



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**EFFECTO DE LA AFRICANIZACIÓN, DE LA DIVISIÓN DEL TRABAJO
Y DEL AMBIENTE DE LA COLONIA SOBRE LOS COMPONENTES
DEL COMPORTAMIENTO DEFENSIVO DE LAS ABEJAS
MELIFERAS (*Apis mellifera* L.)**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSÉ LUIS URIBE RUBIO

TUTOR:

CARLOS G. VÁSQUEZ PELÁEZ

COMITÉ TUTORAL:

ERNESTO GUZMÁN NOVOA

MIGUEL E. ARECHAVALETA VELASCO



MÉXICO D. F.

2008



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

Por la beca recibida al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), a través del Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal de Ajuchitlán, Querétaro, México. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, D. F. y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia México, D.F.

A los Drs. José Luis Romano Muñoz y Moisés Montaña Bermúdez por su apoyo en la realización de mis estudios y porque confiaron en mis capacidades para el logro de este éxito profesional.

A los Drs. Miguel Arechavaleta, José M. Berruecos, Felipe Ruiz, Javier Quezada, Julio Figueroa y Francisco Galindo integrantes de mi comité de examen de candidatura.

A los Drs. Ernesto Guzmán Novoa y Greg Hunt por su apoyo para la realización de mis estudios, y por los años de trabajo que compartimos. Pero sobre todo por la amistad y aprecio que les tengo.

Al Lic. Edmundo Acosta y la Sra. Sonia Ferruzca por su invaluable gestión y apoyo administrativo durante el desarrollo de mis estudios.

A mis compañeros de los Departamentos de Abejas Conejos y Organismos Acuáticos y de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

A la Coordinación del Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo en la administración de mis estudios.

A la Asociación de Apicultores del Estado de México por permitirme realizar pruebas de campo en sus colmenas y por su apoyo incondicional durante el desarrollo de mis estudios.

Al Programa de la Abeja Africana del Distrito Federal por permitirme utilizar su equipo y programa de cómputo para la medición morfométrica de las abejas que formaron parte de uno de mis experimentos.

A mi hermano Antonio Uribe por su apoyo para la realización de mis estudios.

A mis amigos y compañeros de trabajo; Gerardo Perera, Clara Murcia, Frida Salmerón, Hugo Montaldo, Reyes López, Raúl Ulloa, Ana Delgadillo, Iván Olivera,

Guadalupe Sánchez, Pedro Ochoa, José Luis Pablos, Laura Espinosa, Adriana Correa, Angélica Gris, Daniel Prieto, José de la Luz Negrete, Marcelino Rosas, Alicia Ávila, Mercedes Arriaga, Emilia Macías, Itzél Alcalá, Laura Arvízu, Salvador Cajero, Ernesto Tanus, Ricardo Vásquez, Sergio Carrasco, Enrique Estrada, Jonathan Martínez, Susana Rojas, Alberto García, Carlos Robles, Eusebio Sánchez, Esperanza Ochoa y Ernesto Fuentes que me apoyaron de alguna forma para la realización de mi proyecto de investigación.

Al CP Enrique Carrillo y a Miguel Ángel por su amistad y apoyo.

A mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia a lo largo de estos años de preparación.

A mi esposa Cristina Delabra y a mi hija Maddelyne por darme su apoyo y comprensión sin límite y por darme la oportunidad de lograr mi superación académica, por ello me siento un ser afortunado, gracias familia.

Un especial agradecimiento a mi comité de examen de grado, por su paciencia y generosidad en el otorgamiento de su tiempo, pero sobre todo de sus conocimientos que enriquecieron esta tesis.

Dr. José Manuel Berruecos Villalobos. Presidente

Dr. Carlos Vásquez Peláez. Secretario

Dr. Miguel Arechavaleta Velasco. Vocal

Dr. Ernesto Guzmán Novoa. Vocal

Dr. Javier Quezada Euán. Vocal

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera me apoyaron para la conclusión de mis estudios.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	1
ORGANIZACIÓN SOCIAL Y DIVISION DEL TRABAJO EN LAS COLONIAS DE ABEJAS	3
ORGANIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS ABEJAS	6
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
LISTA DE REFERENCIAS	14
CAPITULO I. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEFENSIVO DE LAS ABEJAS AFRICANIZADAS Y EUROPEAS QUE SE ENCUENTRAN EN SU PROPIA COLONIA, PARA EL TIEMPO DE REACCIÓN Y EL NÚMERO DE AGUIJONES.	22
Introducción	22
Objetivo	25
Materiales y Métodos	25
Resultados	27
Discusión ..	28
Lista de Referencias ..	34
CAPITULO II. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEFENSIVO DE LAS ABEJAS AFRICANIZADAS Y EUROPEAS QUE SE ENCUENTRAN EN SU PROPIA COLONIA, PARA EL NÚMERO DE ABEJAS QUE RESPONDEN AL ISOPENTIL ACETATO Y QUE PERSIGUEN A LOS OPERADORES	39

Introducción	39
Objetivo	42
Materiales y Métodos	42
Resultados	46
Discusión	46
Lista de Referencias	52
CAPITULO III. DETERMINACIÓN DE EFECTOS GENOTÍPICOS PARA LAS CARACTERÍSTICAS DE GUARDIA: PROPENSIÓN, PERSISTENCIA Y EDAD DE INICIO EN ABEJAS AFRICANIZADAS Y EUROPEAS	56
Introducción	56
Objetivo	58
Materiales y Métodos	58
Resultados	62
Discusión	63
Lista de Referencias	72
CAPITULO IV. DETERMINACIÓN DE EFECTOS GENÉTICOS PARA LA RESPUESTA AL ISOPENTIL ACETATO Y LA LONGITUD DEL ALA ANTERIOR EN OBRERAS (<i>Apis mellifera</i> L.)	75
Introducción	75
Objetivo	77
Materiales y Métodos	77
Resultados	81
Discusión	83
Lista de Referencias	95
CAPITULO V. DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DEL GENOTIPO, DIVISION DEL TRABAJO Y EL AMBIENTE DE LA COLONIA EN LOS UMBRALES DE RESPUESTA AL AGUIJONEO DE ABEJAS INDIVIDUALES AFRICANIZADAS Y EUROPEAS, POR MEDIO DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA	99
Introducción	99
Objetivo	102
Materiales y Métodos	102
Resultados	108
Discusión	109
Lista de Referencias	118
CONCLUSIONES	123

ANEXOS. Publicación del artículo en revista internacional:

Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Vazquez-Peláez CG, Hunt G. Genotype, Task Specialization, and Nest Environment Influence the Stinging Response Thresholds of Individual Africanized and European Honeybees to Electrical Stimulation. *Behav Genet.* (2008) 38:93-100

LISTA DE CUADROS

CUADRO	Página
1.1. Análisis de varianza para el tiempo (s) que tardó la primera abeja en picar y el número de agujones dejados en el parche de cuero en colonias africanizadas y europeas que se encuentran en su propio ambiente.	32
1.2. Media y error estándar para el tiempo (s) que tardó la primera abeja en picar y el número de agujones dejados en el parche de cuero en colonias africanizadas y europeas que se encuentran en su propio ambiente.	33
2.1. Análisis de varianza para el número de abejas que respondieron al uso del Isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y para el número de abejas que persiguieron al manejador de la colmena a 25 m en colonias de abejas africanizadas y europeas que se encontraban en su propio ambiente.	50
2.2. Medias y error estándar para el número de abejas que respondieron al uso del Isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y para el número de abejas que persiguieron al manejador de la colmena a 25 m en colonias de abejas africanizadas y europeas que se encontraban en su propio ambiente.	51
3.1. Análisis de varianza para las características de comportamiento de guardia: Propensión, Persistencia y Edad de inicio en abejas africanizadas y europeas que se encontraban en un ambiente compartido	70
3.2. Media y error estándar para las características del comportamiento de guardia: Propensión, Persistencia y Edad de inicio en abejas africanizadas y europeas que se encontraban en un ambiente compartido	71
4.1. Análisis de varianza para el número de abejas africanizadas y europeas que responden a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos (AXA, EXE, AXE Y EXA).	88
4.2. Medias mínimas cuadráticas y errores estándar para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos	89
4.3. Análisis de regresión para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de	

la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos (AXA, EXE, AXE Y EXA)	90
4.4. Coeficientes de la regresión para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos (AXA, EXE, AXE Y EXA)	91
4.5. Contrastes lineales utilizando las medias mínimas cuadráticas estimadas para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en los grupos genéticos africanizados y europeos (Aditividad) y el promedio de los grupos puros e híbridos (Dominancia-Heterosis).	92
4.6. Efectos maternos y paternos para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos	93
4.7. Medias mínimas cuadráticas y errores estándar para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en tres grupos genéticos AXA, Híbridas y EXE.	94
5.1. Análisis de varianza para el tiempo de aguijoneo de abejas africanizadas y europeas guardianas y del interior (nido), colectadas en su propia colonia, de colonias de ambiente compartido y de un ambiente de incubadora (artificial), después de la aplicación de un estímulo eléctrico de 0.5mA	115
5.2. Tiempo promedio y error estándar de aguijoneo para las abejas africanizadas y europeas que realizan trabajo de guardia y abejas del interior (nido) que se encuentran en un ambiente compartido, después de la aplicación de un estímulo eléctrico de 0.5mA	116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
5.1. Efecto del genotipo y el ambiente para el tiempo (s) promedio para picar ($s \pm ee$) en abejas obreras africanizadas (AA) y europeas (AE) que fueron colectadas de su propio ambiente (natal), de ambientes compartidos y de un ambiente artificial (mantenidas en una incubadora) que fueron sometidas a un estímulo eléctrico de 0.5 mA	117

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron determinar el efecto de la africanización, división del trabajo y del ambiente de la colonia en las abejas africanizadas (AA) y europeas (AE), sobre la expresión del comportamiento defensivo a nivel colectivo e individual, en su ambiente natal y compartido. Para ello, se realizaron pruebas de campo y de laboratorio, con resultados que indicaron que las AA tardaron menos tiempo en picar y dejar más aguijones sobre el sustrato ($P < 0.01$) con una mayor respuesta a la feromona de alarma y a la persecución de los operadores de las colmenas ($P < 0.01$). Cuando se analizó la característica de la propensión, no se observó diferencias entre genotipos ($P > 0.05$), sin embargo el ambiente y la interacción ambiente-genotipo fueron diferentes ($P < 0.01$). En contraste, el análisis de la persistencia nos indicó que el genotipo y la interacción genotipo-ambiente fueron significativos ($P < 0.01$), no así el ambiente ($P > 0.5$). La edad de inicio de guardia presentó que solo el genotipo fue significativo ($P < 0.01$). Además, se identificaron efectos genéticos aditivos ($P < 0.01$), maternos y paternos para el número de abejas que respondieron a la feromona de alarma y la longitud del ala de las abejas obreras ($P < 0.05$). Así mismo, se presenta por primera vez diferencias en el umbral de reacción al aguijoneo entre abejas especializadas en la defensa y no especializadas ($P < 0.05$). Por lo tanto, se concluye que el genotipo, la división del trabajo y el ambiente de la colonia, participan en el umbral de la respuesta defensiva.

Palabras claves *Apis mellifera* • Comportamiento Defensivo • Estímulo Eléctrico
• Efectos aditivos • Abejas africanizadas • Guardianas

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the africanization effect, labor division and nest environmental on the expression of components of defensive behavior at individual and collective levels in Africanized (AHB) and European bees (EHB). The bees were tested in their own environment (OE) or in a shared environment (cross-fostered, SE). Throughout tests where the bees were located in their OE, it was found that the AHB were quicker to sting and left more stings than EHB. A negative correlation was found between this two characteristics ($r = -0.51$). Furthermore, when the bees were exposed to the alarm pheromone (isopentyl acetate, IPA) the AHB responded with larger quantities of individuals than the EHB and the number of bees that persecuted the beehive operators was also higher, finding a correlation between these two variables ($r=0.58$). The propense (guard tendency) was influenced by the environment ($P<0.0001$) and not by genotype ($P>0.05$) when the bees were in the SE, interaction effects for genotype and environment were found for this characteristic though ($P<0.01$). Guard persistence was influenced by genotype ($P<0.0001$) and not by environment ($P>0.05$) and interaction effects were present ($P<0.0001$). For the age to guard onset, significant differences were found between AHB and EHB ($P<0.0001$). Regarding other results, additive genetic effects were observed for the number of bees that responded to the IPA and for forewing length of the worker bees (FWL) ($P<0.01$), and no dominance effects were found ($P>0.05$). Furthermore, paternal and maternal effects were seen on the number of bees that responded to IPA ($P<0.05$) and only paternal effects were observed on FWL ($P<0.05$). In the electric stimulation tests individually applied to bees AHB and EHB, the first ones had the lowest reaction threshold (stung quicker) in all environments in what were compared, and genetic-environmental interaction effects were found ($P<0.05$). Evidence on the fact that the guardian bees (group specialized for defense) have reaction thresholds significantly lower than those of bees non-specialized for defense (nest bees) ($P<0.05$) is presented for the first time. The main conclusions

of this study were that AHB responded quicker to several types of stimuli, both individually and collectively, in larger numbers and start guard at younger ages than EHB. Besides, significant evidence about environmental effects and their interaction with genotype on defense components at the collective or individual level is showed. Results support the hypothesis about labor division and some models that try to explain causes of labor division. In each of the chapter of this thesis these results and those from other authors are submitted to discussion

Keywords *Apis mellifera* • Defensive behavior • Gards • Africanized bees • Additive effects • Electric stimulus

Introducción

La apicultura en México tiene importancia social, económica y ecológica. Cerca de 42,000 apicultores manejan más de 1´800,000 colmenas que producen 54,000 toneladas de miel (SAGARPA, SIAP, 2007). El 80% de estos apicultores son campesinos de escasos recursos que tienen actividades apícolas como una fuente secundaria de ingresos (Cajero, 1995). México en el contexto internacional ocupa el quinto lugar en la producción mundial de miel después de China, EUA, Argentina y Turquía (FAO, 2006).

Uno de los principales problemas que afecta la apicultura nacional se debe a la presencia de las abejas africanizadas (Guzmán-Novoa y Page, 1994a; Cajero, 1995), que ingresaron a México en 1986 (Moffet, *et al.*, 1987). Estas son producto del cruzamiento entre las abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*) y las subespecies europeas que ya habitaban el continente americano. Estas abejas híbridas han causado serias repercusiones a la producción de miel y han provocado la pérdida de colmenas asociado a un incremento significativo en los costos de producción (Guzmán-Novoa y Page, 1994a; Guzmán-Novoa y Uribe-Rubio, 2004) pero sobre todo han ocasionado la muerte de miles de personas y animales (Breed *et al.*, 2004).

Antecedentes

Introducción de las Abejas Africanas a América Latina

Abejas reinas africanas de la subespecie *A. m. scutellata*, fueron introducidas a Brasil en 1956, con el propósito de establecer un programa de mejoramiento genético cuyo objetivo era mejorar la producción de miel a través de la obtención de una abeja híbrida adaptada a las condiciones tropicales de ese país (Kerr, 1967). Desafortunadamente 26 enjambres conteniendo reinas africanas escaparon accidentalmente y se produjeron apareamientos de los machos africanos con las

reinas europeas y viceversa, causando con ello el inicio del proceso de africanización de las abejas europeas que habitaban América Latina. Con el tiempo estas se convirtieron en la base de las poblaciones que colonizaron la mayor parte del continente Americano (Spivak y Fletcher, 1991). Desde su introducción las abejas africanizadas se han extendido a través de toda América Latina y el Sur de los Estados Unidos (Hall, 1999; Loper, 2002; Loper *et al.*, 1999; Winston, 1992a,b).

Después que dio inicio la hibridación y dispersión de las abejas africanizadas, se presentó una controversia acerca de la simetría del flujo de genes entre las subespecies africanas y europeas y del grado de persistencia de los alelos europeos en las poblaciones silvestres africanas. La necesidad de diferenciar entre los ancestros africanos o europeos para conocer la composición genética de las poblaciones en las áreas africanizadas reveló tres puntos principales; Primero, que existe una frecuencia elevada del ADN mitocondrial (ADNmt) africano, y en algunos casos con la exclusión casi total del ADNmt europeo. Segundo, que las poblaciones africanas a veces presentan alguna evidencia de un flujo de genes paternos de origen europeo, pero la frecuencia de estos disminuye gradualmente. Tercero, los alelos europeos que logran predominar y persistir por algún tiempo son los Europeos del Oeste más que los Europeos del Este, (Clarke *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004).

La colonización del continente americano por una sola raza de insectos ha sido considerada como una de las más exitosas y rápidas invasiones biológicas conocidas (Schneider *et al.*, 2004). Las abejas africanizadas han sido capaces de desplazar a las subespecies europeas al inter cruzarse, dando origen a las africanizadas y a través del tiempo las frecuencias alélicas europeas se han reducido, prevaleciendo los alelos propios de la raza africana (Diniz-Filho y Malaspina, 1995; Quezada-Euán *et al.*, 1996; Oldroyd *et al.*, 1998; Hall, 1999; Segura, 2000; Clarke *et al.*, 2001, 2002; Loper, 2002; Quezada-Euán *et al.*, 2003). Las características de las razas africanas que predominan sobre las que presentan las europeas son las relacionadas con la biología del anidamiento

(McNally y Schneider, 1992), el comportamiento de evasión y enjambrazón (McNally y Schneider, 1992; Rubink *et al.*, 1996; Otis *et al.*, 2002) el pecoreo y la selección de alimentos (Schneider y Hall, 1997; Fewell y Bertram, 2002), al comportamiento defensivo (Stort, 1974, 1975a,b,c; Guzmán-Novoa y Page, 1993; Guzmán-Novoa y Page, 1994b; Hunt *et al.*, 2003a,b; Uribe-Rubio 2001; Uribe-Rubio *et al.*, 2003; Guzmán-Novoa *et al.*, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2005) y la presencia del ADNmt africano (Hall, 1999; Segura, 2000; Clarke *et al.*, 2001, 2002).

Durante años ha existido confusión al referirse a los descendientes de *A. m. scutellata* en América, (Schneider *et al.*, 2004). La dirección y magnitud del flujo de los genes africanos y europeos implica diferentes procesos genéticos (Hall 1990; Sheppard y Smith, 2000), por ello el término de abejas africanizadas y el proceso de africanización serán empleados en este estudio para referirnos a las colonias producto del cruzamiento de reinas europeas con zánganos africanizados a menos que se defina el tipo de cruzamiento empleado.

Organización social y división del trabajo

Las abejas (*Apis mellifera* L.) son insectos sociales que viven en colonias muy populosas (decenas de miles de individuos) y poseen uno de los niveles más elevados de organización, pues se caracterizan por la cooperación de los adultos en el cuidado de la cría, la construcción del nido y la convivencia de al menos dos generaciones de individuos (Wilson, 1982).

La división del trabajo está estrechamente relacionada con la edad de las obreras (Lindauer, 1971; Winston, 1987; Seeley y Kolmes, 1991). Los patrones de distribución del trabajo pueden ser afectados por las características propias de las obreras, y por las necesidades de la colonia (O'Donnell y Bulova, 2007). Las obreras más jóvenes realizan tareas dentro del nido actuando como nodrizas que cuidan y alimentan a la cría, otras de mayor edad desarrollan actividades en la periferia del nido, o vigilando la entrada de la colmena y las abejas de más de 20

días de edad desarrollan actividades de recolección de alimento fuera de su colmena (pecoreo), (Lindauer, 1971; Seeley, 1985; Winston, 1987).

Las colonias de abejas están constituidas por miles de hembras (obreras) y cientos de machos (zánganos). En cada colonia se identifica a una sola reina, madre de todos los individuos. Las obreras son producto de un sistema de reproducción donde la reina; única hembra reproductiva se fecunda en forma natural con un promedio de 14 machos presentándose el fenómeno de poliandria (Palmer y Oldroyd, 2000), por lo que la población descendiente de obreras, (hembras no reproductoras), está formada por diversas familias que comparten diferentes grados de parentesco. Las obreras que pertenecen a una misma familia (descendientes de la misma madre y padre) son llamadas super hermanas, pues comparten el 75% de genes en común por descendencia y las obreras de diferentes padres pertenecientes a familias distintas (donde los zánganos no están emparentados), son llamadas medias hermanas ya que comparten un 25% de genes en común (Laidlaw y Page, 1997). Por lo tanto, al ser las reinas poliándricas una colonia de abejas está constituida de diferentes familias donde la influencia de los alelos maternos y paternos afectan la expresión de diversas tareas que realizan las obreras, como por ejemplo la defensa del nido (Breed *et al.*, 1990; Guzmán-Novoa y Page 1994a), la colecta del agua (Robinson *et al.*, 1984; Kryeger *et al.*, 2000) la remoción de abejas muertas (Robinson y Page 1988, 1995) o cría muerta (Rothenbuhler, 1964) y la ventilación del nido (Oldroyd *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 2004). En algunos estudios se ha comprobado que el genotipo del padre influye sobre la edad a la cual una obrera realiza la transición a las diferentes tareas (Lindauer, 1971; Seeley, 1985; Winston, 1987).

De acuerdo con varios autores (Winston, 1987; Calderone y Page, 1988; Page *et al.*, 1992; Robinson y Huang, 1998), las obreras se encargan de tareas como la alimentación y cuidado de la cría y el pecoreo, siendo consideradas como tareas generales, mientras que la guardia y el aguijoneo se consideran especializadas. Además de lo anterior, las colonias de abejas expresan una gran plasticidad en la manifestación de las tareas, pues las abejas de cada colonia responden de

diferente forma respecto a las condiciones ambientales, por ejemplo algunas obreras pueden acelerar, retrasar y más aún revertir sus tareas, dependiendo de la presentación de diferentes condiciones internas y externas que afectan a la colonia (Robinson, 1992).

Por lo anteriormente descrito, la influencia de las líneas parentales y la estructura propia de cada colonia (producto de la poliandria), modifican la probabilidad y la edad de las obreras en el desempeño de las tareas (Crozier y Page, 1985; Myerscough y Oldroyd, 2004).

Incrementos en los niveles de un estímulo específico provocan que obreras con umbrales más altos respondan, lo cual podría involucrar a varias líneas paternas, por lo que se podría promover la participación de más obreras en tareas específicas (Robinson, 1992; Fewell y Page, 1993; Jones *et al.*, 2004).

Respecto a la respuesta defensiva realizada por grupos especializados, esta comprende varios componentes como la guardia, la persecución y el aguijoneo (Breed *et al.*, 2004). La defensa del nido a su vez involucra la atracción de abejas del interior de la colmena para que participen en una reacción defensiva, como consecuencia de la liberación de la feromona de alarma por parte de las abejas guardianas. El reconocimiento de las abejas guardianas y el papel que juegan en la defensa del nido (Moore *et al.*, 1987; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003), ha llevado a la realización de experimentos en los que se utiliza el isopentil acetato (IPA, principal componente de la feromona de alarma) para estimular la congregación de abejas en la entrada de la colmena (Guzmán-Novoa *et al.*, 2003), en una acción preventiva para defender la colonia, lo cual ha sido de utilidad para medir el nivel de respuesta defensiva y para la clasificación de las colonias de abejas en defensivas y dóciles (Collins y Kubasek, 1982; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003). La protección y vigilancia de la colonia le corresponde a las “abejas guardianas”, que pueden identificarse a simple vista. Estas adoptan una postura típica como es levantarse sobre sus patas traseras y desplegar sus alas como si quisieran volar, manteniendo un nivel de actividad distintivo a todo lo largo de la entrada de la colmena y las proximidades de la colmena para interceptar a las

abejas que regresan del campo, olfateándolas con sus antenas y permitiendo o rechazando a las que pretenden ingresar a la colmena (Butler y Free, 1952; Moore *et al.*, 1987). Las guardianas representan una minoría en una colonia (10-15%) y reconocen a sus hermanas por medio del olor característico de sus hidrocarburos cuticulares (Breed *et al.*, 1995). En caso de amenaza por parte de un intruso algunas permanecen en la entrada de la colmena y otras si se requiere, vuelan y pican, siendo menor del 3% las guardianas que participan aguijoneando (Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003). Las guardianas que quedan en la entrada, alertan a otras obreras de la colonia después que han liberado las feromonas de alarma (Butler y Free, 1952; Ribbands, 1954; Maschwitz, 1964; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003), mientras que las guardianas que vuelan pueden guiar a otras abejas hacia la fuente de emisión de las señales químicas provenientes de la secreción de estas feromonas.

De acuerdo con Breed *et al.*, (1990), las abejas aguijoneadoras son las responsables de los ataques en masa en contra de los vertebrados, y las guardianas se encargan de controlar la amenaza de con-específicos (abejas de otras colonias) y de los invertebrados que pretenden ingresar a su colmena.

Organización de la respuesta defensiva

Para explicar el desarrollo de una respuesta defensiva de una colonia de abejas, Collins *et al.*, (1980) diseñaron un modelo, el cual consta de una serie de eventos secuenciales que culminan con el aguijoneo. Este modelo consta de cuatro niveles o etapas básicas de respuesta (1) la alerta, (2) la activación, (3) la atracción y (4) la culminación. En la primer etapa puede establecerse un estado de alarma y un reclutamiento de abejas a la defensa por medio de la secreción de feromonas de alarma; en la segunda etapa se establece una activación con la salida de abejas que se dirigen hacia el objeto que provocó el estímulo; en la tercera etapa las abejas identifican la fuente de estimulación; y la última etapa puede culminar con el aguijoneo en caso de persistir la fuente de estimulación.

Recientemente se presentó otro modelo (Breed *et al.*, 2004) que incluye una serie de acciones que finalizan con la persecución y el aguijoneo. Este modelo es similar en términos generales al anterior, solo que se adicionan nuevas etapas que van desde la alerta, el reconocimiento y evaluación del tipo de amenaza y el reclutamiento de abejas por medio de la secreción de feromonas de alarma procedentes del interior de la colmena, que reevalúan el tipo de amenaza, y persecución, llegando a culminar con el aguijoneo; y señalan que la magnitud de la respuesta dependerá del tipo de amenaza y de la intensidad o duración del estímulo.

De acuerdo con Breed *et al.*, (2004) hacen falta más estudios que comparen el comportamiento defensivo entre abejas africanizadas y europeas. Los datos disponibles sugieren que las abejas africanizadas despliegan una secuencia de eventos defensivos y de organización similar a los reportados en las europeas, pero con umbrales de respuesta menores. Respondiendo a estímulos defensivos de todo tipo con mayor intensidad, rapidez, mayor número y eficiencia en respuesta a la liberación de la feromona de alarma atrayendo abejas del interior de la colmena (Guzmán-Novoa *et al.*, 2003). Hunt *et al.*, (2003b), encontraron que cuando colonias de abejas africanizadas fueron expuestas al (IPA), éstas respondieron con mayor proporción de defensoras que las europeas. La respuesta defensiva de las abejas africanizadas es más rápida y con mayor intensidad que la respuesta de las europeas (Schneider y MacNally,1992; Guzmán-Novoa y Page, 1994b; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999; Hunt *et al.*, 2003b; Uribe-Rubio *et al.*, 2003; Guzmán-Novoa *et al.*, 2005).

Así mismo se ha observado que las colonias de abejas africanizadas pican de 4 a 10 veces más que las europeas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2002a, 2002b; Guzmán-Nova y Page, 1993,1994b; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999). Por otro lado el número de abejas pertenecientes a colonias africanizadas que persiguen intrusos ha sido reportado en 10 o 30 veces superior que el número de abejas europeas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2003; Prieto-Merlos, 2002; Stort y Goncalves, 1991).

En relación al comportamiento de guardia varios estudios han demostrado que ésta es una tarea realizada por individuos predispuestos genéticamente (Robinson y Page, 1988; Breed y Rogers, 1991; Breed *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 2003a; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2004). La mayoría de las guardianas se ocupa de esta actividad por dos días, pero algunas persisten hasta por seis (Moore *et al.*, 1987; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003a; Hunt *et al.*, 2003a). Debido al número de días que las abejas dedican a la realización de la guardia esta puede ser considerada como una tarea de especialización defensiva (Moore *et al.*, 1987; Hunt *et al.*, 2003a).

Efectos ambientales también influyen sobre la actividad de guardia de las abejas, por ejemplo, en un estudio realizado por Guzmán-Novoa *et al.*, (2003) se encontraron diferencias en el número de individuos que realizan tareas de guardia entre dos grupos genéticos de abejas que compartieron un mismo ambiente y también se encontró que las abejas guardianas de origen africanizado volaron y picaron hasta 7 veces más que las de origen europeo. En cuanto al tiempo que las abejas permanecieron realizando guardia, se ha encontrado que las abejas guardianas europeas permanecieron menor cantidad de días que las abejas guardianas africanizadas (1-6 días contra 21 respectivamente) (Hunt *et al.*, 2003a; Moore *et al.*, 1987) y se ha reportado a las abejas africanizadas como menos propensas (número de abejas que hacen guardia) que las abejas europeas.

Por otro lado se han observado interacciones significativas entre el genotipo de las abejas y su medio ambiente. Por ejemplo en un experimento donde se modificó la estructura genotípica de la colonia por medio de la introducción de abejas de origen africanizado y europeo en diferentes proporciones, las abejas africanizadas fueron más persistentes para la realización de la guardia en colonias que contenían mayor cantidad de abejas africanizadas que europeas, y se encontró que las abejas europeas no respondieron a estos cambios genotípicos (Hunt *et al.*, 2003a; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

El comportamiento defensivo frecuentemente es medido en las colonias de abejas a través del aguijoneo, estimado como el tiempo que la colonia tarda en responder con un primer piquete después de aplicar un estímulo, como la duración del ataque después que el estímulo se ha retirado o bien con base al número de aguijones que dejan las abejas en un blanco determinado (Stort, 1974; Collins y Kubasek, 1982; Breed y Rogers, 1991). Así mismo se ha observado mucha variación en la respuesta de aguijoneo a nivel de colonia (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1984; Breed y Rogers, 1991; Stort y Goncalves, 1991; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999). Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003) encontraron por otra parte que el número de abejas que picaron en una prueba defensiva a nivel de colonia se asoció positivamente con el número de abejas guardianas presentes a la entrada de la colmena y se encontró un porcentaje aunque bajo de participación de guardianas que respondieron picando. Así mismo, colonias con guardianas que permanecieron por largos periodos haciendo guardia presentaron mayores respuestas al aguijoneo que colonias con abejas menos persistentes (Breed y Rogers, 1991).

Pocos estudios han medido el comportamiento de aguijoneo de las abejas a nivel individual (Kolmes y Fergusson-Kolmes, 1989; Paxton *et al.*, 1994; Nuñez *et al.*, 1998; Balderrama *et al.*, 2002; Lenoir *et al.*, 2006). En estos estudios se aplicaron estímulos eléctricos a abejas individuales de diferentes genotipos europeos (dóciles y defensivos), y solo en uno se emplearon abejas de origen africanizado. Estos estímulos también se aplicaron sobre abejas de diferentes edades, y se han comprobado efectos genéticos influyendo sobre el aguijoneo pero solo entre abejas europeas de distinto origen paterno. Las pruebas individuales son importantes para estudiar el comportamiento defensivo ya que las mediciones de grupo pueden estar sujetas a efectos no lineales debido a las interacciones entre las obreras.

Varios estudios han comprobado que loci de características cuantitativas (QTLs) influyen sobre la expresión del comportamiento de pecoreo y el defensivo en las colonias de abejas (Hunt *et al.*, 1995; Page *et al.*, 2000; Arechavaleta-Velasco *et*

al., 2003). Y en los estudios realizados por Guzmán-Novoa *et al.*, (2002a) y Arechavaleta-Velasco *et al.*, (2003) se ha comprobado la influencia de QTLs sobre el comportamiento de las abejas a nivel individual. Uno de estos QTLs llamado sting-1 influye sobre la tendencia de los individuos para realizar el comportamiento de guardia y el de aguijoneo (Guzmán-Novoa *et al.*, 2002a). Y recientemente Arechavaleta-Velasco *et al.*, (2003) comprobó los efectos del sting-1 sobre el comportamiento de guardia y el aguijoneo así como que el sting-2 y sting-3 influyeron únicamente sobre la expresión del comportamiento de guardia en una población independiente a la del estudio previo. Así mismo se han identificado regiones genómicas BTLs, (loci de características binarias por sus siglas en inglés BTL, Binary Trait Loci) que influyen sobre el comportamiento de guardia y sobre el comportamiento de aguijoneo (Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2004).

Justificación

Las abejas africanizadas son consideradas como un problema que afecta la salud pública y la economía de los apicultores debido a su elevado comportamiento defensivo. El comportamiento defensivo de las abejas es una característica heredable que se divide en tres componentes principales que son; la guardia, la persecución y el aguijoneo. Para el estudio del comportamiento defensivo se han diseñado modelos teóricos que tratan de explicar cómo se desarrolla la respuesta defensiva de una colonia, que grupos de abejas participan y como la suma e interacción de respuestas de abejas individuales se expresan en el comportamiento defensivo a nivel colonia. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre este comportamiento de las abejas se ha realizado con abejas europeas y se asume que el desarrollo de una respuesta defensiva es similar en las abejas africanizadas. Por eso, hace falta realizar más estudios comparativos, entre estos dos grupos genéticos a nivel individual y colectivo. Adicionalmente, poco se sabe acerca de la forma de herencia del comportamiento defensivo pues la existente está basada en el componente de aguijoneo, presentándose cierta incertidumbre en los resultados existentes. Por lo que generar un mayor conocimiento del comportamiento defensivo de las abejas explorando otras características defensivas distintas al aguijoneo, permitirá diseñar estudios de investigación básica y aplicada para la selección y producción de colonias con niveles tolerables de defensa compatibles con los objetivos de la producción sobre todo en zonas africanizadas, contribuyendo esto a reducir los riesgos de accidentes causados a la población humana y animal.

El diseño y validación de metodologías para evaluar el comportamiento de las abejas es importante debido a que existe mucha variación en la expresión de las características defensivas, debido a los efectos ambientales a que están sujetas las pruebas tradicionales o de uso común. Además la utilización de pruebas prácticas y confiables que relacionen características morfométricas y defensivas aplicadas a los individuos y a las colonias contribuirán a mejorar la identificación

de genotipos de abejas, pues en la actualidad existe confusión en la separación de colonias con niveles intermedios en la respuesta defensiva y morfométrica, producto del cruzamiento de abejas africanizadas y europeas.

Dado lo anterior se realizaron diferentes estudios para ampliar el conocimiento del proceso defensivo en las colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) desde que se inicia con la guardia y hasta que culmina con el aguijoneo utilizando genotipos de abejas que difieren significativamente en la expresión de su comportamiento defensivo.

Objetivo General

Analizar la variación de la expresión de los componentes del comportamiento defensivo de abejas africanizadas y europeas de manera colectiva e individual en ambientes propios y compartidos, así como el efecto de la africanización sobre el comportamiento defensivo y el tamaño de las abejas.

Objetivos Específicos

Comparar el comportamiento defensivo de las abejas africanizadas y europeas que se encuentran en su propia colonia, para el tiempo de reacción y el número de aguijones.

Comparar el comportamiento defensivo de las abejas africanizadas y europeas que se encuentran en su propia colonia, para el número de abejas que responden al isopentil acetato y el número de abejas que persiguen a los operadores.

Determinar efectos genotípicos para la propensión, persistencia y edad de inicio del comportamiento de guardia de abejas africanizadas y europeas (*Apis mellifera* L.)

Determinar efectos genéticos para el número de abejas que responden al isopentil acetato y para la longitud del ala anterior en abejas (*Apis mellifera* L.).

Determinar la influencia del genotipo, de la división del trabajo y el ambiente de la colonia en los umbrales de respuesta de aguijoneo de abejas individuales africanizadas y europeas.

Lista de Referencias

Arechavaleta-Velasco ME and Hunt GJ. Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie* 2003; 34:439-447.

Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ, Emore C. Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bee. *Behav Genet* 2003; 33:357-364.

Arechavaleta-Velasco ME and Hunt GJ. Binary Trait Loci that influence Honey bee (Hymenoptera:Apidae) Guarding Behavior. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2004; 97(1):177-183.

Balderrama N, Núñez J, Guerrieri F, Giurfa M. Different functions of two alarm substances in the honeybee. *J Comp Physiol A.* 2002; 188: 485-491

Breed MD, Guzmán-Novoa E and Hunt GJ. Defensive Behavior of Honey Bees: Organization, Genetics, and Comparisons with Other Bees. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:271-298.

Breed MD, Robinson GE, Page RE. Division of labor during honey bee colony defense. *Behav Ecol Sociobiol* 1990; 27:395-401.

Breed MD, and Rogers KB. The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 1991; 21:295-303.

Breed MD, Smith TA, Torres A. Role of guard honey bees (Hymenoptera:Apidae) in nestmate discrimination and replacement of removed guards. *Ann Entomol Soc Am* 1992; 85:633-637.

Breed MD, Gary MF, Pearce AN, Bjostad L, Hibbard B, Page RE. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Anim Behav.* 1995;50:489-496.

Butler CG and Free JB. The Behavior of worker honeybees at the hive entrance. *Behavior.* 1952; 4: 263-292.

Collins AM, Rinderer TE, Toker KW, Sylvester HA and Lockett JJ. A Model of Honeybee Defensive Behaviour. *J Apic Res* 1980; 19(4):224-231.

Collins AM and Kubasek KJ. Field test of honey bee (Hymenoptera: Apidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 1982; 75:383-387.

Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Brown MA. Heritabilities and correlation for several characteristics in the honey bee. J Hered 1984; 75:135-140.

Calderone NW, and Page RE. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Behav Ecol Sociobiol. 1988;22:17-25.

Cajero AS. Logros del Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. Memorias del III congreso Internacional de Actualización Apícola; 1995 mayo 26-28; México (DF) México, Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas AC 1995:9-10.

Crozier RH and Page RE. On being the right size: male contributions and multiple mating in the social hymenoptera. Behav Ecol. Sociobiol. 1985;18:105-115.

Clarke KE, Oldroyd BP, Quezada-Euán JG and Rinderer TE. Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. Mol. Ecol. 2001; 10:1347-1355.

Clarke KE, Rinderer TE, Franck P, Quezada-Euán JG and Oldroyd BP. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. Evolution 2002; 56:1462-1474.

DeGrandi-Hoffman G, Collins AM, Martin JH, Schmidt JO, Spangler HG. Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera:Apidae). J. Insect Behav. 1998; 11:37-45.

Diniz-Filho JAF, Malaspina O. Evolution and population structure of Africanized honey bees in Brazil: evidencie from spatial analysis of morphometric data. Evolution 1995; 49: 1172-1179.

FAO: Food Agricultural Organization. Report honey production. 2006.

Fewell JH, Page RE. Genotypic variation in foraging responses to environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*. Experientia 1993;49:1106-1112.

Fewell J.H., Bertram SM. Evidence for genetic variation in worker task performance by African and European honey bees. *Behav Ecol Sociobiol* 2002; 52:318-325.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Backcrossing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann Entomol Soc Amer.* 1993; 86(3):352-355.

Guzmán-Novoa E y Page RE. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Am Bee J*; 1994a:101-106.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Genetic dominance and worker interactions affect honey bee colony defense. *Behav Ecol* 1994b; 5:91-97.

Guzmán-Novoa E, Page RE, J, Spangler HG and Erickson EH. A comparison of two assays to test the defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*), *J. Apicult. Res* 1999; 38:205-209.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe JL, Smith C, Arechavaleta- Velasco ME. Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honey bee defensive behavior: Results of colony and individual behavioral assays. *Behav. Genet* 2002a; 32:95-102.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Page, Fondrk. MK. Genetic correlations among honey bee (Hymenoptera Apidae) behavioral characteristics and wing length *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2002b; 95:402-406.

Guzmán-Novoa E, Prieto- Merlos D, Uribe-Rubio JL, and Hunt, GJ. Relative reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*) *J Apic Res* 2003;42-46.

Guzmán-Novoa E and Uribe-Rubio JL. Honey production by European, Africanized and Hybrid Honey Bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico. *Am Bee J* 2004; 144:318-320.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. *Apidologie* 2004; 35;15-24.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Page RE Jr, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D, and Becerra-Guzman F. Paternal Effects on the Defensive Behavior of Honeybees. *J. Hered.* 2005; 96(4):376-380.

Hall HG. Genetic and physiological studies of African and European honey bee hybridizations: past, present and into the 21st century. In: Hoopengartner R, Connor L, eds. 1999; *Apiculture for the 21st Century*, Cheshire, CT: Wicwas.

Hall HG. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honey bees using nuclear RFLPs. *Genetics* 1990; 125:611-621.

Hunt GJ and Page RE. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 1995; 139:1371-1382.

Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotype-environment interactions in honey bee guarding behavior. *Anim Behav* 2003a; 66:459-467.

Hunt GJ, Wood KV, Guzmán-Novoa E, Lee HD, Rothwell AP and Bonham CC. Discovery of 3-methyl-2-buten-1-yl acetate, a new alarm component in the sting apparatus of Africanized honeybees. *J of Chem Ecol* 2003b;29(2);453-463.

Jones J, Myerscough, Graham S and Oldroyd BP. Honey bee nest Thermoregulation: diversity promotes stability. *Science* 2004; 305: 402-404.

Kerr WE. The history of the introduction of African bees to Brazil. *S. Afr Bee J.* 1967; 39:3-5.

Kryeger P, Kryeger U, Moritz RFA. Genotypical variability for the tasks of water collecting and scenting in a honey bee colony. *Ethology* 2000;106:769-779.

Kolmes SA, Fergusson-Kolmes LA. Measurements of stinging behaviour in individual worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Apic Res.* 1989; 28:71-78

Laidlaw HH Jr and Page RE Jr. *Queen Rearing and Bee Breeding*. Wicwas Press, Cheshire, Connecticut, USA. 1997.

Lenoir JC, Laloi D, Dechaume-Moncharmont FX, Solignac M, Pham MH Intra-colonial variation of the sting extension response in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Soc.* 2006; 53:80-85.

Lindauer M. Communication Among Social Bess. 1971 Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Loper GM. Genetic evidence of the Africanization of feral colonies in S. Arizona between 1993 and 1995. *Am Bee J* 2002;137:669-671.

Loper GM, Fewell J, Smith DR, Sheppard WS, Schiff N. Changes in the genetics of a population of feral honey bees (*Apis mellifera* L) in S. Arizona after the impact of Tracheal mites (*Acarapis woodi*), Varroa mites (*Varroa jacobsoni*) and Africanization. In: Hoopeingartner R, Connor L, eds. 1999; *Apiculture for the 21st Century*, Cheshire, CT: Wicwas.

McNally LC, Schneider SS. Seasonal cycles of growth, development and movement of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata*, in Africa. *Insectes Soc* 1992; 39:167-179.

Maschwitz UW. Alarm substances and alarm behavior in social hymenoptera. *Nature* 1964; 204:324-327.

Myerscough, M. and, Oldroyd, B.P. Simulation models of the role of genetic variability in social insects task allocation. *Insectes Soc.* 2004; 51:146-152.

Moore AJ, Breed MD, Moor MJ. Characterization of guard behavior in honeybees, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 1987; 35:1159-1167.

Moffet JO, Maki DL, Andre T, Fierro MM. The Africanized bee in Chiapas, Mexico. *Am Bee J* 1987; 127:517-520.

Núñez JA, Almeida L, Balderrama N, Giurfa M Alarm pheromone induces stress analgesia via an opioid system in the honey bee. *Physiol Behav* 1998;. 63:75-80.

Oldroyd BP, Sylvester HA, Wongsiri S, Rinderer TE. Task specialization in a wild bee, *Apis florea* (Hymenoptera:Apidae), revealed by RFLP banding. *Behav Ecol Sociobiol* 1994;34:25-30.

Oldroyd BP, Clifton MJ, Parker K, Wongsiri S, Rinderer TE, Corzier RH. Evolution of mating behavior in the genus *Apis* and an estimate of mating frequency in *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Ann Entomol Soc Am* 1998; 91:700-709.

O'Donnell S and Bulova SJ. Worker connectivity: a simulation model of variation in worker communication and its effects on task performance. *Insect. Soc.* 2007;54:211-218.

Otis GW, Taylor OR, Winston ML.. Colony size affects reproductive attributes of African honey bees (*Apis mellifera* L.). In: Erickson E, Page RE Jr, Hanna AA, eds. 2002. Proceedings of the 2nd International Conference on Africanized Honey Bees and Bee Mites. Medina, OH: Root. 2002; pp 25-32.

Palmer KA and Oldroyd BP. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* 2000;31:235-248.

Page RE Jr, Fondrk MK, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Humphries MA. Genetic dissection of honey bee (*Apis mellifera*) foraging behavior. *J Hered* 2000; 91:474-479.

Page RE, Robinson GE, Britton DS, Fondrk MK. Genotypic variability for rates of behavioral development in worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol* 1992; 3:173-180.

Paxton RJ, Sakamoto CH, Rugiga FCN (1994). Modification of honey bee (*Apis mellifera* L.) stinging behaviour by within-colony environment and age. *J Apic Res* 33:75-82.

Prieto-Merlos D (2002). Confiabilidad de pruebas y métodos para evaluar el comportamiento defensivo y el tamaño corporal en tres genotipos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). MS Thesis, Nat Univ, Mex, DF, pp.56.

Quezada-Euán JGG, Echazarreta CM, Paxton RJ. The distribution and range of expansion of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in the state of Yucatan, Mexico. *J. Apic Res* 1996; 35:85-95.

Quezada-Euán JGG, Echazarreta CM, Perez-Castro E, May-Itza WDJ. Hybridization between European and African-derived honeybee population (*Apis mellifera*) at different altitudes in Peru. *Apidologie* 2003; 34:217-225.

Robinson GE and Page RE. Genetic constraints on plasticity for corpse removal in honey bee colonies. *Anim Behav* 1995; 49:867-876.

Ribbands CR. The defense of the honeybee community. *Proc R Soc London B* 1954; 142:514-524.

Robinson, GE and Page, RE. Genetic determination of guarding and undertaking in honey bee colonies. *Nature*, 1988; 333:356-358.

Robinson GE. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 1992;37:637-665.(doi:10.1146/annurev.en.37.010192.003225).

Robinson GE, Huang ZY. Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. *Apidologie* 1998; 29:159-170.

Rothenbuhler WC, Behavior genetics of nest cleaning in honey bee. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. *Am Zool* 1964; 12: 578-583.

Rubink WL, Luevano-Martinez P, Sugden EA, Wilson WT, Collins AM. Subtropical *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) swarming dynamics and Africanization rates in northeastern Mexico and southern Texas. *Ann Entomol Soc Am* 1996; 89:243-251.

SAGARPA: Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). México DF (2007).

Segura JAL. Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. *Genet Mol Biol* 2000; 23:317-322.

Sheppard WS, Smith DR. Identification of African-derived bees in the Americas: a survey of methods. *Ann Entomol Soc Am* 2000; 93:159-176.

Schneider SS, Hall HG. Diet selection and foraging distances of African and European-African hybrid honey bee colonies in Costa Rica. *Insectes Soc* 1997; 44:171-187.

Schneider SS, DeGrandi-Hoffman G, and Smith DR. The African Honey Bee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:351-376.

Schneider SS, McNally LC. Colony defense in the African honey bee in Africa (Hymenoptera: Apidae). *Environ Entomol.* 1992; 21:1362-1370.

Seeley TD. *Honeybee Ecology*. 1985. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.

Seeley TD, Kolmes SA. Age polyethism for hive duties in honey bees-illusion or reality? *Ethology* 1991;87:284-297.

Spivak M, Fletcher DJC, Breed MD, eds. 1991. *The "African" Honey Bee*. Boulder, CO:Westview.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. I. Some tests to measure aggressiveness. *J. Apic. Res.* 1974; 13:33-38.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. II. Time at which the first sting reached the leather ball. *J. Apic. Res.* 1975a; 14:171-175.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. IV. Number of stings in the gloves of the observer. *Behav Genet.* 1975b; 5:269-274.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. V. Number of stings in the leather ball. *J. Kans. Entom. Soc.* 1975c; 48:381-387.

Stort, AC. And Goncalves, LS. Genetics of defensive behavior II. In: *The "African" Honey Bee* (eds. Spivak, M. Fletcher, D. and Breed, M.), 1991; pp. 329-

Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa A. and Zozaya JA. The effect of Africanization on honey production, defensive behavior and size of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the Mexican high plateau. *Veterinaria Mexico*, 2003; 34:47-59.

Uribe-Rubio JL. Loci de efectos genéticos que afectan el comportamiento productivo y componentes del comportamiento defensivo de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Tesis de Maestría) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2001.

Wilson EO. Of insects and man. In "The Biology of Social Insects" (MD Breed, CD Michener and HE Evans, eds), 1982;pp1-9 Westview Press, Boulder, Col.

Winston ML. The Biology and management of Africanized honeybees. *Annu Rev Entomol.* 1992a; 37:173-193.

Winston ML. Killer Bees: The Africanized Honey in the Americas. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 1992b.

Winston ML. *The Biology of the Honeybee*. 1987. Cambridge, MA: Harvard.

CAPITULO I

COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEFENSIVO DE LAS ABEJAS AFRICANIZADAS Y EUROPEAS QUE SE ENCUENTRAN EN SU PROPIA COLONIA, PARA EL TIEMPO DE REACCIÓN Y EL NÚMERO DE AGUIJONES

Introducción

Las características defensivas de las abejas africanizadas han ocasionado problemas de salud pública, y se han reportado miles de accidentes en personas y animales (Breed *et al.*, 2004). Dadas las condiciones de hostilidad de estas abejas hacia los apicultores, se han modificado las técnicas de manejo con el fin de reducir los riesgos que representa el trabajo con estas abejas y para favorecer su explotación comercial (Winston, 1992; Guzmán-Novoa y Page, 1994a).

La protección y vigilancia de la colonia le corresponde a las “abejas guardianas” que inspeccionan a las obreras que regresan del campo así como a otros artrópodos que pretenden ingresar a la colmena. Las guardianas representan entre el 10-15% de la población y reconocen a sus hermanas por medio del olor característico de sus hidrocarburos cuticulares (Breed *et al.*, 1995). En caso de amenaza por parte de un intruso algunas permanecen en la entrada de la colmena y alertan a otras obreras de la colonia después que han liberado feromonas de alarma (Butler y Free, 1952; Ribbands, 1954; Maschwitz, 1964) y si se requiere, vuelan y pican (Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003), y pueden guiar a otras abejas hacia la fuente de estimulación debido principalmente a las señales químicas, provenientes de la secreción de estas feromonas. Las guardianas se pueden identificar a simple vista ya que adoptan una postura típica de alerta que se caracteriza por levantarse sobre sus patas traseras, colocar sus alas como si quisieran volar; interceptando e identificando a las abejas con sus antenas dirigidas hacia el frente y les permiten o no el ingreso a la colmena (Butler y Free, 1952; y Moore *et al.*, 1987).

La respuesta defensiva medida a través del aguijoneo es comúnmente empleada para la evaluación del nivel de respuesta de las colonias de abejas (Stort, 1974; 1975a,b,c; Collins y Kubasek 1982; Hunt *et al.*, 1998; Guzmán-Novoa y Page, 1999b; Uribe-Rubio 2001; Hunt *et al.*, 2003; Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2003). Varios estudios han demostrado, que la respuesta defensiva de las abejas europeas es menor a la observada en las africanizadas cuando las colonias son expuestas a estímulos defensivos que provocan la guardia, el aguijoneo y la persecución (Schneider y MacNally, 1992; Hunt *et al.*, 2003; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003; Breed *et al.*, 2004). Estudios previos han reportado que las características defensivas de las abejas africanizadas son genéticamente dominantes (Guzmán-Novoa y Page 1993,1994b; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 1998; Uribe-Rubio 2001; Guzmán-Novoa *et al.*, 2002ab) y que al parecer este comportamiento está fuertemente influenciado por efectos paternos, como fue comprobado después que se examinó el comportamiento de aguijoneo en cuatro grupos independientes de cruas recíprocas F1 (Guzmán-Novoa *et al.*, 2005). Y en ese mismo estudio también se encontró que las colonias híbridas de paternidad africana (EXA) presentaron una respuesta similar a la encontrada en las colonias parentales africanas. Aunque las colonias híbridas de paternidad europea (AXE) tuvieron respuestas intermedias en relación con la observada entre los dos grupos parentales. El aguijoneo es la parte culminante de la respuesta defensiva y es medido en pruebas de campo con base en el número de aguijones dejados en un parche de cuero en un tiempo determinado o bien con base en el tiempo que tarda la primera abeja en picar (Stort 1974, 1975a; Villa, 1988; Guzmán-Novoa y Page, 1993, 1994b; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999a, 2003; Uribe-Rubio *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Collins *et al.*, (1984), estimaron heredabilidades altas para dos características que son importantes como componentes del comportamiento defensivo. Uno de ellos fue el tiempo que tardó la primera abeja en picar (TP) un parche de cuero ($h^2=0.59$) y el segundo fue el número de aguijones (NA) depositados en el parche de cuero ($h^2=0.57$). Y en ese mismo estudio también se reportó una correlación significativa y negativa entre el TP y el

NA. Collins, (1986) realizó un programa de selección bidireccional en colonias africanizadas y después de dos generaciones observó diferencias en las dos líneas para el TP y NA, presentando poco éxito en las líneas menos defensivas que en las más defensivas, deduciendo que esto tal vez se debe a una baja frecuencia de alelos de los fenotipos menos defensivos en la población africanizada. Posteriormente Guzmán-Novoa y Page, (1993), comprobaron que la inclusión de genes europeos en las poblaciones africanizadas ayudó a reducir el comportamiento defensivo de las abejas africanizadas. Estos resultados fueron obtenidos después de realizar algunas retrocruzas y observaron que la población descendiente de reinas africanizadas apareadas con zánganos europeos fue menos defensiva que la población descendiente de la retrocruza de madre europea apareada con zánganos africanizados.

Se han diseñado modelos defensivos para explicar el desarrollo de una respuesta defensiva (Collins *et al.*, 1980; Breed *et al.*, 2004) que constan de una serie de eventos secuenciales que culminan con el aguijoneo. Los principales eventos involucran varios niveles de respuesta como serían; la alerta, el reconocimiento del tipo y magnitud de la amenaza, la activación, la atracción, persecución y el aguijoneo. Aunque el tiempo que tarda la primera abeja en picar (TP), no se consideró dentro de los niveles incluidos en estos modelos, sin duda es un componente importante en la identificación de colonias defensivas y dóciles.

Durante años se han probado diferentes métodos de campo para evaluar el comportamiento defensivo, pero hasta ahora no existe un método que por sí mismo identifique en todos los casos, el origen genético de las abejas. Una de las razones de porque esto sucede es por la alta variación defensiva exhibida por las colonias de abejas (Breed y Rogers, 1991; Collins y Rinderer, 1991; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999a, 2003), y por los factores ambientales que las afectan (Southwick y Moritz, 1987), por ello se plantea validar el uso de métodos que se apliquen de manera práctica y que sean confiables para la identificación de colonias de abejas africanizadas y europeas.

Objetivo

Comparar la respuesta defensiva de las abejas africanizadas y europeas que se encuentran en su propia colonia, para el tiempo de reacción y el número de agujijones, así como determinar su coeficiente de variación y el grado de asociación entre estas dos variables.

Materiales y Métodos

Colonias experimentales.

Las colonias fuentes estuvieron encabezadas por reinas africanizadas y europeas, estas últimas procedían de reinas importadas de Glenn Apiaries de Fallbrook California, EUA, que fueron mantenidas por inseminación instrumental en México y las reinas africanizadas procedían de enjambres capturados a los alrededores del Centro de Mejoramiento Genético, Investigación y Transferencia de Tecnología en Apicultura a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), lugar donde se realizaron los trabajos. Este se ubica en Villa Guerrero, Estado de México, localizado a los 18° 58' N y 99° 38' W y a 2160 msnm donde predomina un clima templado sub-húmedo con una precipitación pluvial de 1,242 mm y una temperatura anual promedio de 12-14°C (INEGI, 2006).

Para corroborar el origen africanizado o europeo de las colonias fuentes se emplearon métodos morfométricos (Sylvester y Rinderer, 1987) y pruebas de comportamiento (Guzmán-Novoa y Page, 1993; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

Seis colonias africanizadas y seis europeas fueron utilizadas para este experimento. A cada una de las colmenas que contenían a estas colonias se le asignó un número, su población se homogenizó a cuatro panales de cría operculada (cría en etapa de pupa), dos de alimento con miel y polen, una reina fecundada marcada y con el ala anterior derecha cortada, así como una población aproximada de 4000 abejas obreras. Las colmenas se establecieron a una

distancia de 10 m entre ellas para minimizar la participación de abejas ajenas a la colonia durante el desarrollo de las pruebas, recibiendo todas ellas un manejo similar durante el tiempo que duró el estudio. Durante 8 días consecutivos se realizó la prueba de bandera (Guzmán-Novoa *et al.*, 1994b). Las doce colonias fueron evaluadas diariamente.

Después de evaluar una colonia, se dejó un intervalo de 30 min antes de continuar con la siguiente. Las pruebas se realizaron al menos con 24 hrs de separación, en días consecutivos hasta completar 8 pruebas en cada colonia, por lo que, en total se realizaron 96 pruebas (48 en las africanizadas y 48 en las europeas). La prueba de bandera utiliza un parche de cuero de color negro suspendido en una tira de madera de (100 X 0.5 x 0.7 cm), que se agita frente a la entrada de la colmena por un tiempo determinado. Los operadores que realizaron la prueba no conocían el origen genético de las colmenas que se estaban evaluando por lo que también se evitó algún posible sesgo.

Desarrollo de la prueba

Sin utilizar humo, se seleccionó aleatoriamente una colmena y se agitó rítmicamente el parche de cuero impregnado con 5 µl de Isopentil acetato (IPA), a 5-10 cm de la entrada de la colmena y se registró el tiempo en segundos (s) que tardó la primera abeja en picar, y se continuó agitando durante 60 (s) más. El tiempo fue medido con un cronómetro de precisión (*Leonidas Trackmaster*, modelo 8042, Suiza®). Al término de este tiempo el parche, fue retirado e introducido en una bolsa de plástico debidamente identificada con la fecha, número de colmena y número de prueba correspondiente y el día que se utilizó como bloque. Para concluir la prueba, se aplicó humo a la colonia para tranquilizar a las abejas. El límite de tiempo de la prueba en colonias donde no se observó respuesta fue de 120 s. Las pruebas fueron aplicadas en forma aleatoria dentro de cada bloque (día), con la finalidad de hacer las unidades experimentales más homogéneas, para reducir la variabilidad y evitar que los efectos del tratamiento se

vieran confundidos por la posible heterogeneidad de las unidades experimentales y bajo el supuesto de independencia.

Análisis estadísticos. Se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo de bloques al azar. Con objeto de cumplir con los supuestos de normalidad los datos fueron transformados a $\log+1$ (Sahai y Ageel 2000).

El modelo utilizado fue;

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + G_j + \epsilon_{ijk}$$

Donde :

Y_{ijk} = variable medida transformada (tiempo de reacción y número de agujones) en la k -ésima observación aleatoria asociada al i -ésimo día o bloque y al j -ésimo grupo genético.

μ = media de la población

B_i = efecto del i -ésimo día o bloque ($i= 1\dots 8$)

G_j = efecto del j -ésimo genotipo ($j = \textit{Africanizado y Europeo}$)

ϵ_{ijk} = error aleatorio $\sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

El coeficiente de variación se utilizó para determinar el grado de variación de estos dos componentes en las poblaciones africanizadas y europeas. Así mismo se realizó un análisis de correlación para determinar los efectos de asociación entre el tiempo de reacción para picar y el número de agujones.

Resultados

El genotipo tuvo efectos significativos para el tiempo en que la primera abeja picó el parche de cuero ($F_{1,87} = 110.15$, $P < 0.0001$) (Cuadro 1.1). La media y el error estándar para el tiempo en el genotipo africanizado fue de 2.12 ± 0.46 s y para las europeas fue de 27.40 ± 3.37 s.

El genotipo también tuvo efectos significativos en el número de aguijones depositados por las abejas en el parche de cuero ($F_{1,87} = 228.66$, $P < 0.0001$) (Cuadro 1.1). La media y el error estándar para el genotipo africanizado fue de 88.1 ± 6.87 y para las europeas fue de 7.56 ± 3.3 (Cuadro 1.2).

El coeficiente de variación para el tiempo que tardó la primera abeja en picar fue de 58.8% y para el número de aguijones fue de 73%. Y se encontró un coeficiente de correlación negativo entre el tiempo que tardó la primera abeja en picar y el número de abejas que picaron el parche de cuero ($r = -0.51$).

Discusión

Los resultados muestran que las abejas africanizadas respondieron más rápido que las europeas, lo que apoya los resultados previos donde se compararon estos grupos genéticos (Breed *et al.*, 2004). Por ejemplo en el presente estudio encontramos que las abejas africanizadas reaccionaron 13 veces más rápido que las europeas y participaron con 11.6 veces más abejas en la respuesta de aguijoneo. De acuerdo con varios estudios, las abejas africanizadas respondieron de 4 a 10 veces más frecuentemente que las europeas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2002a, 2002b; Guzmán-Novoa y Page 1993, 1994b; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999a), similar a lo encontrado en este estudio.

Guzmán-Novoa *et al.*, (1999a) encontraron un coeficiente de variación (CV) de 73.9% y 69.8% para el tiempo que tomó la primera abeja en picar y para el número de aguijones en la prueba del parche de cuero, respectivamente. En otro estudio realizado por Guzmán-Novoa *et al.*, (2003) encontraron un CV de 90.3% y 71.8% para las mismas características; en el presente estudio se encontró un CV de 58.8% y 73%. Esto indica que tanto en aquel trabajo como en este existen porcentajes elevados de variación para estas características. Guzmán-Novoa *et al.*, (1999a, 2003) reportaron mayor variación en el tiempo promedio que una abeja tardó en picar que para el número promedio de aguijones depositados en el parche de cuero, lo cual es diferente a lo encontrado en el presente estudio,

donde el número de agujones que picaron el parche fue el que presentó mayor variación. Guzmán-Novoa y Page, (1993) reportaron que el número de abejas que picaron el parche de cuero fue más confiable para la separación de colonias defensivas de dóciles, pues encontraron que las colonias de abejas de la primera generación de abejas retro-cruzadas africanizadas que ellos produjeron en su estudio, respondieron más rápido que las europeas, pero no picaron más, quizás por esto se deba investigar más la utilidad de esta característica defensiva en la separación de colonias defensivas de dóciles. La variación de la respuesta defensiva está influida por efectos relacionados al ambiente de la colonia (Delaplane y Harbo, 1987; Southwick y Moritz, 1987) y por un gran número de variables climáticas (Southwick y Moritz, 1987) y por los efectos del grupo (Southwick y Moritz, 1985; Moritz y Bürgin, 1987).

En un estudio posterior Guzmán-Novoa *et al.*, (2004) reportaron un rango del tiempo que tardó la primera abeja en picar de 1.2 a 1.7 s, en colonias africanizadas siendo la media de 1.53 s, mientras que las colonias europeas tuvieron un rango de 7.1 a 41.6 s, siendo la media de 22.06 s; los datos promedios se compararon con los encontrados en el presente estudio y hubo similitudes en los tiempos de reacción con valores de 2.12 s y 27.4 s, respectivamente. Los datos de Guzmán-Novoa *et al.*, (2004) en cuanto al número de agujones depositados en el parche de cuero y sus valores reportados tuvieron un rango de 0 a 44 siendo un promedio el 14.6 para las europeas y un rango de 45 a 98 agujones con un promedio de 62.6 para abejas africanizadas. Esos valores se compararon con los valores promedios encontrados en el presente estudio, en el que el número de agujones depositados en el parche fue de 7.56 en las colonias europeas y de 88.1 para las colonias africanizadas, aunque al hacer el comparativo de estos resultados en forma porcentual a partir de la respuesta total, calculando el porcentaje de participación de cada genotipo se encontraron algunas diferencias (Ej: En este estudio $88.1+7.56=95.66$ total de agujones; $88.1 \times 100 / 95.66 = 92.09$ porcentaje de participación de las abejas que picaron pertenecientes a las colonias africanizadas y $7.56 \times 100 / 95.66 = 7.90$ porcentajes de

participación de las abejas que picaron pertenecientes a las colonias europeas: En el estudio de Guzmán-Novoa *et al.*, (2004) $62.6+14.6=77.2$ total de aguijones; $62.6 \times 100 / 77.2 = 81.08$ porcentaje de participación de las abejas que picaron pertenecientes a las colonias africanizadas y $14.6 \times 100 / 77.2 = 18.91$ porcentajes de participación de las abejas que picaron pertenecientes a las colonias europeas) y no se encontraron diferencias para el tiempo que tardó la primera abeja en picar. Concluyendo que las diferencias en el porcentaje de participación de las abejas africanizadas y europeas para el tiempo que tardó la primera abeja en picar fueron muy similares en ambos estudios, cosa que no ocurrió para el número de aguijones en el parche de cuero, donde hubo una mayor distinción de la participación para aguijonear por parte de las colonias africanizadas que de las europeas, lo que podría estar sugiriendo que la característica defensiva medida por el tiempo que tarda en picar la primer abeja es una buena opción para separar colonias defensivas y dóciles.

Estudios previos (Collins *et al.*, 1984; Guzmán-Novoa y Page, 1993, 1994b) han encontrado correlaciones fenotípicas entre el tiempo que tarda la primera abeja en picar y el número de aguijones dejados por las abejas en un parche de cuero ($r = \square 0.48$ y $r = \square 0.79$ respectivamente). Los resultados del presente estudio coinciden más con los resultados de Collins *et al.*, (1984; $r = \square 0.51$), lo cual sugiere que el empleo de estos dos componentes podrían ser utilizados como características de diagnóstico, para la distinción de genotipos africanizados y europeos o defensivos y dóciles. Además Collins *et al.*, (1984) estimaron heredabilidades de 0.59 y 0.57 para TP y para NA respectivamente, lo cual expresa la confiabilidad del valor fenotípico de estas características (Falconer, 1985).

Los resultados del presente estudio demostraron que las abejas del genotipo africanizado tienen umbrales de reacción más bajos, por ello respondieron más rápido y con mayor número de aguijones ante un estímulo similar al presentado en las colonias europeas. La menor variación en el tiempo de respuesta, nos sugiere que esta característica pudiera ser más confiable en la separación de colonias dóciles y defensivas, ya que el número de aguijones, tuvo un mayor

grado de variación. Así mismo la correlación fenotípica negativa encontrada entre estas dos características también nos permite sugerir que su inclusión en un plan de selección podría ayudar a separar colonias dóciles y defensivas. Collins *et al.*, (1984) propuso que la correlación entre el tiempo de reacción y el número de agujones es genético. Sin embargo sus métodos fueron insuficientes para demostrar efectos de pleiotropía debido a que los zánganos que se utilizaron como los padres en su esquema de cruzamientos venían de poblaciones con características de comportamiento y genético distintas al compararse con aquellas de la población original. Siendo posible que el tiempo de reacción y el número de agujones covarien genéticamente, pero también es factible que ambas características hayan sido seleccionadas independientemente y de este modo, estén afectadas por diferentes genes (Falconer, 1985). Los resultados del presente estudio deben ser tomados con precaución debido a que el tiempo de ejecución de las pruebas pudo no ser tan amplio, pues se eligió realizar una prueba al menos cada 24 h (Guzmán-Novoa *et al.*, 2003, 2004) bajo el supuesto de no crear dependencia entre una y otra. Aunque los resultados fueron claros y no se observaron incrementos ni decrementos importantes en los niveles de respuesta esperados de las colonias europeas y africanizadas a pesar del intervalo empleado en la aplicación de las repeticiones.

Cuadro 1.1. Análisis de varianza para el tiempo (s) que tardó la primera abeja en picar y el número de agujones dejados en el parche de cuero en colonias africanizadas y europeas que se encuentran en su propio ambiente.

Cuadrados Medios							
Fuente de Variación	gl	Tiempo	F	P	Agujones	F	P
Bloque (día)	7	0.4768	0.61	0.7453	1.3018	0.97	0.4552
Genotipo	1	85.9507	110.15	<0.0001	305.5328	228.66	<0.0.001
Error	87	0.7803			1.3361		

Los datos fueron transformados a logaritmo +1 ya que no eran homocedásticos.

Cuadro 1.2. Media y error estándar para el tiempo (s) que tardó la primera abeja en picar y el número de agujones dejados en el parche de cuero en colonias africanizadas y europeas que se encuentran en su propio ambiente.

Genotipo	n	Tiempo	Agujones
		media ± ee	media ± ee
Africanizado	46	2.12 ± 0.46a	88.1 ± 6.87a
Europeo	46	27.4 ± 3.37b	7.56 ± 3.3b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.0001$) basadas en el análisis de varianza y diferencia de medias por medio de pruebas Tukey, con datos transformados a logaritmo +1. Las comparaciones solo son válidas dentro de la misma columna. Las medias ± errores estándar son valores reales no transformados.

Lista de Referencias

Arechavaleta-Velasco ME and Hunt GJ. Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie* 2003; 34:439-447.

Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ, Emore C. Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bee. *Behav Genet* 2003; 33:357-364.

Breed MD, and Rogers KB. The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 1991; 21:295-303.

Breed MD, Gary MF, Pearce AN, Bjostad L, Hibbard B, Page RE. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Anim Behav.* 1995;50:489-496.

Breed MD, Guzmán-Novoa E and Hunt GJ. Defensive Behavior of Honey Bees: Organization, Genetics, and Comparisons with other Bees. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:271-298.

Butler CG and Free JB. The Behavior of worker honeybees at the hive entrance. *Behavior.* 1952; 4: 263-292.

Collins AM, Rinderer TE, Toker KW, Sylvester HA and Lockett JJ. A Model of Honeybee Defensive Behaviour. *J Apic Res* 1980; 19(4):224-231.

Collins AM and Kubasek KJ. Field test of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1982; 75:383-387.

Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Brown MA. Heritabilities and correlation for several characteristics in the honey bee. *J Hered* 1984; 75:135-140.

Collins AM. Bidirectional selection for colony defense in Africanized honey bees. *Am Bee J.* 1986;126:827-828.

Collins AM, Rinderer TE. Genetics of defensive behavior I. In : Spivak, M., Fletcher JDC; Breed, MD (Eds), 1991. The "African Honey Bee. Westview, Boulder, CO, pp. 309-328..

Delaplane KS , Harbo JR. Effect of queenlessness on worker survival, honey gain and defence behavior in honeybees. J Apic Res. 1987; 26(1):37-42

DeGrandi-Hoffman G, Collins AM, Martin JH, Schmidt JO, Spangler HG. Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera:Apidae). J. Insect Behav. 1998; 11:37-45.

Falconer DS. Introduction to quantitative genetics, 2nd edn. Longman, New York. 1985.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Backcrossing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) queens to European drones reduces colony defensive behavior. Ann Entomol Soc Amer. 1993; 86(3):352-355.

Guzmán-Novoa E y Page RE. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. Am Bee J; 1994a:101-106.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Genetic dominance and worker interactions affect honey bee colony defense. Behav Ecol 1994b; 5:91-97.

Guzmán-Novoa E, Page RE, J, Spangler HG and Erickson EH. A comparison of two assays to test the defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*), J. Apicult. Res 1999a; 38:205-209.

Guzmán-Novoa E, and Page RE Jr. Selective breeding of honey bees (Hymenoptera:Apidae) in Africanized areas. J. Econ. Entomol. 1999b; 92:521-525.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe JL, Smith C, Arechavaleta- Velasco, ME. Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honey bee defensive behavior: Results of colony and individual behavioral assays. Behav. Genet 2002a; 32:95-102.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Page, Fondrk. MK. Genetic correlations among honey bee (Hymenoptera Apidae) behavioral characteristics and wing length Ann. Entomol. Soc. Am. 2002b; 95:402-406.

Guzmán-Novoa E, Prieto- Merlos D, Uribe-Rubio JL, and Hunt, GJ. Relative reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*) J Apic Res 2003;42:-46.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. 2004;Apidologie 35:15-24.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Page RE Jr, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D, and Becerra-Guzman F. Paternal Effects on the Defensive Behavior of Honeybees. J. Hered. 2005; 96(4):376-380.

Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Fondrk MK and Page RE. Quantitative trait loci for honey bee stinging behavior and body size. Genetics 1998;21:1203-1213.

Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotype-environment interactions in honey bee guarding behavior. Anim Behav 2003b; 66:459-467.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México (DF): INEGI (2006).

Maschwitz UW. Alarm substances and alarm behavior in social hymenoptera. Nature 1964; 204:324-327.

Moore AJ, Breed MD, Moor MJ. Characterization of guard behavior in honeybees, *Apis mellifera*. Anim Behav 1987; 35:1159-1167.

Moritz RFA, Bürgin H. Group response to alarm pheromone in social wasps and honeybee. Ethology. 1985;76:15-26

Ribbands CR. The defense of the honeybee community. Proc R Soc London B 1954; 142:514-524.

Schneider SS, McNally LC. Colony defense in the African honey bee in Africa (Hymenoptera: Apidae). *Environ Entomol.* 1992; 21:1362-1370.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. I. Some tests to measure aggressiveness. *J. Apic. Res.* 1974; 13:33-38.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. II. Time at which the first sting reached the leather ball. *J. Apic. Res.* 1975a; 14:171-175.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. IV. Number of stings in the gloves of the observer. *Behav Genet.* 1975b; 5:269-274.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. V. Number of stings in the leather ball. *J. Kans. Entom. Soc.* 1975c; 48:381-387.

Sahai H, Ageel MI. *The Analysis of Variance: fixed, random and mixed models*: Birkhäuser, 2000, Boston, USA.

Southwick EE, Moritz RFA. Effects of meteorological factors on defensive behavior of honey bee. *Int. J. Biometeorol* 1987;31:259-265.

Southwick EE, Moritz RFA. Metabolic response to alarm pheromone in honeybees. *J of Insect Phys* 1985;31(5):389-392.

Sylvester H and Rinderer TE. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. *Am. Bee J.* 1987; 127:511-516.

Uribe-Rubio JL. Loci de efectos genéticos que afectan el comportamiento productivo y componentes del comportamiento defensivo de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Tesis de Maestría) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2001.

Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa A. and Zozaya JA. The effect of Africanization on honey production, defensive behavior and size of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the Mexican high plateau. *Veterinaria Mexico*, 2003; 34:47-59.

Winston ML. The Biology and management of Africanized honeybees. *Annu Rev Entomol.* 1992a; 37:173-193.

Villa JD. Defensive behavior of Africanized and European honeybees at two elevations in Colombia. *J. Apic. Res.* 1988;27:141-145.

CAPITULO II

COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEFENSIVO DE LAS ABEJAS AFRICANIZADAS Y EUROPEAS QUE SE ENCUENTRAN EN SU PROPIA COLONIA, PARA EL NÚMERO DE ABEJAS QUE RESPONDEN AL ISOPENTIL ACETATO Y QUE PERSIGUEN A LOS OPERADORES.

Introducción

La organización social de las colonias de abejas está influenciada por señales químicas que son activamente producidas y transmitidas por las reinas, las obreras adultas y por las crías (Slessor *et al.*, 2005). Una mezcla de sustancias son liberadas de la glándula de Koshewnikov del aparato del aguijón de las abejas obreras en el momento de picar (Grandperrin y Cassier, 1983) y son volatizadas sobre la membrana cetácea (Lensky *et al.*, 1994). De los 40 componentes reconocidos, más de 30 son muy volátiles y pueden estar involucrados en la respuesta de alarma de la colonia. El isopentil acetato (IPA) se ha encontrado como el principal componente de la feromona de alarma y por ser el compuesto responsable de la liberación del comportamiento de aguijoneo de las abejas (Boch *et al.*, 1962). Recientemente Hunt *et al.*, (2003b), descubrieron un nuevo componente de la feromona de alarma (3-methyl-2-buten-1-yl acetate) en el aparato del aguijón de las abejas africanizadas que tiene efectos similares a los del IPA.

El comportamiento defensivo consiste de varios patrones de conducta de las abejas como son, la guardia, la persecución y el aguijoneo (Breed *et al.*, 2004). Estos se originan en las cercanías del nido; la defensa del nido involucra entonces la respuesta de la colonia a los efectos del IPA por parte de las abejas guardianas. El sistema primario de protección de la colonia está encabezado por las guardianas que se encuentran a la entrada de la colmena y varios estudios han enfatizado el papel de las guardianas en la respuesta del aguijoneo (Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003; Hunt, 2007). Solo un 10% de las abejas de una colonia

realizan tareas de guardia en algún momento de su vida (Hunt *et al.*, 2003a; Moore y Moor, 1987). Estos individuos especializados en la defensa se encargan de vigilar la entrada del nido, inspeccionando a las abejas o a otros artrópodos que quieran entrar. Las guardianas mantienen una postura típica de alerta por lo que son fácilmente reconocibles (Ribbands, 1954; Moore *et al.*, 1987). Las colonias con obreras que hacen guardia por periodos más largos que solo un día o varios días (Breed *et al.*, 1988), presentan mayores niveles de respuesta de aguijoneo que las colonias con guardianas menos persistentes (Breed y Rogers, 1991; Hunt *et al.*, 2003a) Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003) reportaron una correlación entre el número de abejas a la entrada de la colmena y la respuesta de aguijoneo de la colonia.

Las defensoras no guardianas (persecutoras y aguijoneadoras) comprenden un grupo de abejas involucradas en la defensa de la colonia (Breed, 1991; Cunard y Breed, 1998). Estas pueden ser diferenciadas de las guardianas y las pecoreadoras por el desgaste de sus alas, aunque no existe suficiente evidencia para concluir que las persecutoras y las aguijoneadoras sean grupos defensores especializados distintos. Breed, (1991) estimó que cerca del 10% de las abejas de una colonia europea podrían estar involucradas en una respuesta de aguijoneo y quizás por eso podría considerarse como una tarea especializada. Aunque en las colonias africanizadas la participación de las abejas que pican al intruso podría ser mayor al 50% (Diaz-Sánchez *et al.*, 1998; Schumacher y Egen, 1995) y por lo tanto este nivel de aguijoneo no podría ser considerado como especialización de la abejas (Breed *et al.*, 2004). Las abejas que atacan, persiguen y pican se denominan abeja soldado, pero no se consideran como abejas especializadas al menos en las colonias africanizadas (Breed *et al.*, 2004). Cunard y Breed, (1998) encontraron que el 25% de las abejas europeas que han perdido su aguijón después de picar continúan persiguiendo y hostigando a los intrusos y a esto le llamaron como valor residual de la defensa.

Las pruebas de campo son comúnmente utilizadas para evaluar el comportamiento defensivo de las abejas; estas incluyen el uso de objetos en

movimiento normalmente hechos de piel (Stort, 1974; Collins y Kubasek, 1982; Villa, 1988; Guzmán-Novoa y Page, 1993, 1994; Uribe-Rubio et al., 2003) o de plástico (Spangler *et al.*, 1990) que son presentados a las abejas para estimularlas a picar. En otras pruebas se han utilizado productos químicos para medir la respuesta defensiva, contabilizándose el número de abejas que son atraídas a la entrada de la colmena (Boch *et al.*, 1962; Collins y Kubasek, 1982; Breed y Rogers, 1991).

Guzmán-Novoa *et al.*, (2003), compararon la confiabilidad de cuatro métodos para evaluar el comportamiento defensivo de las colonias de abejas. Las pruebas utilizadas fueron la de apreciación, que asigna un valor numérico a cuatro características de las abejas de la colonia como son, volar al exterior, chocar y picar al manejador, correr sobre los panales y la persecución a 25 y 50 m. El segundo método fue el de la feromona de alarma (isopentil acetato, IPA), que mide el nivel de respuesta de una colonia por medio de la atracción de abejas del interior hacia la fuente de estimulación. El tercer método fue medir el número de agujones depositados en un parche de cuero agitado sobre la cámara de cría y el cuarto consistió en el uso de una pequeña caja acrílica colocada a la entrada de la colmena para medir el número de veces que abejas confinadas en un espacio determinado picaban. El método de apreciación fue el mejor para separar los grupos dóciles de los defensivos, aunque el componente de persecución fue el mejor dentro de este método; y en segundo lugar resultó el IPA para la separación de los grupos defensivos y los dóciles, por lo que fue validado en el presente estudio.

Hay pocos estudios que hayan evaluado el componente defensivo de persecución (Stort 1974; Spivak, 1991; Prieto-Merlos, 2002; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003). Estudios previos han reportado que las abejas africanizadas mantienen un perímetro defensivo alrededor de la colonia mayor al que presentan las europeas. El inicio de los ataques se puede iniciar a cortas distancias de la colmena extendiéndose la persecución al menos a 50 m, incluso pueden perseguir a un intruso por varios kilómetros (Spivak, 1991).

La utilización y perfeccionamiento de métodos prácticos y económicos para la valoración del comportamiento defensivo es importante cuando se desea disminuir los accidentes ocasionados en personas y animales. La identificación de grupos genéticos por medio de pruebas de campo es también importante para fines de regulación y certificación de origen en las explotaciones apícolas encargadas de la crianza y reproducción de material genético. Por ello se requieren técnicas de campo que ofrezcan una elevada confiabilidad para la separación de colonias defensivas y dóciles, y que además puedan ser útiles para fines de investigación. La identificación de genotipos africanizados y europeos por medio de la evaluación de la respuesta de las colonias de abejas al IPA y la persecución de los operadores de las colmenas, es importante para la detección y selección de colonias con los menores y mayores umbrales de reacción para que puedan ser incorporadas dentro de un plan de selección.

Objetivo

El objetivo de este experimento fue comparar el número de abejas que responden al isopentil acetato y el número de abejas que persiguen a los operadores a 25 m en colonias africanizadas y europeas. Así como determinar el grado de asociación de estas características.

Materiales y Métodos

Colonias de origen y área de estudio

Las colonias de origen estuvieron encabezadas por reinas africanizadas y europeas estas últimas procedían de reinas importadas de Glenn Apiaries de Fallbrook California , EUA, que fueron mantenidas por inseminación instrumental en México y las reinas africanizadas procedían de enjambres capturados a los alrededores del Centro de Mejoramiento Genético, Investigación y Transferencia

de Tecnología en Apicultura a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Forestales (INIFAP), lugar donde se realizaron los trabajos. Este se ubica en Villa Guerrero, Estado de México, localizado a los 18° 58' N y 99° 38' W y a 2160 msnm donde predomina un clima templado sub-húmedo con una precipitación pluvial de 1,242 mm y una temperatura anual promedio de 12-14°C (INEGI, 2006).

Para corroborar el origen africanizado o europeo de las colonias de origen se emplearon métodos morfométricos (Sylvester y Rinderer, 1987) y pruebas de comportamiento (Guzmán-Novoa y Page, 1993; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

Tres colonias africanizadas y tres europeas fueron utilizadas para este experimento. A cada una de las colmenas que contenían a estas colonias se le asignó un número y su población se homogenizó a cuatro panales de cría operculada (cría en su etapa de pupa), dos de alimento con miel y polen, una reina inseminada marcada con una placa de plástico y numerada (Graze, KG, Weinstadt, Alemania®) y a la cual se le cortó un tercio del ala anterior derecha, para evitar que volara. Al final de la homogenización cada colonia tenía una población aproximada de 4000 abejas obreras adultas. Las colmenas se establecieron a una distancia de 10 m entre ellas para minimizar la participación de abejas ajenas a la colonia durante la realización de las pruebas defensivas, recibiendo todas ellas un manejo similar durante el tiempo que duró el estudio. Cuarenta y cinco días después de la instalación de las colonias experimentales y habiéndose realizado el ajuste de la población y la cría, se realizaron las pruebas para evaluar el comportamiento defensivo utilizando IPA (Collins y Kubasek, 1982; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003). Las pruebas se realizaron durante 9 días consecutivos. En las seis colonias (3 africanizadas y 3 europeas) experimentales se realizaron dos tipos de prueba por día: reacción al IPA y persecución de los operadores, por lo que se hicieron 12 pruebas por día y en total se realizaron 108 (9x12): *Pruebas de IPA*; 27 en las africanizadas y 27 en las europeas: *Prueba de persecución*: 27 en las africanizadas y 27 en las europeas. Se realizó una prueba cada 30 min hasta completar las doce pruebas. Primero se realizaron las pruebas

de IPA y después las de persecución. Las pruebas fueron aplicadas en forma aleatoria dentro de cada bloque (día), con la finalidad de hacer las unidades experimentales más homogéneas, para reducir la variabilidad y evitar que los efectos del tratamiento se vieran confundidos por la posible heterogeneidad de las unidades experimentales y bajo el supuesto de independencia.

Respuesta al Isopentil acetato (IPA)

Esta se midió como la diferencia en el número de abejas que respondieron en 20 s, al IPA a la entrada de cada colmena en dos fotografías. La metodología propuesta por Collins y Kubasek, (1982) y Guzmán-Novoa *et al.*, (2003) fue modificada mediante la utilización de una tira de madera de 50 cm de largo x 1 cm de diámetro que llevaba fijo en uno de sus extremos un tubo capilar de 75 mm de largo herméticamente cerrado conteniendo 5 µl de IPA, (*Lab. SIGMA®*), envuelto por un papel filtro de 2 x 2 cm. La prueba se desarrollo como sigue: sin utilizar humo, el bastón se colocó a 0.5 cm frente a la entrada de la colmena y se tomó una fotografía con una cámara digital para registrar el número de abejas presentes en ese momento; enseguida, se retiró el bastón y con la ayuda de una pinza se rompió el tubo capilar para liberar el IPA que impregnó el papel filtro e inmediatamente se colocó en la entrada de la colmena por 20 s, después del cual se tomó una segunda fotografía. La colmena se ahumó y se dio por terminada la prueba. Esto se hizo hasta terminar las pruebas en todas las colmenas.

Las fotografías fueron almacenadas en una contadora y con la ayuda del editor de imágenes se realizó el conteo, el cursor sirvió para señalar y marcar con una pequeña línea (3 mm aproximadamente) de color las abejas que se encontraban en la imagen. Cada 50 abejas contadas o menos se cambiaba de color, de esa manera no existió confusión en el conteo. El número de abejas contadas antes y después del uso del IPA fueron registradas con la fecha de realización de la prueba. El registro se dividió en cinco columnas: la primera indicaba el origen de la colonia (africanizada o europea), la segunda el número de la colonia o réplica (1,2

o 3), la tercera el número de abejas antes de la exposición a la IPA (primera fotografía), la cuarta indicaba el número de abejas después de 20 s de exposición al IPA (segunda fotografía) y en la quinta se calculó la diferencia en el número de abejas contadas antes y después del uso del IPA. Esta diferencia se utilizó para determinar la magnitud de la respuesta defensiva de las colonias.

Persecución del operador de las colmenas

Para evaluar la respuesta de persecución de los dos operadores por parte de las abejas, se siguió la metodología propuesta por Guzmán-Novoa *et al.*, (2003, 2004). La prueba consiste en emular una revisión rutinaria de la colmena, y se desarrollo como sigue: Se aplicaron dos bocanadas ligeras de humo por la entrada de una de las colmenas, inmediatamente después se retiraron las tapas que protegen la colmena y se aplicó una bocanada más de humo, y se extrajeron uno por uno 2 bastidores del interior de la colmena e inmediatamente se retornaron al interior de la colmena y se cerraron sin aplicar más humo; los operadores se alejaron caminando a 25 m de la colmena en una dirección previamente determinada. Cada uno de los operadores se colocó uno enfrente del otro a una distancia de 3 metros, y en base a una apreciación visual se contaron mutuamente el número de abejas que los persiguieron y volaban a su alrededor y se registró ese valor. Al término de cada prueba la colonia fue tranquilizada con humo. Esto se repitió hasta terminar las pruebas en todas las colonias.

Análisis estadísticos. Se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo de bloques al azar. Con objeto de cumplir con los supuestos de normalidad los datos se transformaron a log+1 (Sahai y Ageel, 2000).

El modelo utilizado para el Diseño de Bloques al Azar fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + G_j + \epsilon_{ijk}$$

Donde :

Y_{ijk} = variable medida transformada (reclutamiento o persecución) en la k -ésima observación aleatoria asociada al i -ésimo bloque o día y al j -ésimo grupo genético.

μ = media de la población

B_i = efecto del i -ésimo bloque o día ($i= 1...9$)

G_j = efecto del j -ésimo genotipo ($j = Africanizado y Europeo$)

ϵ_{ijk} = error aleatorio \sim NID ($0, \sigma^2$)

Se realizó un análisis de correlación para determinar los efectos de asociación entre la respuesta al IPA y la persecución a los operadores.

Resultados

El análisis de varianza mostró que el genotipo tuvo un efecto significativo sobre el número de abejas que respondieron al IPA ($F_{1,44} = 61.92$, $P < 0.0001$; Cuadro 2.1). La media \pm error estándar en respuesta al IPA para el genotipo africanizado fue de 113.85 ± 10.13 y para el europeo de 30.81 ± 7.38 ($P < 0.0001$, Cuadro 2.2). En otros resultados el genotipo si influyó sobre la persecución de las abejas a los operadores ($F_{1,44} = 137.89$, $P < 0.0001$; Cuadro 2.1). La media \pm error estándar para la persecución de las abejas a los operadores a 25 m fue de 25.48 ± 1.94 y 2.14 ± 1.94 para abejas africanizadas y europeas, respectivamente ($P < 0.0001$; Cuadro 2.2). La correlación de Pearson para el número de abejas que respondieron al IPA y el número de abejas que persiguieron a los operadores fue significativa ($r = 0.58$).

Discusión

Existen pocos estudios que hayan evaluado el número de abejas que responden al IPA (Collins y Kubasek, 1982; Breed y Rogers, 1991; Quezada-Euan y Paxton, 1998; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003). Los resultados de Guzmán-Novoa *et al.*, (2003) y Hunt *et al.*, (2003b), coinciden con lo encontrado en el presente estudio, ya que la respuesta al IPA, permitió distinguir estadísticamente la respuesta de las

colonias africanizadas de las europeas. En el presente estudio se encontró que las colonias de abejas africanizadas respondieron con 3.7 veces más abejas que las colonias europeas después de haber sido expuestas al IPA, así como que las colonias africanizadas respondieron persiguiendo con 12 veces más abejas que las que respondieron en las colonias europeas.

De acuerdo con Breed *et al.*, (1988) existe una fuerte correlación entre la guardia y el comportamiento de aguijoneo a nivel de colonia. Más guardianas significan mayores probabilidades de detectar a los intrusos y por lo tanto responderán en mayor cantidad. En el presente estudio las colonias africanizadas reclutaron (más guardia) y persiguieron con mayor cantidad de abejas que las europeas, por lo que hipotéticamente responderían con un mayor número de abejas en una respuesta de aguijoneo. Esta suposición también está basada en lo reportado por Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003) que encontraron que las colonias con mayor cantidad de abejas realizando guardia también fueron las que picaron más en pruebas de campo. Los resultados del presente estudio confirmaron que la respuesta al IPA y la persecución tuvieron una correlación significativa, que se traduce en que las colonias con mayor número de abejas que respondieron a la IPA, también persiguieron más a los 25 m. Por lo que al parecer las colonias con abejas que presentaron mayor respuesta a la exposición del IPA y que también persiguieron más a los intrusos, podrían tener mayor oportunidad para aguijonear a los operadores.

En un estudio realizado por Guzmán-Novoa *et al.*, (2004), reportaron un rango de 139 a 244 para el número de abejas africanizadas que respondieron al IPA, siendo la media de 174; mientras que las europeas tuvieron un rango de 29 a 150 siendo la media de 73. Para el número de abejas que persiguieron las africanizadas reportaron un rango de 43 a 47 abejas en ambientes compartidos, siendo la media de 44.3; mientras que las europeas tuvieron un rango de 0 a 6 siendo la media de 2.3.

En el presente estudio encontramos que las abejas de las colonias africanizadas tuvieron un promedio de 113.85 abejas que respondieron al IPA; mientras que las

abejas de las colonias europeas respondieron con una media de 30.81. Y para el componente de persecución en las colonias africanizadas se presentó una media de 25.48, mientras que en las colonias europeas una media de 2.14. De este modo al comparar las medias de los dos estudios anteriores y transformarlos a porcentaje de participación de las abejas africanizadas y las europeas se encontró una proporción de 70:30 respectivamente en el estudio de Guzmán-Novoa *et al.*, (2004) y de 80:20 respectivamente en el presente estudio. Para el número de abejas que persiguieron al operador en el estudio de Guzmán-Novoa *et al.*, (2004) se encontró una proporción de 95:5 para africanizadas y europeas respectivamente, y en el presente estudio se encontró una proporción de 91:9 para africanizadas y europeas respectivamente. De esta comparación de resultados se puede concluir que se encontraron resultados muy similares de participación de las abejas en estas dos características defensivas. Por lo que se puede recomendar su uso para la identificación de estos dos grupos genéticos, pues estas pruebas se realizaron en poblaciones independientes a las utilizadas en estudios previos. En otros estudios también se ha demostrado que las abejas africanizadas persiguen a los intrusos con 10 a 30 veces más abejas que las abejas europeas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2003; Prieto-Merlos, 2002; Stort y Goncalves, 1991), lo cual fue confirmado en el presente estudio, pues las abejas africanizadas persiguieron a los operadores con 12 veces más abejas que las europeas.

Estas características defensivas parecen encontrarse dentro del modelo de umbrales de reacción que señala que las obreras tienen umbrales internos para responder a estímulos relacionados a trabajos específicos, es decir que las tareas son realizadas en respuesta a un estímulo específico y que una obrera realiza un trabajo cuando un estímulo excede su umbral interno. El modelo propuesto por Robinson y Page, (1989) supone que las diferencias genotípicas son responsables de la mayor parte de la variación en la respuesta defensiva. En el presente estudio, las diferencias en las dos características defensivas analizadas fueron significativamente influenciadas por el genotipo, ya que las abejas africanizadas

respondieron con mayor cantidad de abejas a un estímulo olfativo (IPA) y persiguieron a un operador con la mayor cantidad de abejas que las colonias europeas.

La correlación fenotípica positiva y significativa encontrada en el presente trabajo, podría indicar que la asociación de estos dos componentes es útil como herramienta diagnóstica. Sin embargo debido a la naturaleza de las colonias (de reinas de apareamiento natural, con líneas paternas desconocidas) que se utilizaron es insuficiente para demostrar efectos de pleiotropía, aunque también es posible que ambas características hayan sido seleccionadas independientemente, y de este modo estén afectadas por diferentes genes (Falconer, 1985). La confirmación de que las colonias africanizadas responden en mayor cantidad ante un estímulo defensivo como fue el IPA y que persiguen a los operadores de las colonias en mayor número que las europeas, así como el coeficiente de correlación encontrados en este estudio apoyan la recomendación para que estas características sean incluidas como pruebas diagnósticas para medir el comportamiento defensivo de las colonias de abejas. Los resultados del presente estudio deben ser tomados con precaución debido a que el tiempo de ejecución de las pruebas pudo no ser tan amplio, pues se eligió realizar una prueba al menos cada 24 h (Guzmán-Novoa *et al.*, 2003, 2004) bajo el supuesto de no crear dependencia entre una y otra. Aunque, los resultados fueron claros y no se observaron incrementos ni decrementos importantes en los niveles de respuesta observados de las colonias europeas y africanizadas a pesar del intervalo empleado en la aplicación de las repeticiones y del número de colonias empleadas en el experimento.

Cuadro 2.1. Análisis de varianza para el número de abejas que respondieron al uso del Isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y para el número de abejas que persiguieron al manejador de la colmena a 25 m, en colonias de abejas africanizadas y europeas que se encontraban en su propio ambiente.

Cuadrados Medios							
Fuente de							
Variación	gl	Reclutamiento	F	P	Persecución	F	P
Bloque (día)	8	2.3713	3.02	0.0086	1.0778	2.02	0.0661
Genotipo	1	48.6343	61.92	<0.0001	73.5831	137.89	<0.0001
Error	44	0.7856			0.5336		

Los datos fueron transformados a logaritmo +1 ya que no eran homocedásticos.

Cuadro 2.2. Medias y error estándar para el número de abejas que respondieron al uso del Isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y para el número de abejas que persiguieron al manejador de la colmena a 25 m en colonias de abejas africanizadas y europeas que se encontraban en su propio ambiente.

Genotipo	n	Reclutadas	Persecutoras
		media \pm ee	media \pm ee
Africanizado	27	113.85 \pm 10.13a	25.48 \pm 2.75a
Europeo	27	30.81 \pm 7.32b	2.14 \pm 0.66b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.0001$) basadas en análisis de varianza y por comparación múltiple de Tukey. Los datos fueron transformados a logaritmo +1 para normalizarlos. Las comparaciones solo son válidas dentro de la misma columna. Las medias \pm errores estándar son valores reales no transformados.

Lista de Referencias

Arechavaleta-Velasco ME and Hunt GJ. Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie* 2003; 34:439-447.

Breed MD. Defensive behavior. (Spivak M., Fletcher DJC, Breed MD, eds). 1991. The "African" Honey Bee, Boulder CO:Westview. pp 299-308.

Breed MD, Guzmán-Novoa E and Hunt GJ. Defensive Behavior of Honey Bees: Organization, Genetics, and Comparisons with other Bees. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:271-298.

Breed MD, Rogers KB, Hunley JA and Moore AJ. A correlation between guard behavior and defensive response in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim. Behav.* 1988; 37:515-516.

Breed MD, and Rogers KB. The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 1991; 21:295-303.

Boch R, Shearer DA, Stone BC. Identification of Isoamyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. *Nature*. 1962;195:1018-1020.

Collins AM and Kubasek KJ. Field test of honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1982; 75:383-387.

Cunard SJ, Breed MD. Post-stinging of worker honey bees (Hymenoptera:Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am* 1998;91:754-757.

Díaz-Sánchez CL, Lifshitz-Guinzberg A, Ignacio-Ibarra G, Halabe-Cherem J, Quiñones-Galván A. Survival after massive Africanized honey bee stings. *Arch. Int. Med* 1998; 158:925-927.

Falconer DS. Introduction to quantitative genetics, 2nd edn. Longman, New York. 1985.

Grandperrin D and Cassier P. Sting alarm pheromones of the honey bee, *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae) *Int. J Insect Morph Embryol.* 1983;12:25-42.

Guzmán-Novoa E, Prieto- Merlos D, Uribe-Rubio JL, and Hunt, GJ. Relative reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*) J Apic Res 2003;42:-46.

Guzmán-Novoa e, Hunt GJ, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. 2004;Apidologie 35:15-24.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Backcrossing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) queens to European drones reduces colony defensive behavior. Ann Entomol Soc Amer. 1993; 86(3):352-355.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Genetic dominance and worker interactions affect honey bee colony defense. Behav Ecol 1994; 5:91-97.

Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotype-environment interactions in honey bee guarding behavior. Anim Behav 2003a; 66:459-467.

Hunt GJ, Wood KV, Guzmán-Novoa E, Lee HD, Rothwell AP and Bonham CC. Discovery of 3-methyl-2-buten-1-yl acetate, a new alarm component in the sting apparatus of Africanized honeybees. J of Chem Ecol 2003b;29(2);453-463.

Hunt GJ. Flight and Fight: A comparative view of the neurophysiology and genetics of honey bee defensive behavior. Jour Insec Physiol 2007. Doi:10.1016/j.jinsphys. 0.01.010.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México (DF): INEGI 2006.

Lensky Y, Cassier P and Tel-Zur E. The setaceous membrane of honey bee (*Apis mellifera* L) workers' sting apparatus: structure and alarm pheromone distribution. 1994. J. Insect Physiol. 1994;41:589-595.

Moore AJ, Breed MD, Moor MJ. Characterization of guard behavior in honeybees, *Apis mellifera*. Anim Behav 1987; 35:1159-1167.

Quezada-Euán JJG, Paxton RJ. Rapid intergenerational changes in morphology and behavior in colonies of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) from tropical Yucatan, México. J Apic Res 1998; 38:93-104.

Prieto-Merlos D. Confiabilidad de pruebas y método para evaluar el comportamiento defensivo y el tamaño corporal en tres genotipos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2002. México DF.

Ribbands CR. The defense of the honeybee community. Proc R Soc London B 1954; 142:514-524.

Robinson GE, Page REJ. Genetic basis for division of labor in an insect society. In *The Genetics of Social Evolution*, ed. MD Breed, REJ, 1989. pp. 61-80. Boulder, CO:Westview.

Sahai H, Ageel MI. *The Analysis of Variance:fixed, random and mixed models*: Birkhäuser, 2000, Boston, USA.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. I. Some tests to measure aggressiveness. J. Apic. Res. 1974; 13:33-38.

Stort, AC. And Goncalves, LS. Genetics of defensive behavior II. In: *The "African" Honey Bee* (eds. Spivak, M. Fletcher, D. and Breed, M.), 1991; pp. 329-356. Boulder, CO: Westview Press.

Spivak M. *The "African" Honey Bee* (eds. Spivak, M. Fletcher, D. and Breed, M.), 1991; Boulder, CO: Westview Press.

Slessor KN, Winston ML, Le Conte Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.) J of Chem Ecol 2005; 31:2731-2745.

Spangler HG, Schmidt JO, Thoenes SC, Erickson EH. Automated testing of the temperament of Africanized honey bees – a progress report. Am Bee Jour 1990;130:731-733.

Schumacher M, Egen NB. Significance of Africanized bees for public health. A review. Arch Int. Med. 1995;155:2038-2043.

Sylvester H and Rinderer TE. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. Am. Bee J. 1987; 127:511-516.

Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa A. and Zozaya JA. The effect of Africanization on honey production, defensive behavior and size of

honeybees (*Apis mellifera* L.) in the Mexican high plateau. *Veterinaria Mexico*, 2003; 34:47-59.

Villa JD. Defensive behavior of Africanized and European honeybees at two elevations in Colombia. *J. Apic. Res.* 1988;27:141-145.

CAPITULO III

DETERMINACIÓN DE EFECTOS GENOTÍPICOS PARA LAS CARACTERÍSTICAS DE GUARDIA: PROPENSIÓN, PERSISTENCIA Y EDAD DE INICIO EN ABEJAS AFRICANIZADAS Y EUROPEAS (*Apis mellifera* L.)

Introducción

La división de las tareas en las colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) está influenciado por la edad (Lindauer, 1971; Winston, 1987; Seeley y Kolmes, 1991), el genotipo (Calderone y Page, 1988; Page y Robinson, 1991; Palmer y Oldroyd, 2000) el ambiente (Breed y Rogers, 1991) y las necesidades particulares de la colonia (Calderone y Page, 1988; Robinson, 1992; Theraulaz *et al.*, 1998; Myerscough y Oldroyd, 2004). El comportamiento defensivo de guardia para su estudio se puede dividir en dos características como la propensión y la persistencia (Hunt *et al.*, 2003). La propensión es una característica que se refiere como el número de abejas que realizan guardia a la entrada de la colmena (Hunt *et al.*, 2003) y la persistencia como el número de días que una abeja permanece como guardiana, siendo esta la principal característica de la guardia que determina el grado de especialización de las abejas (Hunt *et al.*, 2003). Breed *et al.*, (1990), encontraron que el genotipo de las obreras influye sobre la probabilidad que una abeja se comporte como guardiana en la colonia.

Las abejas guardianas son las responsables de realizar actividades de vigilancia y alertar a otros integrantes de la colonia de la presencia de intrusos por medio de la secreción de feromonas de alarma (Maschwitz, 1964; Butler y Free, 1952). Estas abejas son visiblemente reconocidas por la actitud que adoptan al encontrarse a la entrada de la colmena, ya que se mantienen alertas ante la presencia de cualquier intruso e interceptan a las abejas que regresan del campo y pretenden ingresar a la colmena, (Ribbands, 1954; Moore *et al.*, 1987).

La estructura demográfica de la colonia, la edad, el genotipo así como la magnitud y tipo de estímulo, influyen en la expresión de las tareas defensivas que realizan grupos de abejas especializados (Moore *et al.*, 1987; Breed *et al.*, 1990; Hunt *et al.*, 2003; Breed *et al.*, 2004). Aunque también la temperatura (Southwick y Moritz, 1987) y el tamaño de las colonias (Collins *et al.*, 1982).

El componente de guardia realizado por un grupo especializado y esta genéticamente determinado, se realiza por un periodo de uno a tres días por las obreras europeas, aunque algunas lo pueden extender hasta por 6 días (Moore y Moor 1987). En las colonias africanizadas la persistencia en la guardia se puede presentar hasta por 21 días (Hunt *et al.*, 2003). Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003) encontraron un número promedio de 1.9 días de abejas que hicieron guardia y no encontraron diferencias entre las colonias de retrocruza africanizada y europea. Sin embargo, Breed y Rogers (1991) encontraron diferencias en el comportamiento de guardia entre colonias muy defensivas y dóciles, concluyendo que la expresión del comportamiento de guardia está influida por el genotipo de la colonia. Guardianas de las colonias con elevado comportamiento defensivo realizaron guardia por más tiempo que las guardianas de colonias con bajo nivel defensivo. Así mismo Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003) demostraron la existencia de efectos genéticos y ambientales influyendo sobre la persistencia de guardia de las abejas.

Las características defensivas de propensión y persistencia en la guardia fueron estudiadas por Hunt *et al.*, (2003) y encontraron que las abejas africanizadas fueron más persistentes que las europeas y estas últimas fueron más propensas que las africanizadas. En las colonias del estudio de Hunt *et al.*, (2003) donde se encontraban las abejas de los genotipos africanizados y europeos compartiendo el mismo ambiente, el tiempo que duró la guardia fue mayor en un 50% para las abejas africanizadas. Sin embargo sus resultados fueron realizados con solo dos repeticiones de cada uno de los tratamientos (colonias africanizadas y europeas), por lo que en este estudio se decidió realizar una ampliación. Se incluyó la edad

de inicio de la guardia pues es bien sabido que existe una estrecha relación entre la edad y la tarea que realizan las abejas (Winston, 1987).

La detección de efectos genéticos sobre el comportamiento de guardia se presenta debido a las diferencias individuales en su tendencia inherente para realizar actividades de vigilancia dentro de la colonia pudiendo presentarse interacciones entre el genotipo y el ambiente de colonia. Por lo que realizar estudios entre genotipos extremos como las abejas africanizadas y las europeas ayudará a esclarecer los mecanismos de distribución de las tareas en el comportamiento defensivo.

Objetivo

Determinación de efectos genotípicos para las características de guardia: propensión, persistencia y edad de inicio en abejas africanizadas y europeas (*Apis mellifera* L.)

Materiales y Métodos

Colonias de origen y área de estudio

Las colonias fuente estuvieron encabezadas por reinas africanizadas y europeas. Estas últimas procedían de reinas importadas de Glenn Apiaries de Fallbrook California, EUA, que fueron mantenidas por inseminación instrumental en México y las reinas africanizadas procedían de enjambres capturados a los alrededores del Centro de Mejoramiento Genético, Investigación y Transferencia de Tecnología en Apicultura a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Forestales (INIFAP), lugar donde se realizaron los trabajos. Este se ubica en Villa Guerrero, Estado de México, localizado a los 18° 58' N y 99° 38' W y a 2160 msnm donde

predomina un clima templado sub-húmedo con una precipitación pluvial de 1,242 mm y una temperatura anual promedio de 12-14°C (INEGI, 2006).

Para corroborar el origen africanizado o europeo de las colonias fuente se emplearon métodos morfométricos (Sylvester y Rinderer, 1987) y pruebas de comportamiento (Guzmán-Novoa y Page 1993; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

Se utilizaron dos grupos de colonias experimentales: el primero fueron las colonias de origen africanizado y europeo que representan a las colonias fuente citadas arriba. Estas sirvieron de suministro de cría y abejas adultas. El segundo se constituyó de colonias de origen africanizado y europeo que formaron los ambientes experimentales que sirvieron para recibir abejas africanizadas y europeas jóvenes marcadas con un color distintivo.

Ambientes experimentales

Tres colonias europeas y tres africanizadas procedentes del segundo grupo elegido; mencionado arriba, formaron los ambientes experimentales. Estas colonias se establecieron cuarenta y cinco días antes de la introducción de abejas marcadas pertenecientes a los genotipos africanizados y europeos conforme se describe más abajo. Su población se homologó quitando cuadros de cría y abejas adultas con objeto de controlar las diferencias en la población entre las colonias, ya que esto podría afectar las pruebas para evaluar la defensividad. Estos ambientes se integraron con 7 panales de cría y una población aproximada de 30,000 abejas adultas (3.8 kg de abejas; Otis, 1982), así como tres panales con miel y polen además de un alza y una reina fecundada con alas cortadas y con placa de plástico numerada (Graze, KG, Weinstadt, Alemania®) que no estaba emparentada con las abejas marcadas. Cada colonia fue alimentada semanalmente con tres litros de jarabe de azúcar (1:1) y se aplicó tratamiento de antibióticos (*terramicina*, Lab. Pfizer®) para prevenir el desarrollo de enfermedades bacterianas. A cada colonia también se le colocó una ampliación de piquera de 40 cm² a la entrada de la colmena con una cubierta de acrílico

transparente para mejorar la observación y la captura de las abejas que realizaban tareas de guardia (propensión o persistencia). Los experimentos se realizaron durante los meses de mayo a septiembre que son críticos para el mantenimiento de las colonias de abejas, debido a la escasez de fuentes naturales de alimentación, por lo que las colonias tuvieron que ser alimentadas como se describió anteriormente.

Panales de cría de abejas africanizadas y europeas procedentes del primer grupo que se encontraban en estado de pupa se introdujeron en una incubadora eléctrica donde se mantuvieron a temperatura y humedad controlada (32 °C y a 60% HR). Las abejas que emergieron a las 24 h de estos panales, fueron pintadas con un color distintivo para cada genotipo. En total se marcaron 6000 abejas (3000 africanizadas y 3000 europeas) distribuidas en 6 lotes de 1000 abejas (500 africanizadas y 500 europeas) introducidas en cada colonia experimental. Para el marcado de las abejas se utilizó pintura automotriz de color, pintando el dorso del tórax de las abejas. Esto se realizó en un día por lo que asumimos que la mayoría de las abejas tenían menos de 24 h de edad al momento en que fueron introducidas. El pintado de las abejas se realizó dentro de las instalaciones del laboratorio, lugar donde también se encontraba la incubadora. Las abejas pintadas fueron introducidas a las colonias del grupo dos por la tarde para evitar que las abejas pudieran salirse de las colmenas. Esto se realizó, abriendo la colmena con poco humo y las abejas fueron vertidas al interior y se cerró. Las colonias fueron alimentadas con jarabe de azúcar, para mejorar la aceptación de las abejas pintadas y se redujo la piquera.

La toma de datos se inició cuando las primeras abejas marcadas de cualquiera de los genotipos se observaron realizando guardia a la entrada de la colmena. Tres características defensivas fueron evaluadas, la primera fue la propensión que midió el número de abejas de cada genotipo que realizaban actividades de guardia; la segunda fue la persistencia, que consistió en contar el número de días que una abeja en particular hizo guardia y en tercer lugar se determinó la edad de inicio de la guardia.

La propensión se registró identificando el color de las abejas, lo que indicó su origen genético y de esta manera se contabilizó la presencia de un genotipo y otro cada día. Para determinar la persistencia solo las abejas que permanecieron al menos por cinco minutos realizando la guardia fueron capturadas con la ayuda de un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml y fueron trasladadas al laboratorio donde fueron anestesiadas con bióxido de carbono durante 3 min y se les colocó sobre el tórax, una placa de plástico numerada y del color asignado al genotipo africanizado o europeo.

Durante 18 días consecutivos se registró el número de abejas guardianas de cada genotipo (propensión), así como los números y color de placa de las abejas que permanecieron en la guardia por algún tiempo (persistencia) en cada uno de los ambientes experimentales.

La edad fue calculada a partir del día en que fueron vistas por primera vez las abejas de cualquier genotipo realizando labores de guardia a la entrada de la colmena. Por ejemplo abejas de un genotipo u otro que fueron vistas por primera vez en el día 1 y hasta el 18, realizando tareas de guardia correspondieron a la edad en que iniciaron la guardia y se agrego un día, pues al momento de ser introducidas a los ambientes experimentales ya se conocía su edad.

Las observaciones a la entrada de la colmena se realizaron en dos sesiones de 30 min una por la mañana y otra por la tarde y la suma de las dos lecturas para propensión se utilizó para la realización de los análisis estadísticos correspondientes pues representó el número de abejas guardianas del genotipo africanizado o europeo por día. Estas observaciones se hicieron así para seguir el curso de muchas de las abejas guardianas marcadas (Hunt *et al.*, 2003), pues en su mayoría hacen guardia por un día y sólo unas pocas abejas, lo hacen por más tiempo (Moore *et al.*, 1987; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003).

Análisis estadísticos. Se realizó un análisis de varianza utilizando un experimento factorial (2x2), en un diseño completamente al azar, siendo los factores grupos genéticos (Africanizado y Europeo) y los ambientes (Africanizados

y Europeos) con 3 replicas (Stell y Torrie, 1980), para las características de propensión, persistencia y la edad de inicio de guardia. Con objeto de cumplir los supuestos de normalidad, los datos de propensión se transformaron a logaritmo +1, los de persistencia a logaritmo natural y los de la edad al inicio no fue necesario transformarlos pues se distribuían normalmente.

El modelo que se empleó fue el siguiente:

$$Y_{ijk\ell} = \mu + C_i + \delta_{(i)} + A_j + G_k + (AG)_{jk} + \epsilon_{(ijk)\ell}$$

$Y_{ijk\ell}$ = variable medida transformada (propensión, persistencia y edad de inicio de guardia) en la ℓ -ésima observación aleatoria, asociada a la i -ésima colmena (bloque o réplica) y al $\delta_{(i)}$ error de restricción del (bloque o réplica) y al j -ésimo ambiente (Africanizado y Europeo) y al k -ésimo grupo genético (Africanizado y Europeo).

μ = media de la población

C_i = efecto de la colmena (Bloque o réplica)

$\delta_{(i)}$ = es el error de restricción para (Bloque o réplica)

A_j = efecto del i -ésimo ambiente (i = Africanizado y Europeo)

G_k = efecto del j -ésimo genotipo (j = Africanizado y Europeo)

$(AG)_{jk}$ = efecto de interacción del j -ésimo ambiente y el k -ésimo grupo genético

$\epsilon_{ijk\ell}$ = error aleatorio \sim NID (0, σ^2)

Resultados

En el cuadro 3.1 se presentan los resultados del análisis de varianza para la característica de propensión (número de abejas que hacen guardia en cualquiera de los ambientes), donde se muestra que no hubo diferencias significativas causadas por el genotipo ($F_{1,474}=1.73$, $P>0.1889$). Pero si se encontraron efectos de interacción genotipo por ambiente ($F_{1,474}=4.47$, $P>0.0351$) y efectos significativos por ambiente para la misma variable ($F_{1,474}= 58.73$, $P<0.0001$). La

media \pm errores estándar para la propensión de las abejas para realizar guardia y los efectos de la interacción genotipo y ambiente se presentan en el cuadro 3.2.

En el cuadro 3.1 se presentan los resultados del análisis de varianza para la característica de persistencia, donde se muestra que no se encontraron diferencias significativas del ambiente ($F_{1,634}=0.03$, $P>0.8565$); en cambio, si hubo efectos significativos del genotipo ($F_{1,634}=25.52$, $P<0.0001$) y de la interacción genotipo y ambiente ($F_{1,634}=17.04$, $P<0.0001$). La media y los errores estándar de persistencia de las abejas para realizar la guardia y los efectos de interacción genotipo y ambiente se presentan en el cuadro 3.2. Las abejas africanizadas realizaron mayor número de días actividades de vigilancia que las abejas europeas. Así mismo las abejas africanizadas fueron más propensas a realizar la guardia en los ambientes africanizados y no se presentaron diferencias en la propensión entre los dos genotipos en el ambiente europeo.

En el cuadro 1 se presentan los resultados del análisis de varianza para la edad de inicio de guardia, donde se muestra que no existieron diferencias significativas causadas por el ambiente ($F_{1,517}= 0.10$, $P>0.7522$), ni tampoco hubo efectos de interacción genotipo por ambiente ($F_{1,517}=2.03$, $P>0.1551$), pero si se encontraron efectos del genotipo sobre la edad de inicio ($F_{1,517}=17.29$, $P<0.0001$). La media \pm errores estándar para la edad de inicio de guardia de los genotipos africanizados y europeos se presentan en el cuadro 3.2. Las abejas africanizadas iniciaron la guardia a una edad más temprana que las abejas europeas.

Discusión

Se encontró una mayor propensión a la guardia en los ambientes europeos que en los africanizados. Este resultado es intrigante y pudiera deberse a diferencias causadas por el pillaje de las abejas pertenecientes a otras colonias (robo de miel) o por la fortaleza de las colonias. El pillaje pudo haber afectado a las colonias, de tal forma que se incremento la guardia, aunque esto es especulativo sin embargo, es conocido que existen muchos factores que pueden afectar el comportamiento

de guardia (Breed y Rogers, 1991). Se ha comprobado que el número de guardianas durante el día puede cambiar dependiendo de la presión causada por el pillaje o bien por la presencia o ausencia de flujos de néctar (Downs y Ratnieks, 2000). Por ello en el presente estudio se eligieron dos lecturas de 30 min una por la mañana y otra por la tarde para tener mayor representatividad en la distribución de las guardianas. Los efectos de la interacción se hicieron aparentes para la propensión, al comparar las respuestas de los dos genotipos en los dos ambientes (africanizados y europeos). El número de abejas (propensión) africanizadas y europeas que hicieron guardia en cualquiera de los dos ambientes no fue diferente entre ambos genotipos, pero si se presentó una diferencia significativa en el número de abejas entre los dos ambientes. Resultando interesante observar que el número de abejas africanizadas y europeas en el ambiente europeo favoreció la presentación de la guardia, en ambos genotipos. De acuerdo con Hunt *et al.*, (2003) los efectos genéticos sobre el comportamiento de guardia surgen de las posibles interacciones entre los individuos que tienen una predisposición propia para desempeñar la guardia dentro de la colonia, por lo que se presentan las interacciones entre el genotipo y el ambiente de colonia.

En otros resultados las abejas africanizadas se mantuvieron en promedio un día más realizando guardia que las europeas. Sin embargo los efectos de la interacción se hicieron aparentes al comparar el número de días (persistencia) que las abejas de ambos genotipos realizaron guardia en ambos ambientes. Donde se encontró que las abejas africanizadas en el ambiente africanizado se manifestaron con el mayor número de días realizando guardia y en el ambiente europeo no se presentaron diferencias entre los dos genotipos.

Las abejas africanizadas disminuyeron significativamente su respuesta en ambientes europeos con respecto a la observada en los ambientes africanizados y las abejas europeas incrementaron significativamente su respuesta en ambientes europeos con respecto a la observada en los ambientes africanizados. De este modo las abejas africanizadas persistieron en la guardia dos días más que las abejas del genotipo europeo en un ambiente africanizado, y el tiempo de vigilancia

de las africanizadas disminuyó en un día cuando se encontraban en un ambiente europeo. Las abejas europeas realizaron tareas de guardia similares a las africanizadas en un ambiente europeo y su tiempo de vigilancia o persistencia disminuyó significativamente en un día cuando se encontraban en un ambiente africanizado.

De lo anterior se puede inferir que probablemente las abejas africanizadas han desarrollado características defensivas más especializadas que las europeas, pues como lo indican estos resultados el genotipo africanizado influyó significativamente en la persistencia, aún cuando presentó una disminución en los ambientes europeos. Y esto también es explicado por la diferencia observada en la respuesta de las abejas de los genotipos africanizados contra los europeos en el ambiente africanizado. La respuesta de las abejas europeas en un ambiente europeo se incrementó significativamente, probablemente debido a los efectos causados por la presencia de las abejas africanizadas, por lo que se puede concluir que efectos genéticos y ambientales están influyendo sobre el comportamiento de guardia que concuerda con lo reportado en estudios previos (Ribands, 1954; Robinson y Page, 1988; Breed y Rogers, 1991; Downs y Ratnieks, 2000; Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003).

De acuerdo con Hunt *et al.*, (2003) la propensión es un producto de la tendencia de las abejas para el inicio de la guardia así como de la persistencia. Esto significa que debido a la predisposición de ciertas abejas para el inicio en el desempeño de actividades de guardia y al tiempo que invierten en esa función, la propensión es una consecuencia, por ello la persistencia y la edad de inicio de la vigilancia parecen ser más importantes. Pues de acuerdo también con los resultados del presente estudio la edad estuvo significativamente influenciada por el genotipo, debido a que las abejas africanizadas se iniciaron con dos días de anticipación a las europeas, lo cual también sugiere que las abejas africanizadas son más especializadas en actividades defensivas.

Las bases de la especialización surgen del número de días que los individuos se ocupan de una cierta tarea, más que de las probabilidades de ocupación de las

abejas observadas durante su fase de propensión (Moore *et al.*, 1987; Hunt *et al.*, 2003), pues aparentemente ésta se desarrollo más a favor de la defensa contra invertebrados y con -específicos (abejas pilladoras procedentes de otras colonias) pues en Europa es posible que las abejas hayan estado más expuestas a este tipo de presión de selección a diferencia de lo que ocurrió con las abejas que habitaban en África.

Los estudios de Hunt *et al.*, (2003) se realizaron en colonias de abejas catalogadas como de ambiente comercial con una población cercana a las 35,000 abejas y en núcleos de abejas de apenas 5000 abejas. Se estimaron efectos genotípicos en estas colonias después de haber introducido diferentes proporciones de abejas africanizadas y europeas marcadas. Se evaluaron los componentes de propensión y persistencia en colonias africanizadas, europeas, híbridas y retro cruzadas y se comprobó un efecto aditivo para la persistencia. Ellos encontraron efectos significativos de ambiente y de interacción genotipo y ambiente para el componente de propensión. Esto fue parecido a lo encontrado en el presente estudio, para la persistencia y no así para la propensión donde solo se encontraron efectos del ambiente. Así mismo encontraron mayor número de abejas realizando guardia en las colonias europeas que en las africanizadas, que también es apoyado por lo que se encontró en el presente estudio a juzgar por los valores observados en las colonias de ambiente europeo. Las interacciones de genotipo y ambiente también fueron reportadas en su estudio, encontrando que las abejas europeas son más propensas a la guardia en ambientes donde existe una elevada proporción de abejas europeas que en colonias con elevadas proporciones de abejas africanizadas, lo cual también fue encontrado en el presente estudio. Pero en complemento de esos estudios, se está reportando que las abejas africanizadas disminuyeron el tiempo de participación en la guardia cuando se encontraban en los ambientes europeos aunque su número fue superior a las europeas en ambientes africanizados.

Guzmán-Novoa y Page, (1994), reportaron que cuando las abejas africanizadas convivieron con abejas europeas en ambientes europeos fueron menos defensivas

en comparación a cuando estuvieron en sus propias colmenas, lo que demuestra la existencia de efectos ambientales. En el presente estudio observamos que cuando las abejas africanizadas convivieron con abejas europeas en ambientes africanizados fueron menos propensas a la guardia si se compara con los valores observados de las abejas africanizadas en los ambientes europeos que cambió de 5.04 abejas haciendo guardia a un promedio a 3.04, y lo mismo sucedió para las abejas europeas en ambientes africanizados pues cambiaron de 5.36 a 2.13 abejas realizando guardia, lo cual también demuestra la existencia de efectos de interacción genéticos y ambientales. Para la persistencia sucedió algo similar en el caso de las abejas europeas que cambiaron de 4.14 abejas haciendo guardia en los ambientes europeos a 2.89 en los ambientes europeos. Pero en el caso de las africanizadas sucedió lo contrario es decir se observó un cambio de 4.29 abejas haciendo guardia en los ambientes europeos a 5.26 en los ambientes africanizados, esto significó un incremento de 1 día en las actividades de vigilancia. En el estudio de Hunt *et al.*, (2003) las abejas africanizadas en general fueron también más persistentes que las europeas, pero cuando separaron la respuesta de persistencia de las colonias consideradas como comerciales y los núcleos que emplearon; reportaron que las abejas europeas fueron más persistentes a la guardia que las africanizadas, y nuestros resultados no concuerdan con lo que ellos reportaron. En el presente estudio se observó que las abejas africanizadas fueron más persistentes a la guardia en los ambientes africanizados y no hubo diferencias en los ambientes europeos. Quizás estas diferencias se dieron por las proporciones de abejas de los genotipos que se incorporaron en sus colonias experimentales, pues observaron un incremento en la persistencia cuando se compararon los valores de los núcleos y las colonias de tipo comercial (pe, 2.5 días en los núcleos a 3.2 en las colonias de tipo comercial). Y mencionan que esto se pudo deber a un efecto de reforzamiento del comportamiento de guardia causado por un incremento de las interacciones entre los individuos. Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2003), reportaron el tiempo promedio de la guardia en 1.9 días en colonias de retrocruza consideradas como

defensivas y dóciles, que aunque concuerda con los tiempos reportados en otros estudios (Moore *et al.*, 1987; Breed *et al.*, 1988), no se demostraron diferencias significativas entre estas, así mismo estos tiempos son menores a los reportados en el presente estudio, y el de Hunt *et al.*, (2003).

En el estudio de Hunt *et al.*, (2003) también reportaron que las abejas europeas fueron más sensibles al ambiente para el inicio de la guardia esto significó que las europeas iniciarían la guardia a edades más tempranas que las africanizadas; sin embargo, en el presente estudio las abejas africanizadas iniciaron la guardia con dos días promedio de anticipación que las europeas por lo que existe contradicción en estos resultados al menos interpretada la mayor sensibilidad de las europeas como la edad a la que iniciaron la guardia. Por lo que no se confirmaron las abejas europeas como más sensibles (edad de inicio a la guardia) a los efectos del ambiente.

Ahora bien que al observar los valores de propensión y persistencia estos no variaron a favor de uno u otro genotipo en los ambientes europeos, pero sí en los ambientes africanizados, donde se observó una clara distinción sobre todo para la persistencia y no para la propensión lo que pudiera estar confirmando a la persistencia como una tarea especializada, que apoya lo sugerido por Hunt *et al.*, (2003) (ver cuadro 3.2). De acuerdo con la teoría de los modelos umbral de respuesta que supone que los estímulos ambientales influyen sobre las abejas del nido para la realización de tareas específicas (Robinson y Page, 1989; Page y Robinson, 1991), los resultados del presente estudio se ajustan a este modelo. Así mismo, Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2003 y Arechavaleta-Velasco y Hunt, (2004) encontraron regiones dentro del genoma que influyen sobre la expresión del comportamiento de guardia y que la variación genética entre los miembros de la misma familia puede influir sobre la probabilidad que una abeja individual realice una tarea en particular y la división de las tareas en las colonias de abejas.

En varios estudios ya se habían reportado diferencias genotípicas entre abejas de diferentes colonias en cuanto a la propensión y persistencia (Moore *et al.*, 1987; Breed *et al.*, 1988; Breed y Rogers, 1991) aunque estos trabajos solo se realizaron

con genotipos europeos clasificados como muy defensivos y dóciles y no se tomó en cuenta la edad de las abejas.

Los datos presentados por Hunt *et al.*, (2003) fueron obtenidos a partir del uso de dos replicas de colonias africanizadas y europeas por lo que el presente estudio realizado con 3 replicas de cada tipo, nos permitió corroborar parte de sus resultados y en algunos casos no, por lo que se deben continuar realizando estudios encaminados a determinar los mecanismos que están regulando el reforzamiento de la guardia así como los factores ambientales internos y externos que los afectan, para determinar cómo se distribuyen las diversas tareas y que genotipos intervienen en la respuesta defensiva.

Cuadro 3.1. Análisis de varianza para las características del comportamiento de guardia: ¹Propensión, ²Persistencia y ³Edad de inicio en abejas africanizadas y europeas que se encuentran en un ambiente compartido⁴.

	<i>Origen de Variación</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrados</i>		
			<i>Medios</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Propensión¹:	Colmena	2	46.15		
	Genotipo (G)	1	0.83	1.73	0.1889
	Ambiente (A)	1	28.27	58.73	<0.0001
	GxA	1	2.15	4.47	0.0351
	Error	474	0.48		
Persistencia²:	Colmena	2	24.68		
	Genotipo (G)	1	17.23	25.52	<0.0001
	Ambiente (A)	1	0.02	0.03	0.8565
	GxA	1	11.5	17.04	<0.0001
	Error	634	0.67		
Edad de inicio³:	Colmena	2	21.06		
	Genotipo (G)	1	433.32	17.29	<0.0001
	Ambiente (A)	1	2.5	0.10	0.7522
	GxA	1	50.80	2.03	0.1551
	Error	517	5.06		

Los datos de propensión fueron transformados a logaritmo +1 y los de persistencia a logaritmo natural ya que no eran homocedásticos. Los datos de edad de inicio no fueron transformados debido a que se distribuían normalmente.

¹Propensión, número de abejas de los genotipos africanizados y europeos marcados que se observaron realizando guardia a la entrada del nido; en colmenas de ambiente compartido.

²Persistencia, número de días que abejas de los genotipos africanizados y europeos con placa numerada y del color correspondiente a su genotipo, se observaron realizando guardia a la entrada del nido; en colmenas de ambiente compartido.

³Edad de inicio de la guardia en abejas que fueron observadas realizando guardia a la entrada del nido; en colmenas de ambiente compartido.

⁴Ambiente compartido, es un ambiente de colonia africanizado o europeo donde un conjunto de abejas marcadas con un color distintivo pertenecientes a los genotipos africanizados y europeos fue introducido en un mismo ambiente de colonia.

Cuadro 3.2. Media y errores estándar para las características del comportamiento de guardia: ¹Propensión, ²Persistencia y ³Edad de inicio en abejas africanizadas y europeas que se encuentran en un ambiente compartido⁴.

Propensión¹:	Ambiente⁴	Genotipo⁵	n	media ± e.e.
	Europeo		230	5.20±0.24a
	Africanizado		250	2.58±0.23b
	Africanizado	Africanizado	125	3.04±0.33b
	Africanizado	Europeo	125	2.13±0.33b
	Europeo	Africanizado	115	5.04±0.34a
	Europeo	Europeo	115	5.36±0.34a
Persistencia²:		Africanizado	272	4.77±0.24a
		Europeo	368	3.51±0.25b
	Africanizado	Africanizado	113	5.26±0.36a
	Africanizado	Europeo	77	2.89±0.44c
	Europeo	Africanizado	159	4.29±0.32b
	Europeo	Europeo	291	4.14±0.22b
Edad inicio³:		Europeo	285	16.96±0.33a
		Africanizado	237	14.96±0.34b

Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.0001$) basadas en un análisis de varianza y en la comparación múltiple de Tukey. Las medias y los errores estándar son valores reales no transformados

Los datos de propensión fueron transformados a logaritmo +1 y los de persistencia a logaritmo natural ya que no eran homocedásticos. Los datos de edad de inicio no fueron transformados debido a que se distribuían normalmente.

¹Propensión, número de abejas obreras de los genotipos africanizados y europeos marcados que se observaron realizando guardia a la entrada del nido; en colmenas de ambiente compartido.

²Persistencia, número de días que abejas obreras de los genotipos africanizados y europeos con placa numerada y del color correspondiente a su genotipo, se observaron realizando guardia a la entrada del nido; en colmenas de ambiente compartido.

³Edad de inicio de la guardia en abejas que fueron observadas realizando guardia a la entrada del nido; en colmenas de ambiente compartido.

⁴Ambiente compartido, es un ambiente de colonia africanizado o europeo donde un conjunto de abejas obreras marcadas con un color distintivo pertenecientes a los genotipos⁵ africanizados y europeos fue introducido en un mismo ambiente de colonia.

Lista de Referencias

Arechavaleta-Velasco ME and Hunt GJ. Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie* 2003; 34:439-447.

Arechavaleta-Velasco ME and Hunt GJ. Binary Trait Loci that influence Honey bee (Hymenoptera:Apidae) Guarding Behavior. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2004; 97(1):177-183.

Breed MD and Rogers KB. The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 1991; 21:295-303.

Breed MD, Rogers KB, Hunley JA, Moore AJ. A correlation between guard behavior and defensive response in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim Behav.* 1988; 37:515-516.

Breed MD, Robinson GE, Page RE. Division of labor during honey bee colony defense. *Behav Ecol Sociobiol* 1990; 27:395-401.

Breed MD, Guzmán-Novoa E and Hunt GJ. Defensive Behavior of Honey Bees: Organization, Genetics, and Comparisons with Other Bees. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:271-298.

Butler CG and Free JB. The Behavior of worker honeybees at the hive entrance. *Behavior.* 1952; 4: 263-292.

Calderone NW, and Page RE. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behav Ecol Sociobiol.* 1988;22:17-25

Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, and Bolten AB. Colony Defense by Africanized and European honey bee. *Science* 1982;218:383-387.

Downs SG and Ratnieks FLW. Adaptive shifts in honey bee (*Apis mellifera* L.) guardings behavior support predictions of the acceptance threshold model. *Behav. Ecol.* 2000;11:326-333.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Genetic dominance and worker interactions affect honey bee colony defense. *Behav Ecol* 1994; 5:91-97.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Backcrossing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann Entomol Soc Amer.* 1993; 86(3):352-355.

Guzmán-Novoa E, Prieto- Merlos D, Uribe-Rubio JL, and Hunt, GJ. Relative reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*) *J Apic Res* 2003;42:-46.

Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotype-environment interactions in honey bee guarding behavior. *Anim Behav* 2003; 66:459-467.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México (DF): INEGI 2006.

Lindauer M. *Communication Among Social Bess.* 1971 Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Moore AJ, Breed MD, Moor MJ. Characterization of guard behavior in honeybees, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 1987; 35:1159-1167.

Myerscough, M. and, Oldroyd, B.P. Simulation models of the role of genetic variability in social insects task allocation. *Insects Soc.* 2004; 51:146-152.

Maschwitz UW. Alarm substances and alarm behavior in social hymenoptera. *Nature* 1964; 204:324-327.

Otis GW. Population biology of the Africanized honeybee. In *Social Insects in the tropics*. Vol. 1 P. Jaisson. Ed., 1982 ppl 209-210. Université Pans-Nord, Paris.

Palmer KA and Oldroyd BP. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* 2000;31:235-248.

Page RE, Robinson GE. The Genetics of division of labor in honey bee colonies. *Adv Insect Physiol* 1991; 23:117-171.

Robinson GE. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 1992;37:637-665.(doi:10.1146/annurev.en.37.010192.003225).

Robinson, GE and Page, RE. Genetic determination of guarding and undertaking in honey bee colonies. *Nature*, 1988; 333:356-358.

Robinson GE and Page RE. Genetics basis for division of labor in an insect society . In: The Genetics of Social Evolution (eds Breed MD and Page RE) pp 61-80 1989. Boulder, CO Westview Press.

Ribbands CR. The defense of the honeybee community. Proc R Soc London B 1954; 142:514-524.

Seeley TD, Kolmes SA. Age polyethism for hive duties in honey bees-illusion or reality? Ethology 1991;87:284-297.

Southwick EE, Moritz RFA. Effects of meteorological factors on defensive behavior of honey bee. Int. J. Biomeeteorol 1987;31:259-265.

Steel RGD and Torrie JH. Principles and Procedures of statistics a Biometrical Approach. 1980. McGraw-Hill, Inc USA.

Sylvester H and Rinderer TE. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. Am. Bee J. 1987; 127:511-516.

Theraulaz G, Bonabeau E, Deneubourg J-L. Response threshold reinforcement and division of labour in insect societies. Proc R Soc Lond B 1998; 265:327-332.

Winston ML. the Biology of the Honeybee. 1987. Cambridge, MA: Harvard.

CAPITULO IV

DETERMINACION DE EFECTOS GENÉTICOS PARA EL NÚMERO DE ABEJAS QUE RESPONDEN AL ISOPENTIL ACETATO Y LA LONGITUD DEL ALA ANTERIOR EN OBRERAS (*Apis mellifera* L.)

Introducción

Las abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*) fueron introducidas a América en el año de 1956, con el propósito de incorporarlas a un programa de mejoramiento genético apícola en Brasil, (Kerr, 1967). El proceso de africanización se inicio en 1957, cuando los descendientes de esas abejas africanas que escaparon accidentalmente se aparearon con las abejas europeas locales. Las abejas africanizadas han establecido poblaciones silvestres y se han expandido por el continente, encontrándose actualmente desde el Norte de Argentina hasta el Sur de los Estados Unidos (Hall, 1990; Sugden y Williams, 1991; Loper, 2002).

Se ha comprobado que a pesar de que existe un cierto grado de introgresión de los alelos europeos en las poblaciones de abejas africanizadas, algunas características del comportamiento que poseen las razas africanas se han conservado durante el proceso de hibridación (Schneider *et al.*, 2004). Así mismo, diversos estudios han mostrado que a nivel de ADN, los alelos europeos han sido desplazados por los alelos africanos (Hall, 1990; Lobo *et al.*, 1989; Sheppard *et al.*, 1991; Rinderer *et al.*, 1991; Suazo *et al.*, 1998; Quezada-Euan, 2000; Clarke *et al.*, 2002).

Varios estudios han demostrado que las abejas africanizadas son significativamente más defensivas que las europeas (Stort 1974, 1975 a,b,c; Villa, 1988; Guzmán-Novoa y Page, 1993; Guzmán-Novoa y Page, 1994a; Uribe-Rubio *et al.*, 2003). Para evaluar el comportamiento defensivo de las colonias se utilizan varios métodos. Uno consiste en presentar objetos en movimiento frente a la entrada de la colmena para incitar la respuesta defensiva de la colonia, en donde se mide el aguijoneo o número de aguijones dejados por las abejas sobre un

objeto (Maschwitz, 1964; Stort, 1974; Guzmán-Novoa y Page, 1993; Collins y Kubasek, 1982; Guzmán-Novoa *et al.*, 2004) y en varios trabajos se ha reportado que este comportamiento defensivo se hereda de manera dominante (Stort 1975c; Guzmán-Novoa y Page 1993, 1994a; Degrandi-Hoffman *et al.*, 1998) y solo un trabajo ha reportado que es de manera aditiva (Collins *et al.*, 1988).

Otro método para evaluar el comportamiento defensivo de las colonias se basa en contar el número de abejas que responden congregándose en la entrada de la colmena al exponer la colonia al Iso-Pentil Acetato (IPA) que es uno de los principales componentes de la feromona de alarma (Boch *et al.*, 1962; Collins y Kubasek, 1982; Breed *et al.*, 1988; Breed y Rogers, 1991; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

Las abejas africanizadas son difíciles de distinguir de las abejas europeas (Daly y Balling, 1978). Se ha encontrado que además de ser más defensivas, estas abejas son más pequeñas que las europeas (Daly y Balling, 1978) y se ha reportado una correlación negativa entre el número de aguijones depositados por las abejas de una colonia y la longitud promedio del ala de las obreras (Guzmán-Novoa y Page, 1999; Uribe-Rubio, 2001). Los métodos morfométricos basados en medir la longitud del ala anterior son los más utilizados para diferenciar abejas africanizadas y europeas (Daly y Balling, 1978; Sylvester y Rinderer, 1987), aunque existe un trabajo que sugiere que no son lo suficientemente precisos para identificar abejas híbridas que tienen mediciones intermedias (Guzmán-Novoa *et al.*, 1994), por lo que es necesario buscar una técnica que sea confiable para la separación de grupos intermedios con fines de investigación y certificación por parte de las agencias gubernamentales y para los apicultores encargados de la reproducción de reinas para uso comercial. Por tanto es aconsejable el uso de pruebas diagnósticas que complementen a los métodos morfométricos.

La determinación de la forma de herencia de la respuesta de las abejas al IPA y de la longitud del ala anterior no han sido reportadas en la actualidad por lo que este estudio ayudará a entender los factores genéticos que afectan a estas características, teniendo también como propósito la estimación de valores

genéticos que sean de utilidad en un programa de selección y mejoramiento genético.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue la determinación de efectos genéticos para el número de abejas que responden al isopentil acetato y para la longitud del ala anterior en abejas obreras (*Apis mellifera* L.)

Materiales y Métodos

Colonias experimentales.

Los experimentos se realizaron en el Centro de Mejoramiento Genético, Investigación y Transferencia de Tecnología en Apicultura a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas (INIFAP), ubicado en Villa Guerrero, Estado de México, localizado a los 18° 58' N y 99° 38' W y a 2160 msnm donde predomina un clima templado sub-húmedo con una precipitación pluvial de 1,242mm y una temperatura anual promedio de 12-14°C, (INEGI, 2006).

Se utilizaron 12 colonias europeas integradas por reinas europeas que fueron apareadas con zánganos europeos (EXE), 14 colonias africanizadas formadas por reinas africanizadas apareadas con zánganos africanizados (AXA), 5 colonias híbridas formadas por reinas africanizadas apareadas con zánganos europeos (AXE) y 5 colonias híbridas formadas por reinas europeas apareadas con zánganos africanizados (EXA). Los cruzamientos se realizaron utilizando la inseminación instrumental. Para determinar el origen africanizado o europeo de las colonias experimentales se utilizaron métodos morfométricos (Sylvester y Rinderer, 1987) y de comportamiento (Guzmán-Novoa y Page, 1993; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

Cada colmena se identificó y su población se homologó a cuatro panales de cría operculada, dos de alimento con miel y polen, una reina fecundada marcada con una placa de plástico de color y numerada (Graze, KG, Weinstadt, Alemania®) y una población aproximada de 4000 abejas obreras adultas. Las colmenas se establecieron a una distancia de 5 m entre ellas para minimizar la participación de abejas ajenas a la colonia durante la prueba de la feromona de alarma o IPA, para evaluar el comportamiento defensivo y todas recibieron un manejo similar durante el tiempo que duró el estudio.

Evaluación del comportamiento defensivo

Sesenta y cinco días después de la instalación de las colonias se realizaron las pruebas para evaluar el comportamiento defensivo utilizando la prueba de la feromona (Collins y Kubasek, 1982; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003) con los siguientes cambios. Para realizar la prueba se utilizó un bastón de madera de 50 cm de largo x 1 cm de diámetro, en el que se colocó en uno de sus extremos un tubo capilar de 75 mm de largo herméticamente cerrado, conteniendo 5 µl de IPA (*Sigma I-7880®*) envuelto en un papel filtro de 2 x 2 cm. El bastón se colocó frente a la entrada de la colmena y se tomó una fotografía con el propósito de registrar el número de abejas presentes, enseguida se retiró el bastón y con la ayuda de una pinza se rompió el tubo capilar para liberar el IPA impregnando el papel filtro e inmediatamente se colocó en la entrada de la colmena por un periodo de 20 seg (s) y se tomó una fotografía para registrar el número de abejas presentes después que la colonia se expuso al IPA. Posteriormente se analizaron las fotografías y la diferencia en el número de abejas antes y después de exponer la colonia al IPA se utilizó para determinar la magnitud de la respuesta defensiva de las colonias.

Evaluación de la longitud del ala anterior

Para medir la longitud promedio del ala anterior de las obreras pertenecientes a los genotipos africanizados, europeos y las cruzas recíprocas se tomaron muestras de abejas obreras del interior de la colmena en alcohol etílico al 70%. Para el montaje de las alas se utilizó un microscopio estereoscópico a 20X y se diseccionó el ala derecha anterior de 10 abejas, colocándose entre dos cubreobjetos de 25 x 75 mm.

Para medir las alas se empleó el programa de cómputo desarrollado por Daly y Balling (1982, adaptado por Rubink), las mediciones se realizaron utilizando un microscopio invertido (Indumex) que proyecta las imágenes de las alas sobre una base digitalizadora (Summasketch II), y con la ayuda de un digitalizador manual se realizó la medición de la longitud de las alas entre la canaladura de la vena costal y el punto más distante del ala. Las mediciones fueron registradas automáticamente por el programa y aparecieron en el monitor de la computadora y estas fueron copiadas manualmente en una hoja para su posterior análisis. Los datos incluidos en el registro fueron genotipo de la colonia (AXA, EXE, EXA y AXE), número de la colmena, fecha de medición, longitud de las alas (mm).

Análisis estadísticos. Los datos obtenidos para el número de abejas que respondieron al IPA y la longitud del ala se sometieron a pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk. El número de abejas reclutadas se transformó a logaritmo natural para normalizar los datos (Sokal y Rolfh, 1985).

Se realizó un análisis de varianza bajo un modelo aleatorio simple para determinar diferencias para estas dos variables entre los cuatro genotipos.

El modelo de efectos aleatorios:

$$Y_{ij} = \mu + G_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde;

Y_{ij} = variable medida en la j -ésima observación aleatoria (número de abejas que responden al IPA y longitud del ala anterior) asociada al i -ésimo grupo genético)

μ = representa la media de la población

G_{ij} = efecto del *i*-ésimo grupo genético

ε_{ij} = representa el error aleatorio con $X \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

Para detectar diferencias en las medias de los grupos se utilizó una prueba de “t” para medias de cuadrados mínimos (Sokal y Rolfh, 1985).

Se realizó un análisis de regresión para determinar si la respuesta al IPA y la longitud del ala se ajustan a un modelo en donde se consideran únicamente efectos genéticos aditivos o a un modelo donde se consideran solo efectos genéticos de dominancia o un modelo que incluye efectos genéticos aditivos y de dominancia. Así mismo se realizó un contraste lineal utilizando las medias de cuadrados mínimos estimadas entre el promedio de los grupos parentales (AXA y EXE) y el promedio de los grupos híbridos (AXE y EXA), para determinar la presencia de efectos genéticos de dominancia. Los efectos paternos se analizaron mediante un contraste lineal utilizando las medias de cuadrados mínimos estimadas entre el promedio de los grupos que comparten el padre africanizado y el promedio de los grupos que comparten el padre europeo mediante el siguiente modelo: $EP = [AXA + EXA]/2 \square [EXE + AXE]/2$ y los efectos maternos se analizaron utilizando las medias de cuadrados mínimos estimadas entre el promedio de los grupos que comparten la madre africanizada (AXA y AXE) y el promedio de los grupos que comparten la madre europea mediante el siguiente modelo: $EM = [AXA + AXE]/2 \square [EXE + EXA]/2$.

Se realizó otro análisis de varianza por medio de un modelo aleatorio simple para detectar diferencias medias mínimas cuadráticas entre tres grupos genéticos, AXA, EXE e Híbridas (cruzas AXE y EXA juntas como un solo grupo). Esto tuvo como objetivo determinar que el método computarizado de medición del ala propuesto en la metodología puede ser adecuado para detectar diferencias entre tres grupos genéticos, pues hasta ahora con la utilización de los métodos propuestos (Daly *et al.*, 1982; Sylvester y Rinderer, 1987) no es posible separar en un 100% las abejas híbridas (Guzmán-Novoa *et al.*, 1994). Finalmente, se realizó

un análisis de correlación para determinar la relación entre estas dos características.

Resultados

Respuesta de la colonia a la exposición del IPA

Se encontraron diferencias significativas para el número de abejas que respondieron al IPA entre los grupos genéticos ($F_{3,32} = 29.62$; $P < 0.01$) (Cuadro 4.1). El número de abejas promedio y el error estándar que respondieron al IPA para el grupo africanizado (AXA) fue de $83.57 \pm 7.16a$, para el grupo híbrido (AXE) fue de $60.4 \pm 11.98a$ para el grupo híbrido (EXA) fue de $29.2 \pm 11.98b$ y para el grupo europeo (EXE) fue de $11.58 \pm 7.73c$ (Cuadro 4.2). Se encontraron diferencias entre los grupos africanizados (AXA) con respecto a los grupos europeos (EXE) y el híbrido (EXA) ($P < 0.01$), pero no con el grupo (AXE) ($P > 0.05$). Así mismo se encontraron diferencias entre los grupos híbridos ($P < 0.01$) y se encontraron diferencias entre el grupo europeo (EXE) con los dos grupos genéticos híbridos ($P < 0.01$); (Cuadro 4.2).

El análisis de regresión mostró que el número de abejas que responden al IPA se ajusta a un modelo de efectos genéticos aditivos ($F_{1,34} = 73.22$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.68$), y no al de efectos de dominancia ($F_{1,34} = 0.34$; $P > 0.05$; $r^2 = 0.001$), ni al modelo que incluye efectos aditivos y de dominancia ($F_{2,33} = 38.64$; $P < 0.01$; $r^2 = 0.70$) (Cuadro 4.3). El coeficiente de la regresión para el modelo aditivo fue 1.02 ± 0.12 ($t = 8.56$; $gl = 35$; $P < 0.01$), mientras que para el modelo de dominancia fue de 0.23 ± 0.40 ($t = 0.59$; $gl = 35$; $P > 0.05$) y para el modelo donde se consideraron efectos aditivos y de dominancia el coeficiente de regresión para aditividad fue de 1.03 ± 0.11 ($t = 8.73$; $gl = 34$; $P < 0.01$) y para dominancia fue de 0.31 ± 0.22 ($t = 1.40$; $P > 0.05$) (Cuadro 4.4).

El contraste lineal realizado entre el promedio de los grupos genéticos puros y el promedio de los grupos híbridos mostró que no existen diferencias para el número

de abejas que respondieron al IPA ($F_{1,32}=3.39$; $P>0.05$), lo que confirma que no existen efectos de dominancia (Cuadro 4.5).

Efectos maternos y paternos para el número de abejas que responden al IPA.

Se encontraron efectos maternos ($F_{1,32}=43.04$; $P<0.01$) y paternos ($F_{1,32}=9.55$; $P<0.01$), influyendo sobre el número de abejas que respondieron al IPA (Cuadro 4.6).

Longitud del ala anterior de las abejas

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los grupos genéticos en la longitud del ala anterior de las abejas ($F_{3,32}=6.49$; $P<0.01$) (Cuadro 4.1). La longitud promedio y el error estándar expresado en milímetros para el grupo africanizado (AXA) fue de $9.00 \pm 0.033a$, el grupo híbrido (EXA) fue de $9.13 \pm 0.056a,b$, el grupo híbrido (AXE) fue de $9.16 \pm 0.056b$, y el grupo europeo (EXE) fue de $9.21 \pm 0.036b$ (Cuadro 4.2). La longitud promedio del ala anterior del grupo africanizado (AXA) fue diferente del grupo europeo (EXE) y del grupo híbrido (AXE) ($P<0.05$), pero no lo fue del híbrido (EXA) ($P>0.05$). Así mismo no se encontraron diferencias entre los grupos híbridos ($P>0.05$), ni tampoco hubo diferencias entre el europeo y el híbrido (AXE) ($P>0.05$) (Cuadro 4.2).

El análisis de regresión mostró que la longitud del ala anterior de las abejas se ajusta a un modelo de efectos genéticos aditivos ($F_{1,34}=19.29$; $P<0.01$; $r^2=0.36$) y no a uno de efectos de dominancia ($F_{1,34}=0.69$; $P>0.05$; $r^2=0.02$), ni a un modelo que incluye efectos de aditivos y de dominancia ($F_{2,33}=9.93$; $P<0.01$; $r^2=0.38$) (Cuadro 4.3). El coeficiente de regresión para el modelo aditivo fue 0.11 ± 0.02 ($t=4.39$; $gl=35$; $P<0.01$), mientras que para el modelo de dominancia fue de 0.04 ± 0.05 ($t=0.83$; $gl=35$; $P>0.05$) y para el modelo donde se consideraron efectos aditivos y de dominancia el coeficiente de regresión para aditividad fue de 0.11 ± 0.02 ($t=4.34$; $gl=33$; $P<0.01$) y para dominancia fue de 0.03 ± 0.04 ($t=0.85$; $P>0.05$) (Cuadro 4.4).

El contraste lineal realizado entre el promedio de los grupos genéticos puros y el promedio de los grupos híbridos mostró que no existen diferencias para la longitud del ala anterior de las abejas ($F_{1,32}=0.70$; $P>0.05$), con lo cual se confirma que no existen efectos de dominancia (Cuadro 4.5).

Efectos maternos y paternos longitud del ala anterior

No se encontraron efectos maternos ($F_{1,32} = 3.76$; $P>0.05$) , pero si se encontraron efectos paternos ($F_{1,32} = 6.66$; $P<0.05$) que influyen sobre la longitud promedio de las alas de las abejas (Cuadro 4.6).

Medición del ala anterior de las obreras en tres grupos genéticos

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tres grupos genéticos (AXA, EXE y sus híbridos) para la longitud del ala anterior de las abejas obreras ($F_{2,32} = 9.93$; $P<0.01$). La longitud promedio y el error estándar (mm), fue de 9.002 ± 0.033 a, 9.14 ± 0.039 b y 9.21 ± 0.036 c para las abejas AXA, Híbridas y EXE respectivamente (Cuadro 4.7). Estos resultados nos indicaron diferencias significativas entre los tres grupos genéticos.

Resultados de la Correlación

Se encontró una correlación negativa entre el número de abejas que respondieron al IPA y la longitud promedio del ala en las colonias de abejas y ($r = -0.42$, $n=36$, $P<0.01$).

Discusión

Se encontraron efectos genéticos aditivos afectando el comportamiento defensivo de las colonias medido como el número de abejas que responden al IPA. Diversos estudios indican que el comportamiento defensivo medido como el número de

aguijones depositados por las abejas se hereda de forma dominante (Stort, 1975c; Guzmán-Novoa y Page 1993,1994b; Guzmán-Novoa *et al.*, 2002), aunque un estudio indica que se hereda de manera aditiva (Collins *et al.*, 1988). En el presente estudio el comportamiento defensivo medido en función del número de abejas que se congregan a la entrada de la colmena después de la exposición al IPA, se presentó de manera aditiva, lo cual tiene implicaciones importantes que pueden ser utilizadas en la selección de colonias de abejas.

El análisis de regresión indicó que al disminuir la frecuencia de los alelos europeos se incrementó la respuesta de la colonia a la exposición del IPA, ya que las colonias donde se encontraban presentes los alelos africanizados respondieron con una mayor cantidad de abejas congregándose a la entrada de la colmena en comparación con colonias que únicamente llevaban alelos europeos.

Se encontraron diferencias que permitieron distinguir los grupos AXA y EXE, así como los dos tipos de híbridos. El híbrido EXA tuvo menores niveles de respuesta que los híbridos AXE mientras que estos últimos no fueron diferentes al AXA. Esto sugiere que la utilización de colonias híbridas de madre europea apareada con zánganos africanizados (EXA) tendrá menores niveles de respuesta al comportamiento defensivo medido como la respuesta al IPA.

El híbrido EXA, es común en zonas africanizadas (Schneider *et al.*, 2004) y es quizás un cruzamiento de elección debido a que este tipo de colonias aparentemente mantienen niveles defensivos que pudieran ser aceptables para el manejo productivo. Sin embargo aunque las diferencias fueron notables con las colonias de ascendencia materna africanizada (AXE), la respuesta de las colonias híbridas (EXA), también fue significativamente distinta a la observada en las colonias europeas (EXE), es decir que el número de abejas de las colonias EXA que respondieron a la IPA, fue significativamente mayor que la respuesta presentada por las EXE, por lo que los resultados apoyan también la existencia de efectos paternos africanizados influyendo sobre la respuesta de las colonias a la exposición del IPA.

En este estudio se encontraron efectos maternos y paternos afectando la respuesta defensiva de las colonias mientras que Guzmán-Novoa *et al.*, (2005) solo encontraron efectos paternos influyendo sobre el comportamiento defensivo medido como el número de agujones depositados en un parche de cuero.

Guzmán-Novoa *et al.*, (2003), reportaron que la respuesta de las abejas al IPA es una prueba confiable para distinguir colonias defensivas de colonias dóciles aunque no incluyeron colonias híbridas; la confiabilidad de la respuesta de las colonias al IPA fue corroborada en el presente estudio.

En otros resultados del presente estudio se encontraron efectos genéticos aditivos influyendo sobre la longitud del ala anterior de las abejas obreras. El análisis de regresión mostró que al incrementarse la presencia de los alelos europeos la longitud del ala aumentó. Así mismo se encontró que la longitud del ala está influida por efectos paternos. Las colonias híbridas EXA tuvieron una longitud del ala similar estadísticamente a las colonias AXA y las colonias AXE tuvieron un promedio que no fue diferente a la de las colonias EXE.

Los resultados de la medición del largo del ala anterior de las obreras, no permitió la separación de los dos tipos de híbridos (AXE y EXA), prevaleciendo la confusión en la identificación de los híbridos con valores intermedios, como fue reportado por Guzmán-Novoa *et al.*, (1994), donde las abejas fueron medidas por el método morfométrico propuesto por Sylvester y Rinderer, (1987). Sin embargo si hubo diferencia entre los grupos genéticos africanizados (AXA) y los europeos (EXE).

En otros resultados, al analizar los valores de la longitud del ala del grupo Híbrido (AXE y EXA unidos para formar un solo grupo), se encontraron diferencias significativas con respecto de los grupos parentales AXA y EXE, por lo que la medición computarizada (Daly *et al.*, 1982), midiendo únicamente la longitud del ala, resultó ser confiable en la separación de estos tres grupos. El método computarizado normalmente emplea la medición de 25 características repartidas en 4 estructuras de las abejas obreras (ala anterior y posterior, pata trasera y tercer esternito abdominal), y se requiere de 4 a 5 h de trabajo por muestra, por lo que sin duda es una técnica laboriosa. La longitud del ala es empleada como una

estructura anatómica útil en la identificación de genotipos con longitud de ala anterior pertenecientes a grupos de abejas extremos, donde las abejas del genotipo africanizado tienen la menor longitud con respecto de las abejas pertenecientes al genotipo europeo (Sylvester y Rinderer, 1987; Guzmán-Novoa *et al.*, 1994; Uribe-Rubio, 2001; Uribe-Rubio *et al.*, 2003). Aunque en un estudio se identificaron el 100% de las colonias africanizadas y las europeas con alas menores y mayores respectivamente, y el 50% de las híbridas se identificaron incorrectamente utilizando la medición de la longitud del ala anterior (Guzmán-Novoa *et al.*, 1994), por lo que la utilización de esta técnica en la separación de las abejas pertenecientes a genotipos híbridos es dudosa. En el presente estudio se empleó la medición morfométrica computarizada (la medición morfométrica más exacta conocida) para medir exclusivamente el ala anterior de las obreras y los resultados obtenidos indicaron que esta técnica separó estadísticamente los tres grupos genéticos (AXA, Híbridos y EXE), por lo que la metodología empleada, sugiere que si es posible separar los grupos parentales de los híbridos. Al menos esto se logró teniendo control de los apareamientos, mediante el uso de la inseminación instrumental. Por ejemplo los valores de la longitud de las alas de las obreras híbridas producidas mediante la inseminación de reinas africanizadas con el semen de zánganos europeos (AXE) y las obreras híbridas producidas mediante la inseminación de reinas europeas con el semen de zánganos africanizados fueron analizados conjuntamente para formar un solo grupo genético, y se encontraron diferencias significativas entre estos y los grupos parentales. Aunque esta técnica sugiere tener un buen poder de discriminación entre los grupos híbridos y sus parentales, tal vez en un estudio posterior se pueda validar esta metodología midiendo la longitud del ala anterior de las obreras en grupos de reinas africanizadas y europeas inseminadas con el semen mezclado de zánganos europeos y africanizados. Por el momento la metodología empleada promete ser útil para fines de investigación y para la certificación de los criadores de reinas, a través de los organismos de gobierno que regulan la

procedencia del material genético empleado en la reproducción de reinas comerciales.

En más resultados se comprobó una correlación fenotípica significativa entre el número de abejas que respondieron al IPA y la longitud del ala. Esto nos sugiere que las colonias con alto nivel de respuesta al IPA, tendrían menor longitud del ala y quizás mayor respuesta de aguijoneo y viceversa, ya que algunos estudios encontraron una correlación entre el largo del ala y el comportamiento de aguijoneo, (Collins *et al.*, 1994; Guzmán-Novoa y Page, 1999; Uribe-Rubio, 2001). Por ello estas características podrían ser útiles en un programa de mejoramiento genético. La inclusión de colonias con bajos niveles de respuesta al IPA y con alas grandes en un programa de selección ayudará a reducir el comportamiento defensivo de las colonias de abejas.

Cuadro 4.1. Análisis de varianza para el número de abejas africanizadas y europeas que responden a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos (AXA, EXE, AXE Y EXA).

CUADRADOS MEDIOS					
Origen Variación	GL	IPA	F	LAAO	F
Grupo Genético	3	9.78	29.62*	0.10	6.49*
Error	32	0.33	0.016		

*P<0.01

Los datos del número de abejas que respondieron al IPA, fueron transformados a logaritmo natural ya que no eran homocedásticos.

Cuadro 4.2. Medias mínimas cuadráticas y errores estándar para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos

Grupo Genético	IPA	LAAO
AXA (n=14)	83.57 ± 7.16 a	9.002 ± 0.0033 a
AXE (n=5)	60.4 ± 11.98 a	9.16 ± 0.056 b
EXA (n=5)	29.2 ± 11.98 b	9.13 ± 0.056 a,b
EXE (n=12)	11.58 ± 7.73 c	9.21 ± 0.036 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), basadas en un análisis de varianza y en una prueba “t” para medias mínimo cuadráticos. Las medias son valores reales no transformados.

Cuadro 4.3. Análisis de regresión para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos (AXA, EXE, AXE Y EXA)

MODELO	CUADRADOS MEDIOS		R ²	
	IPA	LAAO	IPA	LAAO
Aditividad (A)	0.3721*	0.0155*	0.68	0.36
Dominancia (D)	1.1617 ns	0.0239 ns	0.001	0.02
A y D	0.3618 ns	0.0156 ns	0.70	0.38

*P<0.05

ns = no significativo

Cuadro 4.4. Coeficientes de la regresión para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos (AXA, EXE, AXE Y EXA).

β_1				
MODELO	IPA	t	LAAO	t
Aditividad (A) 4.39*	$\square 1.02 \pm 0.12$	$\square 8.56^*$	0.11 ± 0.02	
Dominancia (D)	0.23 ± 0.40	0.59 ns	0.04 ± 0.05	0.83 ns
A y D	$\square 1.03 \pm 0.11$ y 0.31 ± 22	$\square 8.73^*$ y 1.40 ns	0.11 ± 0.02 y 0.03 ± 0.04	4.34* y 0.85 ns

*P<0.01

ns=no significativo

Cuadro 4.5. Contrastes lineales utilizando las medias de cuadrados mínimos estimadas para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en los grupos genéticos africanizados y europeos (Aditividad) y el promedio de los grupos puros e híbridos (Dominancia-Heterosis).

CUADRADOS MEDIOS			
GRUPOS GENÉTICOS (AXA AXE EXA EXE)	gl	IPA	LAAO
Aditividad (1 0 0 1)	1	33485.53*	0.2944*
Dominancia (0 1 -1 0)	1	2433.60 ns	0.0022 ns
Heterosis (-1 1 1 -1)	1	55.61 ns	0.0113 ns
Error	32	718.636	0.0160

*P<0.001

ns=no significativo

Cuadro 4.6. Efectos maternos y paternos para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras (LAAO) mm, en cuatro grupos genéticos.

CUADRADOS MEDIOS				
GRUPOS GENÉTICOS (AXA AXE EXA EXE)	IPA	F	LAAO	F
Maternos (1 1 -1 -1)	14.21*	43.04	0.06ns	3.76
Paternos (1 -1 1 -1)	3.15*	9.55	0.107*	6.66

*P<0.01

ns=no significativo

Cuadro 4.7. Medias mínimas cuadráticas y errores estándar para las características defensivas: número de abejas que respondieron a la feromona de alarma, isopentil acetato (IPA) a la entrada de la colmena y longitud del ala anterior de las obreras en tres grupos genéticos *AXA, Híbridas y EXE.

CUADRADOS MEDIOS		
GRUPOS GENÉTICOS	IPA	LAO
AXA (n=14)	83.57 ± 7.42a	9.002 ± 0.033a
HÍBRIDAS (n=10)	44.8 ± 8.78b	9.14 ± 0.39b
EXE (n=12)	11.58 ± 8.01c	9.21 ± 0.036c

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), basadas en un análisis de varianza y en una prueba t para medias mínimo cuadráticos. Las medias son valores reales no transformados.

*AXA representa un cruzamiento entre una reina africanizada y zánganos africanizados.

EXE representa un cruzamiento entre una reina europea y zánganos europeos.

HÍBRIDAS representa la unión de los valores de los cruzamientos AXE y EXA.

Lista de Referencias

- Breed MD, and Rogers KB. The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 1991; 21:295-303.
- Breed MD, Rogers KB, Hunley JA and Moore AJ. A correlation between guard behavior and defensive response in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim. Behav.* 1988;37:515-516
- Boch R, Shearer DA, Stone BC. Identification of Isoamyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. *Nature.* 1962;195:1018-1020.
- Collins AM, Rinderer TE, and Tucker KW. Colony defence of two honeybee types and their hybrids. I. Naturally mated queens. *J. Apic. Res.* 1988;27:137-140..
- Collins AM and Kubasek KJ. Field test of honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1982; 75:383-387.
- Collins AM, Daly HV, Rinderer TE, Harbo JR, Hoelmer K. Correlations between morphology and colony defence in *Apis mellifera* L. *J. Apic. Res.* 1994;33:3-10.
- Clarke KE, Rinderer TE, Franck P, Quezada-Euán JG and Oldroyd BP. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution* 2002; 56:1462-1474.
- DeGrandi-Hoffman G, Collins AM, Martin JH, Schmidt JO, Spangler HG. Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Behav.* 1998; 11:37-45.
- Daly HV, and Balling SS. Identification of Africanized bees in the Western hemisphere by discriminant analysis. *J. Kans. Entomol. Soc.* 1978;51:857-869.
- Daly HV, Hoelmer K, Norman P, Allen T. Computer assisted measurement and identification of honey bees. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1982; 75; 591-594.
- Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe JL, Smith C, Arechavaleta- Velasco ME. Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honey bee

defensive behavior: Results of colony and individual behavioral assays. *Behav. Genet* 2002; 32:95-102.

Guzmán-Novoa E, Prieto- Merlos D, Uribe-Rubio JL, and Hunt, GJ. Relative reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*) *J Apic Res* 2003;42:-46.

Guzmán-Novoa E, Page RE Jr and Fondrk MK. Morphometric Techniques do not Detect Intermediate and Low levels of Africanization in Honey bee (Hymenoptera:Apidae) colonies. *Ann Entomol Soc Am.* 1994;87(5);507-515.

Guzmán-Novoa E, and Page RE Jr. Selective breeding of honey bees (Hymenoptera:Apidae) in Africanized areas. *J. Econ. Entomol.* 1999; 92:521-525.

Guzmán-Novoa E y Page RE. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Am Bee J*; 1994a:101-106.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Backcrossing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann Entomol Soc Amer.* 1993; 86(3):352-355.21.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Page RE Jr, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D, and Becerra-Guzman F. Paternal Effects on the Defensive Behavior of Honeybees. *J. Hered.* 2005; 96(4):376-380.

Guzmán-Novoa E and Page RE. Genetic dominance and worker interactions affect honey bee colony defense. *Behav Ecol* 1994b; 5:91-97.

Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. *Apidologie* 2004; 35;15-24.

Hall HG. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honey bees using nuclear RFLPs. *Genetics* 1990; 125:611-621.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México (DF): INEGI (2006).

Kerr WE. The history of the introduction of African bees to Brazil. *S. Afr Bee J.* 1967; 39:3-5.

Loper GM. Genetic evidence of the Africanization of feral colonies in S. Arizona between 1993 and 1995. *Am Bee J* 2002;137:669-671.

Lobo JA, Del Lama MA, Mestriner MA. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.) *Evolution* 1989;43:794-802.

Maschwitz UW. Alarm substances and alarm behavior in social hymenoptera. *Nature* 1964; 204:324-327.

Quezada-Euan JJG, Hybridization between European and Africanized honeybees in tropical Yucatan, Mexico. II Morphometric, allozymic and mitochondrial DNA variability in feral colonies. *Apidologie*. 2000;31;443-453.

Rinderer TE, Stelzer JA, Oldroyd BP, Bucu SM, Rubink WL. Hybridization between European and Africanized honey bees in the Neotropical Yucatan Peninsula. *Sciences* 1991;253:309-311.

Schneider SS, DeGrandi-Hoffman G, and Smith DR. The African Honey Bee: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:351-376.

Sheppard WS, Rinderer JA, Mazzoli JA, Stelzer JA and Shimanuki H. Gene flow between African and European derived honey bee populations in Argentina. *Nature* 1991;349:782-784.

Steel RGD and Torrie JH. Principles and Procedures of statistics a Biometrical Approach. 1980. McGraw-Hill, Inc USA.

Sugden EA and Williams KR. October 15: the day the bee arrived. *Glean Bee Cult* 1991;119:18-21.

Suazo A, McTiernan R, Hall HG. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J Hered* 1998; 89:32-36.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. I. Some tests to measure aggressiveness. *J. Apic. Res.* 1974; 13:33-3.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. II. Time at which the first sting reached the leather ball. *J. Apic. Res.* 1975a; 14:171-175.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. IV. Number of stings in the gloves of the observer. *Behav Genet.* 1975b; 5:269-274.

Stort AC. Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. V. Number of stings in the leather ball. *J. Kans. Entom. Soc.* 1975c; 48:381-387.

Sokal RR, and Rohlf FJ. *Biometry.* 1995. Freeman, New York, N.Y.

Sylvester H and Rinderer TE. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. *Am. Bee J.* 1987; 127:511-516.

Uribe-Rubio JL. Loci de efectos genéticos que afectan el comportamiento productivo y componentes del comportamiento defensivo de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Tesis de Maestría) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2001.

Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa A. and Zozaya JA. The effect of Africanization on honey production, defensive behavior and size of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the Mexican high plateau. *Veterinaria Mexico*, 2003; 34:47-59.

Villa JD. Defensive behavior of Africanized and European honeybees at two elevations in Colombia. *J. Apic. Res.* 1988;27:141-145.

CAPITULO V

DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DEL GENOTIPO, DIVISION DEL TRABAJO Y EL AMBIENTE DE LA COLONIA EN LOS UMBRALES DE RESPUESTA AL AGUIJONEO DE ABEJAS INDIVIDUALES AFRICANIZADAS Y EUROPEAS, POR MEDIO DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA

Introducción

El estudio de la evolución de organizaciones sociales complejas es un importante tópico en biología. Las colonias de abejas son consideradas dentro de los modelos de organización más elevados (Lindauer, 1971; Seeley, 1985; Page y Erber, 2002), dentro de los cuales la división del trabajo juega un papel importante para su éxito reproductivo (Wilson, 1985; Winston, 1987). La división del trabajo en los insectos sociales puede ser explicada por la variación en los umbrales del comportamiento entre los individuos integrantes de una colonia (Page y Robinson, 1991; Robinson 1992; Page y Erber, 2002). En este modelo, se asume que los individuos responden a los estímulos con base en sus umbrales de reacción. Los individuos pertenecientes a grupos con umbrales de reacción similares tienden a realizar trabajos similares adoptando los mismos roles de comportamiento. Sin embargo, diferencias en los umbrales de respuesta entre los individuos pueden resultar en grandes diferencias en el comportamiento debido a procesos de retroalimentación negativa y positiva que involucran efectos de interacción entre los individuos y entre estos y su medio ambiente interno.

El comportamiento defensivo es muy complejo y ha sido muy ventajoso para el éxito evolutivo y ecológico de las abejas melíferas (revisado por Breed *et al.*, 2004). Las tareas defensivas son realizadas por individuos especializados para la guardia que se encuentran en la entrada de la colmena, aunque existen otros grupos de abejas denominadas como aguijoneadoras que se encuentran en el interior de la colmena y que reaccionan de manera defensiva ante la posible invasión de intrusos (Breed *et al.*, 2004). Las guardianas son abejas de 1-3

semanas de edad, que patrullan la entrada de la colmena e inspeccionan a las abejas que pretenden ingresar, tocándolas y olfateándolas con sus antenas para identificarlas como pertenecientes al nido y permitirles el paso o en caso contrario rechazarlas debido a que son abejas ajenas a su nido. Las guardianas alertan a otras obreras sobre la presencia de intrusos mediante la liberación de feromonas. Estas feromonas provocan la salida de abejas que se encuentran en el interior de la colmena y algunas de ellas vuelan al exterior para detectar, perseguir y picar a los vertebrados intrusos que pretenden ingresar al nido (Butler y Free, 1952; Ribbands, 1954; Maschwitz, 1964; Breed *et al.*, 1990, 1992; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003). Es claro que las guardianas desempeñan un rol importante en la defensa de la colonia.

Numerosos estudios han demostrado que la guardia es un trabajo especializado realizado por pocos individuos genéticamente predispuestos (Robinson y Page, 1988; Breed y Rogers, 1991; Breed *et al.*, 1992; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003, 2004; Hunt *et al.*, 2003; Guzmán-Novoa *et al.*, 2004) y se ha comprobado y mapeado la existencia de loci asociados con el comportamiento de guardia y el aguijoneo (Hunt *et al.*, 1998; Guzmán-Novoa *et al.*, 2002; Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2003; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2004). Así mismo se ha comprobado una correlación entre el número de días que los individuos de la colonia persisten en la guardia y el número de abejas que hacen guardia a la entrada de la colonia, utilizándose esta característica para cuantificar la intensidad de la respuesta defensiva (Breed *et al.*, 1988; Breed y Rogers, 1991; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003). El ambiente de colonia y las interacciones sociales entre los integrantes de la colonia también afectan la expresión del comportamiento de guardia y el aguijoneo (Southwick y Moritz, 1987; Breed y Rogers, 1991; Guzmán-Novoa y Page, 1994; Hunt *et al.*, 2003).

Los efectos genotípicos sobre el comportamiento defensivo de las abejas melíferas también son evidentes en la naturaleza; las abejas africanizadas son un ejemplo de un genotipo defensivo. Estas abejas son significativamente más defensivas que las europeas (Collins *et al.*, 1982; Guzmán-Novoa y Page, 1993,

1994; Uribe-Rubio *et al.*, 2003) pues han causado miles de muertes de personas y animales en los últimos 45 años (Breed *et al.*, 2004), por lo que son consideradas como un problema de salud pública en América. El comportamiento defensivo de las abejas africanizadas es heredable (Collins *et al.*, 1984) y parece ser afectado por efectos genéticos de dominancia y paternos (Guzmán-Novoa y Page, 1994; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 1998; Guzmán-Novoa *et al.*, 2002, 2005).

Pocos estudios han demostrado interacciones genotipo por ambiente para características del comportamiento en las abejas melíferas. En el caso del comportamiento defensivo, no se conoce cuanto del umbral de respuesta de abejas individuales es afectado por el ambiente social o por el contacto con abejas más viejas, o con abejas especializadas en trabajos defensivos.

Una razón importante del porque estudiar los efectos genéticos y ambientales que influyen sobre los componentes del comportamiento defensivo en las abejas se debe a que su medición es difícil y porque se carece de métodos adecuados para hacerlo.

El nivel defensivo de las abejas se ha evaluado mediante el empleo de pruebas de campo y laboratorio (revisado por Guzmán-Novoa *et al.*, 2003) que en la mayoría de los casos se refieren a observaciones de características a nivel de colonia como el número de agujones en un blanco, número de abejas persecutoras, o número de abejas que reaccionan a la feromona de alarma a la entrada de la colmena. Las pruebas de campo tienen la desventaja de estar influenciadas por múltiples variables climáticas de las que no se tiene control y de los efectos ambientales de la colonia. Mediante el uso de las pruebas de laboratorio se logra un mayor control de los efectos ambientales, pero las respuestas de las abejas son medidas normalmente a nivel de grupos de abejas, por eso su interpretación está confundida por los efectos del grupo. (Collins y Blum, 1982; Moritz y Bürgin, 1987; Moritz y Southwick, 1987). Así mismo, las variables medidas en la mayoría de las pruebas de laboratorio son difíciles de relacionar a componentes específicos del comportamiento defensivo en las colonias de campo.

Pocos estudios han medido el comportamiento de aguijoneo en abejas individuales. Uno de ellos fue el estudio conducido por Kolmes y Ferguson-Kolmes (1989) quienes encontraron que un estímulo eléctrico aplicado sobre obreras individuales europeas podría distinguir claramente entre colonias defensivas y dóciles. Las abejas de las colonias defensivas picaron más rápido que las pertenecientes a las colonias dóciles. Utilizando la misma prueba, Paxton *et al.*, (1994) encontraron que la edad afecto la velocidad a la cual las abejas picaron. Las abejas más viejas picaron a un menor voltaje que las abejas de un día de edad. La estimulación eléctrica también ha sido utilizada para medir el comportamiento defensivo de abejas africanizadas individuales (Nuñez *et al.*, 1998; Balderrama *et al.*, 2002). Lenoir *et al.*, (2006) utilizó un estímulo eléctrico para probar la extensión de salida del aguijón a nivel individual en abejas europeas y encontró diferencias de la respuesta entre diferentes líneas, lo cual es indicativo de efectos genéticos para este comportamiento. Las pruebas individuales son importantes para estudiar el comportamiento defensivo de las abejas debido a que las mediciones de grupo pueden estar sujetas a efectos no lineales o a las interacciones entre las obreras.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue determinar la variación en los umbrales de respuesta del comportamiento de aguijoneo entre abejas individuales africanizadas y europeas que habitan en su propio ambiente, en un ambiente compartido y en jaulas mantenidas en una incubadora, por medio de la aplicación de un estímulo eléctrico.

Materiales y Métodos

Las colonias fuente estuvieron encabezadas por reinas africanizadas y europeas, esta últimas procedían de reinas importadas de Glenn Apiaries de Fallbrook

California, EUA, que fueron mantenidas por inseminación instrumental en México y las reinas africanizadas procedían de enjambres capturados a los alrededores del Centro de Mejoramiento Genético, Investigación y Transferencia de Tecnología en Apicultura a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Ganaderas (INIFAP), lugar donde se realizaron los trabajos. Este se ubica en Villa Guerrero, Estado de México, localizado a los 18° 58' N y 99° 38' W y a 2160 msnm donde predomina un clima templado sub-húmedo con una precipitación pluvial de 1,242 mm y una temperatura anual promedio de 12-14°C (INEGI, 2006).

Para corroborar el origen africanizado o europeo de las colonias fuente se emplearon métodos morfométricos (Sylvester y Rinderer, 1987) y pruebas de comportamiento (Guzmán-Novoa y Page, 1993; Guzmán-Novoa *et al.*, 2003).

En este estudio se realizaron tres experimentos y se emplearon tres grupos de colonias: en el primer experimento se emplearon tres colonias africanizadas y tres europeas que son las colonias fuentes mencionadas arriba. En el segundo se emplearon colonias llamadas de ambiente africanizado o europeo donde se adicionaron de manera conjunta abejas marcadas con pintura de color para distinguir dos genotipos (africanizadas y europeas) con el propósito de que compartieran un mismo ambiente. El tercer grupo correspondió a abejas africanizadas y europeas que emergieron y fueron mantenidas por separado en una incubadora eléctrica.

Las poblaciones de las colonias experimentales fueron homologadas cuatro semanas antes de introducir abejas marcadas; esto se logró por remoción de abejas y panales de cría de las colonias más pobladas. Cada una de las colonias experimentales contenía 5 panales de cría operculada y ocho panales de abejas adultas, con una población estimada de 18,000 individuos después de la homologación. Las colonias se establecieron a una distancia de 5 m entre ellas para minimizar la participación de abejas obreras ajenas a la colonia durante la realización de las pruebas de campo, recibiendo todas ellas un manejo similar.

Para la obtención de abejas africanizadas y europeas marcadas, panales con cría operculada conteniendo pupas próximas a emerger como adultas, fueron removidos de las colonias fuente del grupo uno y se colocaron en el interior de jaulas de malla de 3mm, que a su vez fueron introducidos en una incubadora eléctrica manteniéndose a 33°C y 60% HR. Obreras recién emergidas fueron marcadas en el dorso sobre el tórax con pintura automotriz de color para señalar el origen genético (Africanizado o Europeo) de las abejas. Quinientas abejas africanizadas marcadas fueron introducidas en cada una de las tres colonias africanizadas y 500 abejas europeas en cada una de las colonias europeas integrantes del experimento 1. Este procedimiento se realizó en un día, de esta manera la edad de las abejas introducidas fue de menos de 24 h. Una semana después, 1000 abejas marcadas (500 africanizadas y 500 europeas) fueron introducidas de manera conjunta en cada una de las tres colonias europeas y las tres colonias africanizadas, integrantes del experimento 2.

Experimento 1: obreras en su propio ambiente

A tres colmenas conteniendo colonias europeas y tres africanizadas conteniendo solo individuos marcados y no marcados de su propio genotipo fueron marcadas se les identificó con un número, además se les colocó una base de madera, cuya plataforma sirvió de extensión de la piquera a la entrada de la colmena la cual se cubrió con una hoja plexiglás (30 cm de largo) esto tuvo como objetivo favorecer la observación de las abejas guardianas pintadas de ambos genotipos. Obreras marcadas de los dos genotipos fueron colectadas de estas colonias para aplicarles una prueba de estimulación eléctrica. Abejas de siete días de edad tomadas directamente de los panales del nido fueron capturadas abriendo las colmenas y abejas marcadas realizando al menos por cinco minutos actividades de guardia fueron capturadas a la entrada de la colmena, cuando tenían una edad de entre 14 y 21 días. Las abejas guardianas fueron detectadas por observación de su comportamiento “típico” (Ribands, 1954; Ghent y Gary, 1962) a la entrada de la

colmena. Las abejas guardianas se distinguen porque se levantan sobre sus patas traseras y con sus antenas extendidas hacia el frente tocan e inspeccionan a las abejas que regresan del campo. Una vez identificadas, las guardianas fueron capturadas colocando con gentileza un tubo de plástico invertido de 15 ml cubriendo la abeja que se encuentra sobre la base de aterrizaje o extensión de la piquera de la colmena. Estas abejas fueron llevadas inmediatamente al laboratorio, y se les evaluó el tiempo que tardaron en responder después de la aplicación de un estímulo eléctrico controlado. Un total de 120 abejas guardianas y 150 abejas del nido de origen africanizado así como un total de 121 guardianas y 151 abejas del nido de origen europeo fueron probadas en un periodo de 4 días para cuantificar la respuesta.

Experimento 2: obreras que cohabitan en un mismo ambiente

De las tres colmenas de ambiente africanizado y las tres de ambiente europeo donde se encontraban abejas marcadas africanizadas y europeas compartiendo el mismo ambiente se capturaron abejas del interior (nido) y abejas guardianas, utilizando el procedimiento de evaluación descrito en el experimento uno.

En los ambientes africanizados se examinaron un total de 103 guardianas y 124 abejas del nido de origen africanizado y un total de 166 guardianas y 118 abejas del nido de origen europeo. En los ambientes europeos se examinaron un total de 130 guardianas y 131 abejas del nido de origen africanizado y un total de 110 guardianas y 125 abejas del nido de origen europeo. Estas pruebas se realizaron en un periodo de 4 días.

Experimento 3: obreras en un ambiente artificial

Cantidades iguales de obreras de cada uno de los genotipos (Africanizados y europeos) que emergieron en una incubadora (33°C y 60%HR) fueron mantenidas por separado en jaulas cubiertas con malla de 3 mm (15 x 15 x 25 cm)

conteniendo un pequeño trozo de panal y fueron alimentadas con una solución azucarada al 50% y de manera individual y por genotipo fueron sometidas a un estímulo eléctrico a la edad de siete días. A las abejas se les permitió que tuvieran esa edad ya que es sabido que el reflejo de picar está completamente desarrollado en abejas con edades de 5-7 días (Burrell y Smith, 1994; Paxton *et al.*, 1994). Un total de 120 abejas africanizadas y 120 abejas europeas fueron probadas en un periodo de 2 días.

La prueba de estimulación eléctrica

Para la realización de la prueba de estimulación eléctrica se utilizó el aparato Isostim 360, modelo A 320 R-E®, World Precision Instruments, Sarasota, Florida., EUA, el cual proporcionó un estímulo constante a pesar de la variación en la resistencia causada por la manera en que la abeja tocó los alambres, o el tamaño de las abejas. Un estímulo eléctrico fijo de 0.5 mA fue aplicado, con un intervalo de pulso de 250 ms y una amplitud de 2.0 ms. Estas condiciones se basaron en estudios preliminares que probaron los efectos en la variación del pulso, intervalo, voltaje o corriente para inducir el aguijoneo. Una corriente constante de 0.5 mA presentó una buena separación entre las obreras europeas y africanizadas capturadas a la entrada de la colmena (Uribe-Rubio *et al.*, datos no publicados; Prieto-Merlos, 2002). El estimulador eléctrico fue conectado a una rejilla compuesta de 21 varillas de acero inoxidable (13 cm x 2 mm) con una separación de 3.5 mm entre ellos (Paxton *et al.*, 1994). Las varillas de alambre fueron colocadas de manera que la electricidad tuviera un flujo alternado (+ / -) con el propósito de cerrar el circuito cuando la abeja tocará los dos alambres adyacentes al mismo tiempo.

De manera individual las abejas fueron colocadas sobre la parrilla con la ayuda de una pinza entomológica. Entonces fueron cubiertas con una caja de petri de plástico transparente (57 mm diámetro) para que no escapara y se mantuviera caminando libremente sobre la parrilla por un minuto, esto tuvo como objetivo

permitir que se tranquilizara y aclimatara a su nueva situación antes de comenzar la prueba. Tiempo transcurrido se le aplicó la estimulación eléctrica y se tomó el tiempo medido en segundos (s) que la abeja tardó en picar un trozo de cuero de color negro colocado debajo de la parrilla eléctrica, este se midió con un cronometro de precisión (Leonidas trackmaster, modelo 8042®, Bern Switzerland). El trozo de cuero sirvió para proporcionar un sustrato donde la abeja pudiera picar. Las defensoras localizan los intrusos potenciales en el campo a través de estímulos visuales y de olor (Breed *et al.*, 2004). Las abejas son más respondedoras a los objetos de color oscuro con olor a mamífero (Free, 1961). Un trozo de cuero a la vez fue colocado para cada prueba y la parrilla de alambre fue limpiada con una solución jabonosa neutra después de cada prueba, para remover posibles residuos de la feromona de alarma liberada por la abeja durante la prueba.

Análisis estadísticos. Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk para probar la normalidad. También se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Bartlett. Debido a que los datos no se distribuían con normalidad, se realizó una transformación a logarítmica + 1, para producir una distribución normal antes de analizarlos. Los datos transformados del tiempo de aguijoneo fueron analizados por un análisis de varianza múltiple para el genotipo de las abejas (africanizadas o europeas) la tarea de especialización (abejas de interior o guardianas), y el ambiente de colmena (propio, africanizado, europeo o artificial). Cuando se encontraron diferencias significativas, las medias de los tratamientos fueron comparadas con pruebas de Tukey (Sokal y Rohlf, 1995).

Modelo estadístico :

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + T_j + A_k + (GT)_{ij} + (GA)_{ik} + (TA)_{jk} + (GTA)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = variable medida transformada (tiempo de reacción al estímulo eléctrico) en la i -ésima observación aleatoria, asociada al i -ésimo grupo genético (africanizado y europeo) y del j -ésimo trabajo (*abeja interior y guardiana*), y al k -ésimo ambiente de colonia (propio, africanizado, europeo y de incubadora).

μ = media de la población

G_i = efecto del i -ésimo genotipo (i = africanizado y europeo)

T_j = efecto del j -ésimo trabajo (j =abeja del interior y guardiana)

A_k = efecto del k -ésimo ambiente (k = propio, africanizado, europeo, incubadora)

$(GT)_{ij}$ = efecto de interacción del i -ésimo grupo genético y la j -ésima tarea

$(GA)_{ik}$ = efecto de interacción del i -ésimo grupo genético y el k -ésimo ambiente

$(TA)_{jk}$ = efecto de interacción del j -ésimo trabajo y el k -ésimo ambiente

$(GTA)_{ijk}$ = efecto de interacción del i -ésimo genotipo, el j -ésimo trabajo y el k -ésimo ambiente.

ϵ_{ijkl} = error aleatorio \sim NID (0, σ^2).

Resultados

En todos los ambientes, las abejas africanizadas respondieron significativamente más rápido a los estímulos eléctricos que las abejas europeas ($F_{1,1775} = 220.55$, $P < 0.0001$; Cuadro 5.1). El tiempo de reacción (segundos) al aguijoneo a través de los diferentes ambientes tuvo un rango de 1.16 ± 0.05 a 2.67 ± 0.22 s y de 2.8 ± 0.25 a 5.77 ± 0.45 s, para abejas africanizadas y europeas, respectivamente (Figura 5.1).

No se encontraron efectos para el trabajo de especialización, pero hubo una interacción significativa de genotipo y el trabajo ($F_{1,1775} = 8.69$, $P = 0.0033$; cuadro 5.1). Las abejas guardianas y las del interior (nido) de origen europeo no fueron diferentes para el tiempo de respuesta al estímulo eléctrico en los ambientes europeos. Pero para los genotipos africanizados, las guardianas picaron significativamente más rápido que las abejas del nido cuando compartieron un

ambiente común con 500 abejas europeas acompañantes presentes en las colmenas africanizadas aun cuando no pertenecían a su misma línea familiar (1.40 ± 0.12 s vs 1.96 ± 0.14 s; cuadro 5.2). Adicionalmente hubo interacción significativa entre trabajo y el ambiente de colonia ($F_{2,1775}=3.10$, $P = 0.0455$; Cuadro 5.1).

También se presentaron diferencias significativas para el tiempo de reacción al estímulo eléctrico que causó el aguijoneo de las obreras entre los diferentes ambientes ($F_{3,1775}=57.37$, $P<0.0001$; Cuadro 5.1). Las abejas picaron significativamente más rápido después que fueron mantenidas en una colonia extraña a su colonia original (Figura 5.1). La respuesta más rápida al estímulo eléctrico se presentó en las abejas que emergieron y se mantuvieron en una incubadora (2.92 ± 0.15 s para las abejas europeas y 1.16 ± 0.05 s para las abejas africanizadas). También se presentó una interacción entre el genotipo y el ambiente ($F_{3,1775}= 11.90$, $P<0.0001$, Cuadro 5.1). Las obreras europeas redujeron sus tiempos a la respuesta defensiva entre 47.6 y 51.5% cuando se mantuvieron en colonias ajenas, en comparación a sus respuestas cuando fueron analizadas de colonias pertenecientes a su propio ambiente natal. Las abejas africanizadas presentaron un decremento menor en los tiempos de respuesta cuando se mantuvieron en colonias extrañas en comparación a las de sus colonias natales (<36.0%; Figura 5.1).

Discusión

Esta es la primera vez que se comparan las respuestas defensivas de aguijoneo de abejas individuales africanizadas y europeas de edad conocida y que realizan un trabajo específico (abejas guardianas y del nido) por medio de un estímulo eléctrico. Los resultados mostraron que las abejas africanizadas respondieron consistentemente más rápido que las europeas a los estímulos a través de todos los ambientes probados. Por ello se presume que las abejas africanizadas deben tener un umbral de respuesta más bajo al aguijoneo que sus contrapartes

europeas. Los efectos genotípicos demostrados aquí están de acuerdo con numerosos estudios que han mostrado que las abejas africanizadas son más defensivas que las europeas (revisado por Breed *et al.*, 2004; Hunt, 2007) y confirman la validez y confiabilidad del uso del estimulador eléctrico para comparar las respuestas defensivas y para probar modelos sobre umbrales a estímulos en diversos estudios con abejas melíferas.

Kolmes y Ferguson-Kolmes (1989), también encontraron diferencias genéticas para el nivel de estimulación eléctrica que liberaba una respuesta defensiva entre grupos de obreras tomadas del nido de colonias de abejas europeas que variaron en su comportamiento defensivo. Lenoir *et al.*, (2006) reportaron que obreras con una movilidad restringida pertenecientes a diferentes líneas paternas europeas variaron su tendencia para extender su aguijón cuando se les aplicó un estímulo eléctrico. En otro estudio usando una metodología similar, Balderrama *et al.*, (2002) probaron abejas africanizadas pecoreadoras en Venezuela y observaron la salida del aguijón después de 2 s de exposición secuencial al estímulo eléctrico que aplicaron en incrementos de 2 V hasta 16 V. Ellos encontraron que la mayor respuesta de las abejas se presentó a los 8 V y que después se presentó un estancamiento en el nivel de respuesta.

Los estudios anteriores difieren con los del presente estudio en que las abejas estuvieron restringidas en su movimiento por medio de un sujetador, el cual probablemente causó un estrés significativo a las abejas y además no se realizaron pruebas comparativas entre abejas africanizadas y europeas; solo abejas europeas fueron probadas en los primeros dos estudios y solo abejas africanizadas fueron probadas en el último. Estudios previos en los cuales la estimulación eléctrica fue utilizada para estudiar el comportamiento defensivo de las abejas no compararon abejas que realizaban diferentes tareas.

En este estudio se presenta por primera vez evidencia que indica que en algunos genotipos de abejas, individuos especializados en la guardia también pueden tener un umbral de respuesta de aguijoneo bajo, lo cual apoya la hipótesis propuesta que indica que las guardianas tienen los umbrales más bajos de

respuesta a estímulos defensivos (Robinson y Page, 1988). Los individuos que se especializan en el comportamiento de guardia fueron los más rápidos en picar en comparación con las abejas del nido de 7 días de edad para los genotipos africanizados, pero no para los europeos. La razón del porque las abejas guardianas europeas no fueron más rápidas en picar que las abejas del nido del mismo genotipo no es claro, particularmente debido a que se sabe que QTL, (loci de características cuantitativas), como el sting-1, sting-2, y el sting-3 tienen efectos significativos sobre el comportamiento de guardia y el de aguijoneo en un ambiente de colonia en familias pertenecientes a una sola línea paterna (Guzmán-Nova *et al.*, 2002; Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2003). Sin embargo abejas guardianas de origen europeo no mostraron una mayor probabilidad a picar que las abejas del nido en los ambientes de colonia con líneas paternas múltiples (Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003). Tal vez las diferencias que fueron encontradas entre las abejas guardianas africanizadas y las abejas africanizadas del nido en las colonias de líneas paternas múltiples de este estudio se deban a que los alelos de origen africano tienen mayor efecto sobre el umbral de respuesta al estímulo defensivo que la variación alélica encontrada dentro de las abejas europeas. Adicionalmente, el hecho que las abejas africanizadas sean más persistentes como guardianas que las europeas refuerza este argumento. Hunt *et al.*, (2003) reportaron que las abejas africanizadas hicieron guardia por más tiempo que las europeas que se encontraban en colonias de su propio ambiente natal. En colonias donde abejas de ambos genotipos compartieron un ambiente común, compuestas de diferentes fuentes de abejas africanizadas y europeas, el tiempo que las abejas permanecieron realizando la guardia fue 50% mayor para el genotipo africanizado. Así mismo las abejas africanizadas (pero no las europeas) fueron más persistentes a la guardia en ambientes de colonia africanizados que en ambientes de colonia europeos. La interacción genotipo y ambiente es similar a los resultados encontrados en el presente estudio que muestra los umbrales de respuesta al aguijoneo más bajos para las guardianas africanizadas en colonias africanizadas.

Es poco probable que los umbrales de respuesta más bajos de las guardianas africanizadas comparado con las abejas del nido sean una consecuencia de tener una semana de edad, ya que estudios previos reportaron que a una semana de edad las abejas europeas tienen umbrales de respuesta equivalentes a las de las abejas más viejas y a que las abejas europeas se desarrollan un poco más lento (Paxton *et al.*, 1994; Giray *et al.*, 2000; Uribe-Rubio *et al.*, datos no publicados).

Los efectos ambientales fueron evidentes en este estudio. En todos los casos, las abejas respondieron más rápido a los estímulos eléctricos después de ser mantenidas en ambientes distintos a su colonia natal. No es claro porque sucedió esto, pero tal vez los ambientes distintos al propio utilizados en este estudio fueron relativamente estresantes para las abejas obreras, resultando en un incremento en la sensibilidad a los estímulos defensivos. La aceptación de las abejas obreras depende del olor particular de cada colonia, así como de los componentes genéticos y ambientales, aunque es común que las abejas jóvenes sean mejor aceptadas que las abejas viejas (Breed *et al.*, 2004).

Tal vez las obreras anfitrionas de las colonias de los ambientes experimentales donde se introdujeron abejas de los dos genotipos para convivir en un ambiente común, se ocupen en más conductas agonistas en contra de las abejas introducidas que las obreras de sus colonias natales, o bien las obreras que cohabitan en un ambiente común pueden haber tenido muy pocos momentos de alimentación directa. La respuesta de aguijoneo y la sensibilidad para la estimulación exhibida por las abejas puede ser regulada por la actividad neuronal mediada por neuro-hormonas en el sistema nervioso central (revisado por Hunt, 2007; Hunt *et al.*, 2007). Interacciones agresivas o estrés pueden causar cambios en los títulos de neuro-hormonas o neurotransmisores y pueden influenciar umbrales de respuesta a diferentes estímulos.

Las respuestas más rápidas a la estimulación eléctrica se dieron en aquellas abejas que fueron emergidas y mantenidas por 7 días en un ambiente artificial (la incubadora). Cuando estas obreras fueron evaluadas, respondieron mucho más rápido que aquellas mantenidas en sus propias colonias. Este resultado es

inexplicable y fue similar a los resultados donde las abejas compartieron un ambiente común. Obreras de siete días de edad capturadas de jaulas que se encontraban en la incubadora, en general presentaron umbrales similarmente bajos de respuesta a la estimulación eléctrica a las obreras capturadas de las colonias donde las abejas compartieron un ambiente común (Figura 5.1). Estos hallazgos de las abejas de la incubadora sugieren que el contacto físico con los individuos más viejos, la feromona de la reina, así como también el desarrollo dentro del ambiente de colonia no es esencial para que las obreras reduzcan sus umbrales de respuesta a los estímulos defensivos. Adicionalmente estos resultados refuerzan la hipótesis de que el estrés causado por un ambiente distinto al ambiente propio afecta los umbrales de respuesta al aguijoneo de las abejas.

Es muy probable que el ambiente de la incubadora haya sido más estresante para las abejas que los ambientes de colonia. Se sabe que la longevidad de las abejas en las jaulas es menor comparado con la longevidad de las que habitan en las colonias, especialmente cuando se enjaulan en pequeños grupos (Moncharmont *et al.*, 2003). También se ha visto que el estrés puede causar incrementos en el comportamiento defensivo; abejas obreras enjauladas que se han mantenido en aislamiento por 5 días exhibieron un incremento en los niveles de agresión hacia reinas ajenas (Breed, 1983).

A pesar de la influencia del ambiente artificial sobre los umbrales de respuesta para el comportamiento de aguijoneo, las abejas africanizadas y europeas mostraron diferencias consistentes entre unas y otras y la varianza dentro de los genotipos fue más baja en las abejas enjauladas (Figura 5.1). Por lo tanto los resultados del presente estudio apoyan el uso de esta metodología para comparar diferentes genotipos de abejas mantenidas en una incubadora. En un estudio similar obreras de diferentes líneas paternas mantenidas en una incubadora que se sometieron a estimulación eléctrica presentaron diferencias significativas en la extensión del aguijón (Lenoir *et al.*, 2006). En este último estudio al igual que en el presente, los efectos ambientales no fueron suficientemente grandes para impedir la detección de diferencias significativas entre abejas de diferente genotipo.

Las abejas africanizadas son más pequeñas que las europeas. En este sentido se podría especular que las diferencias encontradas entre las abejas africanizadas y las europeas se debieron a la relación entre el voltaje del estímulo eléctrico empleado y el tamaño corporal de las obreras pertenecientes a los dos genotipos. Aunque, el tamaño corporal no pudo haber influido en los resultados debido a que se utilizó una corriente eléctrica constante, la cual corrigió las diferencias en la resistencia causada por el tamaño corporal de las abejas. Además las abejas europeas y africanizadas redujeron significativamente sus tiempos para picar, cuando se mantuvieron en nidos extraños o en un ambiente artificial comparado con las respuestas obtenidas cuando se encontraban en su propio ambiente natal (Figura 5.1), al mismo tiempo que se mantuvieron las diferencias entre genotipos. Los resultados de este estudio sugieren que el genotipo, el trabajo de especialización y el ambiente del nido influyen sobre los umbrales de respuesta de aguijoneo de las abejas. La identificación de estos componentes asociados con la variabilidad en el comportamiento de aguijoneo de abejas individuales es consistente con el modelo de umbrales de respuesta que explica la división de trabajo en la colonia como el resultado de la variabilidad en la sensibilidad para varios estímulos entre sus miembros (Page y Robinson, 1991; Robinson, 1992; Page y Erber, 2002). El conocimiento generado acerca de los efectos de estos componentes sobre el comportamiento defensivo, y las pruebas de estímulos eléctricos que se han desarrollado serán útiles para en un futuro ayudar en diseccionar la genética de este complejo comportamiento social.

Cuadro 5.1. Análisis de varianza para el tiempo (seg (s)), de aguijoneo de abejas africanizadas y europeas guardianas y del interior (nido), colectadas de su propio ambiente de colonia (natal), de colonias de ambiente compartido y de ambiente artificial (incubadora), después de la aplicación de un estímulo eléctrico de 0.5mA^a

Fuente de variación	gl	Cuadrados medios	F	P
Genotipo (g)	1	56.78	220.55	<0.0001
Trabajo (t) ^b	1	0.30	1.05	0.3062
Ambiente (a) ^c	3	14.77	57.37	<0.0001
g x t	1	2.46	8.69	0.0033
g x a	3	3.06	11.90	<0.0001
t x a ^d	2	0.88	3.10	0.0455
g x t x a ^d	2	0.38	1.33	0.2639
Error	1755	0.28		

^a Análisis de varianza basado en datos transformados a logaritmo + 1.

^b Obreras marcadas de dos grupos de trabajo fueron colectadas y evaluadas. Abejas de siete días de edad tomadas del interior de las colmenas y abejas guardianas que se encontraban a la entrada de la colmena.

^c Los ambientes de colonia o de ambiente propio contenían únicamente abejas africanizadas, o abejas europeas. Los ambientes compartidos (colonias africanizadas o europeas) contenían un conjunto de abejas de los dos genotipos (africanizados y europeos).

^d Únicamente los datos de los ambientes de colonia fueron utilizados para el análisis de estas interacciones. El ambiente artificial fue excluido de estos análisis debido a que las abejas colectadas de la incubadora no se agruparon por tarea de especialización. En un ambiente artificial, abejas obreras de genotipos africanizados y europeos se mantuvieron por separado, en jaulas dentro de una incubadora (33°C y 60%) hasta la edad de 7 días, después de los cuales fueron evaluadas.

Cuadro 5.2. Tiempo (seg (s)), promedio de aguijoneo y el error estándar para las abejas africanizadas y europeas que realizaron el trabajo de guardia y abejas del interior (nido) colectadas de los ambientes que compartían en común, de colonias no relacionadas (ambientes africanizados y europeos) después de la aplicación de un estímulo eléctrico de 0.5mA

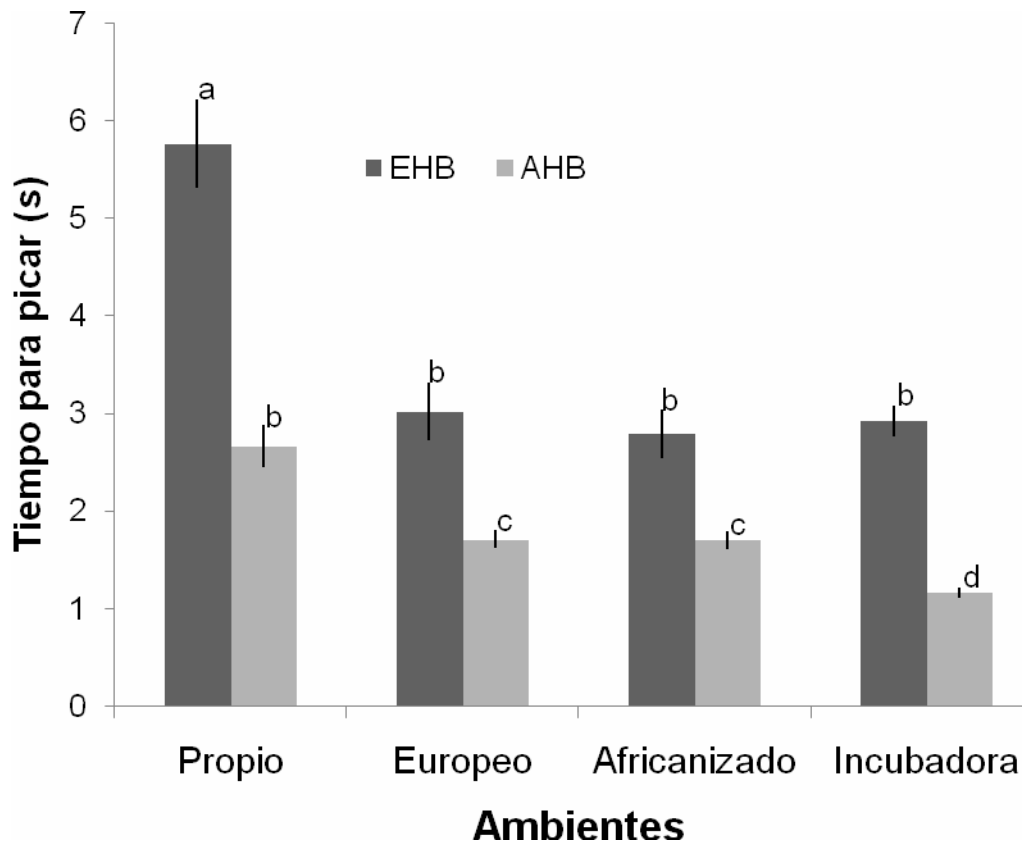
Genotipo	Trabajo de Especialización ¹	Ambiente	
		Africanizado ²	Europeo ²
Africanizado	Guardia	1.40±0.12 ^a (n=103)	1.69±0.14 ^b (n=130)
Africanizado	Nido	1.96±0.14 ^c (n=124)	1.73±0.12 ^{b,c} (n=131)
Europeas	Guardia	3.05±0.41 ^d (n=166)	3.45±0.55 ^d (n=110)
Europeas	Nido	2.44±0.37 ^d (n=118)	2.65±0.25 ^d (n=125)

Diferentes literales indican diferencias significativas de medias, basadas en análisis de varianza y pruebas de Tukey con datos transformados a logaritmo + 1. Los datos presentados son valores no transformados.

¹ Obreras marcadas de dos grupos de trabajo fueron colectadas y evaluadas. Abejas de siete días de edad tomadas del interior de las colonias y abejas guardianas de 14 a 21 días de edad que se encontraban a la entrada de la colmena.

² En las colonias de ambientes africanizados o europeos se encontraban abejas pintadas de los genotipos africanizados y europeos. que fueron introducidas conjuntamente.

Figura 5.1. Efecto del genotipo y el ambiente para el tiempo (seg (s)), promedio para picar ($s \pm ee$). Abejas obreras africanizadas (AHB) y europeas (EHB) que fueron colectadas de su propia colonia (natal), de colonias de ambiente compartido, (ambientes Africanizados y Europeos) o de un ambiente artificial (mantenidas en una incubadora); que fueron sometidas a un estímulo eléctrico de 0.5 mA y se registró el tiempo que las abejas tardaron en picar un sustrato de cuero.



Diferentes literales indican diferencias significativas de medias, basadas en un análisis de varianza y pruebas de Tukey con datos transformados a $\log + 1$. Los datos actuales son valores no transformados

Lista de Referencias

- Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ (2003). Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie* 34: 439-447.
- Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ (2004). Binary trait loci that influence honey bee guarding behavior. *Ann Entomol Soc Am* 97: 177-183.
- Arechavaleta Velasco ME, Hunt GJ , Emore C (2003). Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bees. *Behav Genet* 33: 357-364.
- Balderrama N, Núñez J, Guerrieri F, Giurfa M (2002). Different functions of two alarm substances in the honeybee. *J Comp Physiol A* 188: 485-491.
- Breed MD (1983). Correlations between aggressiveness and corpora allata volume, social insolation, age and dietary protein in worker honeybees. *Insect Soc* 30: 482-495.
- Breed MD, Rogers KB (1991). The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 21: 295-303.
- Breed MD, Rogers KB, Hunley JA, Moore AJ (1988). A correlation between guard behaviour and defensive response in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 37: 515-516.
- Breed MD, Robinson GE, Page RE (1990). Division of labor during honey bee colony defense. *Behav Ecol Sociobiol* 27:395-401.
- Breed MD, Smith TA, Torres A (1992). Role of guard honeybees (Hymenoptera: Apidae) in nestmate discrimination and replacement of removed guards. *Ann Entomol Soc Am* 85:633-637.
- Breed MD, Guzmán- Novoa E, Hunt GJ (2004). Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annu Rev Entomol* 49:71-298.
- Burrell BD, Smith BH (1994). Age- but not caste- related regulation of abdominal mechanisms underlying the sting reflex of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 174: 581-592.

- Buttler CG, Free JB (1952). The behavior of worker honeybees at the hive entrance. *Behaviour* 4:262-292.
- Collins AM, Blum MS (1982). Bioassay of compounds derived from the honeybees sting. *J Chem Ecol* 8:463-470.
- Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Bolten AB (1982). Colony defense by Africanized and European honeybees. *Science* 218:72-74.
- Collins AM, Blum MS. Bioassay of compounds derived from the honeybee sting. *J. Chem Ecol.* 1982;8:463-470.
- Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Brown MA (1984). Heritabilities and correlations for several characters in the honey bee *J Hered* 75:135-140.
- De Grandi- Hoffman G, Collins AM, Martin JH, Schmidt JO, Spangler HG (1998). Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) *J Insect Behav* 11:37-45.
- Free JB. The stimuli releasing the sitnging response of honeybees. *Anim Behav* 1961;9:193-196.
- Ghent RL, Gary NE (1962). A chemical alarm releaser in honey bee stings (*Apis mellifera* L.). *Psyche* 69:1-6.
- Giray T, Guzmán- Novoa E, Aron CW, Zelinsky B, Fahrbach SE, Robinson GE (2000). Genetic variation in worker temporal polyethism and colony defensiveness in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behav Ecol* 11:44-55.
- Guzmán- Novoa E, Page RE Jr (1993). Backcrossing Africanized honey bee queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann Entomol Soc Am* 86:352-355.
- Guzmán- Novoa E, Page RE Jr (1994). Genetic dominance and worker interactions affect honeybee colony defense. *Behav Ecol* 5:91-97.
- Guzmán- Novoa E, Hunt GJ, Uribe- Rubio JL, Smith C, Arechavaleta- Velasco ME (2002). Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honeybee defensive behavior: results of colony and individual behavioral assays. *Behav Genet* 32: 95-102.

Guzmán- Novoa E, Prieto- Merlos D, Uribe- Rubio JL, Hunt JG (2003). Relative reliability of four fields assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*). J Apic Res 42:42-46.

Guzmán- Novoa E, Hunt GJ, Uribe- Rubio JL, Prieto- Merlos D (2004). Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*).defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. Apidologie 35:15-24.

Guzmán- Novoa E, Hunt GJ, Page RE Jr, Uribe-Rubio JL, Prieto- Merlos D, Becerra- Guzmán F (2005). Paternal effects on the defensive behavior of honey bees. J Hered 63:1-5.

Hunt GJ (2007). Flight and fight. A comparative look at the physiology and genetics of honey bee defensive behavior. J Insect Physiol 53:399-410.

Hunt GJ, Guzmán- Novoa E, Fondrk MK, Page RE Jr (1998). Quantitative trait loci for honeybee stinging behavior and body size. Genetics 148:1203-1213.

Hunt GJ, Guzmán- Novoa E, Uribe-Rubio JL, Prieto- Merlos D (2003). Genotype by environment interactions in honey bee guarding behavior. Anim Behav 66:469-477.

Hunt GJ, Amdam GV, Schlipalius D, Emore C, Sardesai N, Williams CE, Rueppell O, Guzmán- Novoa E, Arechavaleta-Velasco M, Chandra S, Fondrk MK, Beye M, Page RE Jr (2007). High recombination rates lead targeted genome scans for foraging and defensive-behavior genes Naturwissenschaften 94:247-267.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México (DF): INEGI (2006).

Kolmes SA, Fergusson-Kolmes LA (1989). Measurements of stinging behaviour in individual worker honeybees (*Apis mellifera* L.). J Apic Res 28:71-78.

Lindauer M. Communication Among Social Bess. 1971 Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Lenoir JC, Laloï D, Dechaume-Moncharmont FX, Solignac M, Pham MH(2006). Intra-colonial variation of the sting extension response in the honey bee *Apis mellifera*. Insect Soc 53:80-85.

Maschwitz UW (1964). Alarm substances and alarm behaviour in social hymenoptera. *Nature* 204:324-227.

Moncharmont F-XD, Decourtye A, Hennequet-Hantier C, Pons O, Pham-Delégue M-H (2003). Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environ Toxicol Chem* 22: 3088-3094.

Moritz RFA, Bürgin H (1987) Group response to alarm pheromones in social wasps and the honeybee. *Ethology* 76:15-26.

Moritz RFA, Southwick EE (1987). Phenotype interactions in group behavior of honey bee workers (*Apis mellifera* L.) *Behav Ecol Sociobiol* 21:53-57.

Núñez JA, Almeida L, Balderrama N, Giurfa M (1998). Alarm pheromone induces stress analgesia via an opioid system in the honey bee. *Physiol Behav* 63:75-80.

Page RE Jr, Erber J (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89:91-106

Page RE, Robinson GE (1991). The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Adv Insect Physiol* 23:117-169.

Paxton RJ, Sakamoto CH, Rugiga FCN (1994). Modification of honey bee (*Apis mellifera* L.) stinging behaviour by within-colony environment and age. *J Apic Res* 33:75-82.

Prieto-Merlos D (2002). Confiabilidad de pruebas y métodos para evaluar el comportamiento defensivo y el tamaño corporal en tres genotipos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). MS Thesis, Nat Univ, Mex, DF, pp.56.

Ribbands CR (1954). The defense of the honeybee community. *Proc Roy Soc Lond (B)* 142:514-524.

Robinson GE (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 37:637-665.

Robinson GE, Page RE Jr (1988). Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* 333:356-358.

Seeley TD. *Honeybee Ecology*. 1985. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.

Sokal RR, Rohlf FJ (1995). Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Freeman, New York, NY.

Southwick EE, Moritz RFA (1987). Effects of meteorological factors on defensive behaviour of honey bees. Int J Biometeorol 31:259-265.

Sylvester H and Rinderer TE. Fast Africanized bee identification system (FABIS) manual. Am. Bee J. 1987; 127:511-516.

Uribe- Rubio JL, Guzmán- Novoa E, Hunt GJ, Correa BA, Zozaya RJA (2003). Effect of Africanization on honey production, defensive behavior and size in honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Mexican high plateau. Vet Mex 34:47-59.

Wilson EO (1985). The sociogenesis of insect colonies. Science 228: 1489-1495.

Winston ML (1987). The biology of the honeybee. Harvard University Press, Cambridge, MA.

CONCLUSIONES

Mediante la medición de la variación de la expresión del comportamiento defensivo de las abejas africanizadas y europeas, a nivel individual y colectivo en ambientes propios y en ambientes compartidos a través de la aplicación de diferentes estímulos se llegó a las siguientes conclusiones:

Ambientes propios con respuesta colectiva

a) Se ha comprobado que las abejas africanizadas respondieron más rápido para picar y en mayor cantidad de individuos, cuando las colonias fueron expuestas a un estímulo químico, movimiento y de color en comparación con las respuestas observadas en las abejas europeas.

b) Se ha comprobado por otra parte que la expresión del comportamiento defensivo tiene porcentajes elevados de variación. Sin embargo los resultados para el tiempo que tarda una abeja en picar sugieren que esta característica puede ser útil en la separación de colonias defensivas de dóciles.

c) Se encontró una correlación negativa significativa entre el tiempo que tarda la primera abeja en picar y el número de abejas que pican un sustrato, lo cual apoya los resultados de trabajos previos y sugiere que estas dos características puedan ser útiles en la separación de colonias defensivas y dóciles.

d) El número de abejas que respondieron a un estímulo químico a la entrada de la colmena fue significativamente mayor en las colonias africanizadas que en las europeas, validando que esta metodología es útil para la separación de colonias defensivas y dóciles.

e) El número de abejas que persiguen a los operadores de la colmena cuando se alejaron a 25 m fue estadísticamente superior en las colonias africanizadas que en las europeas, comprobando que también esta metodología es útil en la separación de colonias defensivas y dóciles.

f) Se encontró una correlación significativa entre el número de abejas que respondieron a un estímulo químico y el número de abejas que persiguieron a los operadores, lo que también indica que estas características pueden ser útiles en la separación de colonias defensivas y dóciles.

Ambientes compartidos con respuesta colectiva: Efectos genotípicos

g) La propensión al comportamiento de guardia no fue afectada por el genotipo, observándose mayor propensión de las abejas para esta característica en los ambientes europeos que en los africanizados.

h) Se presentaron efectos de interacción genotipo por ambiente para la característica de propensión de las abejas.

i) Efectos del genotipo influyeron sobre la persistencia de las abejas para realizar la guardia. Las abejas africanizadas realizaron dos días más de guardia en comparación con lo encontrado en las abejas europeas.

j) Los efectos de interacción genotipo por ambiente se hicieron aparentes al comparar el número de días que las abejas hicieron guardia entre las abejas africanizadas y europeas en ambos ambientes (africanizado y europeo).

k) La edad de inicio estuvo afectada por el genotipo y no por el ambiente, ni por la interacción de estos dos factores.

l) Las abejas africanizadas se iniciaron con dos días antes que las abejas europeas en las actividades de guardia.

Ambientes propios con respuesta colectiva: Efectos Genéticos

m) Se encontraron efectos genéticos aditivos para la característica de guardia medida como el número de abejas que responden a un estímulo químico a la entrada de la colmena y para la longitud del ala anterior de las abejas obreras.

n) Se encontraron efectos maternos y paternos actuando sobre el número de abejas que respondieron a un estímulo químico a la entrada de la colmena.

ñ) Solo se encontraron efectos paternos actuando sobre la longitud del ala anterior de las obreras.

o) Se encontró una correlación negativa ($r = -0.42$) entre el número de abejas que responden a un estímulo químico y la longitud del ala anterior de las obreras. Lo cual podría ser útil en la selección de colonias dóciles con alas grandes.

p) La metodología computarizada propuesta para la medición de la longitud del ala anterior de las abejas sugiere que es posible separar los grupos parentales africanizados y europeos de sus híbridos y potencialmente se podría emplear como prueba de certificación y diagnóstico de africanización y para fines de investigación.

Ambientes propios y compartidos con respuestas individuales

g) Es la primera vez que en un solo estudio se incluyen abejas de genotipos africanizados y europeos, de edad conocida y pertenecientes a un grupo de abejas que realizan actividades de guardia y que son evaluados con un solo

método para determinar sus umbrales de reacción a un estímulo eléctrico cuando las abejas se encuentran en ambientes propios y compartidos.

q) Se confirmó la validez y confiabilidad del uso del estimulador eléctrico para comparar las respuestas de aguijoneo a nivel individual de abejas pertenecientes a grupos africanizados y europeos.

r) Las abejas africanizadas respondieron más rápido para picar un sustrato que las europeas en todos los ambientes que se probaron después de aplicar un estímulo eléctrico fijo.

s) Se demostraron efectos genéticos y ambientales sobre el tiempo de reacción de las abejas al aplicar un estímulo eléctrico en abejas africanizadas y europeas.

t) Se presentaron efectos de genotipo por ambiente para el tiempo que las abejas tardan en responder al estímulo eléctrico.

u) Efectos de interacción genotipo por división del trabajo se presentaron entre abejas del genotipo africanizado y europeo que realizaban actividades de guardia y abejas tomadas del nido.

v) Se demostró que las abejas especializadas en la guardia tienen umbrales de respuesta de aguijoneo menores en comparación con lo encontrado en abejas no especializadas en el aguijoneo.

x) Los resultados sugieren que el genotipo, la división del trabajo de especialización y el ambiente del nido influyen sobre los umbrales de respuesta de aguijoneo de las abejas.

Genotype, Task Specialization, and Nest Environment Influence the Stinging Response Thresholds of Individual Africanized and European Honeybees to Electrical Stimulation

José Luis Uribe-Rubio · Ernesto Guzmán-Novoa ·
Carlos G. Vázquez-Peláez · Greg J. Hunt

Received: 20 March 2007 / Accepted: 15 October 2007 / Published online: 2 November 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract This study was conducted to analyze the stinging response thresholds of individual European and Africanized worker honeybees (*Apis mellifera* L.) to electrical stimulation. Newly emerged workers were identified, and either were placed into an incubator, into their natal colonies, or cross-fostered in common colonies of European or Africanized ancestry. Nest and guard bees of each type were collected and exposed to an electric stimulus of 0.5 mA, and the time they took to sting a leather substrate was recorded. Africanized bees consistently had significant lower thresholds of defensive response than European bees across all of the environments tested. Guards were faster to sting than nest bees only for the Africanized genotype, suggesting that alleles of African origin have pleiotropic effects on guarding and stinging. This is the first study that shows that single individuals specialized in guarding also may have a lower

response threshold for stinging. Environmental effects were also evident. In all cases, bees responded faster to the electrical stimulation after being kept in environments other than their natal nest. Moreover, significant genotype by environment and genotype by task specialization interactions were found. Our results fit a model of division of labor based on differences in response thresholds to stimuli among workers of different genotypes and task groups that result in non-additive effects on colony behavior.

Keywords *Apis mellifera* · Defensive behavior · Guards · Africanized honeybees · Response thresholds · Electric stimuli

Introduction

The study of the evolution of complex social organizations is an important issue in biology. Insect colonies may serve as models of complex systems, and honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies stand as prime examples of social organization because they have large colonies and well-studied division of labor (Wilson 1985; Winston 1987).

Division of labor in insect societies can be explained by behavioral threshold variance among individual members of a colony (Page and Robinson 1991; Robinson 1992; Page and Erber 2002). In this model, it is assumed that individuals respond to stimuli on the basis of their response thresholds. Members with similar sets of thresholds will tend to perform similar tasks and thus end up in the same behavioral roles. However, differences in response thresholds among individuals may result in large differences in behavior through positive and negative feedback loops involving interactions between individuals and between individuals and their shared nest environment.

Edited by Yong-Kyu Kim.

J. L. Uribe-Rubio
CENIDFA-INIFAP, Km 1, Carretera a Colón, Ajuchitlan, Qro
76280, Mexico
e-mail: joseuribe_178@hotmail.com

E. Guzmán-Novoa (✉)
Department of Environmental Biology, University of Guelph,
Guelph, ON, Canada N1G 2W1
e-mail: eguzman@uoguelph.ca

C. G. Vázquez-Peláez
Departamento de Genética, FMVZ, UNAM, Cd. Universitaria,
Coyoacán, Mexico, DF 04510, Mexico
e-mail: carlosgv@servidor.unam.mx

G. J. Hunt
Department of Entomology, Purdue University, West Lafayette,
IN 47907-1158, USA
e-mail: ghunt@purdue.edu

Defensive behavior is a good example of a complex behavior that has been highly advantageous for the evolutionary and ecological success of honeybees (reviewed by Breed et al. 2004). Defensive tasks are carried out by individuals that specialize to either guard the colony entrance or to sting potential intruders (Breed et al. 2004), although there is overlap between these two task groups. Guards are middle-age bees (1–3 weeks old) that patrol the entrance of their colony and inspect incoming individuals, touching them with their antennae to identify them as nest mates or non-nest mates. Guards exclude bees (or other invertebrates) that are foreign to their colony, and alert other colony workers about intruders. By releasing pheromones, they recruit bees from the interior of the colony and some of the recruited bees fly out, detect, pursue and sting vertebrate intruders (Butler and Free 1952; Ribbands 1954; Maschwitz 1964; Breed et al. 1990, 1992; Arechavaleta-Velasco and Hunt 2003). So it is clear that guards play an important role in colony defense.

Numerous studies have demonstrated that guarding is a specialized task that is performed by few, genetically predisposed individuals (Robinson and Page 1988; Breed and Rogers 1991; Breed et al. 1992; Arechavaleta-Velasco and Hunt 2003, 2004; Hunt et al. 2003; Guzmán-Novoa et al. 2004) and loci associated with guarding and stinging behavior have been mapped and confirmed (Hunt et al. 1998; Guzmán-Novoa et al. 2002; Arechavaleta-Velasco et al. 2003; Arechavaleta-Velasco and Hunt 2004). Both the number of days that individuals in a colony persist at guarding and the number of bees guarding the nest entrance correlate with the intensity of the defensive response (Breed et al. 1988; Breed and Rogers 1991; Arechavaleta-Velasco and Hunt 2003). Colony environment or social interactions also may affect guarding and stinging behavior (Southwick and Moritz 1987; Breed and Rogers 1991; Guzmán-Novoa and Page 1994; Hunt et al. 2003).

Genotypic effects on the defensive behavior of honeybees are also evident in nature; Africanized bees are an example of a defensive genotype. They are significantly more aggressive than European bees (Collins et al. 1982; Guzmán-Novoa and Page 1993, 1994; Uribe-Rubio et al. 2003) and have caused thousands of human and animal deaths during the last 45 years (Breed et al. 2004) for which they have become a public health issue in the Americas. The defensive behavior of Africanized bees is heritable (Collins et al. 1984) and seems to be affected by additive and paternal effects (Guzmán-Novoa and Page 1994; DeGrandi-Hoffman et al. 1998; Guzmán-Novoa et al. 2002, 2005).

Few studies have demonstrated genotype by environment interactions for behavioral traits of honeybees. In the case of defensive behavior, it is not known how much the thresholds of response of individual bees are affected by a social environment or by the contact with older bees, or with bees specialized on defensive tasks.

An important reason why the genetic and environmental effects influencing the components of defensive behavior in honeybees have been difficult to evaluate is the inadequacy of the methods used to measure them. The defensiveness of bees has been evaluated with field and laboratory tests (reviewed by Guzmán-Novoa et al. 2003) that in most cases, rely on observations of colony-level traits such as the number of stings in a target, numbers of pursuers, or number of bees that emerge from the colony entrance in response to alarm pheromone. Field assays have the disadvantage of being influenced by multiple uncontrolled climatic variables and colony-environment effects. Laboratory assays better control for environmental effects, but the bee responses are measured under conditions that are usually done on groups of bees, and therefore their interpretation is confounded by group effects (Collins and Blum 1982; Moritz and Bürgin 1987; Moritz and Southwick 1987). Additionally, the variables measured in most laboratory assays are difficult to relate to specific components of defensive behavior in field colonies.

Few studies have measured the stinging behavior of individual bees. One of them was the study conducted by Kolmes and Fergusson-Kolmes (1989) who found that an electric shock assay applied on individual workers could clearly distinguish between defensive and gentle European honeybee colonies. The bees from the defensive colony stung faster than those of the gentle one. Using the same assay, Paxton et al. (1994) found that age affected the speed at which bees stung. Older bees stung at a lower voltage threshold than 1-day old bees. Electrical stimulation has also been used to measure defensive behavior of individual Africanized bees (Nuñez et al. 1998; Balderrama et al. 2002). Lenoir et al. (2006) used an electrically stimulated, sting-extrusion test on individual, restrained European honeybees and found differences of response among patrines, which indicated genetic effects for this behavior. Individual tests are therefore important to study the defensive behavior of honeybees because group measures may be subject to nonlinear effects owing to interactions among workers.

The present study addresses the important question of variation in thresholds of response for stinging behavior between individual European and Africanized honeybees. We report results of stinging response-thresholds to electric stimulation of nest and guard bees taken from their natal colonies, from cross-fostered colonies, or from cages kept in an incubator.

Material and methods

These studies were conducted in the Center for Beekeeping Development, located near Villa Guerrero, Mexico (19° N,

99° W). For all the experiments, we obtained Africanized bee stocks from swarms captured locally. The European colonies used were derived from queens that were instrumentally inseminated with the semen of 8–10 drones that were obtained from Glenn Apiaries of Fallbrook CA, USA and naturally mated queens from a breeding program in Ontario, Canada. Morphometric and mitochondrial DNA analyses (Nielsen et al. 1999) of the queens' progeny were used to confirm the origin of our source colonies. Six Africanized and six European bee colonies that were unrelated among each other were used for the experiments. Three, six and three colonies for each of the two bee types were used for the experiments 1, 2 and 3, respectively.

Experimental colonies were contained in standard Dardant jumbo-size hives. The populations of the experimental colonies were equalized 4 weeks before introducing marked bees into them by removing bees and frames of brood from the most populous colonies. Each of the experimental colonies contained ca. 6,000 cm² (4–5 frames) with capped brood and eight frames of adult bees (about 18,000 individuals) after equalization. Hives were positioned at least 5 m apart to minimize inter-hive drifting of workers.

To obtain bees from the source colonies (Africanized and European), frames with capped brood containing pupae ready to eclose as adults were removed from these colonies and placed in screened cages (3 mm mesh) inside of an incubator, maintained at 33°C and 60% RH. Newly emerged workers were marked on the back of their thorax with colored enamel paint according to the source type. Five hundred marked Africanized bees were introduced into each of the three Africanized colonies, and 500 European bees into each of the three European colonies, to be used in Experiment 1. This procedure was completed in 1 day, thus the age of the introduced bees was <24 h. Additionally, 1 week later, 1,000 marked bees (500 Africanized and 500 European) were cross-fostered into each of the three European and the three Africanized colonies, to be used in Experiment 2 (different from the ones used as colony environments for Experiment 1, see below).

Experiment 1: workers in their natal nest

Three European or three Africanized colonies containing only marked and unmarked individuals of their own genotype were housed in hives that had plywood-based, plexiglass-covered platforms (30 cm long) that served as entrance extensions, thus permitting the observation of the color (and hence the genotype) of marked guard bees. Marked workers from two behavioral categories were collected from these colonies to subject them to an electric-stimulus assay. Seven-day old marked nest bees

from the interior of the colonies were captured by opening the hives and marked bees performing guarding bouts were captured at the hive entrance (the age of guards varied between 14 and 21 days). Guard bees were detected by observing their "typical" behavior (Ribbands 1954; Ghent and Gary 1962) at the hive entrance for a period of 5 min before taking the sample. Guard bees stand with their forelegs off the ground and their antennae held forwards to touch and inspect incoming bees. Once identified, guards were captured by gently placing an inverted 15-ml plastic tube over the bee on the landing board of the hive. These bees were immediately transported to the laboratory, where they were tested for their time of response to an electric stimulus. A total of 120 guard and 150 nest bees of Africanized origin, as well as a total of 121 guard and 151 nest bees of European origin were tested over a period of 4 days.

Experiment 2: workers in cross-fostered nests

Marked nest and guard bees originating from three Africanized and three European colonies that had been cross-fostered together in unrelated colonies of the two genotypes were collected as above from three different European (European environment) and three different Africanized (Africanized environment) colonies. Then, they were subjected to the electric stimulus assay. A total of 103 guard and 124 nest bees of Africanized origin, as well as a total of 166 guard and 118 nest bees of European origin were tested from Africanized colony environments. Additionally, a total of 130 guard and 131 nest bees of Africanized origin, as well as a total of 110 guard and 125 nest bees of European origin were tested from European colony environments. These tests were conducted over a period of 4 days.

Experiment 3: workers in an artificial environment

Worker bees of each genotype were allowed to emerge in an incubator (33°C and 60% RH). Then, equal numbers of bees from each of the combs with emerging brood for each bee type were transferred to a different 3 mm wire-mesh cage (15 × 15 × 25 cm) containing a small empty comb, and were fed with a 50% sugar solution ad libitum. They were collected and subjected to the electric stimulus assay 7 days after their emergence. Bees were permitted to age because it is known that the sting reflex is fully developed in bees older than 5–7 days (Burrell and Smith 1994; Paxton et al. 1994). A total of 120 Africanized and 120 European bees were tested over a period of 2 days.

The assay

A constant-current stimulator (Isostim 360, model A 320 R-E, World Precision Instruments, Sarasota, Fla., USA) was used to provide a constant stimulus regardless of variation in resistance caused by the manner a bee touched the wires, or the size of the bee. A fixed electric stimulus of 0.5 mA was applied, with a pulse interval of 250 ms and an amplitude of 2.0 ms. These conditions were set based on preliminary studies that tested the effects of varying pulse rate, interval, voltage or current to induce stinging. A constant current of 0.5 mA showed good separation between European and Africanized workers captured at the hive entrance (Prieto-Merlos 2002; Uribe-Rubio et al. unpublished data). The electric stimulator was connected to a wire grid composed of 21 parallel stainless steel wires (13 cm × 2 mm) with a separation of 3.5 mm between them (Paxton et al. 1994). The grid wires were assembled in an alternate electric manner (+ and –) so that the circuit was closed by the bee touching two adjacent wires.

Individual bees were placed unrestrained above the device's grid with the aid of entomological forceps. Then, the individual was covered with an inverted plastic petri dish (57 mm diameter) that restrained the bee within the grid, but allowed her to freely walk on it. Then, the bee was left undisturbed for 1 min to allow her to acclimate, before being stimulated. Each bee was then subjected to the electric stimulation and the time taken by the individual from the application of the electric stimulus to the stinging of a black suede leather patch placed underneath the wire grid, was measured with a precision chronometer (Leonidas trackmaster, model 8042, Bern, Switzerland). The black suede was used to provide a more realistic target to sting. Defenders localize potential intruders in the field by visual cues and odor (Breed et al. 2004). Bees are more responsive to dark colored objects with a mammalian smell (Free 1961). A new suede patch was used for each bee and the wire grid was cleaned with a solution of water and neutral soap after each test to remove possible residues of alarm pheromones left by the previous bee.

Statistical analyses

We tested data for normality using the Shapiro-Wilk test. The homogeneity of the variances was also verified using the Bartlett test. Since data were not normally distributed, a log + 1 transformation was performed to produce a normal distribution before analyzing them. Transformed data for time to sting were then subjected to multi-way analyses of variance (ANOVA) for bee genotype (Africanized or European), task specialization (nest or guard bee), and hive environment (Natal, Africanized, European, or artificial).

When significant differences were found, treatment means were compared with Tukey tests (Sokal and Rohlf 1995).

Results

In all environments, Africanized bees responded significantly faster to the electric stimulus than European bees ($F_{1,1775} = 220.55$, $P < 0.0001$; Table 1). In fact, the phenotypic distributions just barely overlapped. The stinging time across the different environments ranged from 1.16 ± 0.05 to 2.67 ± 0.22 s and from 2.80 ± 0.25 to 5.77 ± 0.45 s, for Africanized and European bees, respectively (Fig. 1).

No overall effect of task specialization was found, but there was a significant interaction between genotype and task ($F_{1,1775} = 8.69$, $P = 0.0033$; Table 1). Guards and nest bees of European origin did not differ for their time of response to the electric stimulation, regardless of rearing environment. But for the Africanized genotype, guards stung significantly faster than nest bees when co-fostered along with 500 European bees in Africanized hives that were unrelated to their natal nest (1.40 ± 0.12 s; Table 2).

Table 1 Analysis of variance for time to sting of guard or nest Africanized and European honeybees collected from their natal colony, from cross-fostered, unrelated colonies, or from an artificial environment (incubator) after the application of a 0.5 mA electric stimulus^a

Source of variation	df	Mean square	F	P
Genotype (g)	1	56.78	220.55	<0.0001
Task (t) ^b	1	0.30	1.05	0.3062
Environment (e) ^c	3	14.77	57.37	<0.0001
g × t	1	2.46	8.69	0.0033
g × e	3	3.06	11.90	<0.0001
t × e ^d	2	0.88	3.10	0.0455
g × t × e ^d	2	0.38	1.33	0.2639
Error	1775	0.28		

^a Analysis based on log + 1 transformed-data

^b Marked workers from two task groups were collected and assayed. Seven-day old nest bees from the interior of the colonies, and bees performing guarding bouts at the hives' entrances

^c Colony environments consisted of either only European and only Africanized bees or cross-fostered environments (European and Africanized workers fostered together in either Africanized or European, unrelated colonies). The artificial environment consisted of an incubator maintained at 33°C and 60% RH where workers were emerged and kept for 7 days until assayed

^d Only the data from colony environments were used for the analyses of these interactions. The artificial environment was excluded from these analyses because bees collected from the incubator were not sorted by task specialization

Effects of genotype, task, environment (colony or incubator), and interaction of genotype by task and by environment are shown

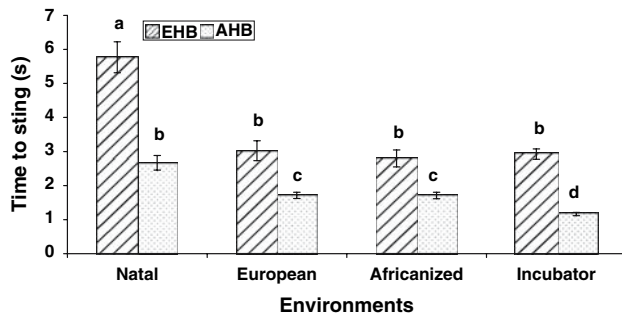


Fig. 1 Effect of genotype and environment for mean time to sting ($s \pm$ s.e.). European (EHB) and Africanized (AHB) worker honeybees were collected from their natal colony, from cross-fostered, unrelated colonies (Africanized or European environment), or from an artificial environment (caged in an incubator); then they were subjected to a 0.5 mA electric stimulus and the time they took to sting a leather substrate was recorded. Different literals indicate significant differences of means, based on analysis of variance and Tukey tests of log + 1 transformed-data. Actual non-transformed values are shown

In addition, there was a significant interaction between worker task group and colony environment ($F_{2,1775} = 3.10$, $P = 0.0455$; Table 1).

There were significant differences in the workers' times of defensive response among the different environments ($F_{3,1775} = 57.37$, $P < 0.0001$; Table 1). Bees stung significantly faster after they were kept in a foreign colony or artificial environment than when they were kept in their original colony. The fastest responses to the electric stimulus were those of bees emerged and kept in an incubator (2.92 ± 0.15 s for European bees and 1.16 ± 0.05 s for Africanized bees). There were also genotype by environment interactions ($F_{3,1775} = 11.90$, $P < 0.0001$; Table 1). European workers reduced their times of defensive response between 47.6 and 51.5% when kept in foreign colonies, relative to their responses when sampled from their natal colonies. Africanized bees showed a lesser decrease in response times when kept in foreign colonies relative to their natal colonies (<36.0%; Fig. 1).

Discussion

This is the first time that individual Africanized and European bees of known age and defensive task-related group (nest and guard bees) have been compared for stinging response to an electric stimulation. Results showed that Africanized bees consistently responded faster than Europeans to the stimulus across all of the environments tested. Thus, they must have a lower threshold of stinging response than their European counterparts. The genotypic effects demonstrated here are in accordance with numerous studies that have shown that Africanized bees are more defensive than Europeans (reviewed by Breed et al. 2004; see also Hunt 2007) and confirm the validity and reliability of using an electric stimulator to compare defensive responses and to test threshold models in honeybee studies.

Kolmes and Fergusson-Kolmes (1989) also found genetic differences for the level of electric stimulation that elicited a defensive response between groups of workers taken from the nest of European bee colonies that varied in their defensive behavior. Lenoir et al. (2006) reported that restrained workers of different patriline in a colony of European origin varied in their tendency to extrude their stinger when subjected to an electric stimulus. In another study using a similar methodology, Balderrama et al. (2002) tested Africanized bee foragers in Venezuela. They looked at stinger extrusion after 2 s of sequential exposure to an electric stimulus that increased from 2 to 16 V. They found that the higher the voltage, the higher the response of the bees, up to 8 V. Then, a plateau in the level of responses was reached.

The above studies differed from ours in that bees were restrained in a holder—which probably caused significant stress to the bees—and no comparisons between Africanized and European bees were performed; only European bees were tested in the first two studies and only Africanized bees were tested in the last one. Additionally, previous studies in which electric stimulation was used to

Table 2 Mean time to sting ($s \pm$ s.e.) for guard and nest Africanized and European honeybees collected from cross-fostered, unrelated colonies (Africanized or European environment) after the application of a 0.5 mA electric stimulus¹

Genotype	Task specialization ²	Africanized environment ³	European environment ³
Africanized	Guard	1.40 ± 0.12^a ($n = 103$)	1.69 ± 0.14^b ($n = 130$)
Africanized	Nest	1.96 ± 0.14^c ($n = 124$)	$1.73 \pm 0.12^{b,c}$ ($n = 131$)
European	Guard	3.05 ± 0.41^d ($n = 166$)	3.45 ± 0.55^d ($n = 110$)
European	Nest	2.44 ± 0.37^d ($n = 118$)	2.65 ± 0.25^d ($n = 125$)

¹ Different literals indicate significant differences of means, based on analysis of variance and Tukey tests of log + 1 transformed-data. Actual non-transformed values are shown

² Marked workers from two task groups were collected and assayed. Seven-day old nest bees from the interior of the colonies, and bees performing guarding bouts at the hives' entrances

³ Colony environments consisted of cross-fostered colonies (European and Africanized workers fostered together in either Africanized or European, unrelated colonies)

study the defensive behavior of honeybees did not compare bees performing different tasks.

Ours is the first study showing evidence indicating that in some genotypes of honeybees, individuals specialized in guarding also may have a lower response threshold for stinging, which supports the hypothesis that guards have lowered response thresholds to defensive stimuli (Robinson and Page 1988). Individuals that specialized in guarding behavior were faster to sting than 7-day old nest bees for the Africanized genotype, but not for the European one. The reason why European guard bees were not faster to sting than nest bees of the same genotype is not clear, particularly because it is known that QTL, *sting-1*, *sting-2*, and *sting-3*, all have been found to have significant effects on both guarding and stinging behavior in a colony environment in families that have a single patriline (Guzmán-Novoa et al. 2002; Arechavaleta-Velasco et al. 2003). However, guard bees of European origin are not more likely to sting than nest bees in colony environments with multiple patrilines (Arechavaleta-Velasco and Hunt 2003). Perhaps differences were found between Africanized guard bees and Africanized nest bees in the multiple-patriline colonies of this study because the alleles of African origin have a greater effect on the stimulus response threshold than the allelic variation within European bees. Additionally, the fact that Africanized bees are more persistent as guards than are European bees reinforces this argument. Hunt et al. (2003) showed that Africanized workers guarded much longer than European bees in their natal colonies. In co-fostered colonies composed of different sources of European and Africanized bees, the time that bees spent performing guarding bouts was about 50% higher for the Africanized genotype. Moreover, Africanized bees (but not Europeans) were more persistent at guarding in Africanized colony environments than in European environments. This genotype by environment interaction is similar to our current results that show the lowest stinging response thresholds for Africanized guards in Africanized colonies.

It is unlikely that the lower response thresholds of Africanized guards compared to nest bees was a consequence of being a week older, because previous studies reported that 1-week old European bees have response thresholds equivalent to older bees and European bees develop a little more slowly (Paxton et al. 1994; Giray et al. 2000; Uribe-Rubio et al. unpublished data).

Environmental effects were evident in this study. In all cases, bees responded faster to the electrical stimulation after being kept in environments other than their natal colony. It is not clear why this happened, but perhaps the non-natal environments used in this study were relatively stressful to the introduced workers, resulting in increased sensitivity to defensive stimuli. The acceptance of worker

bees into colonies is affected by whether they have a particular colony odor that is influenced by genetic and environmental components, although younger bees are more readily accepted than older bees (Breed et al. 2004). Perhaps host workers of the cross-fostered colony environments engaged in more agonistic behavior towards introduced workers than did workers of their natal colonies, or cross-fostered workers may have had fewer instances of direct food sharing. Stinging responses and sensitivity to stimuli exhibited by honeybees may be regulated by neuronal activity mediated by neurohormones in the central nervous system (reviewed by Hunt 2007; Hunt et al. 2007). Aggressive interactions or stress can cause changes in titers of specific neurohormones or neurotransmitters and can influence thresholds of response to different stimuli.

The fastest responses to electric stimulation were those of bees that were emerged and kept for 7 days in an artificial environment (the incubator). When these workers were tested, they responded much faster than those that were kept in their own colonies. This result was unexpected and was similar to results from cross-fostered colony environments. Seven-day old workers captured from cages in the incubator, in general showed similarly low thresholds of response to the electric stimulation as those of workers captured from cross-fostered colonies (Fig. 1). These incubator findings suggest that physical contact with older individuals and queen pheromone, as well as development within a colony environment is not essential for workers to reduce their threshold of response to defensive stimuli. Additionally, these results reinforce the hypothesis that stress caused by a different environment from that of natal colonies affects the stinging response thresholds of honeybees.

It is highly likely that the incubator environment was more stressful to the bees than colony environments. It is known that the lifespan of bees in cages is much reduced from that of bees in colonies, especially when caged in small groups (Moncharmont et al. 2003). It has also been shown that stress may cause increased defensive behavior; workers caged in isolation for 5 days exhibited increased levels of aggression towards foreign queens (Breed 1983). In spite of this artificial environmental influence on response thresholds for stinging behavior, Africanized and European bees consistently showed differences relative to each other and the variance within genotypes was lowest in the caged bees (Fig. 1). Therefore, our results support the notion that it would be valid to compare different genotypes by keeping bees in incubators in further studies. In another study in which bees were also emerged and kept for several days in an incubator before subjecting them to electric stimulations, workers from different patrilines showed significant differences in stinger extension (Lenoir et al. 2006). In this study, like in ours, environmental effects were not sufficiently large to prevent

detection of significant differences between bees of different genotype.

Africanized bees are smaller than European bees. Thus, it could be argued that the differences found between European and Africanized bees were due to the relationship between voltage of the shock and body size differences between the two worker genotypes. However, body size could not have influenced the stimulus because we used a constant-current stimulator, which corrects for differences in resistance caused by different bee body types. Moreover, European and Africanized bees reduced their time to sting significantly when kept in foreign nests or in an artificial environment compared with responses when sampled from their natal nest (Fig. 1), and still the differences between genotypes were maintained.

Our results suggest that genotype, task specialization, and nest environment influence the stinging response thresholds of honeybees. The identification of these components associated with the variability in stinging behavior of individual honeybees is consistent with a response-threshold model that explains the division of labor in the colony as the result of variability for the sensitivity to various stimuli among its members (Page and Robinson 1991; Robinson 1992; Page and Erber 2002). Knowledge gained about the effect of these components on defensive behavior, and the electrical stimulus assay that we have developed will be useful for further genetic dissection of this complex social behavior.

Acknowledgments We thank the Mexican Council of Science and Technology-CONACYT, the National University of Mexico, INI-FAP, and the U.S. National Science Foundation (IBN 0110842) for the financial support received to conduct these experiments. We also thank Carlos Robles, Eusebio Sánchez, Alberto García, Cristina Delabra, Maddelyne Uribe, Miguel Arechavaleta, and Reyes López for their participation in the experimental work. Gerardo Perera critically reviewed this manuscript.

References

- Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ (2003) Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie* 34: 439–447
- Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ (2004) Binary trait loci that influence honey bee guarding behavior. *Ann Entomol Soc Am* 97:177–183
- Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ, Emore C (2003) Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bees. *Behav Genet* 33:357–364
- Balderrama N, Nuñez J, Guerrieri F, Giurfa M (2002) Different functions of two alarm substances in the honeybee. *J Comp Physiol A* 188:485–491
- Breed MD (1983) Correlations between aggressiveness and corpora allata volume, social isolation, age and dietary protein in worker honeybees. *Insect Soc* 30:482–495
- Breed MD, Rogers KB (1991) The behavioral genetics of colony defense in honeybees: genetic variability for guarding behavior. *Behav Genet* 21:295–303
- Breed MD, Rogers KB, Hunley JA, Moore AJ (1988) A correlation between guard behaviour and defensive response in the honeybee, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 37:515–516
- Breed MD, Robinson GE, Page RE (1990) Division of labor during honey bee colony defense. *Behav Ecol Sociobiol* 27:395–401
- Breed MD, Smith TA, Torres A (1992) Role of guard honey bees (Hymenoptera: Apidae) in nestmate discrimination and replacement of removed guards. *Ann Entomol Soc Am* 85:633–637
- Breed MD, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ (2004) Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annu Rev Entomol* 49:271–298
- Burrell BD, Smith BH (1994) Age- but not caste-related regulation of abdominal mechanisms underlying the sting reflex of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 174:581–592
- Buttler CG, Free JB (1952) The behavior of worker honeybees at the hive entrance. *Behaviour* 4:262–292
- Collins AM, Blum MS (1982) Bioassay of compounds derived from the honeybee sting. *J Chem Ecol* 8:463–470
- Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Bolten AB (1982) Colony defense by Africanized and European honeybees. *Science* 218:72–74
- Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Brown MA (1984) Heritabilities and correlations for several characters in the honey bee. *J Hered* 75:135–140
- DeGrandi-Hoffman G, Collins AM, Martin JH, Schmidt JO, Spangler HG (1998) Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Behav* 11:37–45
- Free JB (1961) The stimuli releasing the stinging response of honeybees. *Anim Behav* 9:193–196
- Ghent RL, Gary NE (1962) A chemical alarm releaser in honey bee stings (*Apis mellifera* L.). *Psyche* 69:1–6
- Giray T, Guzmán-Novoa E, Aron CW, Zelinsky B, Fahrbach SE, Robinson GE (2000) Genetic variation in worker temporal polyethism and colony defensiveness in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behav Ecol* 11:44–55
- Guzmán-Novoa E, Page RE Jr (1993) Backcrossing Africanized honey bee queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann Entomol Soc Am* 86:352–355
- Guzmán-Novoa E, Page RE Jr (1994) Genetic dominance and worker interactions affect honeybee colony defense. *Behav Ecol* 5:91–97
- Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe JL, Smith C, Arechavaleta-Velasco ME (2002) Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honeybee defensive behavior: results of colony and individual behavioral assays. *Behav Genet* 32:95–102
- Guzmán-Novoa E, Prieto-Merlos D, Uribe-Rubio JL, Hunt GJ (2003) Relative reliability of four field assays to test defensive behavior of honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 42:42–46
- Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D (2004) Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. *Apidologie* 35:15–24
- Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Page RE Jr, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D, Becerra-Guzmán F (2005) Paternal effects on the defensive behavior of honey bees. *J Hered* 63:1–5
- Hunt GJ (2007) Flight and fight. A comparative look at the physiology and genetics of honey bee defensive behavior. *J Insect Physiol* 53:399–410
- Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Fondrk MK, Page RE Jr (1998) Quantitative trait loci for honeybee stinging behavior and body size. *Genetics* 148:1203–1213

- Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D (2003) Genotype by environment interactions in honey bee guarding behavior. *Anim Behav* 66:469–477
- Hunt GJ, Amdam GV, Schlipalius D, Emore C, Sardesai N, Williams CE, Rueppell O, Guzmán-Novoa E, Arechavaleta-Velasco M, Chandra S, Fondrk MK, Beye M, Page RE Jr (2007) High recombination rates lead to targeted genome scans for foraging and defensive-behavior genes. *Naturwissenschaften* 94:247–267
- Kolmes SA, Fergusson-Kolmes LA (1989) Measurements of stinging behaviour in individual worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Apic Res* 28:71–78
- Lenoir JC, Laloi D, Dechaume-Moncharmont FX, Solignac M, Pham MH (2006) Intra-colonial variation of the sting extension response in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Soc* 53:80–85
- Maschwitz UW (1964) Alarm substances and alarm behaviour in social hymenoptera. *Nature* 204:324–327
- Moncharmont F-XD, Decourtye A, Hennequet-Hantier C, Pons O, Pham-Delégue M-H (2003) Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environ Toxicol Chem* 22:3088–3094
- Moritz RFA, Bürgin H (1987) Group response to alarm pheromones in social wasps and the honeybee. *Ethology* 76:15–26
- Moritz RFA, Southwick EE (1987) Phenotype interactions in group behavior of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 21:53–57
- Nielsen DI, Ebert PR, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Kinnee SA, Page RE (1999) Identification of Africanized honey bees (hymenoptera: Apidae) incorporating morphometrics and an improved PCR mitotyping procedure. *Ann Entomol Soc Am* 92:167–174
- Nunéz JA, Almeida L, Balderrama N, Giurfa M (1998) Alarm pheromone induces stress analgesia via an opioid system in the honeybee. *Physiol Behav* 63:75–80
- Page RE Jr, Erber J (2002) Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89:91–106
- Page RE, Robinson GE (1991) The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Adv Insect Physiol* 23:117–169
- Paxton RJ, Sakamoto CH, Rugiga FCN (1994) Modification of honey bee (*Apis mellifera* L.) stinging behaviour by within-colony environment and age. *J Apic Res* 33:75–82
- Prieto-Merlos D (2002) Confiabilidad de pruebas y métodos para evaluar el comportamiento defensivo y el tamaño corporal en tres genotipos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). MS Thesis, Nat Univ, Mex, DF, pp 56
- Ribbands CR (1954) The defence of the honeybee community. *Proc Roy Soc Lond (B)* 142:514–524
- Robinson GE (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 37:637–665
- Robinson GE, Page RE Jr (1988) Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* 333:356–358
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman, New York, NY
- Southwick EE, Moritz RFA (1987) Effects of meteorological factors on defensive behaviour of honey bees. *Int J Biometeorol* 31:259–265
- Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa BA, Zozaya RJA (2003) Effect of Africanization on honey production, defensive behavior and size in honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Mexican high plateau. *Vet Mex* 34:47–59
- Wilson EO (1985) The sociogenesis of insect colonies. *Science* 228:1489–1495
- Winston ML (1987) *The biology of the honeybee*. Harvard University Press, Cambridge, MA