en un ultracongelador Revco a -70°C para su posterior análisis enzimático en el Laboratorio de Genética y Evolución del Centro de Ecología, U.N.A.M.

4.2 TRABAJO DE LABORATORIO

4.2.1 Técnica de electroforesis

Se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón, para la caracterización de las frecuencias alélicas y genotípicas con las enzimas MDH (Malato deshidrogenasa) y HK (Hexoquinasa). La metodología así como el equipo utilizado en las electroforesis está basado principalmente en el utilizado en el Laboratorio de Genética y Evolución del Centro de Ecología, U.N.A.M., (Werth, 1985; Soltis et al., 1983; Piñero, 1982; Hakim-Elahi, 1976; entre otras) la cual se lleva a cabo de la siguiente manera:

a) Preparación del gel: Los geles se prepararon a una concentración del 12% utilizándose almidón hidrolizado (Sigma No. S-4501) para todos los geles. Cada gel fué preparado con 30 gr. de almidón, que se colocó en un matraz Erlenmeyer para vacío de 1 l. Al matraz se añaden 250 ml de solución amortiguadora y se agitó fuertemente para mezclar perfectamente el almidón y la solución amortiguadora. Una vez homogenizada la mezcla se calentó en un mechero de flama hasta llegar a la ebullición y permitir que la

solución opaca se tornara semitransparente. Inmediatamente después se aplicó vacío a la solución durante 1-2 minutos , para eliminar las burbujas de aire. El gel se vertió rápidamente en el molde para gel (previamente nivelado), y se dejó enfriar alrededor de 30 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos en refrigeración. Posteriormente se cubrió cada gel con plástico transparente delgado autoadherible para evitar la deshidratación del gel y se dejó toda la noche a temperatura ambiente . Todos los geles fueron preparados el día anterior de los corrimientos electroforéticos.

Los moldes utilizados en este trabajo son de acrílico transparente, cuyas medidas son: 20 cm de ancho x 24 cm de largo x 1 cm de altura.

Después de varias pruebas con diferentes sistemas-amortiguador, se determinaron dos tipos de sistemas para las dos enzimas, denominados como sistema Morfolina y sistema Histidina (Tablas A y B del Apéndice 1). El sistema Morfolina fué utilizado principalmente para MDH, mientras que el de Histidina lo fué para HK.

b) Extracción de las muestra: Se utilizaron 10 o más abejas por colmena, a cada abeja se le disectó el tórax colocándolos en placas de cultivo de tejidos, a los cuales se les agregó 2-3 gotas de solución amortiguadora de gel correspondiente al sistema y posteriormente fueron macerados con un agitador de vidrio (cuidando que esté perfectamente limpio en cada ocasión)

formándose un homogenizado de tejido y solución-buffer. A cada homogenizado se le colocó de 1-2 piezas de papel filtro para cromatografía (Whatman No. 3) de 0.4 cm de ancho x 1 cm de largo, para absorber la muestra y esta tira se colocó en el gel. La extracción de la muestra se hizo el mismo día del corrimiento de las enzimas, pero otras veces se realizó días antes del corrimiento, en cuyo caso eran colocados las piezas de papel filtro con la muestra en cajas Petri desechables adecuadamente etiquetadas con número de colmena, fecha de extracción, y sistema - amortiguador utilizado, éstas fueron almacenadas a -70 °C, hasta el momento del corrimiento.

c) Corrimiento: Para llevar a cabo la electroforesis se colocan las piezas de papel filtro con muestra a lo ancho del gel (16 cm) previamente cortado horizontalmente a 11 cm del extremo del cátodo, se utilizaron 20 muestras por gel más dos muestras con solución de amaranto (una a cada extremo) para visualizar la migración del frente durante el corrimiento.

Una vez colocadas las muestras se juntan las dos piezas de gel de tal manera que hagan firme contacto para el corrimiento adecuado. El gel es colocado en las charolas de electroforesis que han sido llenadas con la solución-amortiguadora para electrodos dependiendo del sistema utilizado y las toallas que funcionan como la conexión eléctrica entre el gel y las charolas (Fig. 4). Una vez montado el sistema se coloca en el refrigerador y se le aplica una corriente eléctrica. Después de 15-20 min. de

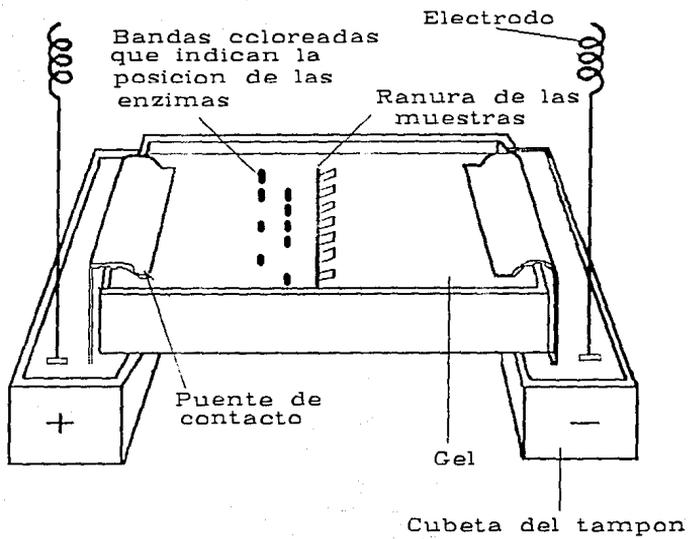


Figura 4.- Montaje de Electroforesis.

corrimiento, la corriente es suspendida y las tiras de papel filtro son retiradas del gel, cuidando que las dos piezas de gel queden perfectamente unidas, se cubre con plástico se coloca una placa de vidrio delgado encima del gel junto con un bloque de hielo (para evitar la deshidratación y el sobrecalentamiento del gel) y se reanuda el paso de corriente. El corrimiento se dejó hasta que el frente llegó al extremo del ánodo o alcanzó 9 cm a partir del origen.

d) Tinción y fijación: Una vez terminado el corrimiento, el gel es marcado en el extremo izquierdo con una ranura para la identificación de las muestras individuales y cortado en rebanadas horizontales de aproximadamente 2 mm de espesor (2-3 rebanadas por gel). Cada rebanada es colocada en una charola de tinción. La tinción de los geles se lleva a cabo en la oscuridad. Las soluciones de tinción fueron preparadas previamente (Tablas C y D del Apéndice 1), las cuales eran almacenadas en el congelador y descongeladas 30 minutos antes de la tinción, estas se vierten en cada rebana colocada en las charolas de tinción añadiendo los reactivos faltantes y agua destilada (20-30 ml aproximadamente). Los geles fueron incubados en la oscuridad a la temperatura ambiente hasta que las bandas de las isoenzimas estuvieran completamente teñidas. Al término de la tinción el excedente de solución para teñir se desecha y cada gel es enjuagado tres veces con agua corriente y fijado con una solución al 50% de etanol. Después de 12 horas en la solución fijadora los geles se sacan y

se envuelven en papel plástico transparente delgado autoadherible, etiquetandolos con los siguientes datos: sistema, fecha, número de muestras y enzima .

Algunos comentarios acerca de los problemas en la utilización de esta técnica en abejas mieleras y sus posibles soluciones son dados en el Apendice 3.

e) Interpretación de geles: Las isoenzimas son proteínas que presentan una misma actividad catalítica pero con distintas cadenas polipeptídicas producto de diferentes loci genéticos y las aloenzimas son definidas como proteínas producidas por diferentes alelos en un mismo locus. La lectura de los geles se realizó de acuerdo al número de bandas desplegadas en el gel. Cada banda representa una isoenzima la cual es definida en términos electroforéticos como enzimas que comparten un sustrato común pero con distinta movilidad electroforética, donde se asume que las isoenzimas que son separadas pueden ser codificadas por loci genéticos distintos.

Las isoenzimas pueden estar codificadas por diferentes alelos para un mismo locus llamadas aloenzimas. Para un locus dado, los individuos homocigos presentan una sola banda, mientras que los individuos heterocigos mostraran 2 o más bandas dependiendo de la estructura primaria de la enzima (Werth, 1985).

f) Análisis de Datos: Las frecuencias para cada uno de los alelos por sitio fueron obtenidas a través del programa SPSS.PC.

(V. 3. 1)

Dos tipos de análisis de las frecuencias alélicas fueron realizadas:

- Análisis de varianza: En este análisis las frecuencias alélicas fueron transformadas a arcoseno para aproximarles a una distribución normal, a través del programa SPSS.PC.

- Análisis genético: Para este análisis se realizó una prueba de heterogeneidad de varianzas de las frecuencias alélicas de Workman y Niswander (1970), la cual estima si existen deferencias en las frecuencias alélicas de diferentes sitios. Una vez realizada esta prueba, se estimaron los equilibrios en Hardy- Weinberg, índices de fijación F , estadísticos de Wrigth, distancias y similitudes genéticas de Nei (1978), (Hartl y Clark, 1989) (Apéndice 2). Este análisis fué realizado a través del programa BIOSYS.1 (Swofford, 1989) instalado en la computadora del Lab. de Genética y Evolución del Centro de Ecología, U.N.A.M.

5. RESULTADOS

Los patrones aloenzimáticos de MDH y HK en las abejas (Apis mellifera L.) de seis apiarios de la zona de Xalapa, Veracruz fueron obtenidos. En la Fig. 5 se puede observar la presencia de un locus con tres alelos: A, B y C en MDH representados por los seis genotipos AA, BB, CC (homócigos) y AB, AC, BC (heterócigos) de este locus. En todos los sitios HK solo se presentó un locus con un alelo (F).

Las frecuencias alélicas en MDH al T1 se muestran en la Tabla 6 estos resultados indican que el alelo A fué el menos común en la mayoría de los apiarios, los valores van de 0.115 a 0.294, excepto en el apiario 3 donde el alelo B fué el menos común con una frecuencia de 0.207. De manera opuesta, el alelo C es el que se presentó con las frecuencias más altas con valores de 0.353 a 0.553 en la mayoría de los apiarios a excepción del apiario 6 donde el alelo B fué el mas común (frecuencia=0.468). Por último el alelo B se presenta en frecuencias intermedias de 0.292 a 0.331 en comparación con los alelos A y C excepto en los apiarios 3 y 6 como se mencionó anteriormente. Esta Tabla también nos muestra las frecuencias genotípicas, donde lo más importante de destacar es la ausencia del genotipo AA en los apiarios 4 y 6, una baja frecuencia en los apiarios 1,2 y 5, siendo en el apiario 3 donde este genotipo fué más frecuente (frecuencia= 0.096).

Para el tiempo 2, el alelo A fué el menos frecuente en los apiarios 2 y 6 (frecuencia= 0.184 y 0.216 respectivamente) , no así en el apiario 3 donde el alelo menos frecuente fué el B

(frecuencia= 0.115). El alelo C tuvo las frecuencias más altas en todos los apiarios con valores de 0.492 a 0.503. Por último, el alelo B se mantuvo en frecuencias intermedias entre los alelos A y C sólo en los apiarios 2 y 6.

El genotipo AA para el T2 no se observó en el apiario 6, mientras que en los apiarios 2 y 3 disminuyó su frecuencia con respecto al tiempo 1.

Los resultados de la Tabla 8 muestran que no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) en las frecuencias alélicas entre los seis apiarios en noviembre de 1988. Para mayo-julio de 1989 (Tabla 9) el alelo B se presenta en frecuencias significativamente diferentes ($P < 0.05$) entre los apiarios La Joya, Tamarindo y Cerro Gordo. Una prueba de comparación múltiple muestra a Cerro Gordo como el apiario significativamente diferente para el alelo B con respecto a La Joya y Tamarindo.

Por otro lado al analizar las frecuencias alélicas de los apiarios tomando como factor al tiempo tenemos que los sitios de Tamarindo (Tabla 10) y Cerro Gordo (Tabla 11) no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$), mientras que en el apiario La Joya (Tabla 12) la frecuencia del alelo B cambia con el tiempo de manera estadística ($P < 0.05$).

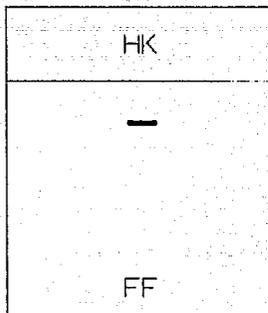
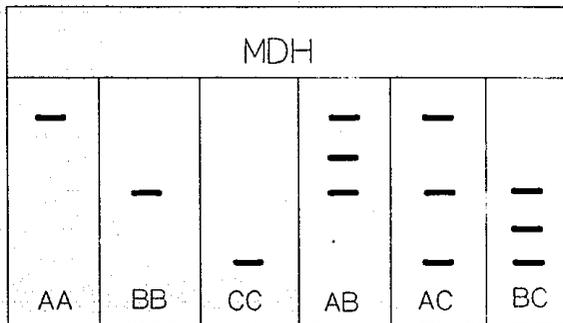


Figura 5.- Patrón electroforético de MDH y HK en *Apis mellifera*

Tabla 6.- Frecuencias genotípicas y alélicas de MDH al tiempo 1 (noviembre, 1988) para cada uno de los apiarios, donde los números entre parentesis representan la desviación estandar. El número de apiario corresponde a los denominados en la tabla 3.

APIARIO	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS OBS.						FRECUENCIAS ALELICAS			No. Colonias	No. abejas
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C		
1	0.010	0.074	0.138	0.148	0.308	0.319	0.115 (0.113)	0.331 (0.152)	0.553 (0.200)	10	94
2	0.020	0.166	0.166	0.093	0.229	0.322	0.190 (0.119)	0.292 (0.259)	0.518 (0.213)	10	96
3	0.096	0.118	0.268	0.021	0.258	0.236	0.294 (0.240)	0.207 (0.179)	0.500 (0.218)	10	93
4	0.000	0.240	0.253	0.060	0.228	0.216	0.233 (0.148)	0.305 (0.129)	0.461 (0.179)	10	83
5	0.043	0.043	0.260	0.152	0.304	0.195	0.196 (0.171)	0.308 (0.266)	0.496 (0.221)	10	92
6	0.000	0.146	0.231	0.256	0.207	0.158	0.179 (0.170)	0.468 (0.254)	0.353 (0.203)	10	82

Tabla 7.- Frecuencias genotípicas y alélicas de MDH al tiempo 2 (mayo-julio, 1989) de los apiarios Tamarindo (2), Cerro Gordo (3) y La Joya (6) donde los números entre paréntesis representan la desviación estandar.

APIARIO	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS OBS.						FRECUENCIAS ALELICAS			No. Colonias	No. abejas
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C		
2	0.016	0.137	0.193	0.080	0.322	0.250	0.184 (0.164)	0.313 (0.192)	0.503 (0.227)	12	124
3	0.067	0.061	0.413	0.000	0.141	0.314	0.300 (0.179)	0.115 (0.129)	0.585 (0.186)	15	162
6	0.000	0.259	0.185	0.059	0.237	0.259	0.216 (0.182)	0.291 (0.156)	0.492 (0.269)	15	135

Tabla 8.- Análisis de varianza de las frecuencias alélicas (A, B, C) de MDH en Apis mellifera para los seis apiarios al tiempo 1 (noviembre, 1988).

ALELO	F. VARIANZA	S.C	G.L	F	P
A	APIARIO	0.20799	5,54	1.33709	0.263
B	APIARIO	0.48297	5,54	1.67131	0.157
C	APIARIO	0.34613	5,54	1.09827	0.372

Tabla 9.- Análisis de varianza de las frecuencias alélicas (A,B y C) de MDH en Apis mellifera para los apiarios Tamarindo, Cerro Gordo y La Joya en el tiempo 2 (mayo-julio, 1989). (*d.s. a $P < 0.05$)

ALELO	F. VARIANZA	S.C	G.L	F	P
A	APIARIO	0.11173	2,39	1.61215	0.212
B	APIARIO	0.37340	2,39	6.20041	*0.005
C	APIARIO	0.09536	2,39	0.60719	0.550

Tabla 10.- Análisis de varianza de las frecuencias alélicas (A,B y C) de MDH en Apis mellifera en el tiempo 1 (noviembre, 1988) y 2 (mayo-julio, 1989) para el apiario 2 (Tamarindo).

ALELO	F. VARIANZA	S.C	G.L	F	P
A	TIEMPO	0.000	1,20	0.004	0.952
B	TIEMPO	0.002	1,20	0.027	0.871
C	TIEMPO	0.002	1,20	0.025	0.876

Tabla 11 .- Análisis de varianza de las frecuencias alélicas (A,B y C) de MDH en Apis mellifera en el tiempo 1 (noviembre, 1988) y 2 (mayo-julio, 1989) para el apiario 3 (Cerro Gordo).

ALELO	F. VARIANZA	S.C	G.L	F	P
A	TIEMPO	0.000	1,23	0.000	0.992
B	TIEMPO	0.055	1,23	2.232	0.149
C	TIEMPO	0.066	1,23	1.109	0.303

Tabla 12.- Análisis de varianza de las frecuencias alélicas (A,B y C) de MDH en Apis mellifera en el tiempo 1 (noviembre, 1988) y 2 (mayo-julio, 1989) para el apiario 6 (La Joya). (*d.s a $P < 0.05$)

ALELO	F. VARIANZA	S.C	G.L	F	P
A	TIEMPO	0.009	1,23	0.273	0.606
B	TIEMPO	0.275	1,23	4.796	*0.039
C	TIEMPO	0.183	1,23	2.152	0.156

- Resultados de Variación genética y equilibrios en Hardy-Weinberg

Los resultados de la prueba heterogeneidad de varianzas de las frecuencias alélicas de Workman y Niswander (1970) muestran diferencias significativas en ambos tiempos con valores de $X^2=984.30$, $df=10$, $P < 0.05$ en el tiempo 1 y $X^2=210.66$, $df=4$, $P < 0.05$ en el tiempo 2, lo que indica una cierta estructuración de los apiarios de Xalapa.

Las pruebas de Ji-cuadrada para los equilibrios de Hardy-Weinberg de MDH en cada uno de los apiarios en ambos tiempos dados en Tabla 13, tenemos que en el tiempo 1 los apiarios 4, 5, y 6 se presentan fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$), mientras que en el tiempo 2 únicamente el apiario 6 está fuera del equilibrio ($P=0.004$).

En esta misma Tabla se encuentran los valores de los índices de fijación para MDH donde se observa que al T1 en los apiarios 1, 2, 5 y 6 hay un exceso de homócigos, mientras que en los apiarios 3 y 4 se presenta un exceso de heterócigos. Para T2 en los tres apiarios (2,3 y 6) son negativos lo que nos indica un exceso de heterócigos. Sin embargo, los valores de Ji-cuadrada para los índices de fijación son estadísticamente no significativos ($P < 0.05$) en ambos tiempos, esto como resultado de que en los apiarios algunos genotipos están subrepresentados y otros se encuentran en exceso, tal como lo indican los valores de Ji-cuadrada (Tabla 13)

donde al agrupar a los individuos heterócigos en una sola clase unicamente el apiario de La Joya (6) en el tiempo 2 fué significativo debido principalmente a que el genotipo homócigo AA esta subrepresentado con respecto a lo esperado en Hardy-Weinberg.

Las pruebas de similitud y distancia genética de Nei (1978) dados en la Tabla 14 muestran de manera general que los apiarios son genéticamente muy similares con similitudes entre 0.9 y 1.0, en donde los apiarios 2, 4, y 5 son idénticos entre si (distancia genética de 0.00 y por lo tanto similitud genética de 1.00), siendo los apiarios 3 y 6 los más diferentes entre si (distancia genética de 0.096 y similitud genética de 0.908).

Estos resultados se ven representados en el dendrograma de similitud genética de Nei (1978) (Fig. 6) en el que se muestra que los apiarios Tamarindo, El Lencero y Conafrut forman un sólo grupo el cual está muy cercano al apiario Soledad de Doblado le sigue el apiario Cerro Gordo en diferenciación y por último La Joya que se muestra como el apiario más diferente del resto de los apiarios.

Los resultados similitud y distancia genética en el tiempo 2 (Tabla 15) muestran que el apiario 2 y 6 presentan una similitud genética de 1.00 (Tabla 15) mientras que el apiario 3 presenta una similitud de 0.929 y 0.932 entre los apiarios 2 y 6 respectivamente.

En el dendrograma de similitud genética (Fig. 7) el apiario Cerro Gordo sigue presentándose como un sitio más diferenciado genéticamente de Tamarindo y La Joya.

Los estadísticos F de Wright (1978) para MDH en los dos tiempos (Tabla 16 y 17) se presentaron de la siguiente manera: para el T1, FIS fué de 0.017 mientras que para el T2 este índice se torna negativo (-0.089), esta misma tendencia la muestra FIT el cual en el T1 es de 0.033 y para el T2 es de -0.063, por otro lado FST se presenta muy similar en los dos tiempos con un valor de 0.016 al T1 y de 0.024 en el T2. Al realizar las pruebas de Ji-cuadrada para cada uno de los estadísticos, FIS y FIT no fueron significativamente diferentes de cero ($P > 0.05$) en ninguno de los dos tiempos, únicamente FST fué significativa ($P < 0.05$) para cada tiempo.

Tabla 13.- Análisis de Ji-cuadrada de los equilibrios de Hardy-Weinberg e índices de fijación (F) para cada uno de los apiarios al T1 (noviembre, 1988) y T2 (mayo-junio, 1989) (*d.s. a P< 0.05). El número de apiario corresponde a los denominados en la tabla 3. (N= no. de abejas)

APIARIO	N	TIEMPO	No. IND/GENOTIPO						X ² (H-W)	P	**X ² (H-W)	P	F	X ² (F)	P
			AA	AB	AC	BB	BC	CC							
1	94	T1	1	7	13	14	29	30	2.346	N.S.	1.642	N.S.	0.095	1.696	N.S.
	--	T2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	96	T1	2	16	16	9	22	31	6.684	N.S.	1.921	N.S.	0.076	1.108	N.S.
	124	T2	2	17	24	10	40	31	2.008	N.S.	1.747	N.S.	-0.066	1.080	N.S.
3	93	T1	9	11	25	2	24	22	2.433	N.S.	1.388	N.S.	-0.038	0.268	N.S.
	162	T2	11	10	67	0	23	51	5.010	N.S.	4.966	N.S.	-0.132	5.645	N.S.
4	83	T1	0	20	21	5	19	18	11.465	*0.009	6.612	N.S.	-0.126	2.635	N.S.
	--	T2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
5	92	T1	4	4	24	14	28	18	10.202	*0.017	2.372	N.S.	0.029	0.154	N.S.
	--	T2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	82	T1	0	12	19	21	17	13	13.475	*0.004	5.437	N.S.	0.077	0.972	N.S.
	135	T2	0	35	25	8	32	35	25.610	*0.000	9.791	*<0.05	-0.073	1.438	N.S.

X²(H-W)=(O-E)²/E con g.l.= k(k-1)/2 donde k=número de alelos (Hedrick, 1983)

F= 1-H/2pq

X²F= F²N (k-1) con g.l.= k(k-1)/2 donde k=número de alelos (Hedrick, 1983)

** Para esta prueba fueron agrupados los individuos heterocigos (AB,AC,BC) en una sola categoría.

Tabla 14.- Matriz de distancia y similitud genética para el locus MDH en *Apis mellifera* de los seis apiarios al tiempo 1 (noviembre, 1988) donde arriba de la diagonal se muestran los valores de distancia genética y abajo de la diagonal los valores de identidad genética de Nei (1978).

APIARIO	1	2	3	4	5	6
1 SOL. DE DOBLADO	—	.001	.053	.021	.003	.041
2 TAMARINDO	.999	—	.015	.000	.000	.045
3 CEPRO GORDO	.948	.986	—	.005	.022	.096
4 EL LENCERO	.979	1.000	.995	—	.000	.030
5 CONAFRUT	.997	1.000	.978	1.000	—	.020
6 LA JOYA	.959	.956	.908	.971	.981	—

Tabla 15.- Matriz de distancia y similitud genética para el locus MDH en *Apis mellifera* de los apiarios Tamarindo, Cerro Gordo y La Joya al T2 (mayo-julio, 1989) donde arriba de la diagonal se muestran los valores de distancia genética y abajo de la diagonal los valores de identidad genética de Nei (1978).

APIARIO	2	3	6
2 TAMARINDO	—	.073	.000
3 CERRO GORDO	.929	—	.070
6 LA JOYA	1.000	.932	—

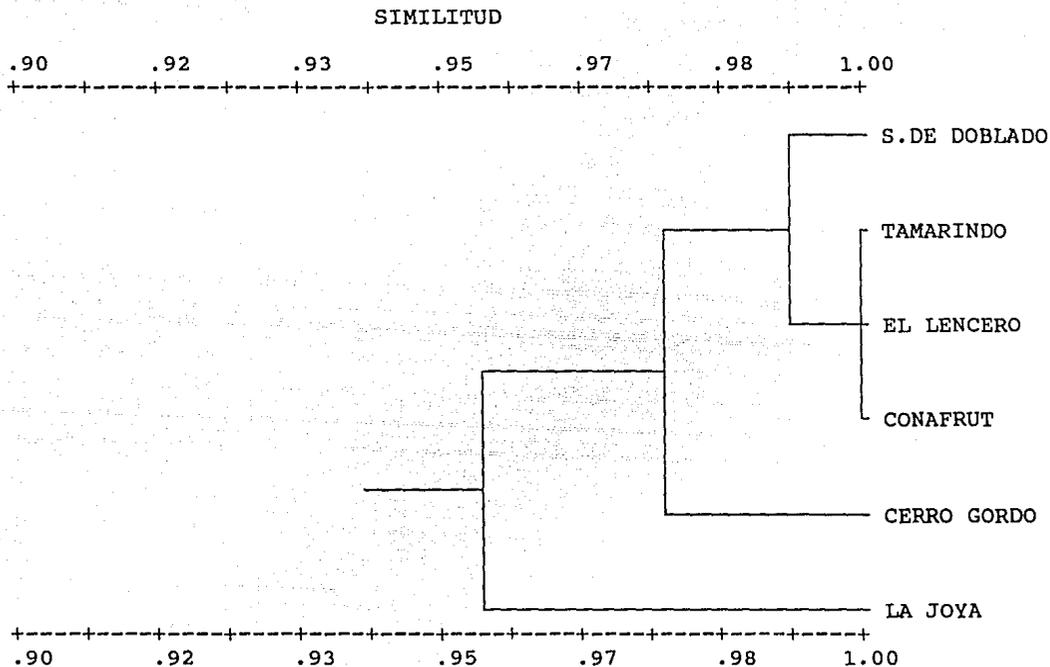


Figura 6 .- Dendrograma de similitud genética (Nei, 1978) de los apiarios analizados en el tiempo 1 (noviembre, 1988), de acuerdo a los valores dados en la matriz de similitud y distancia genética (Tabla 14).

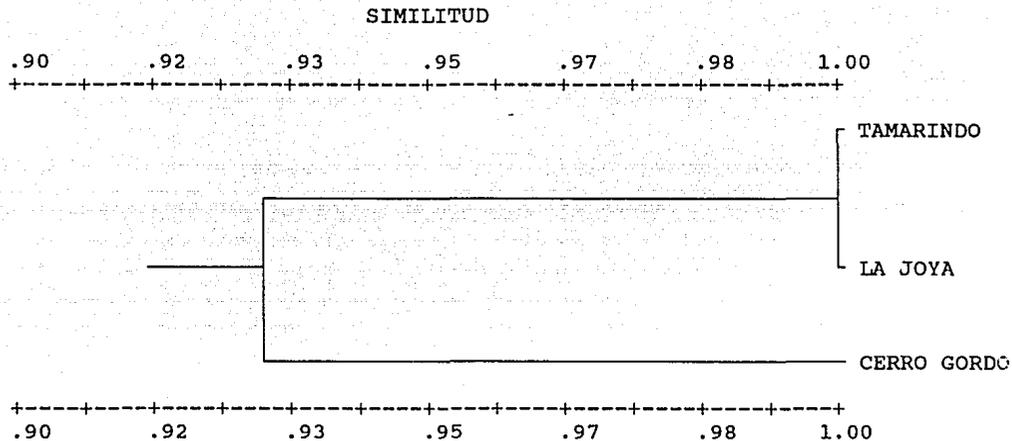


Figura 7.- Dendrograma de similitud genética (Nei, 1978) de los apiarios analizados en el tiempo 2 (mayo-julio, 1989), de acuerdo a los valores dados en la matriz de similitud y distancia genética (Tabla 15).

Tabla 16.- Estadísticos F de Wrigth (1978) para MDH en Apis mellifera al tiempo 1 (noviembre, 1988), así como los análisis de Ji-cuadrada para cada uno de los estadísticos (*ds a $P < 0.05$).

	T1	X'	GL	P
FIS	0.017	0.312	3	N.S
FIT	0.033	1.176	3	N.S
FST	0.016	34.560	10	* < 0.05

Tabla 17.- Estadísticos F de Wrigth (1978) para MDH en Apis mellifera al tiempo 2 (mayo-julio, 1989), así como los análisis de Ji-cuadrada para cada uno de los estadísticos (*ds a $P < 0.05$).

	T2	X ²	GL	P
FIS	-0.089	6.669	3	N.S
FIT	-0.063	3.341	3	N.S
FST	0.024	40.416	4	* < 0.05

6. DISCUSION

6.1 Proceso de africanización.

En esta parte del capítulo sólo serán discutidos los resultados encontrados en los apiarios Cerro Gordo, La Joya y Tamarindo debido a que estos sitios fueron muestreados en dos ocasiones.

Los frecuencias alélicas y genotípicas que encontramos para las enzimas MDH y HK en las abejas de los apiarios de Xalapa se presentan en un patrón semejante al de poblaciones de origen europeo de otras regiones de México y en general del Continente Americano.

En los numerosos estudios realizados encontramos que uno de los resultados más consistentes en las poblaciones de abejas europeas es que en MDH, el alelo C es el más común, mientras que para HK el alelo F se presenta en frecuencias muy altas, donde generalmente este alelo se encuentra en forma homóciga (Sylvester, 1976; Contel et al, 1977; Spivak, 1988; Del Lama et al., 1988; entre otros).

En este trabajo encontramos que para MDH el alelo C se presentó en frecuencias de 0.35 a 0.51 en el tiempo 1 y 0.49 a 0.58 en el tiempo 2. Por otro lado, las frecuencias en el alelo A se presentaron bajas, de 0.179 a 0.294 al tiempo 1 y de 0.184 a 0.300 en el tiempo 2, caracterizándose como el alelo menos frecuente en las abejas de Xalapa.

En otras regiones de México como Veracruz, Chiapas y la zona del Istmo, el alelo C se presentan en frecuencias un poco mayores

a las encontradas en las abejas de la zona de Xalapa, con valores de de 0.54 a 0.72 (Taylor, com. per. y Spivak, 1988).

Estos valores difieren significativamente de colonias silvestres africanizadas de dos zonas de Veracruz y una zona de Oaxaca, donde el alelo A con frecuencias de 0.7 a 0.85 es el más representado en este tipo de abejas (Labougle, Taylor y Mancera, 1989; Brizuela en prep.).

Nunamaker et al. (1984) determinan las frecuencias genotípicas y alelicas de MDH en algunas colonias europeas de Mexico, encontrando la presencia de individuos homócigos para el alelo A. Estos autores proponen que la presencia del alelo A en forma homóciga de cualquier población de abejas mieleras es debido a un ancestro africano y por lo tanto también determina la dispersión de los genes africanos. La presencia del genotipo AA en colonias de abejas de México, antes del arribo de los primero enjambres de abejas africanizadas en 1986, es explicado por la exportación de abejas africanas (Morse, 1982 en Nunamaker et al., 1984). Sin embargo no es claro porqué los genes africanos no se desplazaron o predominaron en las abejas europeas de México de la misma forma como sucedió en Brasil. Esta suposición parece interesante sin embargo no se tienen los datos necesarios que permitan sustentarla dado que en la mayoría de los trabajos realizados con MDH no se reportan las frecuencias genotípicas que apoyen la hipótesis. La presencia del genotipo AA podría ser el resultado del apareamiento al azar de individuos con el alelo A.

Orley Taylor a principios de 1988 (com. pers.) determina las frecuencias en MDH-1 para las abejas de origen europeo en la zona de Xalapa donde el alelo C presenta una frecuencia de 0.665, el alelo B con la frecuencia más baja (0.115) y por último el alelo A con frecuencia de 0.22, encontrándose en estas abejas el genotipo AA con una frecuencia de 0.04. Estos resultados son importantes ya que determinan el patrón de MDH de abejas europeas de esta zona.

Las frecuencias de cada uno de los alelos entre los apiarios de Xalapa, en el tiempo 1, no fueron significativamente diferentes, por lo que no se puede afirmar que haya un proceso de africanización claro. Sin embargo, las características genéticas y de comportamiento observadas en el tiempo 1 y 2 en el apiario Cerro Gordo donde la mayor frecuencia del alelo A (0.294) así como una mayor frecuencia del genotipo AA de 0.096 se presentó en este sitio probablemente sugiera de que este apiario algunas colonias ya presentan un cierto grado de africanización. Esta hipótesis puede estar apoyada en el hecho de que al momento en que se realizó el muestro, las abejas africanizadas ya habían llegado a la zona de Xalapa. Así mismo, el comportamiento de las abejas en Cerro Gordo fué notablemente agresiva considerado como una característica constante de colonias de abejas africanizadas. Para el tiempo 2, a pesar de que la frecuencia del alelo A fué de 0.3 este incremento no fué significativo con respecto al tiempo 1 donde el genotipo AA se presentó con una frecuencia menor de 0.067 lo cual puede ser explicado como consecuencia de que algunas colonias que se muestrearon en el tiempo 1 no fueron muestreadas en el tiempo 2 y

por lo tanto los resultados en las frecuencias de este alelo no sean muy claros con respecto al inicio de un proceso africanización en este apiario, sin embargo la agresividad en las abejas de este apiario fué más notable.

Otra característica interesante encontrada en este apiario es que la variación del alelo B en el tiempo 2 es significativamente diferente con respecto a los apiarios de La Joya y Tamarindo ($P < 0.05$). El alelo B fué el de menos frecuente en Cerro Gordo en los dos tiempos (0.207 al tiempo 1 y de 0.115 al tiempo 2). Varias preguntas surgen con respecto a los cambios en el alelo B con referencia a si existe alguna selección en contra que tienda a su eliminación en este sitio, el cual sea dado por las características del ambiente o si hay alguna relación con respecto a la africanización con el cual este alelo sea seleccionado en contra. Las repuestas a estas preguntas sólo pueden ser contestadas si se realiza un seguimiento en el cambio de las frecuencias de esta enzima durante más tiempo que involucre el estudio de un mayor número de generaciones.

Los mecanismos que se han sugeridos para explicar los procesos de africanización de colmenas, una vez que las colonias silvestres africanizadas llegan y se establecen en determinado sitio (Rinderer et al., 1985; Taylor, 1985; Rinderer, 1985 (b)) se explican con base en:

- a) Apareamiento de reinas europeas predominantemente con zánganos africanizados.

- b) Invasión de colonias africanizadas en colmenas vacías o *débiles.
- c) Parasitismo de reinas africanizadas en colmenas *débiles.
- d) Parasitismo de zánganos africanizados en colmenas *débiles.

Los resultados encontrados en el apiario de La Joya (6) donde la frecuencia del alelo A fué más baja respecto a la encontrada en la zona de Xalapa antes de la llegada de la abeja africanizada, además el genotipo AA no se presenta en este apiario, lo cual podría ser atribuido a que el tamaño de la muestra es pequeño. Sin embargo para el tiempo 2 donde el tamaño de muestra es notablemente aumentado y a pesar de que hubo un incremento no significativo del alelo A, el genotipo AA permaneció con una frecuencia de cero.

* se considera una colmena o colonia debil cuando el número de individuos es pequeño.

Contrario a las características de agresividad de las abejas de Cerro Gordo, las abejas de la Joya (6) fueron sumamente pasivas en los dos tiempos, lo que sugiere que en este sitio no se presentan inicios de una africanización de sus abejas. La Joya se encuentra localizado a la altitud mayor (1950 msnm), lo que probablemente determine que no se haya iniciado la africanización en este sitio; dos posibles hipótesis son establecidas para explicar este hecho:

1) Que el desplazamiento de las abejas africanizadas no haya alcanzado la zona donde se localiza el apiario para ese tiempo por lo que las abejas aun se mantienen con las características europeas.

2) Que factores climáticos, principalmente temperatura aunado a la limitación de recursos, sean los que estan actuando para que no se establezcan colonias silvestres africanizadas y por lo tanto puedan mantenerse apiarios con características europeas.

Esta última hipótesis se basa en la información que existe sobre la capacidad que tienen las colonias africanizadas para invadir zonas templadas y subtropicales (Taylor y Spivak, 1984; Villa, 1986; Spivak, 1986). Los resultados encontrados en estos trabajos muestran que las abejas africanizadas no son capaces de alcanzar zonas altas teniendo como principal barrera climática la temperatura y con la baja disponibilidad de recursos.

El poco éxito de las abejas africanizadas a invadir zonas templadas, es explicado con base en sus características biológicas, principalmente a su escasa capacidad de hibernación el cual es atribuido a: 1) pequeño tamaño de las colonias, 2) cantidad limitada de miel, 3) tasa metabólica más alta de las obreras y por lo tanto mayor consumo de miel aunado a 4) limitada disponibilidad de recursos (néctar y polen) además de adecuadas temperaturas para pecorear en los meses fríos y 5) limitada capacidad para agruparse durante la época fría (Villa, 1987; Taylor y Spivak, 1984). Entonces es posible que en este tipo de zonas puedan mantenerse poblaciones de abejas europeas debido a que las colonias de abejas africanas mueran o migren hacia zonas más cálidas (Taylor, 1985)

Respecto a los cambios en el tiempo de las frecuencias alélicas sólo fueron observadas en el apiario de La Joya donde el alelo B se presenta en frecuencias muy diferentes en el tiempo 2 con respecto al tiempo 1 ($P < 0.05$). Esta variación del alelo B puede ser atribuido al cambio en la composición genética de reinas y/o zanganos entre los dos tiempos.

Con respecto al apiario 2 (Tamarindo), las frecuencia del alelo A así como del genotipo AA en el tiempo 1 es inferior a las encontradas en esta zona antes de la llegada de la abeja africanizada. Para el tiempo 2, la frecuencia del alelo A disminuye con respecto al tiempo 1, sin embargo esta disminución no es significativa en contraposición a la disminución en la frecuencia

del alelo A, un aumento en la frecuencia del genotipo AA fué encontrado. Es posible que para el tiempo 1 este apiario ya presentaba un grado de africanización por las razones mencionadas anteriormente sólo que este pudiera estar enmascarado pues sólo se tomaron 10 colmenas, por lo que debido al azar fueran muestreadas las colmenas no africanizadas sin embargo para el tiempo 2 un incremento en el genotipo AA, parece apoyar esta suposición. La conducta de estas abejas fué agresiva aunque esta agresividad no fué tan marcada como en las abejas de Cerro Gordo.

En relación a los resultados encontrados con HK-1, donde el alelo F se presenta en frecuencias muy altas (0.8 - 1.00) en las abejas europeas siendo el alelo S poco frecuente en estas poblaciones, mientras en las poblaciones de abejas africanizadas los alelos F y S están similarmente representados (Del Lama et al., 1988; Spivak, 1988; Labougle et al., 1989). Los resultados encontrados con HK-1 en los apiarios de La Joya, Cerro Gordo y Tamarindo, esta enzima se presentó fija para el alelo F del mismo modo en que fué establecido en Xalapa zona en enero de 1988 antes del arribo de las colonias africanizadas (Taylor, com. pers.). Es difícil establecer porque la ausencia del alelo S en los apiarios de Tamarindo y Cerro Gordo, donde se sugiere un cierto grado de africanización, sin embargo una posible explicación pueden ser los problemas de corrimiento con esta enzima donde los artificios de teñido (Spivak, 1988; Lobo et al.) pudieran estar enmascarando la presencia de Hk-S.

Otra explicación es que los cambios en esta enzima no sean expresados al inicio de la hibridización, como resultado de que, por azar, zánganos africanizados con el Hk-F se hayan apareado con las reinas europeas, por lo que sólo este alelo se presente en las abejas de estos apiarios. Sin embargo no se conocen trabajos con esta enzima en colonias europeas durante el proceso de hibridización, que pudieran apoyar esta hipótesis.

Con los resultados obtenidos, en particular los de Cerro Gordo, no es posible determinar que factores están influyendo en el proceso de africanización. Sin embargo, algunas hipótesis pueden ser sugeridas con respecto a la influencia de un microambiente, de clima, de recursos, depredadores, corredores etc., el cual sea percibido por las abejas africanizadas y seleccionado como un sitio preferente para su establecimiento.

Es necesario un replanteamiento del trabajo para poder resolver los problemas encontrados en este estudio, que son los siguientes:

- 1 - Establecimiento de las frecuencias génicas y genotípicas de HK y MDH en las colonias (obreras y zánganos) de cada sitio antes de la llegada de la abeja africanizada, y así establecer los cambios en las frecuencias en estas enzimas con el arribo de la colonias africanizadas.

2 - Caracterizar los sitios con base en la abundancia de recursos, así como de factores climáticos que determinen si estos factores son importantes para que sean seleccionados por la colonias de abejas africanizadas.

3 - Determinar el tipo de herencia de MDH y HK por medio de cruzas experimentales con genotipos conocidos, y cruzas experimentales de abejas africanas con abejas europeas, para saber como se estan segregando los alelos de estas enzimas en ambas poblaciones.

4 - Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de las colonias silvestres (enjambres) que arriben en cada sitio, así como determinar su abundancia relativa, que probablemente determine que los procesos de africanización sean más o menos rápidas en determinadas zonas.

Este trabajo involucra un seguimiento a través por un periodo mínimo de 3-5 años, tiempo necesario para que ocurra una completa africanización en apiarios (Winston y Katz, 1981).

6.2 Endogamia y Estructura genética de poblaciones de Apis mellifera L.

Los datos enzimáticos obtenidos en este estudio nos permiten hacer un análisis preliminar del grado de endogamia y estructura genética de poblaciones de Apis mellifera.

a) Equilibrios en Hardy-Weinberg e Índices de Fijación F

Los comparación de las frecuencias observadas con las esperadas por la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg indican que la abejas de Xalapa no son panmíticas completamente, es decir que los apareamientos de las abejas no son al azar. Los apiarios de El Lencero (4), Conafrut (5) en el tiempo 1 y La Joya (6) en ambos tiempos se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, los índices de fijación no fueron significativos para algunos de los sitios estudiados. Esto es explicado porque algunos genotipos heterocigos se encuentran sobrerrepresentados y otros subrepresentados en un mismo apiario. De tal manera que la diferencia con los valores esperados se anulan lo que determina que los valores de F son muy pequeños y estadísticamente no significativos. Generalmente la sobrerrepresentación de los heterocigos se explica por selección natural. La subrepresentación, por otro lado, se explica por endogamia, deriva génica, selección natural en favor de los individuos homocigos o por el efecto Wahlund. Pero al tener , como en nuestro caso, tres tipos

diferentes de heterócigos, se sugiere que más bien podría estar actuando algún tipo de selección natural a favor de algunos de los heterócigos y en contra de otros. Sin embargo para poder observar efectos de selección natural es necesario un diseño específico de trabajo que involucre un mayor número de loci enzimáticos polimórficos, con tamaños de muestra más grandes, así como un mayor número de generaciones.

b) Estructura genética

Los resultados de la estructura genética de las poblaciones de A. mellifera, a través de las distancias genéticas de Nei y los estadísticos de Wright indican que existe poca diferenciación entre los apiarios de Xalapa.

Uno puede pensar que los efectos de deriva génica y la endogamia son dos de las principales factores que determinan la estructura genética en las poblaciones de Apis mellifera como consecuencia de la estructura social que presentan este tipo de abejas así como su sistema de reproducción haplodiploide.

Badino et al. (1983), encuentra poca variación para MDH-1 en poblaciones de A. m. ligustica en una región de Italia. Este autor sugiere que el flujo génico en la fuerza principal que determina que los apiarios sean muy homogéneos y que la poca diferenciación es atribuida a la localización de los apiarios el cual reduce en cierto grado la migración de las abejas.

Seeley (1985) estima un tamaño efectivo de la población grande en abejas mieleras de 240-480 individuos como consecuencia de su sistema reproductivo lo cual disminuye los efectos de deriva génica así mismo apoya la idea de que el flujo genético en las abejas es alto.

De manera similar a los resultados encontrados en el trabajo de Badino et. al. (1983, las distancias y similitudes genéticas (Nei, 1978) encontradas en este estudio indican que los apiarios en los dos tiempos presentan poca diferenciación, donde la mayor distancia para el tiempo 1 e encontró entre el apiario de Cerro Gordo (3) y La Joya (6) (distancia genética = 0.096), mientras que en el resto de los apiarios las distancias genéticas fueron más pequeñas en un rango de 0.000-0.053. Para el tiempo 2, estas distancias genéticas cambian muy poco, sin embargo Cerro Gordo sigue manteniéndose diferente con respecto a la Joya y Tamarindo (distancia genética=0.07). Esta poca diferenciación de los apiarios podría explicarse como consecuencia de que el flujo de genes no se este dando con la misma intensidad hacia todos los apiarios debido principalmente a las distancias geográficas así como cierto grado de hibridización con colonias africanizadas que se ha sugerido en el apiario de Cerro Gordo.

Esta suposición parece estar apoyada por los valores de FST (0.016 al tiempo 1 y 0.024 al tiempo 2) que sugieren que el flujo génico en los apiarios es alto. La características del tipo de reproducción de las abejas, parecen apoyar esta sugerencia. Las abejas presentan una estructura social dentro de una colonia

(colmena) en la que se da la existencia de castas dada por la reina (cuya función es la reproducción) y las obreras (hembras estériles) que se encargan del mantenimiento de una colonia en cuanto a limpieza, defensa, alimentación de la cría, aprovisionamiento de recursos , etc. (Free, 1982; Michener, 1974). En una colonia de abejas aproximadamente el 95% de la progenie de una reina son obreras y el 5% restante son individuos reproductivos (reinas y zánganos) (Seeley, 1985). De este modo el flujo de genes puede darse por medio de dos procesos: (1) reemplazamiento y multiplicación de los miembros de una colonia cuando la transmisión de genes a una nueva generación reproductiva ocurre a través del apareamiento de la reina con los zánganos o cuando una reina vieja es remplazada y (2) multiplicación de la colonia a través de enjambrazón cuando la reina vieja y 1 o más reinas jóvenes cada una funda una nueva colonia con una parte de las obreras de la colonia vieja (Koeniger, 1986).

El sistema reproductivo de las abejas se lleva a cabo por el apareamiento de reinas y zánganos fuera de la colonia en determinada época del año. La reina y los zánganos de una misma colonia rara vez llegan a aparearse ya que vuelan en diferentes direcciones en un rango máximo de 16 km de distancia (Peer, 1957 en Koeniger, 1986). Estos apareamientos ocurren en sitios denominados "áreas de congregación de zánganos" donde un gran número de machos de diferentes colonias y apiarios se congregan para tratar de fecundar con la reina. Cada reina se aparee con ocho a diez

zánganos en promedio, esto puede ocurrir en una sola congregación de zánganos o en diferentes congregaciones así como en un mismo día o durante un cierto periodo de tiempo dependiendo del éxito de los zánganos para copular a la reina (Winston, 1987 (b)). Durante el ciclo de vida de una reina cuya duración es de uno a dos años en promedio, es fecundada durante un sólo periodo de tiempo (de tres a cinco días aproximadamente) llamado "vuelo nupcial" regresando a la colonia para no volver a fecundarse, así mismo los zánganos sólo pueden fecundar a una sola reina ya que estos mueren después de la copula.

Por otro lado, la reproducción a través enjambres llevado a cabo por las colonias de abejas también determina la dispersión de genes. La multiplicación de una colonia es dada por la abundancia de recursos durante cierta época, si los recursos son abundantes es probable que un mayor número de enjambres se formen y por lo tanto el flujo de genes sea mayor.

De este modo la reproducción de las abejas por apareamiento de los individuos reproductivos y el proceso de enjambrazón pueden generar que el flujo genético sea alto y de como consecuencia la poca diferenciación genética de los apiarios. Otro aspecto que puede estar influenciando en la poca diferenciación de los apiarios es el manejo de éstos por el hombre, ya que comúnmente se realizan movimientos de los apiarios con fines productivos hacia zonas con mayor abundancia de recursos, los cuales incrementan el flujo

génico entre las poblaciones de abejas (Badino et al., 1983).

Los estadísticos FIS y FIT muestran que no hay dominancia de individuos homocigos o individuos heterocigos significativa, a pesar de ello se observaron variaciones que nos indican que en el tiempo 1 se presentó un ligero exceso de homocigos (FIS= 0.017 y FIT= 0.033) contrario a lo que ocurre en el tiempo 2 donde hubo un exceso de heterocigos (FIS= -0.089 y FIT= -0.063). Estas variaciones en FIS y FIT pueden estar dadas por los cambios en las colonias de abejas durante los periodos de enjambrazón y apareamientos que ocurrieron entre el tiempo 1 y tiempo 2. Los periodos de enjambrazón y apareamientos varía dependiendo de la región, pero casi siempre esta ligada con la disposición de recursos (agua, polen y nectar) en el medio, que determina que las colonias de abejas crezcan hasta llegar a una sobrepoblación y se dividan (Winston, 1987 (a); Butler, 1974). Para las abejas de Xalapa las divisiones de las colonias deben ocurrir con mayor frecuencias en los meses de noviembre, diciembre y enero, es decir, justo después del periodo de lluvias (mayo-octubre) como se observa en la Fig. 3 (García, 1988) donde la disposición de recursos es abundante y esto trae como consecuencia que las colonias se reproduzcan y por lo tanto haya cambios en su estructura genética.

7.- COMENTARIOS FINALES

El proceso de africanización de colonias de abejas europeas através de marcadores genéticos como MDH y HK involucra el estudio de un mayor número de generaciones, así como de estudios más específicos que nos permitan observar el cambio paulatino en las frecuencias de estas dos enzimas.

No obstante estas observaciones, de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos hacer los siguientes comentarios:

- La técnica de electroforesis es una herramienta importante en estudios de variación genética entre las poblaciones de abejas, que puede ser utilizada en selección de abejas con fines productivos.

- El características genéticas y de conducta del apiario de Cerro Gordo sugieren que en este sitio un proceso de africanización ya se ha iniciado.

- El apiario de La Joya cuya altitud es de 1950, es propuesto como un sitio donde no se ha iniciado un proceso de africanización por lo que se sugiere una barrera climática como uno de los principales factores que impiden el establecimiento de colonias silvestres africanizadas.

- La mayoría de los estudios de genética de poblaciones en abejas melíferas únicamente se han enfocado en el nivel de la búsqueda de variación genética, sin embargo no existen estudios

acerca de el uso de marcadores enzimáticos que nos permitan determinar la estructura genética de este tipo de poblaciones y su relación con los posibles factores ecológicos y evolutivos que determinan dicha estructura.

8. APENDICE 1

TABLA A

SISTEMA MORFOLINA pH = 8.0

Solución amortiguadora para electrodos

Ac. cítrico (monohidratado) _____ 8.4 gr.

Aforar a 1 lt. (ajustar con morfolina).

Solución amortiguadora para gel

solución 1/25 del buffer para electrodos con agua
destilada.

200 volts - 5 hrs.

TABLA B

SISTEMA HISTIDINA pH = 7.0

Solución amortiguadora para electrodos

Ac. cítrico (monohidratado) _____ 9.04 gr.

Tris- HCl _____ 16.35 gr.

Aforar a 1 lt. con agua destilada

Solución amortiguadora para gel

DL-Histidina _____ 1.05 gr.

Aforar a 1 lt. con agua destilada, ajustar con NaOH

40 mA - 3 hrs.

TABLA C

MDH

0.2 M Tris-HCl _____ 75 ml.
 2 M DL- Malato _____ 20 ml.
 1% NAD _____ 10 ml.
 1% MTT _____ 5 ml.

colocar 5 ml. de solución en cada frasco

justo antes de teñir

1% PMS _____ 2 gotas

TABLA D

HK

0.1 M Tris-HCl pH = 7.0 - 7.5 _____ 85 ml.
 Alfa-D Glucosa _____ 1 gr.
 1 M MgCl₂ _____ 10 ml.
 ATP _____ 0.1 gr.
 1% NADP _____ 5 ml.
 1% MTT _____ 5 ml.

colocar 5 ml. de solución en cada frasco

justo antes de teñir

1% PMS _____ 2 gotas

Glucosa 6-PO₄ _____ 5 gotas

Para medir la variación genética en las poblaciones de Apis mellifera L. se utilizaron las siguientes medidas: índices de fijación F , distancias de similitud genéticas de Nei y estadísticos F de Wright, así como también fueron determinados los equilibrios en Hardy-Weinberg para cada uno de los apiarios (Equiarte, 1990, Pérez 1990) los cuales son descritos a continuación:

1) Equilibrios de Hardy-Weinberg

Esta medida predice la relación de las frecuencias alélicas y genotípicas en ausencia de cualquier fuerza evolutiva (migración, deriva génica, selección natural, mutación y endogamia), así, en el caso de un locus con dos alelos (A y a) tenemos que:

$$D=p^2$$

$$H=2pq \quad \text{donde } p=D+1/2H$$

$$R=q^2 \quad \quad \quad q=R+1/2H$$

donde D es igual a la frecuencia de los homócigos AA , H la frecuencia de las heterócigos Aa y R la de los homócigos aa , siendo p la frecuencia del alelo A y q la frecuencia del alelo a , considerando también que $D+H+R= 1$ y $p+q=1$. De tal modo que si una población estuviera sujeta a alguna fuerza evolutiva, esta afectaría la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg. Para determinar

si las poblaciones se encuentran o no en equilibrio es a través de la prueba $\chi^2 = (O - E)^2 / E$ con $K(K-1)/2$ grados de libertad donde K es el número de alelos (Hedrick, 1983).

2) Índice de Fijación F (Wright 1951, 1953):

Otra manera de visualizar si las poblaciones se encuentran o no en equilibrio es a través del índice de fijación F , el cual es definido como:

$$F = 1 - H/2pq$$

donde H es la proporción de heterocigos observados y $2pq$ como la proporción de heterocigos esperados en Hardy-Weinberg.

Este índice F tiene un valor de 0 si la población se encuentra en equilibrio o encontrarse en valores de +1 a -1, donde +1 significaría que existen únicamente individuos homocigos y -1 cuando sólo hay individuos heterocigos.

La significancia de este índice puede ser probada a través de $\chi^2 = F^2 N (K-1)$ para $K(K-1)/2$ grados de libertad donde N es el número total de la población y K número de alelos.

3) Distancias e identidades genética de Nei (1972):

La identidad genética de Nei esta expresada como:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde J_{xy} es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la población x y otro de la población y ($J_{xy} = \sum P_i^x P_i^y$) y J_x y J_y son las probabilidades de escoger un par de alelos idénticos dentro de cada población ($J_x = \sum P_i^x P_i^x$ y $J_y = \sum P_i^y P_i^y$). A partir de I se puede obtener la distancia genética de Nei D :

$$D = -\ln(I)$$

Estas identidades y distancias se obtienen para pares de poblaciones. La identidad toma valores de 0, si las dos poblaciones no comparten ningún alelo y 1 si sus frecuencias alélicas son idénticas. La distancia genética D toma valores de 0 si las poblaciones son idénticas en sus frecuencias alélicas y de infinito si estas no comparten ningún alelo.

4) Estadísticos F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) :

Los estadísticos F de Wright F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} toman en cuenta la distribución geográfica de las poblaciones y son definidas como:

A) F_{IS} (F individuo-subpoblación) que es la desviación a nivel subpoblación. Toma valores de +1 a -1 cuya expresión es

$$F_{IS} = (H_s - H_o) / H_s$$

donde H_o es la proporción de heterocigosis observada promedio dentro de una subpoblación y H_s es la proporción de heterocigosis esperada promedio a nivel subpoblación.

B) FST (F subpoblación-total) nos indica la diferenciación entre subpoblaciones. Toma valores de 0 y 1 y su expresión es:

$$FST = (H_t - H_s) / H_t$$

donde H_s es la proporción de heterocigosis esperada promedio a nivel subpoblación y H_t es la heterocigosis esperada promedio de la población total. Toma un valor de 0 si todas las subpoblaciones son idénticas en términos de variación genética y de 1 si las subpoblaciones son completamente diferentes entre sí, o sea que no comparten ningún alelo por lo que puede estar actuando flujo génico, la deriva génica y/o selección natural. Generalmente si la FST es similar en todos los loci se considera que se debe a deriva génica y entre más alto es el valor de FST, quiere decir que ha habido mayor deriva génica y menor flujo génico, y por lo tanto mayor diferenciación y divergencia entre las subpoblaciones. Si los valores cercanos a 1 son diferentes para cada loci se considera que esta actuando la selección natural.

C) FIT (F individuo-total) mide la diferenciación total debida

tanto a endogamia como a deriva génica . Se puede obtener mediante la fórmula :

$$FIT = (H_t - H_o) / H_t$$

Toma valores de +1 y -1.

Para probar la significancia de FIT y FIS se determina del mismo modo que el índice de fijación F del inciso 2 mientras que para FST la significancia esta dada por $X^2 = 2nFST$ con $(K-1) (S-1)$ grados de libertad donde N es el tamaño de la muestra, K es el número de alelos y s el número de subpoblaciones.

Técnica de Electroforesis

La electroforesis involucra un sin número de aspectos técnicos que determinan la obtención de resultados confiables para su interpretación, por lo que el cuidado de estos es importante. Uno de ellos es el mantenimiento de los organismos hasta el momento mismo de la electroforesis, el cual en este trabajo fué realizada de dos formas ya descritas anteriormente, donde las abejas fueron mantenidas vivas hasta ser congeladas a -70°C y la otra, donde las abejas fueron congeladas en hielo azul desde el momento mismo de su colecta para después ser almacenadas muertas a la misma temperatura. Los corrimientos electroforéticos indican que no hay diferencias al realizar cualquiera de los dos métodos, al menos para las enzimas MDH y HK ya que su actividad no se vió afectada. El método de mantenimiento de las abejas muertas en hielo azul resulta, en términos prácticos, más fácil que el transportar a las abejas vivas el cual involucra un mayor cuidado de éstas en cuanto a su alimentación y proveerlas de agua constantemente. Además, la colocación de éstas en los contenedores de reinas es más difícil en el campo debido al equipo protector que se utiliza durante el muestreo para evitar los picaduras de abejas.

Otro aspecto de la técnica que fué modificado en este trabajo es el tiempo de extracción de la muestra de hemolinfa, donde

algunas veces se extrajeron al mismo instante de la electroforesis y otras de 1-8 días de anticipación por el cual los corrimientos no se vieron afectados siempre y cuando las muestras se mantengan congeladas en óptimas condiciones. Esto último resulta ventajoso ya que permite optimizar el tiempo de montaje de las electroforesis y cuidar con más detalle las múltiples variables a las que está sujeta la utilización de esta técnica.

Muchos sistemas amortiguadores han sido sugeridos para el corrimiento de MDH como tris-citrato, pH=8.15; tris-HCl, pH=7.0; tris-maleato, pH=7.8; LiOH, pH=8.3 (Sheppard y Berlocher, 1985; Richardson et al., 1986; Sylvester, 1976). En este trabajo se utilizaron dos sistemas Morfolina e Histidina, siendo el primero el que permite una separación más clara de las bandas y por lo tanto disminuye el error en la lectura de los geles. En MDH fué evidente la presencia de un locus con tres alelos, como previamente fué reportado por Sylvester (1976) y Cornuet (1979).

En lo que respecta a HK con ninguno de los dos sistemas utilizados se logró una clara separación de las bandas ya que siempre se presentaron artefactos de teñido haciendo confusa la lectura en esta enzima. Una posible solución a este problema es la utilización de otro medio de soporte, por ejemplo; el acetato de celulosa, donde los artefactos de teñido son muy ténues o no se presentan (observación personal). De los pocos trabajos que se han realizado en este tipo de abejas con la enzima HK (Spivak et al., 1988; Sylvester, 1976; Del Lama et al., 1988) en ninguno se logró

eliminar las bandas adicionales.

11. BIBLIOGRAFIA

- Ayala, F.J. (1975). Genetic differentiation during the speciation process. Evolutionary Biology. 8: 1-78.
- Avise, J.C. (1974). Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23: 465-481.
- Badino, G., G. Celebrano, A. Manino (1983). Population structure and MDH-1 locus variation in Apis mellifera ligustica. The Journal of heredity. 74: 443-446.
- Brown, A.H. D. (1978). Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. Theor. Appl. Genet. 52: 145-157.
- Brown, A. H. D., A. C. Matheson y K. G. Eldrige. (1975). Estimation of the mating system of Eucalyptus oblicua L'Herit by using allozyme polymorphism. Aust. J. Bot. 23: 931- 942.
- Buth, D.G. (1984). The application of the electrophoretic data in systematics studies. Ann. Rev. Syst. 15.
- Buttler C. G. (1974). The World of honey bee. Collins St, James Place, London.
- Calkins, Ch. F. (1974). Beekeeping in Yucatan: A study in historical-cultural zoogeography. Ph. D. Thesis. University of Nebraska-Lincoln.
- Contel, E. P. B., M. A. Mestriner y E. Martins. (1977). Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in Apis mellifera. Biochemical Genetics. 15 (9/10):859-876.
- Cornuet, J. M. (1979). The MDH system in honeybees of Guadalupe. The Journal of Heredity. 70: 223-224.
- Daly, H.V. y S.S. Balling. (1978). Identification of africanized honey bees in the western hemisphere by discriminant analysis. J.Kans. Entomol. Soc. Am. 51: 857-869.
- Del Lama, M. A., M.A. Mestriner y J. C. A. Paiva. (1985). EST-5 y PGM-1: New polymorphism in Apis mellifera. Brazil. J.Genetics. 8(1): 17-27.
- Del Lama, M. A., R. A. Figueiredo, A. E. E. Soares y S. N. Del Lama. (1988). Hexokinase polymorphism in Apis mellifera and its use for Africanized honeybee identification. Rev. Brazil. Genet. 2(2): 287-297.

- Eguiarte, L.E.F. (1990). Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liemb. Tesis de Doctorado. UNAM, México.
- Fierro, M. M., J. O. Moffet, D. L. Maki y T. Andre. (1987). The Africanized bees in Chiapas. México. Am. Bee. Jour. 127(7): 517-527.
- Fierro, M.M., A. Barraza, D.L. Maki y J. O. Moffett (1988). The effects of the first year of Africanization on honey-bee populations in Chiapas, Mexico. Proceedings of the third American Bee Research Conference. Am. Bee. Jour. 128(12).
- Free, J. B. (1982). Bees and Mankind. George Allen & Unwin, London.
- Garcia, E. (1988). Modificaciones al sistema climático de Koppen. UNAM, México.
- González, P.D. (1991). Destruyen un enjambre de abejas africanas en el Centro del D.F. Excelsior, D.F.
- Gottlieb, L.D. (1981). Electrophoretic evidence and plant populations. Prog. Phytochem. 7:1-46.
- Hakim-Elahi, A. (1976). Temporal changes in the population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphism. Ph. D. Thesis. University of California, Davis. U.S.A.
- Hall, G. H. y Muralidharan. (1989). Evidence from mitochondrial DNA that african honey bees spread as continuous maternal lineages. Nature. 339: 211-213.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. (1989). Principles of Population Genetics. 2nd. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hedrick, P.W. (1983). Genetics of populations. Science Books Int., Boston.
- INEGI-SPP. (1985). México. Carta topográfica. 1:1000 000
- Kerr, W.E. (1967). The history of the introduction of africanized bees to Brazil. S. Afr. Bee. J. 39: 3-5.
- Koeniger, G. (1986). Reproduction and mating behavior. Bee Genetics and Breeding. Academic. Press. Inc. U.S.A.
- Labougle, J. M. R. y J. A. R. Zozaya. (1986). La apicultura en Mexico. Ciencia y Desarrollo. 69: 17-36.
- Labougle, J. M. R.; O. Taylor y M. Mancera (1989). A morphometric and electrophoretic study of the African Honey Bees in Southern

Mexico. Proceedings of the American Bee Research Conference. Am. Bee. Jour. 139 (12).

- Martins, E., M.A. Mestriner y E. P. B. Contel. (1976). Alcohol dehydrogenase polymorphism in Apis mellifera. Biochemical Genetics. 7:(3/4): 357-366.

- Mestriner, M. A. (1969). Biochemical polymorphism in bees (Apis mellifera ligusica). Nature. 223:188-189.

- Mestriner, M. A. y E.P.B. Contel (1972). The P-3 and EST loci in the honeybee Apis mellifera. Genetics. 72: 733-738.

- Michener, Ch. D. (1975). The Brazilian bee problem. Ann. Review of Entomology. 20: 399-416.

- Michener, Ch. D. (1974). The social behavior of the bees. Harvard University Press, Massachusetts.

- Nunamaker, R. A., W.T. Wilson y B. E. Haley. (1984). Electrophoretic detection of Africanized honeybees (Apis mellifera scutellata) in Guatemala and Mexico based on Malate dehydrogenase allozyme patterns. J. Kans. Entomol. Soc. 54: 622- 631.

- Page, R. E. (1989). Neotropical african bees. Nature. 339: 181-182.

- Pérez, N.N. (1990). Biología reproductiva y estructura genética de Psychotrya faxlucens (Rubiaceae). Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM, México.

- Piñero, D. (1982). Correlation between enzyme phenotypes and physical environment in California populations of Avena barbata and Avena fatua. Ph. D. Thesis. University of California, Davis. U.S.A.

- Powell, J.R. (1975). Protein variation in natural populations of animals. Evol. Biol. 8: 79-119.

- Richardson, B.J.; P.R. Baverstock y M., Adams. (1986). Allozyme electrophoresis. Academic Press, Australia.

- Rinderer, T.E., R.L. Hellmich, R.G. Danka y A. M. Collins. (1985). Male reproductive parasitism: a factor in the africanization of european honey-bee populations. Science. 228: 1119-1121.

- Rinderer, T. E.; H.A. Sylvester, M.A. Brown, J. Villa, D. Pesante y M. Collins. (1986). Field and simplified techniques for identifying africanized and european honey bees. Apidology. 17: 33-48.

- Rinderer, T. E. (1986). Africanized bees: The africanization process and potencial range in the United States. Bull. of the ESA. pp. 222-227.
- Ruttner, F. (1988). Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany.
- S.A.R.H. (1986). Las abejas africanas y su control. Manual # 2, Orientaciones tecnicas, México. 84 pp.
- Seeley, T. D. ((1985). Reproduction. In Honey Bee Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Selander, R. K. (1986). Variación genética en las poblaciones naturales. En Evolución Molecular. Omega. pp. 21-46.
- Sheppard, W. S. Y S. H. Berlorcher. (1985). New allozyme variability in Italian honey bees. The Journal of Heredity. 76: 45-48.
- Soltis, D.E., C.H. Haufler, D. C. Darrow y G. J. Gastony. (1983). Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. Am. Fern. J. 73: 9-27.
- Spivak, M. T. Ranker, O. R. Taylor, W. Taylor y L. Davis. (1988). Discrimination of africanized honeybees using behavior, cell size, morphometrics and a newly discovered isozyme polymorphism. In: Africanized honey bees and mites. John Willey, N. Y.
- Spivak, M. (1986). Relative survivorship of africanized and european honey bees in the highlands of Costa Rica. Am. Bee. Jour. 12: 83.
- Sylvester, H. A. (1976). Allozyme variation in honeybees (Apis mellifera L.). Ph. D. University of California, Davis, Calif.
- Sylvester, H. A. (1985). Biochemical genetics. In Bee Genetics and Breeding. Academic Press, Inc.
- Taylor, O. R. (1977). The past and possible future spread of africanized honeybees in the Americas. Bee World. 58: 19-30.
- Taylor, O. R. y M. Spivak. (1984). Climatic limits of tropical african honeybees in the Americas. Bee World. 65(1): 38-47.
- Taylor, O. R. (1985). Spread of the africanized honeybee. Bull. of the ESA. pp. 15-23.
- Taylor, O. R., Smith D.R. y Brown W.M. (1989). Neotropical africanized honey bees have african mitochondrial DNA. Nature. 339:

- Villa, J. D. (1986). Performance of africanized colonies at high elevations in Colombia. Am. Bee Jour. 12: 835.
- Villa, J.D. (1987). Africanized and european colony conditions at different elevations in Colombia. Am. Bee Jour. 127(1): 53-57.
- Werth, Ch. R. (1985). Implementing an isozyme laboratory at a field station. Virginia J. of Sci. 36(1): 53-76.

- Winston, M. L. y S. J. Katz. (1981). Longevity of cross-fostered honey bee workers (Apis mellifera) of european and africanized races. Con.J.Zool. 59: 1571-1575.

- Winston, M. L. (1987) (a). Reproduction: Swarming and Supersedure. In The Biology of Honey Bee. Harvard University Press.Cambridge, Massachusetts, London England.

- Winston, M. L. (1987) (b). Drones, queens and mating. In The Biology of Honey Bee. Harvard University Press.Cambridge, Massachusetts, London England.