



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA
EN LAS POBLACIONES DE COLONIAS DE
ABEJAS MELÍFERAS DE LÍNEAS SELECCIONADAS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

FLOR GARCÍA FERNÁNDEZ

**TUTOR
MIGUEL E. ARECHAULETA VELASCO**

**COMITÉ TUTORAL
MOISÉS MONTAÑO BERMÚDEZ
ROGELIO ALONSO MORALES**

México, D.F.

2011



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.

A **Dios,**

porque con su presencia ilumina cada momento de mi vida y gracias a él tuve la oportunidad de tener a mi lado al ser humano más maravilloso que pude haber tenido a mi lado;



porque gracias a todas sus enseñanzas he podido llegar a ser una mejor persona y por ellas he podido lograr vencer cada uno de los obstáculos a los que me enfrentado y me seguiré enfrentando
"Siempre estarás en mi corazón".

A mis **hermanas,**

son las personas más importantes en mi vida, con ustedes he atravesado infinidad de situaciones adversas y juntas hemos podido salir de ellas.



por ser una especie de admirable organización y comportamiento social, increíble que siendo insectos tan pequeños sean capaces de conformarse como uno solo.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM porque en ella tuve mi formación profesional y personal, deseo que algún día las personas que la conformamos, desde administrativos, académicos, alumnos y ex-alumnos dejemos en alto el nombre de esta universidad, con **HECHOS** y no solo palabras.

A la Dra. Lety García, Dr. Felipe Ruíz, Dra. Lulú, Ing. Becerra, Nora, Elizabeth, Lety, Doña Mary, Jess que laboran en el CENID-FA, Ajuchitlán, Querétaro, así como a todos mis compañeros de maestría.

Al Dr. Moisés Montaña y al Dr. Rogelio Alonso por formar parte de mi comité tutorial y por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Gúzman, al Dr. Felipe Ruíz, a la Dra. Laura Espinosa, al Dr. José Luis Uribe y al Dr. Miguel Arechavaleta por formar parte de mi jurado.

A mis amigos que me acompañaron en este capítulo de mi vida: Mayra, Miriam, Nuri, Silvia, Manuel, Izty Net, Indira, Verónica, Brenda y a la familia Reyes Cuayáhuitl.

A mis amigos del Departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos (ACyOA): Dra. Adriana, Dra. Laura, Daniel, Angelito, Chema, Angy, Richie, Tatiana, Nidia, Carlos Robles.

A todas aquellas personas que de alguna manera formaron parte de mi vida y que por ellas he aprendido a dirigir mejor mi vida.

“El secreto de la sabiduría, el poder y el conocimiento es la humildad”.
Ernest Hemingway

CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
Justificación	6
Objetivos	7
Hipótesis	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1 Colonias experimentales	9
2.2 Análisis genético	10
2.2.1 Muestras de abejas	10
2.2.2 Extracción de ADN	10
2.2.3 Generación de marcadores moleculares	10
2.2.3.1 Secuencia de iniciadores	10
2.2.3.2 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	10
2.2.3.3 Análisis de restricción	11
2.3 Análisis estadístico	11
3. RESULTADOS	15
4. DISCUSIÓN	21
5. CONCLUSIONES	26
6. REFERENCIAS	27
7. CUADROS Y FIGURAS	31

1. INTRODUCCIÓN

La abeja africanizada se originó en Brasil en 1956 a partir de la cruce entre abejas africanas y abejas europeas (Kerr, 1967). Las colonias de este tipo de abeja presentan características que las hacen poco deseables para la apicultura ya que son altamente defensivas (Stort, 1975; Collins *et al.*, 1892; Guzmán-Novoa y Page 1993, 1994), presentan una alta tendencia a enjambrar (Otis, 1980), a evadir (Winston, 1979) y algunos estudios indican que producen menos miel que las colonias de abejas europeas (Otis, 1980; Guzmán-Novoa y Uribe, 2004).

La abeja africanizada llegó a México en 1986 (Moffet *et al.*, 1987) y a partir de este momento se inició el proceso de africanización de las colonias de abejas que existen en el país. En la actualidad las abejas africanizadas se encuentran en todo el territorio nacional (Zamora y Quezada, 2005). La africanización ha tenido un impacto negativo sobre la apicultura en México, ya que a partir de que la abeja africanizada llegó al país se observó una reducción en la producción de miel a nivel nacional. En 1985 antes de la llegada de la abeja africanizada, la producción de miel superó las 65,000 toneladas y se exportaron 48,000 toneladas (SAGARPA, 2000), mientras que para el 2008 se reportó una producción de 55,271 toneladas de las cuales se exportaron 30,886 toneladas (SAGARPA, 2009), con lo cual se observa una reducción de aproximadamente 15% en la producción y de 36% en la exportación.

Con el fin de realizar investigación en métodos de mejoramiento genético que permitan contrarrestar la baja producción de miel y el alto comportamiento defensivo que presentan las colonias de abejas como

consecuencia de la africanización, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) desarrolla un programa de investigación en mejoramiento genético apícola, en donde se han generado tres líneas de abejas que han sido seleccionadas para alta producción de miel, bajo comportamiento defensivo y mayor tamaño. La línea CA fue desarrollada a partir de abejas de raza italiana, la línea ONT a partir de abejas de raza carniola y la línea SG se desarrolló a partir de abejas locales. Las poblaciones de colonias de abejas de las líneas seleccionadas se han mantenido bajo selección por 12 generaciones. Las líneas de abejas de raza italiana y carniola se mantienen en un programa de selección masal en población cerrada, mientras que la línea formada con abejas locales se mantiene en un programa de selección masal en población semi-cerrada.

El método de selección en población cerrada (MPC), consiste en un núcleo pie de cría formado por reinas inseminadas instrumentalmente, a partir de las cuales se obtienen reinas de libre fecundación que encabezan las colonias de la población bajo selección, de las cuales se seleccionan las que tengan el mejor desempeño para las características de interés. Las reinas seleccionadas se utilizan para criar zánganos, los cuales a su vez son utilizados para inseminar reinas vírgenes que se crían a partir del núcleo pie de cría. Las reinas inseminadas se integran al núcleo pie de cría para formar la siguiente generación (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2007).

El método de selección en población semi-cerrada (MPSC) consiste en un núcleo pie de cría formado por reinas de libre fecundación, a partir del cual se crían reinas de libre fecundación que encabezan las colonias de la población

bajo selección, a partir de ésta se producen cantidades importantes de zánganos provenientes de las mismas colonias con el objeto de incrementar la probabilidad de que las reinas se apareen con zánganos provenientes de dicha población. Las colonias se evalúan para las características de interés y se seleccionan aquellas que tengan el mejor desempeño, de tal forma que las reinas seleccionadas forman el núcleo de pie de cría para formar la siguiente generación (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2007).

El mejoramiento genético se basa en la selección y apareamiento de los individuos sobresalientes para aprovechar la variabilidad existente en las poblaciones. La respuesta a la selección depende de cinco factores: variabilidad genética, intervalo generacional, intensidad de selección, tamaño efectivo de población y presión de selección (Aggrey *et al.*, 1995).

La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse, y determina la capacidad de la población para responder a cambios en el medio ambiente y a cambios en los objetivos de selección en programas de mejoramiento genético; es así como la variabilidad genética constituye la base para el progreso genético de las poblaciones (Rochambeau *et al.*, 2000).

Dado que la variación genética se reduce como resultado de la selección, así como por la acción de la deriva génica debido al tamaño finito de la población; la respuesta a la selección a corto plazo de pocas generaciones, dependerá de la intensidad y presión de selección en esas generaciones; mientras que la respuesta de selección a largo plazo dependerá de la cantidad de variabilidad que se mantenga en la población, de la endogamia que ocurra a

través de las generaciones y del tamaño efectivo de población (Robertson, 1960). Es por esto que para mantener el progreso genético de las poblaciones en los programas de mejoramiento genético o para poder reorientar los objetivos de los programas, es indispensable considerar la variabilidad genética en los esquemas de mejoramiento, para tratar de disminuir, en lo posible, su pérdida (Notter, 1999; Hill, 2000; Gautschi *et al.*, 2003).

En el caso de las abejas, la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones puede ocasionar problemas de depresión endogámica que se manifiesta principalmente en la reducción en la cantidad de abejas obreras presentes en la colonia, debido a que la cría viable disminuye al reducirse la heterocigosidad para los alelos en el locus sexual, lo que provoca que a nivel de este locus se presenten con menor frecuencia individuos heterocigotos que se desarrollarían como abejas obreras viables y se presenten con mayor frecuencia individuos homocigotos que se desarrollan en zánganos diploides, los cuales son eliminados por las obreras de la colonia durante la etapa larvaria (Moritz, 1986; Kerr, 1997; Cowan, 2004; Van Wilgerburg *et al.*, 2006). Es por esto que es muy importante conservar la diversidad genética en las poblaciones de colonias de abejas bajo selección, ya que a mayor variación menor será la posibilidad de que se presenten problemas en la cría asociados a la endogamia.

Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones es un componente importante para el manejo de los recursos genéticos animales, para evaluar la variabilidad genética se puede utilizar la información generada por marcadores moleculares tanto a nivel de ADN mitocondrial, como de ADN genómico.

El ADN mitocondrial de *Apis mellifera* L., es una molécula de estructura circular, que se hereda por vía materna, de tal forma que al caracterizar el ADN mitocondrial de la progenie, se puede establecer el origen racial de la reina y en consecuencia el origen materno de la colonia (Meusel y Moritz, 1993; Cánovas *et al.*, 2002; De la Rúa, 2001). La caracterización molecular de las colonias de abejas basada en el ADN mitocondrial es una técnica utilizada para el estudio de la diferenciación de subespecies y razas de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Smith *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992., Garnery *et al.*, 1995, De la Rúa *et al.*, 1998, 1999, 2001).

Existen marcadores RFLP (Restriction Fragment-Length Polymorphism por sus siglas en inglés) dentro del ADN mitocondrial que permiten distinguir el origen racial de las abejas (Hall y Smith, 1991). Dos de estos marcadores, uno ubicado en el gen que codifica para la síntesis del 16S rRNA y otro en el gen que codifica para la síntesis de citocromo oxidasa, permiten identificar tres haplotipos: Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano. El fragmento de 964 pb del gen 16S rRNA (subunidad ribosomal grande) ubicado en la posición 13479-14443, presenta un sitio de restricción para la endonucleasa *EcoRI* que solo se encuentra en el haplotipo Europeo del Este (Hall y Smith, 1991; Crozier y Crozier, 1993; Nielsen *et al.*, 1999). El fragmento de 1028 pb ubicado en la posición 2095-3123 de la subunidad I del gen citocromo oxidasa (COI) presenta un sitio de restricción para la endonucleasa *HincII*, que solo se localiza en el haplotipo Europeo del Oeste (Hall y Smith, 1991; Crozier y Crozier, 1993), mientras que para el haplotipo Africano, no existen sitios de restricción en estos fragmentos para ninguna de las dos enzimas.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar la variabilidad genética de poblaciones de tres líneas de abejas seleccionadas y abejas no seleccionadas, así como el efecto de dos métodos de selección sobre la variabilidad genética con respecto a marcadores moleculares del ADN mitocondrial. Para el desarrollo del estudio se utilizaron cuatro grupos experimentales que corresponden a tres líneas de abejas seleccionadas para alta producción y bajo comportamiento defensivo (CA, ONT y SG) y un grupo de abejas locales no seleccionadas (LO) que se mantiene como grupo control dentro del programa de investigación en mejoramiento genético apícola del INIFAP. Las líneas CA y ONT se mantienen bajo un programa de selección masal en población cerrada (MPC) y la línea SG en un programa de selección masal en población semi-cerrada (MPSC). El estudio incluyó poblaciones de los cuatro grupos experimentales de tres generaciones: 2004-2005 (n=249), 2005-2006 (n=268) y 2007-2008 (n=314). Se generaron dos marcadores de ADN mitocondrial por PCR-RFLP, uno ubicado en la región 13479-14443 del gen *ls rRNA* y el otro en la región 2095-3123 del gen citocromo oxidasa I (COI). Se elaboró una base de datos para cada marcador, representando la ausencia o presencia de bandas por 0 y 1 respectivamente. La diversidad genética se evaluó utilizando el índice de diversidad de Shannon y la diversidad genética insesgada haploide. Para comparar la variabilidad genética entre grupos experimentales se utilizó un análisis de varianza molecular (AMOVA). Hubo diferencia significativa en la variabilidad genética de las líneas seleccionadas y la población de abejas no seleccionadas en las tres generaciones ($P < 0.01$), pero no entre las líneas

seleccionadas CA, ONT y SG en las generaciones 2004-2005 y 2005-2006, sin embargo en la generación 2007-.2008 la variabilidad genética de la línea SG fue diferente a la de la línea ONT ($P < 0.01$). Hubo diferencias significativas en la variabilidad genética entre poblaciones desarrolladas bajo MPC y MPSC con respecto a la población no seleccionada en cada generación ($P < 0.01$). No se detectaron diferencias significativas en la variabilidad genética de las poblaciones generadas bajo MPC y MPSC en las generaciones 2004-2005 y 2005-2006, pero si en la generación 2007-2008 ($P < 0.05$).

Palabras clave: variabilidad genética / ADN mitocondrial / abejas melíferas / métodos de selección

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the genetic variability between populations of three lines of selected honeybees and non-selected honeybees, and to compare the effect of two breeding methods on the genetic variability using mitochondrial DNA molecular markers. Four experimental groups were used, three of these groups correspond to three honeybees lines selected for high honey production and low defensive behavior (CA, ONT, SG) and a group of non-selected honeybees (LO) that is maintained as control group in the honeybee breeding research program of INIFAP. The CA and ONT lines are maintained under a mass selection in a closed population breeding program (MPC) and the SG line is maintained under a mass selection in a semi-closed population breeding program (MPSC). The study included populations of the four experimental groups of three generations: 2004-2005 (n=249), 2005-2006 (n=268) y 2007-2008 (n=314). Two mitochondrial DNA markers were generated by PCR-RFLP, one is located at the 13479-14443 region of 16S rRNA gene and the other is located at the 2095-3123 of cytochrome oxidase I gene (COI). A data base was generated for each marker, representing the absence or presence of bands by 0 and 1 respectively. Genetic diversity was evaluated using the Shannon diversity index and the unbiased haploid genetic diversity. To compare the genetic variability between experimental groups an analysis of molecular variance (AMOVA) was used. There were significant differences in the genetic variability between the selected lines and the non-selected population of honeybees in the three generations ($P < 0.01$), but not between the CA, ONT y SG lines in 2004-2005 and 2005-2006 generations, however in

2007-2008 generation the genetic variability of the SG line was different from the ONT line ($P < 0.01$). There were significant differences in the genetic variability of the populations developed under MPC and MPCS with the non-selected population in each generation ($P < 0.01$). No significant differences were detected in the genetic variability of the populations developed under MPCS and MPC in 2004-2005 and 2005-2006 generations, there was a difference in 2007-2008 generation ($P < 0.05$).

Keys words: genetic variability / mitochondrial DNA / honeybees / selection methods.

OBJETIVOS

1. Comparar la variabilidad genética de tres líneas de abejas seleccionadas y abejas no seleccionadas con respecto a marcadores moleculares del ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas.
2. Comparar el efecto de dos métodos de selección sobre la variabilidad genética de las poblaciones de colonias de abejas con respecto a marcadores moleculares del ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas.

HIPÓTESIS

1. Existe diferencia en la variabilidad genética de las poblaciones de colonias de abejas de las tres líneas seleccionadas para los marcadores moleculares del ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas.
2. Las poblaciones de colonias no seleccionadas presentan mayor variación con respecto a marcadores moleculares del ADN mitocondrial asociados al origen racial en comparación con las poblaciones de colonias de las líneas seleccionadas.
3. La población de colonias que se mantiene bajo un programa de selección masal en población semi-cerrada tiene mayor variación genética que la población de colonias que se mantienen bajo selección masal en población cerrada con respecto a marcadores moleculares del ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la variabilidad genética de las poblaciones influye en los resultados de la selección y ayuda a determinar las estrategias a seguir en el desarrollo de programas de mejoramiento genético es importante conocer cuál es el estado de la diversidad genética en las poblaciones de las tres líneas de abejas seleccionadas para alta producción de miel y bajo comportamiento defensivo generadas por el programa de investigación en mejoramiento genético apícola del INIFAP, así como conocer cuál ha sido el efecto sobre la diversidad genética de las poblaciones de abejas a nivel de marcadores moleculares del ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas al utilizar métodos de selección.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Colonias experimentales.

Para el desarrollo del estudio se utilizaron cuatro grupos experimentales que corresponden a tres líneas de abejas seleccionadas para alta producción y bajo comportamiento defensivo (CA, ONT, SG) y un grupo de abejas locales no seleccionadas (LO) que se mantiene como grupo control dentro del programa de investigación en mejoramiento genético apícola del INIFAP. Las líneas CA y ONT se mantienen en un programa de selección masal en población cerrada (MPC) y la línea SG en un programa de selección masal en población semi-cerrada (MPSC). En el estudio se incluyeron colonias de los cuatro grupos experimentales de tres generaciones: 2004-2005 (n=249), 2005-2006 (n=268) y 2007-2008 (n=314) (Cuadro 1).

Las colonias de abejas que se incluyeron en el estudio provienen de apiarios localizados en los municipios de Villa Guerrero, Coatepec de Harinas e Ixtapan de la Sal. Estos municipios están ubicados en la región sur del Estado de México, a una altitud media sobre el nivel del mar de 2,160 m, el clima de la región está clasificado como templado subhúmedo (C(w)), con lluvias en verano, presenta una temperatura promedio anual de 14°C y una precipitación anual de 1,250 mm (INEGI, 1998).

2.2 Análisis genético.

2.2.1 Muestras de abejas.

Se utilizaron muestras que incluían 30 abejas obreras de cada una de las colonias experimentales, las muestras de abejas se conservaron en alcohol al 96% y a -70°C.

2.2.2 Extracción de ADN.

Se extrajo el ADN de una abeja tomada aleatoriamente de la muestra de cada colonia. La extracción del ADN involucró la maceración de la abeja en solución de lisis (1% bromuro de hexadeciltrimetil-amonio, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1.1 M NaCl), la cual fue digerida con proteinasa K, seguido de una doble extracción con fenol/cloroformo y la precipitación del ADN en etanol (Hunt, 1997). El ADN de cada abeja fue cuantificado y diluido a una concentración final de 100 ng/μl en agua bidestilada y se almacenó a – 70°C.

2.2.3. Generación de marcadores moleculares.

2.2.3.1 Secuencia de Iniciadores.

El fragmento de 964 pb ubicado en la posición 13479-14443 del gen *ls rRNA* se amplificó con los iniciadores 5´ CAA CAT CGA GGT CGC AAA CAT C 3´ y 5´ GTA CCT TTT GTA TCA GGG TTG A 3´. El fragmento de 1028 pb ubicado en la posición 2095-3123 de la subunidad I del gen citocromo oxidasa (COI) fue amplificado usando los iniciadores 5´ GAT TAC TTC CTC CCT CAT TA 3´ y 5´ AAT CTG GAT AGT CTG AAT AA 3´ (Nielsen *et al.*, 1999).

2.2.3.2 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 15 μl y consistieron en 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM

DTT, 50% glicerol, 0.5% tween®, 0.5% Nonidet®P40, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 10 mM de cada iniciador, 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa y 200 ng de ADN genómico y fueron cubiertas con una gota de aceite mineral.

Las condiciones bajo las que se realizó la PCR fueron 2 minutos a 94° C, seguidos 34 ciclos a 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto y 72° C por 2 minutos, y se concluyó con 5 minutos a 72° C.

2.2.3.3 Análisis de restricción.

La digestión de los productos de PCR se realizó a 37° C durante 180 min. La reacción de digestión del fragmento amplificado del gen *ls rRNA* (ADNr) se realizó en un volumen de 18 µl y consistió en 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 15 µl del producto de la PCR y 3 unidades de la enzima *EcoRI* (Figura 1). La reacción de digestión del fragmento amplificado del gen citocromo oxidasa I (COI) se realizó en 18 µl formada por 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 15 µl del producto de la PCR y 6 unidades de la enzima *HincII* (Figura 2).

Los fragmentos de restricción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y posteriormente fueron visualizados con luz ultravioleta después de ser teñidos en 5 ng/ml de bromuro etidio durante 60 minutos.

2.3 Análisis estadístico.

Se elaboró una base de datos, representando la ausencia y presencia de bandas por 0 y 1, respectivamente para cada uno de los dos marcadores. La diversidad genética de los grupos se evaluó utilizando el índice de diversidad de Shannon y la diversidad genética insesgada haploide. Para

comparar la variabilidad genética entre grupos experimentales se utilizó un análisis de varianza molecular (AMOVA).

2.3.1 Frecuencias alélicas y genotípicas.

Las frecuencias alélicas se estimaron utilizando el programa GenAIEx 6.1 (Peakall y Smouse, 2006), con base en la siguiente fórmula:

$$F(x) = \frac{Nx}{N}$$

En donde:

$F(x)$ = frecuencia alélica

Nx = número de alelos x

N = número de muestras

2.3.2. Índice de diversidad de Shannon.

El índice de diversidad de Shannon (I), es un estimador de la variabilidad genética basado en la presencia y ausencia de bandas (Bonin *et al.*, 2007), y determina el nivel de polimorfismo con base en la frecuencia de fragmentos amplificados. Para calcularlo se utilizó el programa GenAIEx 6.1 (Peakall y Smouse, 2006) mediante la siguiente fórmula:

$$I = -1 \left[\sum_{i=1}^l (p_i)(\ln p_i) \right]$$

En donde:

I = Índice de diversidad de Shannon

\ln = logaritmo natural

p_i = frecuencia del i ésimo alelo

2.3.3 Diversidad genética haploide insesgada.

Uno de los métodos utilizados para estimar la variabilidad genética de las poblaciones a partir de datos haploides es el cálculo de la diversidad genética haploide insesgada (U_h), la cual es un indicador de la probabilidad de que dos individuos sean diferentes (Schneider *et al.*, 1997) y se estimó utilizando el programa GenAlEx 6.1 (Peakall y Smouse, 2006) mediante la siguiente fórmula:

$$U_h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum p_i^2 \right)$$

En donde:

U_h =diversidad genética haploide insesgada

n = tamaño de muestra

p_i = frecuencia del i ésimo alelo

Para calcular la diversidad genética haploide promedio, considerando los dos loci incluidos en el estudio se utilizó la siguiente fórmula:

$$H = \sum_{i=1}^k \frac{U_h}{k}$$

En donde:

H = diversidad genética haploide promedio

U_h = diversidad genética haploide insesgada

k = número de loci

2.3.4 Análisis de Varianza Molecular.

Para estimar el grado de diferenciación genética entre y dentro de poblaciones se llevó a cabo un análisis de la varianza molecular (AMOVA);

comprobando la significancia de la variación mediante una prueba de permutaciones y calculando un estadístico para datos haploides, Φ_{PT} , que es equivalente al índice de fijación de Wright's F_{ST} , el cual es un estadístico usado para datos diploides. El AMOVA se realizó usando el programa GenAlEx 6.1 (Peakall y Smouse, 2006) y para establecer los puntos críticos para determinar la significancia se utilizó una prueba de permutaciones, realizando 999 permutaciones.

2.3.5 Distribución de frecuencias de haplotipos.

Para determinar si existen diferencias en la frecuencia de los haplotipos Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano entre las poblaciones de abejas seleccionadas y no seleccionadas, así como entre las poblaciones que se mantienen bajo los dos métodos de selección y la población de colonias no seleccionadas se realizó una prueba de homogeneidad (Daniel, 2002).

3. RESULTADOS

3.1 Variabilidad genética en poblaciones de abejas de líneas seleccionadas y de abejas no seleccionadas.

La diversidad genética estimada con base en el promedio del índice de diversidad de Shannon en la generación 2004-2005 para las colonias de la línea seleccionada CA fue 0.23 (n=61), para la línea ONT fue 0.22 (n=60) y para la línea SG fue 0.22 (n=89), mientras que para el grupo LO fue 0.40 (n=39). La diversidad genética haploide promedio en las líneas seleccionadas fue CA 0.12, ONT 0.11 y SG 0.11, mientras que para el grupo de abejas LO fue de 0.26 (Cuadro 1).

El AMOVA reveló que existen diferencias en la variabilidad genética entre grupos ($\Phi_{PT}=0.331$; $P<0.01$). Se observaron diferencias significativas en la variabilidad genética entre las poblaciones de abejas LO y las líneas de abejas CA ($\Phi_{PT}=0.52$; $P<0.01$), ONT ($\Phi_{PT}=0.54$; $P<0.01$) y SG ($\Phi_{PT}=0.54$; $P<0.01$), no se encontraron diferencias entre las tres líneas de abejas seleccionadas (Cuadro 2). La mayor parte de la variación (67%) se debió a diferencias dentro de los grupos experimentales, mientras que el resto de la variación (33%) se encontró entre grupos.

La distribución de los haplotipos Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano no fue homogénea entre las poblaciones de colonias de las líneas seleccionadas y el grupo de colonias no seleccionadas ($X^2= 87.12$, $gl=6$, $P<0.01$). El haplotipo Europeo del Este fue el que se presentó con mayor frecuencia en las líneas CA (0.90), ONT (0.92), SG (0.90), mientras que el haplotipo Africano fue el más frecuente en el grupo LO (0.67) (Cuadro 9).

En la generación 2005-2006, los estimadores de la variabilidad genética con base en el promedio del índice de Shannon para las colonias de la línea CA fue 0.12 (n=75), para la línea ONT fue 0.09 (n=93) y para SG 0.07 (n=68), mientras que para el grupo de abejas LO fue 0.33 (n=32). La diversidad genética haploide promedio en las tres líneas fue CA 0.06, ONT 0.04 y SG 0.03, mientras que en el grupo de abejas LO fue de 0.24 (Cuadro 1).

Con base en los resultados de un AMOVA se detectaron diferencias en la variabilidad genética entre grupos ($\Phi_{PT}=0.180$; $P<0.01$). Hubo diferencias significativas entre las poblaciones de abejas LO y las líneas CA ($\Phi_{PT}=0.28$; $P<0.01$), ONT ($\Phi_{PT}=0.37$; $P<0.01$) y SG ($\Phi_{PT}=0.37$; $P<0.01$); no se encontraron diferencias entre las líneas ONT, SG y CA (Cuadro 3). Del total de la variación detectada, el 82% corresponde a la variación dentro de grupos experimentales y el 18% entre grupos.

La distribución de haplotipos no fue homogénea entre las poblaciones de colonias de las líneas seleccionadas y el grupo de colonias no seleccionadas ($\chi^2= 39.39$, $gl=6$, $P<0.01$). El haplotipo Europeo del Este fue el que se presentó con mayor frecuencia en las líneas CA (0.93), ONT (0.96), SG (0.97) y en el grupo LO (0.63) (Cuadro 9).

La diversidad genética estimada con base en el promedio del índice de diversidad de Shannon en la generación 2007-2008 para la línea CA fue 0.24 (n=85), para la línea ONT fue 0.17 (n=120) y para SG fue 0.31 (n=41), mientras que para el grupo de abejas LO fue 0.34 (n=68). La diversidad genética haploide promedio en las tres líneas fue CA 0.16, ONT 0.10 y SG 0.22, mientras que en el grupo de abejas LO fue de 0.24 (Cuadro 1).

El AMOVA indica que existen diferencias en la variabilidad genética entre grupos ($\Phi_{PT}=0.231$; $P<0.01$), el 77% representa la variación dentro de poblaciones y el 23% entre poblaciones. El análisis mostró diferencias significativas en la variabilidad genética de la población de abejas LO y la de las poblaciones de las líneas de abejas CA ($\Phi_{PT}=0.30$; $P<0.01$), ONT ($\Phi_{PT}=0.45$; $P<0.01$) y SG ($\Phi_{PT}=0.13$; $P<0.01$), también fue posible observar diferencias entre las líneas ONT y SG ($\Phi_{PT}=0.13$; $P<0.01$), sin embargo; no hubo diferencias significativas entre las líneas ONT y CA ni entre CA y SG (Cuadro 4).

La distribución de los haplotipos Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano no fue homogénea entre las poblaciones de colonias de las líneas seleccionadas y el grupo de colonias no seleccionadas ($\chi^2=70.97$, $gl=6$, $P<0.01$). El haplotipo Europeo del Este fue el que se presentó con mayor frecuencia en las líneas CA (0.81), ONT (0.89), SG (0.68), mientras que el haplotipo Africano fue el más frecuente en el grupo LO (0.66) (Cuadro 9).

3.2 Efecto de dos métodos de selección sobre la variabilidad genética de poblaciones de abejas.

La diversidad genética estimada con base en el promedio del índice de diversidad de Shannon en la generación 2004-2005 para las poblaciones de abejas que se mantienen bajo MPC fue 0.23 ($n=121$) y para MPSC fue 0.22 ($n=89$), mientras que para el grupo de poblaciones de abejas no seleccionadas LO fue de 0.40 ($n=39$). La diversidad genética haploide promedio en las poblaciones de abejas que se encuentran bajo MPC fue 0.12 y de las

poblaciones bajo MPSC fue 0.11, mientras que la diversidad genética haploide promedio en la población de abejas LO fue 0.26 (Cuadro 5).

El AMOVA reveló que existen diferencias en la variabilidad genética entre grupos ($\Phi_{PT}=0.375$; $P<0.01$), el 63% de la variación corresponde a la variación dentro de poblaciones y el 37% a la variación entre poblaciones. Hubo diferencias significativas entre las poblaciones de colonias de abejas LO y las poblaciones de colonias de abejas que se mantienen bajo MPC ($\Phi_{PT}=0.57$; $P<0.01$) y MPSC ($\Phi_{PT}=0.54$; $P<0.01$), sin embargo; no hubo diferencias significativas entre las poblaciones de colonias de abejas que se encuentran bajo un MPC y MPSC (Cuadro 6).

La distribución de los haplotipos Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano no fue homogénea entre el grupo de colonias que se mantienen bajo MPC, el grupo que se mantiene bajo MPSC y el grupo LO ($\chi^2=85.29$, $gl=4$, $P<0.01$). El haplotipo Europeo del Este fue el que se presentó con mayor frecuencia en el grupo MPC (0.91), MPCS (0.90), mientras que el haplotipo Africano fue el más frecuente en el grupo LO (0.67) (Cuadro 10).

La diversidad genética estimada con base en el promedio del índice de diversidad de Shannon, en la generación 2005-2006 para las poblaciones de abejas que se mantienen bajo MPC fue 0.10 ($n=168$) y para MPSC fue 0.07 ($n=68$), mientras que para el grupo de abejas LO tuvo un valor de 0.33 ($n=32$). La diversidad genética haploide promedio en las poblaciones de abejas que se encuentran bajo un MPC fue 0.05 y de las poblaciones bajo MPSC fue 0.03, mientras que la diversidad genética haploide promedio en las poblaciones de abejas LO fue 0.24 (Cuadro 5).

El AMOVA indica que existen diferencias en la variabilidad genética entre grupos ($\Phi_{PT}=0.234$; $P<0.01$). El 77% de la variación total se debió a la variación dentro de poblaciones y el 23% se debió a la variación entre poblaciones. Se encontraron diferencias significativas entre poblaciones de abejas LO y poblaciones de abejas que se mantienen bajo MPC ($\Phi_{PT}=0.38$; $P<0.01$) y MPSC ($\Phi_{PT}=0.37$; $P<0.01$), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las poblaciones de abejas que se conservan bajo MPC y MPSC (Cuadro 7).

La distribución de los haplotipos Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano no fue homogénea entre el grupo de colonias que se mantienen bajo MPC, el grupo que se mantiene bajo MPSC y el grupo LO ($X^2= 39.09$, $gl=4$ $P<0.01$). El haplotipo Europeo del Este fue el que se presentó con mayor frecuencia en el grupo MPC (0.95), MPCS (0.97) y en el grupo LO (0.63) (Cuadro 10).

La diversidad genética estimada con base en el promedio del índice de diversidad de Shannon en la generación 2007-2008 para las poblaciones de abejas que se mantienen bajo MPC fue de 0.20 ($n=205$) y para MPSC fue 0.31 ($n=41$), mientras que para el grupo de poblaciones de abejas LO fue de 0.34 ($n=68$). La diversidad genética haploide promedio en las poblaciones de abejas que se encuentran bajo un MPC fue 0.12 y de las poblaciones bajo MPSC fue 0.22, mientras que la diversidad genética haploide promedio en las poblaciones de abejas LO fue 0.24 (Cuadro 5).

El AMOVA indica que existen diferencias en la variabilidad genética entre grupos ($\Phi_{PT}=0.293$; $P<0.01$). El 71% de la variación total se debió a

variación dentro de poblaciones y el 29% se debió a la variación entre poblaciones. Se encontraron diferencias significativas entre poblaciones de abejas LO y poblaciones de abejas que se mantienen bajo MPC ($\Phi_{PT}=0.41$; $P<0.01$) y MPSC ($\Phi_{PT}=0.13$; $P<0.01$), así mismo se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones de abejas que se conservan bajo MPC y MPSC ($\Phi_{PT}=0.088$; $P<0.05$) (Cuadro 8).

La distribución de los haplotipos Europeo del Este, Europeo del Oeste y Africano no fue homogénea entre el grupo de colonias que se mantienen bajo MPC, el grupo que se mantiene bajo MPSC y el grupo LO ($X^2= 69.39$, $gl=4$ $P<0.01$). El haplotipo Europeo del Este fue el que se presentó con mayor frecuencia en el grupo MPC (0.86) y el grupo que se mantiene bajo MPSC (0.68), mientras que el haplotipo africano fue el de mayor frecuencia en el grupo LO (0.66) (Cuadro 10).

4. DISCUSIÓN

4.1 Variabilidad genética en poblaciones de abejas de líneas seleccionadas y de abejas no seleccionadas.

Los resultados del análisis de varianza molecular indicaron que la variabilidad genética de las poblaciones de las líneas de abejas seleccionadas CA, ONT y SG para los dos marcadores de ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas fue significativamente menor a la variabilidad genética detectada en el grupo de abejas locales no seleccionadas en las tres generaciones incluidas en el estudio. La línea SG no fue diferente de las líneas ONT y CA en las generaciones 2004-2005 y 2005-2006, sin embargo en la generación 2007-2008 se registró un aumento considerable de la variabilidad genética en la población de la línea SG y ésta fue diferente de la variabilidad genética detectada en la población de colonias de abejas de la línea ONT.

En las generaciones 2004-2005 y 2007-2008 los estimadores del índice de diversidad de Shannon y de la diversidad genética haploide promedio para la variabilidad genética de las líneas CA y ONT fueron prácticamente 50% menores a los estimadores en las abejas locales no seleccionadas mientras que en la generación 2005-2006 el valor de los estimadores en las líneas seleccionadas correspondieron cuando menos a una quinta parte de los estimadores para la población de abejas locales no seleccionadas.

Los estimadores del índice de diversidad de Shannon y de diversidad genética haploide promedio para la variabilidad genética de las líneas SG en la generación 2004-2005 fueron menores a la mitad de los valores detectados para estos estimadores en la población local no seleccionada; en la generación

2005-2006 el valor de los estimadores fue una octava parte del valor de los estimadores en la población local no seleccionada, sin embargo, en la generación 2007-2008 se detectó un incremento considerable en la variabilidad genética de la línea SG y los estimadores del índice de diversidad de Shannon y de la diversidad genética haploide promedio fueron cercanos a los estimadores para la población local no seleccionada. Este incremento en la variabilidad genética de la población de la línea SG se pudo deber a un flujo de material genético en la población ya que la línea SG es la que se mantiene bajo un método de selección masal en población semi-cerrada.

La variabilidad genética de la población de abejas locales no seleccionadas se mantuvo constante a lo largo de las tres generaciones, como lo indican los estimadores del índice de diversidad de Shannon y la diversidad genética haploide promedio.

El haplotipo que se presentó con mayor frecuencia en las poblaciones de las líneas CA, ONT y SG fue el Europeo del Este en las tres generaciones, mientras que en el caso del grupo LO el haplotipo más frecuente fue el Africano en las generaciones 2004-2005 y 2007-2008, mientras que en la generación 2005-2006 el Europeo del Este fue el más frecuente. Únicamente en la generación 2004-2005 fue posible detectar la presencia del haplotipo Europeo del Oeste.

La menor diversidad genética detectada en las tres líneas de abejas seleccionadas está asociada a la presencia de los haplotipos de origen Europeo del Este en las poblaciones seleccionadas, como consecuencia del proceso de selección, mientras que la mayor diversidad genética detectada en

la población de abejas locales no seleccionadas esta asociada a la presencia de los haplotipos Europeo del Este y Africano en la población como lo indican los resultados del estudio realizado por Arechavaleta- Velasco *et al.*(2006).

4.2 Efecto de dos métodos de selección sobre la variabilidad genética de poblaciones de abejas.

Los resultados del análisis de varianza molecular indican que la variabilidad genética de las poblaciones de las líneas de abejas desarrolladas bajo un método de selección masal en población cerrada y bajo un método de selección masal en población semi-cerrada para los dos marcadores de ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas fue significativamente menor a la variabilidad genética detectada en el grupo de abejas locales no seleccionadas en las tres generaciones incluidas en el estudio.

No se detectaron diferencias en la variabilidad genética de las poblaciones generadas por selección masal en población cerrada y en población semi-cerrada en las generaciones 2004-2005 y 2005-2006, sin embargo, si hubo diferencia entre estos dos grupos en la generación 2007-2008.

En la generación 2004-2005 los estimadores del índice de diversidad de Shannon y de la diversidad genética haploide promedio para la variabilidad genética de las poblaciones de las líneas de abejas desarrolladas bajo un método de selección masal en población cerrada y bajo un método de selección masal en población semi-cerrada tuvieron valores de prácticamente la mitad de los valores que presentaron los dos estimadores en las abejas locales no seleccionadas.

En la generación 2005-2006 el valor de los estimadores para las poblaciones seleccionadas en población cerrada y en población semi-cerrada fue de aproximadamente una quinta parte en relación a los estimadores para la población no seleccionada.

En la generación 2007-2008 los valores de los estimadores del índice de diversidad de Shannon y de la diversidad genética haploide en las poblaciones desarrolladas bajo un método de selección masal en población cerrada fueron cercanos a la mitad del valor de los estimadores de la variabilidad genética en la población de abejas no seleccionadas. En el caso de la población generada bajo selección masal en población semi-cerrada los valores de los estimadores son menores pero cercanos a los valores estimados para la población no seleccionada.

El haplotipo que se presentó con mayor frecuencia en las poblaciones que se mantienen bajo MPC y MPSC fue el Europeo del Este en las tres generaciones, mientras que en el caso del grupo LO el haplotipo más frecuente fue el Africano en las generaciones 2004-2005 y 2007-2008, mientras que en la generación 2005-2006 el Europeo del Este fue el más frecuente.

La menor diversidad genética detectada en las poblaciones de abejas seleccionadas está asociada a una mayor frecuencia del haplotipo Europeo del Este, como consecuencia del proceso de selección, mientras que la mayor diversidad genética detectada en la población de abejas LO no seleccionadas está asociada a la presencia de los haplotipos Europeo del Este y Africano en las poblaciones, como lo indican los resultados del estudio realizado por Arechavaleta- Velasco *et al.* (2009). No es posible determinar si el proceso de

selección al que han sido sometidas las poblaciones ha reducido la variabilidad genética de éstas, ya que se desconoce cuál era la variabilidad genética inicial de las poblaciones para los marcadores incluidos en el estudio; sin embargo, los resultados indican que los métodos de selección han permitido mantener una menor variabilidad genética en las poblaciones asociadas a una mayor frecuencia de los haplotipos Europeos a pesar de que las poblaciones se desarrollan en regiones en donde existen abejas con haplotipo Africano.

5. CONCLUSIONES

Los resultados indican que existe una menor variabilidad genética en los marcadores del ADN mitocondrial asociados al origen racial de las abejas en poblaciones que se mantienen bajo un método de selección masal en población cerrada y bajo selección masal en población semi-cerrada, en comparación con la población de abejas locales no seleccionadas. No hubo diferencias entre las poblaciones de abejas de las líneas seleccionadas en las dos primeras generaciones analizadas, excepto entre las líneas SG y ONT de la última generación analizada. La menor variabilidad genética es consecuencia del proceso de selección al que han sido sometidas las poblaciones.

La diversidad genética estimada en este estudio es de mucha utilidad para evaluar el efecto del proceso de selección, ya que está asociada a la mayor frecuencia de colonias con haplotipo Europeo en las poblaciones bajo selección. En este caso la reducción en la variabilidad genética a nivel de los marcadores incluidos en el estudio es un resultado positivo del proceso de selección.

7. CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Promedio del índice de diversidad de Shannon (I) y diversidad genética haploide promedio (H) de poblaciones de colonias de abejas de las líneas seleccionadas CA, ONT, SG y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a las generaciones 2004-2005, 2005-2006 y 2007-2008.

Generación		Número de colonias	I	H
2004-2005	CA	61	0.23	0.12
	ONT	60	0.22	0.11
	SG	89	0.22	0.11
	LO	39	0.40	0.26
2005-2006	CA	75	0.12	0.06
	ONT	93	0.09	0.04
	SG	68	0.07	0.03
	LO	32	0.33	0.24
2007-2008	CA	85	0.24	0.16
	ONT	120	0.17	0.10
	SG	41	0.31	0.22
	LO	68	0.34	0.24

Cuadro 2. Comparaciones pareadas (Φ_{PT}) de la variabilidad genética de poblaciones de abejas de las líneas seleccionadas CA, ONT, SG y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a la generación 2004-2005.

Población 1	Población 2	Φ_{PT}	P
LO	CA	0.52	<0.01
LO	ONT	0.54	<0.01
LO	SG	0.54	<0.01
CA	ONT	0.00	0.29
CA	SG	0.00	0.35
ONT	SG	0.00	0.33

Cuadro 3. Comparaciones pareadas (Φ_{PT}) de la variabilidad genética de poblaciones de abejas de las líneas seleccionadas CA, ONT, SG y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a la generación 2005-2006.

Población 1	Población 2	Φ_{PT}	P
LO	CA	0.28	<0.01
LO	ONT	0.37	<0.01
LO	SG	0.37	<0.01
CA	SG	0.00	0.49
CA	ONT	0.00	0.31
ONT	SG	0.00	0.38

Cuadro 4. Comparaciones pareadas (Φ_{PT}) de la variabilidad genética de poblaciones de abejas de las líneas seleccionadas CA, ONT, SG y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a la generación 2007-2008.

Población 1	Población 2	Φ_{PT}	P
LO	CA	0.30	<0.01
LO	ONT	0.45	<0.01
LO	SG	0.13	<0.01
CA	SG	0.03	0.07
CA	ONT	0.02	0.16
ONT	SG	0.13	<0.01

Cuadro 5. Promedio del índice de diversidad de Shannon (I) y diversidad genética haploide promedio (H) de poblaciones de colonias de abejas bajo un método de selección masal en población cerrada (MPC), método de selección masal en población semi-cerrada (MPSC) y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a las generaciones 2004-2005, 2005-2006 y 2007-2008.

Generación		Número de colonias	I	H
2004-2005	MPC	121	0.23	0.12
	MPSC	89	0.22	0.11
	LO	39	0.40	0.26
2005-2006	MPC	168	0.10	0.05
	MPSC	68	0.07	0.03
	LO	32	0.33	0.24
2007-2008	MPC	205	0.20	0.12
	MPSC	41	0.31	0.22
	LO	68	0.34	0.24

Cuadro 6. Comparaciones pareadas (Φ_{PT}) de la variabilidad genética de poblaciones de abejas que se mantienen bajo un método de selección masal en población cerrada (MPC), método de selección masal en población semi-cerrada (MPSC) y de abejas locales no seleccionadas (LO) de la generación 2004-2005.

Población 1	Población 2	Φ_{PT} (Φ_{PT})	P
LO	MPC	0.57	<0.01
LO	MPSC	0.54	<0.01
MPC	MPSC	0.00	0.37

Cuadro 7. Comparaciones pareadas (Φ_{PT}) de la variabilidad genética de poblaciones de abejas que se mantienen bajo un método de selección masal en población cerrada (MPC), método de selección masal en población semi-cerrada (MPSC) y de abejas locales no seleccionadas (LO) de la generación 2005-2006.

Población 1	Población 2	Φ_{PT}	P
LO	MPC	0.38	<0.01
LO	MPSC	0.37	<0.01
MPC	MPSC	0.00	0.31

Cuadro 8. Comparaciones pareadas (Φ_{PT}) de la variabilidad genética de poblaciones de abejas que se mantienen bajo un método de selección masal en población cerrada (MPC), método de selección masal en población semi-cerrada (MPSC) y de abejas locales no seleccionadas (LO) de la generación 2007-2008.

Población 1	Población 2	PhiPT (Φ_{PT})	P
LO	MPC	0.41	<0.01
LO	MPSC	0.13	<0.01
MPC	MPSC	0.09	<0.05

Cuadro 9. Distribución de frecuencias relativas y absolutas de haplotipos Europeo del Este (EE), Europeo del Oeste (EO) y Africano (AF) en poblaciones de abejas de las líneas seleccionadas CA, ONT, SG y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a las generaciones 2004-2005, 2005-2006 y 2007-2008.

Generación	Grupo	Número de colonias	EE	EO	AF
2004-2005	CA	61	0.90 55	0 0	0.10 6
	ONT	60	0.92 55	0.03 2	0.05 3
	SG	89	0.90 80	0.02 2	0.08 7
	LO	39	0.28 11	0.05 2	0.67 26
2005-2006	CA	75	0.93 70	0 0	0.07 5
	ONT	93	0.96 89	0 0	0.04 4
	SG	68	0.97 66	0 0	0.03 2
	LO	32	0.63 20	0 0	0.37 12
2007-2008	CA	85	0.81 69	0 0	0.19 16
	ONT	120	0.89 107	0 0	0.11 13
	SG	41	0.68 28	0 0	0.32 n=13
	LO	68	0.34 23	0 0	0.66 45

Cuadro 10. Distribución de frecuencias relativas y absolutas de haplotipos Europeo del Este (EE), Europeo del Oeste (EO) y Africano (AF) en poblaciones de colonias de abejas que se mantienen bajo un método de selección masal en población cerrada (MPC), bajo un método de selección masal en población semi-cerrada (MPSC) y de abejas locales no seleccionadas (LO) correspondientes a las generaciones 2004-2005, 2005-2006 y 2007-2008.

Generación	Grupo	Número de colonias	EE	EO	AF
2004-2005	MPC	121	0.91	0.02	0.07
			110	2	9
	MPSC	89	0.90	0.03	0.07
			80	2	7
	LO	39	0.28	0.05	0.67
			11	2	26
2005-2006	MPC	168	0.95	0	0.05
			159	0	9
	MPSC	68	0.97	0	0.03
			66	0	2
	LO	32	0.63	0	0.37
			20	0	12
2007-2008	MPC	205	0.86	0	0.14
			176	0	29
	MPSC	41	0.68	0	0.32
			28	0	13
	LO	68	0.34	0	0.66
			23	0	45

Figura 1. Análisis de restricción para detección de haplotipos. *EcoRI* solo digiere el fragmento de 964 pb del gen 1s rRNA para el haplotipo Europeo del Este produciendo dos fragmentos de 480 y 484 pb.

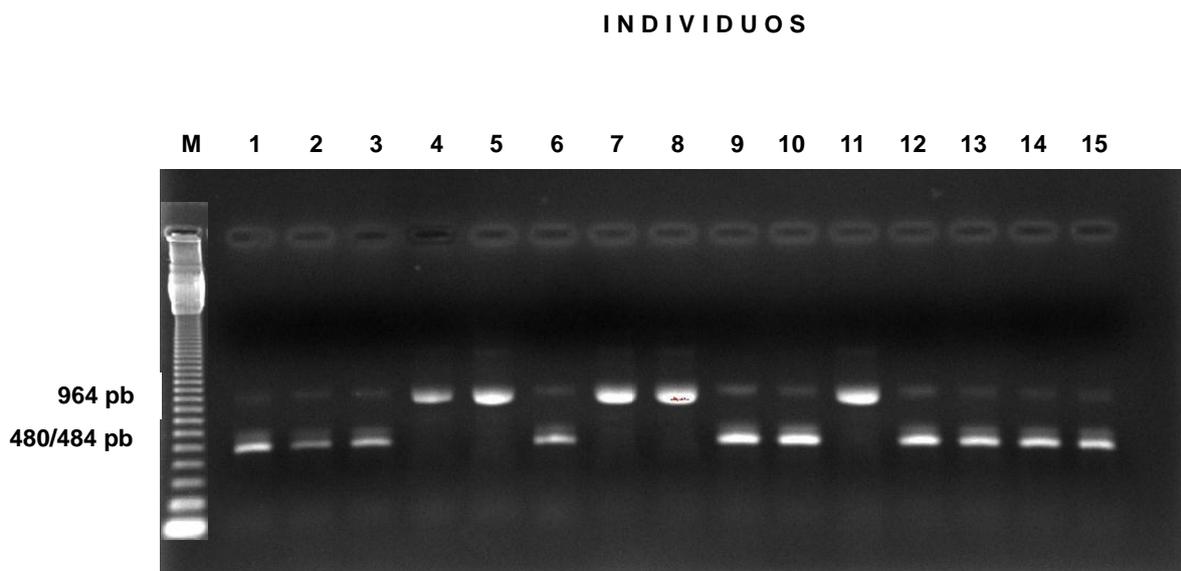
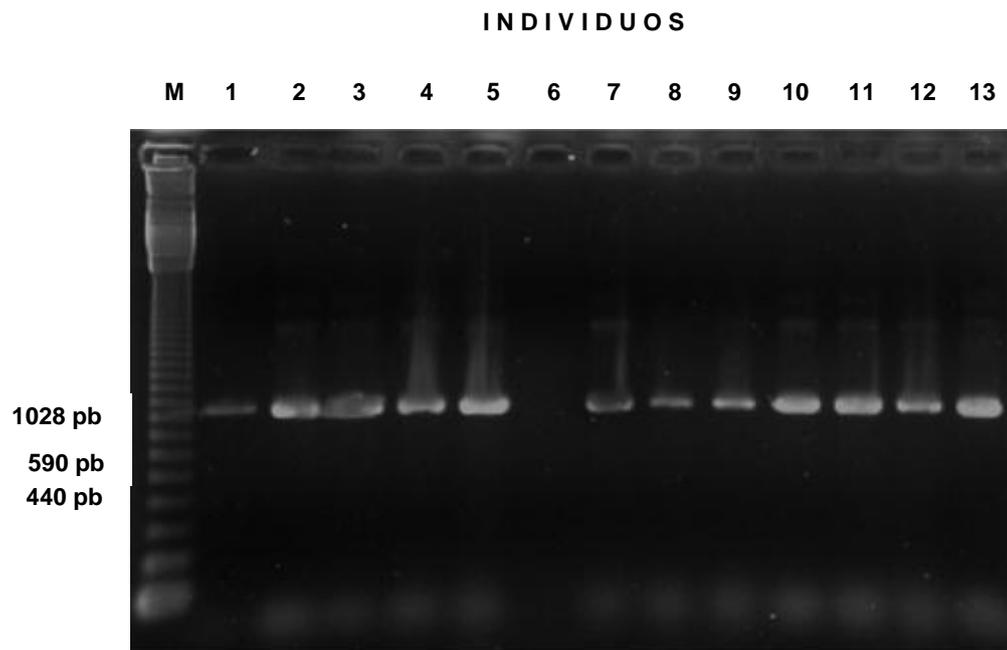


Figura 2. Análisis de restricción para detección de haplotipos. *HincII* solo digiere el fragmento de 1028 pb del gen citocromo oxidasa I (COI) para el haplotipo Europeo del Oeste produciendo fragmentos de aproximadamente 440 y 590 pb.



6. REFERENCIAS

- Aggrey SE, Linc CY, Cheng KM. Size of breeding populations required for selection programs. *Theor Appl Genet* 1995; 91: 553-556.
- Arechavaleta-Velasco ME, Robles Ríos CA, Uribe Rubio JL., Guzmán-Novoa E. Distribución de mitotipos y morfotipos en poblaciones de colonias de abejas melíferas seleccionadas y no seleccionadas. *Memorias XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Boca del Río, Ver. México. INIFAP; 2006:1
- Arechavaleta-Velasco ME, Robles Ríos CA, García Fernández F, Noriega Valladolid GL., Uribe Rubio JL. Producción de miel, comportamiento defensivo y longitud promedio del ala anterior de colonias de abejas desarrolladas bajo dos métodos de selección. *Memorias XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Culiacán, Sin. México. INIFAP; 2007:205
- Arechavaleta-Velasco ME, Robles Ríos CA, García Fernández F, Alcalá Escamilla KI, Camacho-Rea MC. Producción de miel, comportamiento defensivo, longitud promedio del ala anterior y frecuencia de haplotipos de poblaciones de colonias de abejas desarrolladas bajo dos métodos de selección en zonas africanizadas. *Memorias de la 55 Reunión Anual de la Sociedad del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales*. Campeche, Cam. México. PCCMCA; 2009:219
- Bonin A, Ehrich D, Manel S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol Ecol* 2007; 16: 3737–3758.
- Cánovas FP, de la Rúa P, Serrano J, Galián J. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de *Apis mellifera iberica* de Galicia (Nw España). *Arch Zootec* 2002; 51: 441-448.
- Collins AM, Rinderer TE, Harbo JR, Bolten AB. Colony defense by Africanized and European honey bees. *Science* 1982; 218: 72-74.
- Cowan DP, Stahlhut JK. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenoptera with complementary sex determination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 10374-10379.
- Crozier YC, Crozier RH. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 1993;133:97-117.

- Daniel WW. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. México:Limusa, 2002.
- De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). Mol Ecol 1998; 7: 1543-1547.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de abejas de la miel (*Apis mellifera* L.) de la Región de Murcia. Invest Agr Prod San Anim 1999; 14: 41-49.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J y Mortiz RFA. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from Canary Islands. Mol Ecol 2001; 10: 1733-1742.
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Mol Ecol 1992; 1: 145-154.
- Garnery L, Mosshine EH, Cornuet JM. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. Mol Ecol 1995; 4: 465-471.
- Gautschi B, Muller JP, Schmid B, Shykoff JA. Effective number of breeders and maintenance of genetic diversity in the captive bearded vulture population. Heredity 2003; 91: 9-16.
- Guzmán-Novoa E, Page RE. Backcrossing Africanized Honey bee queens to European drones reduces colony defensive behavior. Ann Entomol Soc Am 1993; 86: 352-355.
- Guzmán-Novoa E, Page RE. Genetic dominance and worker interactions affect honeybee colony defense. Behav Ecol 1994; 5: 91-97.
- Guzmán-Novoa E, Uribe RJL. Honey Production by European, Africanized and Hybrid Honey Bees (*Apis mellifera*) colonies in Mexico. Am Bee J 2004; 318-320.
- Hall HG, Smith DR. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 4548-4552.
- Hill, W.G. Maintenance of quantitative genetic variation in animal breeding programmes. Livest Prod Sci 2000;63: 99-109.
- Hunt GJ. Insect DNA extraction protocol. In fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR, MR. Michelli and R. Bova (eds.). Springer, Berlin, Germany, 1997; pp. 21-24.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario Estadístico del Estado de México (DF): INEGI, 1998.
- Kerr WE. The history of the introduction of African bees to Brazil. *S Afr Bee J* 1967;39:3-5.
- Kerr WE. Sex determination I honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequences. *Braz J Genet* 1997; 20: 601-611.
- Meusel MS, Moritz RFA. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* 1993;24:539-543.
- Moffett JO, Maki DL, Andre T, Fierro MM. The Africanized bee in Chiapas, México. *Am Bee J* 1987;127:571-520.
- Mortiz RFA. The origin of inbreeding depression in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Bee World* 1986; 67: 157-163.
- Nielsen DI, Ebert PR, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Kinee SA, Page RE Jr. Identification of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) incorporating morphometrics and an improved polymerase chain reaction mitotyping procedure. *Ann Entomol Soc Am* 1999;92:167-174.
- Notter DR. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J Anim Sci* 1999; 77: 61-69.
- Otis GW. The swarming biology and population dynamics of the Africanized honey bee. (PhD. dissertation). Lawrence. EUA: University of Kansas, 1980.
- Peakall R, Smouse PE. GenALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 2006;6:288-295.
- Robertson A. A theory of limits in artificial selection. *Proc Roy Soc Lond* 1960; B153:234-249.
- Rochambeau HF, Fournet-Hanocq, Vu Tien Khang J. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann Zootech* 2000; 49: 77-93.
- Schneider S, Kueffer J, Roessli D, Excoffier L. A software for population genetic data analysis, University of Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, 1997.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [homepage en Internet] (SAGARPA) 2000 Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Estadisticas/Paginas/default.aspx>

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
[homepage en Internet] (SAGARPA) 2009 Disponible en:
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Estadisticas/Paginas/default.aspx>

Smith DR, Palopoli MF, Taylor BR, Garnery L, Cornuet JM, Solignac M, Brown WM. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). J Hered 1991; 82: 96-100.

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

Van Wilgerburg E, Driessen G, Beukeboom LW. Single locus sex determination in Hymenoptera: an unintelligent desing?. Front Zool 2006; 3: 1-15.

Winston ML, Otis GW, Taylor OR. Absconding behavior of the Africanized honeybee in South America. J Apic Res 1979; 18: 85-94.

Zamora SO, Quezada EJJ. Análisis molecular y morfométrico en poblaciones de *Apis mellifera* de Baja California Sur. Memorias del XIX Seminario de Apicultura. Campeche, México. UNA; 2005:99-105.