



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DEL GENOTIPO DE LA REINA SOBRE EL ORIGEN GENÉTICO DE  
LOS ZÁNGANOS CON LOS QUE SE APAREAN LAS REINAS DE LAS ABEJAS  
MELÍFERAS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
FRANCISCO JAVIER RAMÍREZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. MIGUEL ENRIQUE ARECHAVALETA VELASCO  
INIFAP-FMVZ

COMITÉ TUTOR  
DR. MOISÉS MONTAÑO BERMÚDEZ  
INIFAP-FESC  
DR. FELIPE DE JESÚS RUIZ LÓPEZ  
INIFAP-FESC

CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX AGOSTO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Abigail Ramírez Ortiz y Elías Ramírez López que siempre han estado para apoyarme en todas mis decisiones de vida. Gracias por todas las enseñanzas, el sacrificio y ejemplo que me han dado.

A mi hermana Elizabeth Ramírez Ramírez por estar ahí apoyándome en todo momento y en todas mis locuras.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincera gratitud al Dr. Miguel E. Arechavaleta Velasco por su apoyo, enseñanzas y amistad, ya que sin ellos no se hubiera completado este proyecto.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por haberme permitido hacer mis estudios de posgrado.

A la MVZ. Claudia García Figueroa por su amistad, la paciencia tuvo al trasmitirme sus enseñanzas y por el gran apoyo a este proyecto ya que sin él hubiera sido más difícil realizarlo.

Al Dr. Moisés Montaña Bermúdez y al Dr. Felipe de Jesús Ruiz López por pertenecer a mi comité tutor ya que fue una parte importante para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales y Dr. Sergio Román Iván Ponce por pertenecer a mi jurado.

A todos los que contribuyeron en mi formación o al desarrollo de en este proyecto de investigación

## **CONTENIDO**

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	5
1.2 Objetivos	5
1.3 Hipótesis	5
2. MATERIAL Y MÉTODOS	6
2.1 Localización de una zona de congregación de zánganos	6
2.2 Establecimiento de un apiario experimental	7
2.3 Grupos genéticos de reinas	7
2.4 Cría y apareamiento de reinas vírgenes	7
2.5 Disección de la espermateca y extracción del ADN del semen	8
2.6 Cuantificación del origen genético del ADN del semen	9
2.7 Estimación de la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africanos presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon la reinas	12
2.8 Análisis estadísticos	13
3. RESULTADOS	14
3.1 Frecuencia relativa del alelo africano y del alelo no africano en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos.	14
3.2 Comparación de la frecuencia relativa promedio del alelo africano y del alelo no africano presente en el ADN del semen	15

que se obtuvo de la espermateca de las reinas de los cuatro grupos genéticos con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el tiempo en que se aparearon las reinas vírgenes.

4. DISCUSIÓN	17
5. CONCLUSIÓN	21
6. LITERATURA CITADA	22
7. FIGURAS	29

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo africano y no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA.

Figura 2. Frecuencia relativa promedio del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA.

Figura 3. Frecuencia relativa promedio del alelo no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA

Figura 4. Comparación de las frecuencias relativas promedio del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA, con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas

Figura 5. Comparación de las frecuencias relativas promedio del alelo no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA, con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas.

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar si el origen genético de la reina influye sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparea la reina. Se localizó una zona de congregación de zánganos y se instaló un apiario en donde se criaron reinas vírgenes de cuatro grupos genéticos: europeo (EE), africanizado (AA) y sus híbridos recíprocos (EA y AE), con el objeto de que se aparearan con los zánganos de la zona. Una vez que las reinas se aparearon se les extrajo la espermateca, se recuperó el semen almacenado y se extrajo el ADN. Se determinó el origen africano y no africano del semen utilizando un marcador SNP localizado en el ADN mitocondrial. Se estimó la frecuencia relativa del alelo africano y el alelo no africano presente en el ADN que se recuperó del semen de cada reina por medio de un ensayo de cuantificación por curva estándar. Se encontró que existen diferencias entre grupos genéticos de reinas en la frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo africano y el alelo no africano en el ADN que se recuperó del semen ( $P < 0.01$ ). La frecuencia relativa promedio del alelo africano en el ADN del semen de las reinas AA y AE fue significativamente mayor a la de las reinas EA y EE ( $P < 0.05$ ), mientras que la frecuencia relativa del alelo no africano en el ADN del semen de las reinas EE y EA fue significativamente mayor a la de las reinas AE y AA ( $P < 0.05$ ). Asimismo, se determinó la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas. Se encontró que la frecuencia relativa promedio del alelo africano y el alelo no africano en el ADN del semen que se obtuvo de las reinas AA y EE fue diferente a la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano en la zona de congregación ( $P < 0.05$ ).

Palabras clave: Abejas melíferas, Reinas, Zánganos, Apareamiento, Africanización



## **ABSTRACT**

The objective of the study was to determine if the genetic origin of the queen influence the genetic origin of the drones that mate with the queen. A drone congregation area was localized and an apiary was installed where virgin queen of four genetic groups: European (EE), Africanized (AA) and the two reciprocal F1 (EA and AE) were raised in order to mate with the drones of the zone. Once the queens mate, the spermateca of the queens was obtained, the semen was recovered and the DNA was extracted. The Africanized and the non Africanized origin of the semen was determined using a SNP marker located in the mitochondrial DNA. The relative frequency of the African and the non African alleles in the DNA was estimated using a standard curve relative quantification assay. Significant differences were found between queen genetic groups in the mean relative frequency of the copy number of the African and the non African alleles in the DNA extracted from the semen ( $P < 0.01$ ). The mean relative frequency of the African allele in the DNA of the semen of the AA and AE queens was significantly higher than in the EA and EE queens ( $P < 0.05$ ), meanwhile the relative frequency of the non African allele in the DNA of the semen of the EE and EA queens was significantly higher than in the AE and AA queens ( $P < 0.05$ ). The relative frequency of drones with African and non African haplotype in the drone congregation area was determined for the period of time when the queens mate. It was found that the mean relative frequency of the African and the non African alleles in the DNA of the semen obtained from the queens of the AA and EE groups were different from the relative frequency of drones with African and non African haplotype in the drone congregation area ( $P < 0.05$ ).

Key Words: Honey bee, Queens, Drones, Mating, Africanization.

# **EFFECTO DEL GENOTIPO DE LA REINA SOBRE EL ORIGEN GENÉTICO DE LOS ZÁNGANOS QUE SE APAREAN CON LAS REINAS DE LAS ABEJAS MELÍFERAS**

## **1. INTRODUCCIÓN.**

Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) son insectos eusociales, que se caracterizan por el traslape de generaciones, la cooperación de los insectos adultos en el cuidado de la cría y la presencia de reinas y zánganos, que son las castas especializadas en la reproducción de la especie (Gadagkar, 1990).

Las colonias crían reinas bajo tres condiciones: cuando la colonia va a enjambrar, cuando la colonia pierde a la reina o cuando la colonia necesita reemplazar a la reina. Las reinas tardan 16 días en desarrollarse en insectos adultos y alcanzan la madurez sexual seis días después. Las colonias de abejas crían zánganos durante la época de floración y el número de estos depende del tamaño de la población de abejas en la colonia y de la disponibilidad de alimento. Los zánganos tardan aproximadamente 24 días en desarrollarse desde huevo hasta insecto adulto y alcanzan la madurez sexual cuando tienen entre ocho y doce días de ser insectos adultos (Ruttner, 1966; Colonello y Hartfelder 2003).

Cuando los zánganos y las reinas maduran sexualmente realizan vuelos de apareamiento. En los vuelos de apareamiento las reinas y los zánganos se dirigen a áreas geográficas específicas, denominadas zonas de congregación, que se forman independientemente de la presencia de una reina y se encuentran en sitios abiertos delimitados por límites geográficos visibles como pueden ser: valles, orillas de ríos, veredas con líneas de árboles, orillas de bosques, claros y costas (Jaffé *et al.*, 2009) en donde confluyen las reinas y zánganos de colonias que se pueden encontrar en un radio de hasta 5 km de distancia (Ruttner, 1966).

En una zona de congregación se pueden observar zánganos volando en un área de 30 a 200 metros de diámetro y a una altura entre 10 y 40 metros siguiendo

una trayectoria elíptica (Ruttner, 1966; Winston, 1987; Baudry, *et al.*, 1998). Koeniger *et al.*, (2005) estimaron que en una zona de congregación se pueden encontrar en promedio 11,750 zánganos, mientras que Baudry *et al.*, (1998) estimaron que puede haber zánganos de más de 232 colonias al mismo tiempo en la zona de congregación.

El apareamiento entre la reina y el zángano se lleva a cabo en la zona de congregación, una vez que la reina llega, los zánganos la detectan y vuelan hacia ella formando una estela que contiene de 20 a 40 zánganos (Koeniger *et al.*, 2005). El apareamiento ocurre en el aire cuando uno de los zánganos se posiciona en la región dorsal de la reina y la sujeta con los tres pares de patas. El apareamiento dura menos de cinco segundos, durante este período la reina abre la cámara del aguijón permitiendo la entrada del endófalo del zángano y una vez que éste eyacula, se separa de la reina quedando parte del endófalo dentro de la vagina y el zángano muere (Winston, 1992; Dade, 1994).

Las abejas melíferas son poliándricas, una reina se cruza con varios zánganos y generalmente se aparea con más de un zángano durante un vuelo de apareamiento. El número de zánganos con los que se aparea una reina ha sido estimado en diferentes poblaciones y éste va de seis a 20 zánganos (Neumann *et al.*, 1999b; Neumann y Moritz 2000; Tarpy *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2005; Schlüns *et al.*, 2005).

Las reinas pueden aparearse durante un solo período de su vida, que dura de 14 a 21 días después de alcanzar la madurez sexual. Las reinas almacenan el semen de los zánganos con los que se aparean durante este periodo en la espermateca, en este órgano el semen de los zánganos se mezcla y permanece viable durante toda la vida de la reina (Winston, 1987).

El eyaculado de un zángano contiene entre 6.1 y 11.9 millones de espermatozoides (Woyke, 1960; Moritz, 1981; Rinderer *et al.*, 1985; Berg y Koeniger 1990; Rinderer *et al.*, 1999; Phiancharoen, 2004; Schlüns *et al.*, 2003),

las reinas son capaces de almacenar entre 4.7 y 8.0 millones de espermatozoides en la espermateca, de tal forma que sólo una pequeña fracción del eyaculado de un zángano entra en la espermateca, se estima que sólo entre el 2.5% y el 5% de los espermatozoides del eyaculado de un zángano son almacenados en la espermateca, el resto son expulsados por la reina a través de la vagina (Koeniger y Koeniger 1991; Baer, 2005).

Cuando una reina se aparea con varios zánganos en un solo vuelo de apareamiento, el semen de los zánganos se almacena en los oviductos laterales, en donde se mezcla y posteriormente una fracción de la mezcla del semen de todos los zánganos entra en la espermateca. Si la reina se aparea con un solo zángano durante un vuelo de apareamiento el semen también se almacena en los oviductos laterales y posteriormente solo una fracción entra a la espermateca en donde se mezcla con el semen de otros zánganos que hayan copulado con la reina durante vuelos de apareamiento previos y con el de los zánganos que copulen posteriormente con la reina durante otros vuelos de apareamiento. De tal forma que en la espermateca se almacenan y mezclan fracciones de aproximadamente el mismo volumen del semen de todos los zánganos con los que se aparea la reina (Bresslau, 1905; Ruttner y Koeniger 1971; Duvoisin *et al.*, 1999; Koeniger y Koeniger 1991).

Se han propuesto varias hipótesis para tratar de explicar las consecuencias evolutivas de la poliandria, la más aceptada plantea que la poliandria tiene como fin aumentar la diversidad genética de las obreras de una colonia (Crozier y Page. 1985; Keller y Reeve 1994; Cole y Wiernasz 1999; Palmer y Oldroyd 2000; Tarp y Page 2000). Se sabe que el genotipo de las obreras influye sobre las actividades que éstas realizan en la colonia, de tal forma que las abejas de una de las familias que forman a una colonia tienden a especializarse en alguna de las distintas tareas que se deben realizar dentro de la colmena, por lo que la diversidad genética en la población de obreras aumenta la aptitud genética de la colonia (Page y Robinson 1991; Page *et al.*, 2000; Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2003;

Arechavaleta-Velasco y Hunt 2003). Asimismo, la diversidad genética de las obreras de una colonia influye en la resistencia a enfermedades (Schmid-Hempel 1994; Palmer y Oldroyd 2000; Tarpy y Nielsen 2002) y en la capacidad de la colonia para adaptarse al medio ambiente (Kolmes *et al.*, 1989; Page y Mitchell 1998; Tarpy y Nielsen 2002).

La apicultura en México sufrió cambios importantes debido a la llegada de la abeja africanizada en 1986 (Guzmán-Novoa y Page 1994). Estas abejas presentan un alto comportamiento defensivo, una alta tendencia a enjambrar y en algunos estudios se ha encontrado que producen menos miel que las abejas europeas (Collins *et al.*, 1982; Uribe-Rubio *et al.*, 2003). La africanización ha ocasionado un aumento en los costos de producción porque obliga a los apicultores a ubicar sus apiarios en sitios más remotos, con el consecuente aumento en los costos de transportación y de mano de obra y por el aumento en el uso de equipo de protección.

Las abejas africanizadas han podido colonizar y prevalecer en más de 20 países del continente americano, reemplazando en mayor o menor medida a las poblaciones de abejas europeas desde que se generaron en Brasil con la introducción de abejas de razas africanas en 1956. Se estima que en la actualidad la abeja africanizada está presente en más del 95% de las regiones apícolas de México (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

El proceso de africanización se ha estudiado desde varias perspectivas, tratando de comprender como ocurrió el reemplazo de los genotipos europeos por los africanizados en las poblaciones.

Uno de los enfoques tiene que ver con la transmisión de genes de una generación a la siguiente, ya que cuando una reina se aparee con zánganos europeos y africanizados las dos líneas paternas estarán presentes dentro de la colonia, cuando la colonia reemplaza a la reina y cría una nueva reina a partir de

su progenie la línea paterna de la nueva reina se conservará en la siguiente generación.

La composición de líneas paternas dentro de una colonia es función del número y origen genético de los zánganos que se aparean con la reina, así como de la proporción de espermatozoides de los diferentes zánganos almacenados en la espermoteca de las reinas que son utilizados para la fertilización de huevos (DeGrandi *et al.*, 2003).

Si las abejas africanizadas presentan ventajas reproductivas sobre las abejas europeas, como la presencia de mecanismos que favorezcan que los zánganos que se aparean con las reinas sean de origen africanizado, esto incrementaría la proporción de cría de la línea paterna africanizada dentro de la colonia y por lo tanto la probabilidad de que alguna de esas larvas se convierta en reina, lo que podría explicar parcialmente porque el genotipo africanizado se conservó con mayor frecuencia que el genotipo europeo en las poblaciones durante el proceso de africanización.

### **1.1 Justificación.**

Conocer si el genotipo de las reinas influye sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas, contribuirá a entender los mecanismos que regulan el comportamiento reproductivo de las abejas y a comprender los mecanismos mediante los cuales se dio el proceso de africanización de las poblaciones de abejas.

### **1.2 Objetivo.**

Determinar si el origen genético de la reina influye sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas.

### **1.3 Hipótesis.**

El genotipo de la reina determina el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **2.1 Localización de una zona de congregación de zánganos**

Se construyó una trampa para localizar zonas de congregación de zánganos y para tomar muestras de los zánganos presentes en la zona de congregación. La trampa se elaboró con tela de tul en forma de cono con una altura de 1.04 m, una base de 0.50 m de diámetro y un volumen de 0.68 m<sup>3</sup>, la estructura del cono se formó utilizando tres aros de madera de 50, 35 y 29 cm de diámetro, la entrada a la trampa se localizó en la base del cono (Williams 1987). En el interior de la trampa se colocaron dos reinas vírgenes dentro de jaulas de plástico para atraer a los zánganos. Para elevar la trampa se utilizaron tres globos con un volumen de 0.50 m<sup>3</sup> cada uno, que se inflaron con helio, los globos se amarraron a la parte superior de la trampa (punta del cono) a una distancia de 3 m.

Para localizar la zona de congregación, se delimitaron transectos de 500 m de longitud en el municipio de Colón, Querétaro. Se recorrieron los transectos, elevando la trampa cada 100 m a una altura de 20 m durante 30 minutos para detectar la presencia de una zona de congregación de zánganos.

Se localizó una zona de congregación de zánganos ubicada a los 20°70'50" de latitud norte y a los 100°01'91" de longitud oeste a una altitud de 1,969 msnm. El tipo de clima en la zona de congregación es templado semiseco, con una temperatura media anual de 17.4°C, una temperatura máxima de 33°C y una temperatura mínima de 0°C, la precipitación media anual es de 574.1 mm. La vegetación predominante en las inmediaciones de la zona de congregación es de bosque caducifolio espinoso, bosque esclerófilo, matorral alto espinoso y matorral crasicaule. (INEGI 2013).

## **2.2 Establecimiento de un apiario experimental**

Se instaló un apiario experimental al suroeste de la zona de congregación a una distancia de 980 m. El apiario se estableció en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP, que se encuentra ubicado en Ajuchitlán, Querétaro. El apiario estuvo formado por ocho colonias progenitoras, cuatro colonias incubadoras huérfanas, 30 colonias de apoyo y 36 núcleos de fecundación.

## **2.3 Grupos genéticos de reinas.**

Para el desarrollo del estudio se utilizaron reinas de cuatro grupos genéticos: europeo (EE), africanizado (AA) y sus híbridos recíprocos (EA y AE). Se generaron reinas progenitoras de cada grupo genético (n=2) utilizando inseminación instrumental, cada una de las reinas progenitoras se inseminó con el semen de seis zánganos, las reinas del grupo EE se obtuvieron cruzando reinas y zánganos europeos, las reinas progenitoras del grupo AA se generaron cruzando reinas y zánganos africanizados, las reinas progenitoras del grupo EA cruzando reinas europeas con zánganos africanizados y las reinas progenitoras del grupo AE se obtuvieron cruzando reinas africanizadas con zánganos europeos.

## **2.4 Cría y apareamiento de reinas vírgenes.**

A partir de las reinas progenitoras se criaron reinas vírgenes de cada grupo genético utilizando larvas de menos de tres días, las cuales se colocaron en copaceldas de plástico y se introdujeron en colonias incubadoras huérfanas. A los nueve días se recolectaron las celdas reales de las incubadoras y se introdujeron en los núcleos de fecundación. Cinco días después se revisaron los núcleos de fecundación para examinar si las reinas habían emergido, las reinas que emergieron se aparearon en forma natural con los zánganos presentes en la zona.

Una vez que las reinas se aparearon e iniciaron la postura de huevos se les permitió que pusieran huevos durante 15 días. Al finalizar este periodo las reinas



se introdujeron en jaulas Benton y se trasladaron al laboratorio en donde se sacrificaron para extraerles la espermateca y recuperar el semen almacenado.

Las reinas se aparearon en el periodo comprendido entre los meses de mayo a septiembre y se obtuvieron 21 reinas del grupo genético africanizado (AA), 20 reinas del europeo (EE), 22 reinas del grupo híbrido AE y 22 reinas del grupo genético EA.

## **2.5 Disección de la espermateca y extracción del ADN del semen**

Para obtener la espermateca de las reinas se realizó una disección utilizando un microscopio estereoscópico. Se fijó la reina en forma ventral sobre un bloque de unicel con la ayuda de dos alfileres entomológicos que se colocaron en el tórax y en la base del abdomen. Se realizaron incisiones a ambos lados del abdomen con la ayuda de unas tijeras, se separó la parte dorsal del abdomen con unas pinzas evitando dañar los órganos subyacentes y se obtuvo la espermateca limpiándola de la red de tejido que la envuelve (Carreck *et al.*, 2013).

Para extraer el semen almacenado, se colocó la espermateca en un vidrio de reloj con 20  $\mu$ l de agua desionizada estéril, utilizando unas pinzas y una aguja de disección muy fina se hizo una perforación en la pared de la espermateca permitiendo que el semen saliera por sí solo sin presionar la espermateca para evitar que el semen se contaminara con tejido proveniente de la espermateca. Se recuperaron los 20  $\mu$ L de agua con el semen utilizando una micropipeta y se almacenó en tubos de plástico a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Tripet *et al.*, 2001; Delaney *et al.*, 2010).

Se extrajo el ADN del semen homogenizando cada muestra en una solución lisis (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1.1 M NaCl), seguido de una extracción de fenol/cloroformo y la precipitación del ADN en etanol (Hunt 1997). El ADN del semen se cuantificó y diluyó a una concentración final de 25 ng/ $\mu$ l y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6 Cuantificación del origen genético del ADN del semen

Para determinar el origen africano y no africano del semen se utilizó un marcador del tipo de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) localizado en el ADN mitocondrial en el sitio 689 el gen del Citocromo b en donde las abejas de origen africano (*A. m. scutellata* y *A. m. intermissa*) tienen una Citosina y las abejas de origen no africano (*A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasia*, *A. m. syriaca*, *A. m. cypria*, *A. m. lamarckii*) presentan una Timina (Pinto *et al.*, 2003; Crozier y Crozier 1992; Gibson y Hunt 2014).

Para estimar la proporción de zánganos de origen africano y europeo con los que se aparearon las reinas de cada grupo genético, se determinó la frecuencia relativa del alelo africano y el alelo no africano presente en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de la espermateca de cada reina por medio de un ensayo de cuantificación por curva estándar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

Se diseñaron los iniciadores y las sondas para el ensayo de cuantificación por curva estándar utilizando PCR en tiempo real con el programa Primer Express Ver. 1.5 (Applied Biosystem®). Los iniciadores que se diseñaron son: 5' TTG CCT TAC ATT TAA CTG GAT CAT CT 3' y 5' CAT ATC ATT TAG GAG ATC CAG ACA ATT T 3', las sondas para detectar las variantes alélicas del marcador SNP se marcaron en los extremos 5' con los fluorocromos FAM y VIC. La sonda que identifica el alelo de origen no africano se marcó con FAM (FAM-5' CAA TTA AAG ATC TTT TAG GAT TT 3'), mientras que la sonda que identifica el alelo de origen africano se marcó con VIC (VIC- 5'CAA TTA AAG ACC TTT TAG GAT TT 3').

Debido a que la concentración de ADN mitocondrial en el semen de los zánganos es muy baja (Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Lensky *et al.*, 1979), el ensayo de cuantificación por curva estándar se llevó a cabo utilizando una PCR en tiempo real anidada, la cual consiste en realizar la reacción de tiempo real utilizando como fuente de ADN al producto de una PCR de punto final (Teruyuki y Tomohiro 2005).

Se amplificó un fragmento de 485 pb del gen del Citocromo b que contenía al marcador SNP por medio de PCR de punto final utilizando los iniciadores: 5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3' y 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3', en una reacción de 20 µl con 0.5 X de buffer, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.5 µM de cada iniciador, 0.8 U de Taq Polimerasa y 75 ng de ADN. La reacción de PCR consistió en un ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 15 s, 50°C por 15 s y 68°C por 5 s, terminando con un ciclo a 72°C por 10 min (Pinto *et al.*, 2003).

Utilizando el producto de la PCR de punto final se llevó a cabo el ensayo de cuantificación por curva estándar por PCR en tiempo real para el alelo africano y para el alelo no africano en forma individual, amplificando un fragmento de 174 pb que contenía al marcador SNP. Las reacciones se realizaron en un volumen de 15 µl con 1 X de TaqMan MasterMix Gene Expression Assays, 0.9 µM de cada iniciador, 0.25 µM de la sonda correspondiente y 2 µl de producto de la amplificación de PCR por punto final, la reacción se realizó en un equipo StepOne de Applied Biosystems y consistió en un ciclo a 95°C por 10 min, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min y 72°C por 30s.

Para obtener la curva estándar se utilizó ADN de dos zánganos, uno identificado como africano y el otro como europeo utilizando tres marcadores de tipo PCR-RFLP ubicados en el ADN mitocondrial. Uno de los marcadores se ubica en el gen Citocromo b (Pinto *et al.*, 2003), otro se ubica en el gen lsmRNA y el otro en el gen citocromo oxidasa I (COI) (Nielsen *et al.*, 2000).

A partir del ADN de estos dos zángano se amplificó un fragmento de 485 pb del gen del Citocromo b que contiene al marcador SNP por medio de PCR de punto final utilizando los iniciadores: 5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3' y 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3', en una reacción de 15 µl con 0.5 X de buffer, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.5 µM de cada iniciador, 0.8 U de Taq Polimerasa y 75 ng de ADN. La reacción de PCR consistió en un ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 15 s, 50°C por 15 s

y 68°C por 5 s, terminando con un ciclo a 72°C por 10 min. Se cuantificó la concentración de ADN en el producto de la amplificación utilizando un espectrofotómetro y se realizaron diluciones seriadas en una concentración de  $4.77 \times 10^{10}$ ,  $4.77 \times 10^8$ ,  $4.77 \times 10^6$ ,  $4.77 \times 10^4$  y  $4.77 \times 10^2$  copias/ $\mu$ l para construir la curva estándar.

Para validar la capacidad del ensayo de cuantificación por curva estándar para identificar el origen africano y no africano del ADN, se llevó a cabo una prueba en la que se incluyeron muestras de ADN de 10 zánganos africanos y 10 zánganos europeos, cuyo origen genético fue determinado previamente utilizando los tres marcadores de tipo PCR-RFLP ubicados en el ADN mitocondrial (Nielsen *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2003). Los resultados de esta prueba mostraron que el ensayo fue capaz de identificar las dos variantes alélicas del marcador SNP y de discriminar con claridad el origen africano y no africano del ADN en todas las muestras.

Las muestras de ADN que se obtuvieron del semen de la espermateca de las 85 reinas de los cuatro grupos genéticos se corrieron por duplicado para cada alelo utilizando el ensayo de cuantificación por curva estándar. Utilizando el programa StepOne Ver. 2.3 (Applied Biosystem®) se cuantificó el número de copias presentes del alelo correspondiente en cada reacción. A partir de las dos reacciones que se corrieron se estimó la media para cada muestra tanto para el alelo africano, como para el alelo no africano. Utilizando los valores de las medias se estimó la frecuencia relativa del número de copias del alelo africano y del alelo no africano presentes en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de cada una de las reinas de los cuatro grupos genéticos.

## **2.7 Estimación de la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas**

Se realizaron muestreos mensuales en la zona de congregación para capturar zánganos con objeto de estimar la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo de tiempo en el que se aparearon las reinas de los cuatro grupos genéticos. Para capturar a los zánganos se utilizó la trampa descrita previamente, la cual se elevó a una altura aproximada de 10 m durante 30 minutos. En cada muestreo se capturaron aproximadamente 200 zánganos que se colocaron en frascos con alcohol al 96% y se mantuvieron a -20°C.

Se extrajo el ADN de una muestra de los zánganos capturados (n= 296). La extracción del ADN se hizo macerando cada zángano en una solución lisis (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1.1 M NaCl), seguido de una extracción de fenol/cloroformo y la precipitación del ADN en etanol (Hunt 1997). El ADN se cuantificó y diluyó a una concentración final de 100 ng/μl las cuales se mantuvieron a -80° C.

Para determinar el haplotipo de cada zángano en africano y no africano, se amplificó un fragmento de 485 pb del gen del Citocromo b que contenía al marcador SNP por medio de PCR de punto final utilizando los iniciadores: 5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3' y 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3', en una reacción de 15 μl con 0.5 X de buffer, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.5 μM de cada iniciador, 0.8 U de Taq Polimerasa y 75 ng de ADN. La reacción de PCR consistió en un ciclo a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 15 s, 50°C por 15 s y 68°C por 5 s, terminando con un ciclo a 72°C por 10 min. Posteriormente se generaron fragmentos de restricción a través de digerir el producto de la PCR con la enzima Bgl II (Pinto *et al.* 2003). Los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa al 1.2% y se visualizaron con luz ultravioleta después de ser teñidos con bromuro de etidio.

A partir de los resultados se estimó la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo de tiempo en que se aparearon las reinas.

## **2.8 Análisis estadísticos**

Para determinar si existe efecto del grupo genético de la reina sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparea, se realizó un análisis de varianza bajo un modelo aleatorio simple para determinar si existen diferencias entre los cuatro grupos genéticos en la frecuencia relativa del número de copias del alelo africano y del alelo no africano presente en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas, posteriormente para identificar diferencias en la frecuencia relativa promedio entre grupos genéticos se realizó una prueba de t de student, siguiendo el procedimiento para el análisis de modelos lineales del programa JMP 4<sup>®</sup>.

Para determinar si las reinas de los cuatro grupos genéticos se aparearon con una proporción de zánganos africanos y no africanos diferente a la proporción de zánganos africanos y no africanos presentes en la zona de congregación, se realizó una prueba para comparar la proporción de dos poblaciones, en la que se comparó la frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo africano y el alelo no africano presentes en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de la espermateca de las reinas, con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo de tiempo en que se aparearon las reinas.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Frecuencia relativa del alelo africano y del alelo no africano en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos.

La frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las reinas del grupo AA fue  $0.75 \pm 0.09$ , de las reinas AE fue  $0.71 \pm 0.09$ , del grupo EA fue  $0.40 \pm 0.09$  y de las reinas EE fue  $0.30 \pm 0.09$ . La frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo no africano presente en el ADN del semen de las reinas del grupo genético AA fue  $0.25 \pm 0.09$ , del grupo AE fue  $0.29 \pm 0.09$ , del grupo de reinas EA fue  $0.60 \pm 0.09$  y del grupo EE fue  $0.70 \pm 0.09$  (Figura 1).

Se encontró que existen diferencias entre grupos genéticos en la frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo africano en el ADN que se obtuvo del semen que se recolectó de las espermatecas de las reinas ( $F=5.69$ ;  $gl=3, 81$ ;  $P<0.01$ ). La frecuencia relativa promedio del alelo africano presente en el ADN del semen que se recuperó de las reinas del grupo genético africanizado (AA) no fue diferente a la del grupo AE ( $P>0.05$ ) pero sí fue diferente a la del grupo de reinas EA ( $P<0.05$ ) y a la del grupo genético europeo (EE) ( $P<0.05$ ). La frecuencia relativa promedio del alelo africano en el semen que se recuperó de las reinas AE fue diferente a la de las reinas EA ( $P<0.5$ ) y a la de las reinas europeas (EE) ( $P<0.05$ ). No se encontraron diferencias en las frecuencias relativas promedio de las reinas híbridas EA y de las reinas europeas (EE) ( $P>0.05$ ) (Figura 2).

Asimismo, se encontraron diferencias entre los cuatro grupos genéticos en la frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo no africano presentes en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas ( $F=5.69$ ;  $gl= 3, 81$ ;  $P<0.01$ ). La frecuencia relativa promedio del alelo no africano en el ADN del semen que se recuperó de las reinas africanizadas (AA) no fue diferente a la del grupo de reinas AE ( $P>0.05$ ) pero sí

fue diferente a la de las reinas EA ( $P < 0.05$ ) y a la de las reinas europeas (EE) ( $P < 0.05$ ). La frecuencia relativa promedio del alelo no africano en el semen que se obtuvo de las reinas AE fue diferente a la de las reinas EA ( $P < 0.5$ ) y a la de las reinas europeas (EE) ( $P < 0.05$ ). No se encontraron diferencias para la frecuencia relativa de este alelo entre las reinas híbridas EA y de las reinas europeas (EE) ( $P > 0.05$ ) (Figura 3).

### **3.2 Comparación de la frecuencia relativa promedio del alelo africano y del alelo no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de la espermateca de las reinas de los cuatro grupos genéticos con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación durante el tiempo en que se aparearon las reinas vírgenes.**

La frecuencia relativa de zánganos en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas con haplotipo africano fue 0.55 y la de zánganos con haplotipo no africano fue 0.45.

Se encontró que la frecuencia relativa promedio del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas del grupo africanizado (AA) ( $z = -2.02$ ;  $P < 0.05$ ) y del grupo de reinas europeas (EE) ( $z = 2.35$ ;  $P < 0.05$ ) fueron diferentes a la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano presentes en la zona de congregación durante el periodo que se aparearon las reinas. No se encontraron diferencias en la proporción del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas del grupo AE ( $z = -1.58$ ;  $P > 0.05$ ) y del grupo EA ( $z = 1.38$ ;  $P > 0.05$ ) con respecto a la proporción de zánganos con haplotipo africano presentes en la zona de congregación durante este periodo (Figura 4).

Se encontró que la frecuencia relativa promedio del alelo no africano presente en el semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas del grupo genético AA ( $z = 2.02$ ;  $P < 0.05$ ) y del grupo EE ( $z = -2.35$ ;  $P < 0.05$ ) fueron diferentes a



la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo que se aparearon las reinas. No se encontraron diferencias en la proporción del alelo no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos AE ( $z=1.58$ ;  $P>0.05$ ) y EA ( $z=-1.38$ ;  $P>0.05$ ) con respecto a la proporción de zánganos con haplotipo no africano presentes en la zona de congregación (Figura 5).

#### 4. DISCUSIÓN

Se encontró que existen diferencias en la frecuencia relativa promedio de los alelos africano y no africano presentes en el ADN que se obtuvo del semen que se recolectó de las espermatecas de las reinas europeas, africanizadas e híbridas. Estos resultados sugieren que el apareamiento entre reinas y zánganos de diferentes grupos genéticos no ocurre en forma aleatoria.

En el semen que se recuperó de las reinas africanizadas y de las reinas híbridas AE la frecuencia relativa del alelo africano fue significativamente mayor a la frecuencia relativa de este alelo en el semen que se obtuvo de las reinas europeas y las reinas híbridas EA. Mientras que en el semen que se obtuvo de las reinas europeas y de las reinas híbridas EA la frecuencia relativa del alelo no africano fue significativamente mayor que en el semen de las reinas africanizadas y las reinas AE. Estos resultados sugieren que el genotipo de las reinas influye en el origen genético de los zánganos con los que se aparean, de tal forma que las reinas africanizadas (AA) y las reinas híbridas AE se aparean con una mayor proporción de zánganos con haplotipo africano, mientras que las reinas europeas y las reinas EA se aparean con una mayor proporción de zánganos con haplotipo no africano.

El que las reinas de los grupos genéticos AA y AE se apareen preferentemente con zánganos con haplotipo africano, mientras que las reinas de los grupos genéticos EE y EA se apareen preferentemente con zánganos con haplotipo no africano sugiere la presencia de efectos genéticos para el efecto que tiene el genotipo de la reina sobre el origen de los zánganos con los que se aparean, ya que los grupos que comparten el mismo origen materno africanizado (AA y AE) o europeo (EE y EA) tuvieron el mismo efecto sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean.

Las reinas realizan varios vuelos de apareamiento durante el periodo de su vida en que se pueden aparear (Neumann *et al.*, 1999b; Tarpy *et al.*, 2004; Kraus

*et al.*, 2005; Schlüns *et al.*, 2005), durante un vuelo de apareamiento, las reinas se pueden aparear con uno o varios zánganos (Woyke 1960; Adams *et al.*, 1977). Cuando una reina se aparea con varios zánganos en un solo vuelo de apareamiento, el semen de los zánganos se almacena en los oviductos laterales, en donde se mezcla y posteriormente una fracción de la mezcla del semen de todos los zánganos entra en la espermateca. Cuando la reina se aparea con un solo zángano durante un vuelo de apareamiento el semen se almacena en los oviductos laterales y posteriormente solo una fracción entra a la espermateca en donde se mezcla con el semen de otros zánganos. Se estima que solo entre el 2.5% y el 5% de los espermatozoides del eyaculado de un zángano son almacenados en la espermateca, el resto son expulsados por la reina a través de la vagina (Koeniger y Koeniger 1991; Baer, 2005). De tal forma que en la espermateca se almacenan y mezclan fracciones de aproximadamente el mismo volumen del semen de todos los zánganos con los que se aparea la reina (Bresslau, 1905; Ruttner y Koeniger 1971; Duvoisin *et al.*, 1999; Koeniger y Koeniger 1991).

Lo anterior indica que en el semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas en este trabajo se encontraban espermatozoides de todos los zánganos que se aparearon con las reinas en cantidades aproximadamente iguales, por lo que a partir de la frecuencia relativa de los alelos africano y no africano presentes en el ADN que se extrajo del semen que se obtuvo de cada reina se puede estimar la proporción de zánganos con haplotipo africano y no africano con los que se aparearon las reinas.

Asimismo, en otro estudio se encontró que no existen diferencias en el número de zánganos con los que se aparean reinas europeas, africanizadas e híbridas, los autores reportan que no existe un efecto del grupo genético de la reina sobre el número de zánganos con los que se aparea, pero que sí existe efecto del medio ambiente (Morfin *et al.*, 2012). Lo anterior permite asumir que no hubo diferencias en el número de zánganos con los que se aparearon las reinas

de los cuatro grupos genéticos de este estudio, ya que los apareamientos se llevaron a cabo en un solo ambiente bajo las mismas condiciones. Por lo que el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas corresponde a un número aproximadamente igual de zánganos en todas las reinas.

La frecuencia relativa del alelo africano en el semen que se recuperó de las reinas africanizadas fue significativamente mayor que la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas, mientras que en el semen que se recuperó de las reinas del grupo genético europeo la frecuencia relativa promedio del alelo no africano fue significativamente mayor a la frecuencia de zánganos con haplotipo no africano presentes en la zona de congregación cuando se aparearon las reinas. Para el caso de las reinas híbridas AE y EA las frecuencias relativas de los alelos africanos y no africanos en el semen no fueron diferentes de las frecuencias relativas de los zánganos con haplotipo africano y no africano presentes en la zona de congregación cuando las reinas se aparearon. Estos resultados, además de ser otro indicador del efecto del grupo genético de la reina sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean, sugieren que la frecuencia con que las reinas de un grupo genético se aparean con zánganos de un origen genético en particular es independiente de la frecuencia con la que estos zánganos se encuentren presentes en la zona de congregación, en este estudio el efecto se observó particularmente en los grupos genéticos de reinas africanizadas y europeas.

El efecto del grupo genético de la reina sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean que se encontró en este estudio, puede deberse a que las reinas de un grupo genético atraigan preferente a zánganos de un haplotipo en particular durante el vuelo en las zonas de congregación, probablemente por medio de feromonas. Es poco probable que las reinas puedan seleccionar con que zánganos se aparean, ya que los apareamientos ocurren

durante el vuelo, cuando la reina es perseguida por un grupo de zánganos y uno de ellos logra aparearse con ella.

El que los apareamientos entre reinas y zánganos no ocurran en forma aleatoria, así como el que las reinas con genotipo AA y AE se apareen preferentemente con zánganos con haplotipo africano, pudo ser uno de los mecanismos que favorecieron el proceso de africanización de las poblaciones de abejas, ya que de esta forma se pudo mantener una fuente de material genético de origen africano en las poblaciones de abejas sin que éste se perdiera a través de la hibridación con abejas europeas. Al iniciar el proceso de africanización en una población de abejas la frecuencia relativa de los genotipos africanizados es muy baja, el apareamiento selectivo pudo ser uno de los mecanismos mediante los cuales las abejas africanizadas se mantuvieron en las poblaciones de abejas europeas y posteriormente mediante otros mecanismos relacionados con su capacidad de adaptación, producción de enjambres, producción de zánganos, entre otros, se favoreció la sustitución de los genotipos europeos por africanizados en las poblaciones (Schneider *et al.*, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

## **5. CONCLUSIÓN**

El grupo genético de la reina influye sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean.

Las reinas africanizadas (AA) y las reinas híbridas AE se aparean con una proporción mayor de zánganos con haplotipo africano que con zánganos con haplotipo no africano, mientras que las reinas europeas (EE) y las reinas híbridas EA se aparean con una proporción mayor de zánganos con haplotipo no africano que con zánganos con haplotipo africano.

Las reinas africanizadas se aparean con mayor frecuencia con zánganos con haplotipo africano, mientras que las reinas europeas se aparean con mayor frecuencia con zánganos con haplotipo no africano, independientemente de la frecuencia de estos dos haplotipos de zánganos en la zona de congregación durante la época en que se aparean las reinas.

## 6. LITERATURA CITADA

- Adams J, Rothman ED, Kerr WE, Paulino ZL. Estimation of the number of sex alleles and queen mating form diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* 1977;86:583-596.
- Arechavaleta-Velasco ME, 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 bees. *Behavior Genetics* 2003;33:355-362.
- Baer B. Sexual selection in Apis Bees. *Apogologie* 2005;36(2):187-200.
- Baudry E, Solignac M, Garnery L, Gries M, Cornuet J-M, Koeniger N. Relatedness among honeybee (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *The royal society* 1998;265:2009-2014.
- Berg S, Koeniger N. Larger drone (*Apis mellifera*) have more offspring in: *Proc. German Zoological Society, 83<sup>rd</sup> Meeting, Frankfurt am Main, Gustav Fisher Verlag* 1990: 614.
- Bresslau E. Der samenblasengang de bienenonigin. *Zool. Anz* 1905;29(10):299-323.
- Carreck NL, Andree M, Brent CS, Cox-Foster D, Dade HA, Ellis JD, Hatjina F, VanEnglesdorp D. Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. *Journal of Apicultural Research* 2013;52(4):1-39.
- Cole BJ, Wiernasz DC. The selective advantage of low relatedness. *Science* 1999;285:891-893.
- Collins AM, Rinderer TE, Harbo J. Colony Defense by Africanized and European Honey Bees. *Science* 1982;218:72-74.

- Colonello NA, Hartfelder K. Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honeybee drones. *Apidologie* 2003;34:257-267.
- Cornuet JM, Daoudi A, Chevalet C. Genetic pollution and number of matings in a black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) population. *Theor Appl Genet* 1986;73:223-227.
- Crozier RH, Crozier YC. The mitochondrial of the honeybee *Apis mellifera* complete sequence and genome organization. *Genetics Society of America* 1992;133:97-117.
- Crozier RH, Page RE. On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behav Ecol Sociobiol* 1985;18:105-115.
- Cruz-Höfling MA, Cruz-Landim C, Kitajima EW. The fine structure in spermatozoa from the honey bee. *An Acad Bras Ciênc* 1970;42:69-78.
- Dade HA. *Anatomy and Dissection of the Honeybee*. 4<sup>th</sup> ed. The Alden Press, Oxford 1994.
- DeGrandi G, Tarpy DR, Schneider SS. Patriline composition of worker populations in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by queens inseminated with semen from African and European drones. *Apidologie* 2003;34:111-120.
- Delaney DA, Keller JJ, Caren JR, Tarpy DR. The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 2010;42:1-13.
- Duvoisin N, Baer B, Schmid-Hempel P. Sperm transfer and male competition in a bumblebee. *Anim Behav* 1999;58:743-749.
- Estoup A, Solignac M, Cournuet JM. Precise assessment of the number of patrilines and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proc R Soc Lond* 1994;258:1-7.



- Gadagkar R. Origin and evolution of eusociality: A perspective from studying primitively eusocial wasps. *J Genet* 1990;2:113-125.
- Gibson JD, Hunt GJ. The complete mitochondrial of the invasive Africanized honey bee *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera:Apidae). *Mitochondrial DNA* 2014;27:561-562.
- Guzmán-Novoa E, Correa AB, Espinosa LM, Guzman-Novoa G. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Vet Mex* 2011;42(2):149-178.
- Guzmán-Novoa E, Page REJ. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Ann Bee J* 1994;124(2):101-106.
- Hunt GJ. Insect DNA extraction protocol. In fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR, MR. Michelli y R. Bova (eds.). Springer, Berlin Germany 1997;21-24.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática Anuario Estadístico del Estado de Querétaro: INEGI 2003.
- Jaffé R, Dietemann V, Crewee RM, Moritz FA. Temporal variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Molecular Ecology* 2009;18:1511-1522.
- Jensen AB, Palmer KA, Chaline N, Raine NE, Tofilsky A, Martin SJ. Quantifying Honey bee mating range and isolation in semi isolated valleys by microsatellite paternity analysis. *Conserve Genet* 2005;6:227-527.
- Keller L, Reeve HK. Genetic variability, queen number and polyandry in social Hymenoptera. *Evolution* 1994;139:1371-1382.
- Kraus FB, Neumann P, Moritz RFA. Genetic Variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insect Soc* 2005;52:1-5.

- Koeniger N, Koeniger G. An evolutionary approach to mating behavior and drone copulatory organs in apis. *Apogologie*, Springer Verlag 1991;22(6):581-590.
- Koeniger N, Koeniger G, Gries M, Tingek S. Drone competition at drone congregation areas in four Apis species. *Apidologie*, Springer Verlag 2005;36(2):211-221.
- Kolmes SA, Winston ML, Ferguesson LA. The division of labour among worker honey bees (Hymenoptera:Apidae): the effects of multiple patriline. *J Kans Entomol Soc* 1989;62:80-95.
- Lensky Y, Ben-David E, Schindler H. Ultrastructure of the spermatozoon of the mature drone honey bee. *J Apic Res* 1979;18:264-271.
- Morfin RN, Arechavaleta VME, Robles RCA, Montaña BM, Gutiérrez AC. Número efectivo de zánganos que se aparean con reinas europeas, africanizadas e híbridas bajo diferentes condiciones medio ambientales. *Memorias de XLVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. 2012 septiembre 10-13. Querétaro México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias: 2012:168.
- Moritz RFA. Der einfluss der inzucht auf die fitness der drohnen von *Apis mellifera carnica*. *Apodologie* 1981;12:41-55.
- Neumann P, Praagh JP, Moritz RFA, Dustman JH. Testing reliability of a potential island mating apiary using DNA microsatellites. *Apidologie* 1999a;30:257-276.
- Neumann P, Moritz FRA, Praagh J. Queen mating frequency in different types of honeybee mating apiaries. *Journal of Apicultural Research* 1999b;38:11-18.
- Neumann P, Moritz RFA. Testing genetic variance hypothesis for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insect Soc* 2000;47:271-279.

- Nielsen DI, Ebert PR, Page RE, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E. Improved polymerase Chain reaction based mitochondrial genotype assay for identification of the africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2000;93:1-6.
- Palmer KA, Oldroyd BP. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* 2000;31:235-248.
- Page RE, Mitchell SD. Self-organization and the evolution of division of labour. *Apidologie*. 1998;29:171-190.
- Page RE Jr, Robinson GE. The genetics of division of labour in honeybee colonies. *Adv Insect Physio* 1991;23:117–169.
- Page RE Jr, Fondrk MK, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E., Humphries MA, Nguyen K, Greene AS. Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *J Hered* 2000;91:474–479.
- Phiancharoen M. Instrumental insemination and reproductive incompatibility in the genus *Apis* in Thailand. Phd Tesis. Fac. Science. Dept Biology, Bee Biology Research Unit, Bangkok 10330 Thailand. 2004.
- Pinto MA, Johnston JS, Rubink WL, Coulson RN, Patton JC, Sheppard WS. Identification of africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) mitochondrial DNA: validation of a rapid polymerase chain reaction-based assay. *Ann. Entomol. Soc. Am* 2003;96(5):679-684.
- Rinderer TE, Collins AM, Pesante D. A comparison of Africanized and European drones: weights, mucus gland and seminal vesicle weights, and counts of spermatozoa. *Apodologie* 1985;16:407-412.
- Rinderer TE, de Guzman LI, Lancaster VA, Delatte GT, Stelzer JA. *Varroa* in the mating yard: the effect of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bee. *Am Bee J* 1999;139:134-139.
- Ruttner F. The life and flight activity of drones. *Bee World* 1966;47:93-100.

- Ruttner F, Koeniger G. The filling of the spermathecal of the honey bee queen: active migration or passive transport of the spermatozoa. *Z Vgl Physiol* 1971;72:411-422.
- Schlüns H, Moritz RFA, Neumann P, Kryger P, Koeniger G. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour* 2005;70:125-131.
- Schlüns H, Schlüns EA, van Praagh J, Moritz RFA. Sperm numbers in drone honeybee (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*. 2003;34:577-584.
- Schmid-Hempel. Infection and colony variability in social insects. *Phil Trans R Soc Lond B* 1994;346:313-321.
- Schneider SS, DeGrandi-Hoffman G, Smith DR. The African honey bee: Factors contributing to a successful biological invasion. *Annu Rev Entomol* 2004; 49:351-376.
- Taber S, Wendel J. Concerning the number of times queen bees mate. *J Econ Entomol* 1958;51:786-789.
- Tarpy DR, Page RE. No behavioral control over mating frequency in queen honey bee (*Apis mellifera* L.) Implications for the evolution of extreme polyandry. *The American Naturalist* 2000;155(6):820-827.
- Tarpy DR, Nielsen DI. Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (hymenoptera:apidae). *Ann Entomol Soc Am* 2002;95:513-528.
- Tarpy DR, Nielsen R, Nielsen DI. A scientific note on the revised estimates of the effective paternity frequency in *Apis*. *Insect Soc* 2004;51:203–204.
- Teruyuki T, Tomohiro N. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Journal of clinical microbiology* 2005;44(3):1029-1039.

- Tripet F, Touré YT, Taylor CE, Norris DE, Dolo SG, Lanzaro GC. DNA analysis of transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology* 2001;10: 1725-1732.
- Uribe-Rubio JL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa-Benitez, Zozaya JA. Efecto de la africanización sobre la producción de miel, comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en el altiplano mexicano. *Vet Mex* 2003;34 (1):47-59.
- Williams JL. Wind-directed pheromone trap for drone honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 1987;80:532-536.
- Winston ML. *The biology of the honey bee*. Harvard University Press. EUA 1987
- Winston ML. The Biology and management of the Africanized honey bees. *Annu Rev Entomol* 1992;37:173-193.
- Woyke J. Natural and artificial insemination of queen honey bees. *Bee World* 1960;11:65-75.

## 7. FIGURAS

Figura 1. Frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo africano y no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA.

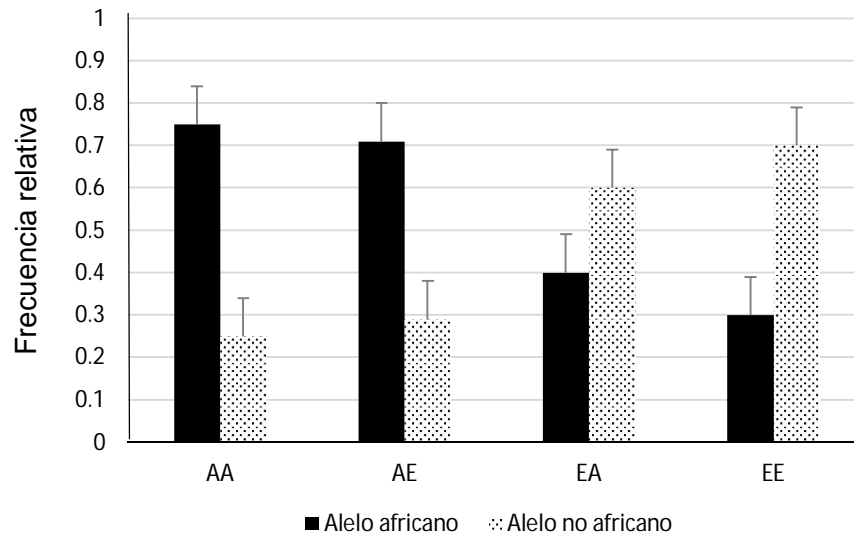
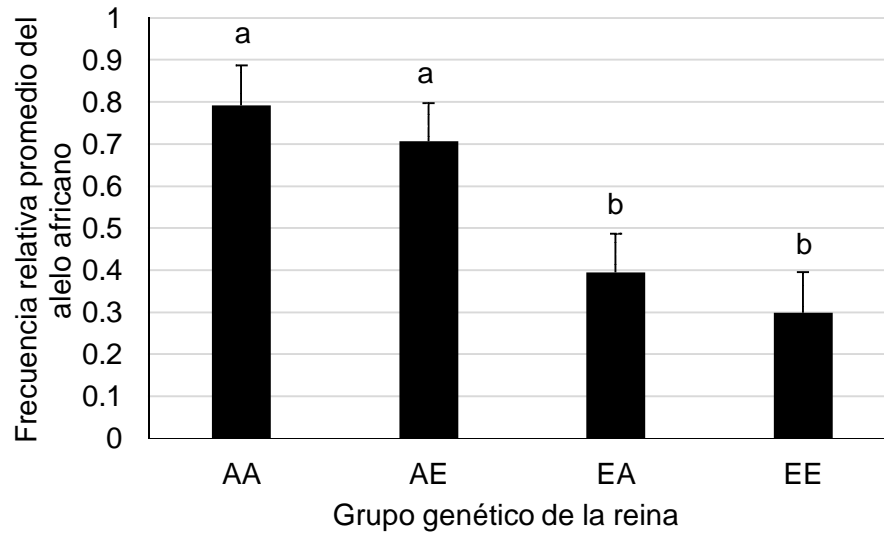
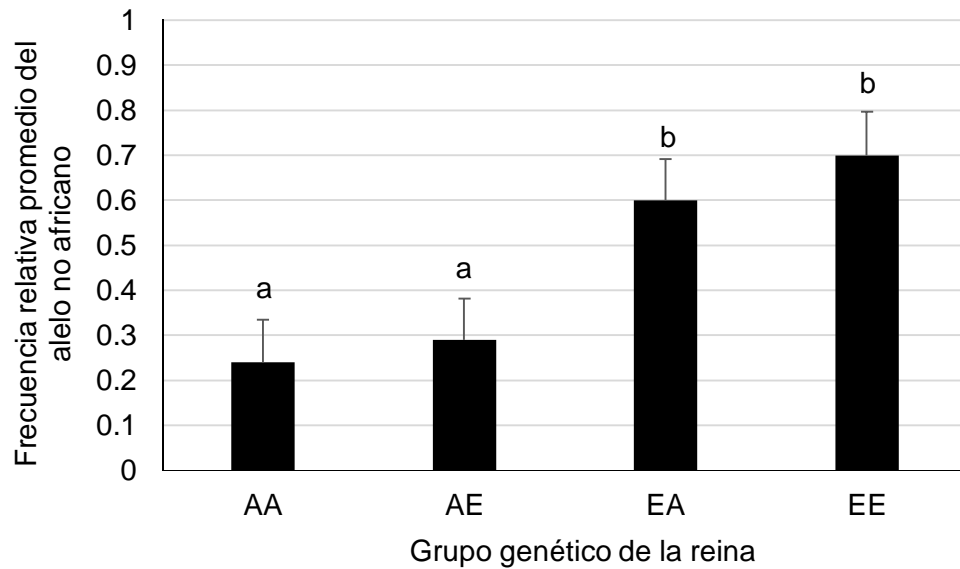


Figura 2. Frecuencia relativa promedio del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA.



Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) basadas en un análisis de varianza y una prueba t de student.

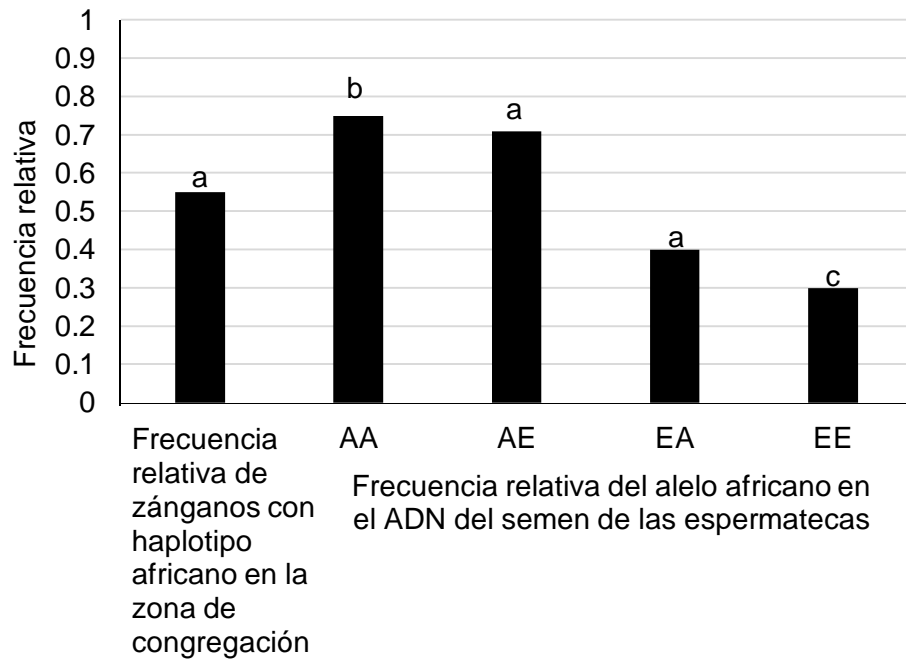
Figura 3. Frecuencia relativa promedio del alelo no africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA.



Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) basadas en un análisis de varianza y una prueba t de student.

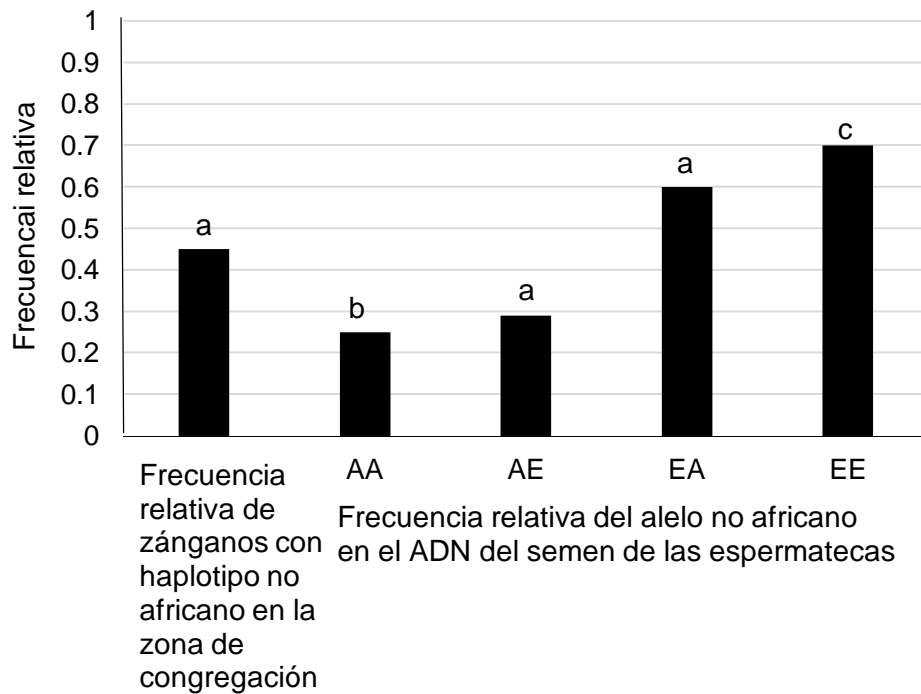


Figura 4. Comparación de las frecuencias relativas promedio del alelo africano presente en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA, con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas.



Letras diferentes indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre cada grupo genético y los zánganos en la zona de congregación basadas en una prueba para comparar la proporción de dos poblaciones.

Figura 5. Comparación de las frecuencias relativas promedio del alelo no africano presentes en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los grupos genéticos africanizado (AA), europeo (EE) y los híbridos recíprocos AE y EA, con la frecuencia relativa de zánganos con haplotipo no africano presentes en la zona de congregación durante el periodo en que se aparearon las reinas.



Letras diferentes indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre cada grupo genético y la frecuencia de los zánganos en la zona de congregación basadas en una prueba para comparar la proporción de dos poblaciones.