



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE ZÁNGANOS DE COLONIAS  
SELECCIONADAS SOBRE EL ORIGEN GENÉTICO DE LOS ZÁNGANOS CON LOS  
QUE SE APAREAN LAS REINAS DE LAS ABEJAS *Apis mellifera L.***

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

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

**PRESENTA:**

**CLAUDIA PATRICIA MARTINEZ RUIZ**

**TUTOR:**

**DR. MIGUEL ENRIQUE ARECHAULETA VELASCO**  
INIFAP-FMVZ

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. FELIPE DE JESUS RUIZ LOPEZ-INIFAP FESC**

**DR. SERGIO IVAN ROMAN PONCE-INIFAP FESC**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**OCTUBRE 2021**



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.

Dedicada a mi familia que me apoyo en cada paso del camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la base de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por dar el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Miguel Enrique Arechavaleta, por darme la oportunidad de formar parte de su proyecto de investigación.

Al Dr. Felipe de Jesús Ruiz López y al Dr. Sergio Iván Román Ponce, por sus consejos, apoyo y paciencia.

A mi familia, gracias por ser el apoyo más grande que tengo en la vida.

A mis amigos Roxana, Norma, Luis Felipe, Enrique Mandujano y Marcos, por siempre apoyarme, escucharme y motivarme.

A mis mascotas Coco, Twinky, Taffy, Mascarita y Canela, por ser mis compañeros incondicionales.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	6
<b>RESULTADOS</b> .....	13
<b>DISCUSIÓN</b> .....	14
<b>CONCLUSIONES E IMPLICACIONES</b> .....	16
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	17

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar y cuantificar si es posible influir sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas a través de producir en forma artificial zánganos de colonias seleccionadas. Para el desarrollo del estudio se utilizaron reinas de cuatro grupos genéticos: europeo (EE), africanizado (AA) y sus híbridos recíprocos (AE y EA). Las reinas de los cuatro grupos genéticos se aparearon bajo dos condiciones. En la primera se permitió que las reinas se aparearan en forma natural sin que se produjeran zánganos de origen europeo en forma artificial. En la segunda condición se permitió que las reinas se aparearan en forma natural, produciendo zánganos de origen europeo en forma artificial para tratar de influir sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparearon las reinas. Los resultados del estudio indican que no fue posible influir sobre el origen genético de los zánganos, ya que no hubo diferencias en la frecuencia relativa del alelo de origen europeo en el semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos cuando se aparearon en ambas condiciones. La frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo europeo presente en el ADN del semen que se obtuvo de las reinas que se aparearon cuando se produjeron zánganos de origen europeo en forma artificial fue de  $0.34 \pm 0.06$ , mientras que para las reinas que se aparearon cuando no se produjeron zánganos de origen europeo en forma artificial la frecuencia relativa fue de  $0.46 \pm 0.06$ . Se encontraron diferencias en la frecuencia relativa del número de copias del alelo europeo en ADN del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos ( $F=11.75$ ;  $gl=3, 83$ ;  $p<0.01$ ). Las frecuencias relativas promedio estimadas fueron  $0.75 \pm 0.09$ ,  $0.49 \pm 0.09$ ,  $0.19 \pm 0.08$  y  $0.17 \pm 0.08$  para los grupos genéticos EE, EA, AE y AA, respectivamente.

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

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to determine and quantify whether it is possible to influence the genetic origin of the drones with which queens mate by artificially producing drones from selected colonies. For the development of the study, queens from four genetic groups were used: European (EE), Africanized (AA) and their reciprocal hybrids (AE and EA). The queens of the four genetic groups were mated under two conditions. In the first, the queens were allowed to mate naturally without artificially producing drones of European origin. In the second condition, the queens were allowed to mate while at the same time artificially producing drones of European origin to try to influence the genetic origin of the drones with which the queens mated. The results indicate that it was not possible to influence the genetic origin of the drones, since there were no differences in the relative frequency of the allele of European origin in the semen that was recovered from the spermathecas of the queens of the four genetic groups when they mated in both conditions. The average relative frequency of the number of copies of the European allele present in the DNA of the semen that was obtained from the queens that mated when drones of European origin were produced artificially was  $0.34 \pm 0.06$ , meanwhile for the queens that mated when drones of European origin were not produced artificially, the relative frequency was  $0.46 \pm 0.06$ . Differences were found in the relative frequency of the number of copies of the European allele in semen DNA that was recovered from the spermathecas of the queens of the four genetic groups ( $F = 11.75$ ;  $gl = 3.83$ ;  $p < 0.01$ ). The estimated mean relative frequencies were  $0.75 \pm 0.09$ ,  $0.49 \pm 0.09$ ,  $0.19 \pm 0.08$  and  $0.17 \pm 0.08$  for the genetic groups EE, EA, AE and AA, respectively.

**Keywords: Honey bee, Queens, Drones, Mating, Africanization.**

## 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 situaciones: 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 de emerger. 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 la disponibilidad de alimento. Los zánganos se desarrollan de huevo hasta adulto en un periodo de 24 días 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. Los vuelos de apareamiento se ha reportado que ocurren entre las 14:00 y las 16:00 horas del día, aunque los horarios son flexibles y se adaptan a la situación climática (Howell y Usinger, 1933; Taber, 1954; Oertel, 1956; Ruttner, 1966; Taylor *et al.*, 1986; Winston, 1991). En los vuelos de apareamiento las reinas y los zánganos se dirigen a áreas geográficas específicas, denominadas zonas de congregación, estas zonas se forman independientemente de la presencia de una reina y se caracterizan por estar en sitios abiertos delimitados por límites geográficos visibles como valles, orillas de ríos, líneas de árboles, orillas de bosques, claros y costas. En las zonas de congregación confluyen las reinas y zánganos de colonias que se pueden encontrar en un radio de hasta 5 km de distancia (Ruttner, 1966). El tiempo que duran los vuelos tanto para las reinas como para los zánganos es variable, pero generalmente van de 25 a 32 minutos, aunque pueden durar hasta 60 minutos. La duración de los vuelos depende directamente de las condiciones

climáticas, los zánganos salen en promedio de 3 a 5 veces al día a vuelos de apareamiento. Las condiciones ideales para realizar los vuelos de apareamiento son temperaturas por encima de los 20° C, cielo despejado, velocidad de viento por debajo de los 20 a 28 km/hr sin embargo de ser necesario los vuelos de apareamiento se realizarán en condiciones adversas (Howell y Usinger, 1933; Oertel, 1956; Witherell, 1971; Winston, 1991).

En una zona de congregación se pueden observar zánganos volando en un área de 30 a 200 metros de diámetro y a una altura de 10 a 40 metros siguiendo una trayectoria elíptica (Ruttner, 1966; Winston, 1991). 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 aproximadamente 240 colonias al mismo tiempo en una zona de congregación, de igual forma (Page y Metcalf, 1982) estimaron que en una zona de congregación había al menos 25,000 zánganos provenientes de 200 colonias.

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 agujón permitiendo la entrada del endófalo del zángano y una vez que este 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, esto implica que una reina se aparee con varios zánganos y generalmente se aparee con más de un zángano durante un vuelo de apareamiento. El número de zánganos con los que se aparee una reina ha sido estimado en diferentes poblaciones y éste va de 6 a 20 zánganos (Taber *et al.*,

1958; Woyke, 1960; Adams *et al.*, 1977; Estoup *et al.*, 1994; Cornuet *et al.*, 1986; Tarpy *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005; Kraus *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, 1991).

La apicultura en México ha tenido 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 algunos estudios reportan que producen menos miel que las abejas europeas (Collins *et al.*, 1982; Winston, 1992; Hunt *et al.*, 1998; Uribe-Rubio *et al.*, 2003). La africanización ha ocasionado un aumento en los costos de producción ya que obliga a los apicultores a ubicar sus apiarios en sitios remotos, con el consecuente aumento en los costos de transportación, mano de obra y aumento en 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 razas de abejas africanas en 1956. En la actualidad la abeja africanizada está presente en todas las regiones apícolas de México (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

El mejoramiento genético de las poblaciones ha demostrado ser una alternativa para controlar los niveles de africanización de las poblaciones con el fin de mantener colonias productivas y con bajo comportamiento defensivo (Guzmán-Novoa y Page, 1999; Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2008). Un aspecto fundamental en el desarrollo de programas de mejoramiento genético en abejas, es el control de los apareamientos, para que solo las reinas y zánganos de las colonias seleccionadas se reproduzcan. Debido al comportamiento poliándrico de las reinas y a que los

apareamientos ocurren durante el vuelo en zonas de congregación, el controlar los apareamientos representa un problema importante a resolver.

Actualmente, la única forma en que se puede tener control total de los apareamientos es a través del uso de inseminación instrumental de reinas, o por medio del aislamiento geográfico de las poblaciones de abejas en islas.

Se ha propuesto que otra forma de ejercer control sobre los apareamientos es a través de saturar el medio ambiente con zánganos provenientes de colonias seleccionadas. Para hacer esto es necesario contar con colonias dedicadas a la producción de zánganos. Los zánganos seleccionados que se críen en estas colonias tendrán que acudir a las zonas de congregación y competir con los zánganos de las colonias que existan en la zona de congregación para aparearse con las reinas, pero al producir grandes cantidades de zánganos seleccionados la teoría indica que se incrementará la probabilidad de que las reinas se apareen con estos.

Existen dos estudios, en los que se ha buscado determinar si se puede ejercer control sobre los apareamientos entre reinas y zánganos (Hellmich y Waller, 1990; Hellmich *et al.*, 1993), los resultados de estos estudios indican que se puede llegar a ejercer control sobre los apareamientos en forma parcial. En el primer estudio realizado en el estado de Texas, EUA, se estableció que se puede lograr el control de los apareamientos en un rango que oscila entre 90 y 95%, sin modificar sustancialmente las prácticas de manejo de los apiarios (Hellmich y Waller, 1990). El segundo estudio fue realizado en el Suroeste de Guatemala, evaluándose el control de los apareamientos en dos regiones que compartían ambientes similares de bosque subtropical, cálido y húmedo, con 8-10 km de distancia entre ambas regiones. En este estudio se concluyó que se puede ejercer un control sobre el 70% de los apareamientos de las reinas utilizando técnicas de saturación de zánganos en zonas afectadas por la africanización (Hellmich *et al.*, 1993). En ambos estudios se utilizó como marcador el fenotipo Cordovan, el cual se expresa por homocigosis recesiva. Mediante este marcador se determinó el control en los apareamientos a

través de la cantidad de progenie con fenotipo Cordovan, ya que únicamente reinas que se aparean con zánganos portadores del gen Cordovan, darían lugar a progenie con el fenotipo Cordovan.

En un estudio desarrollado recientemente por Ramírez (2017) sobre el comportamiento de apareamiento entre reinas y zánganos de origen europeo y africanizado, se encontró que el genotipo de la reina influye en el origen genético de los zánganos con los que se aparean. Las reinas africanizadas (AA) e híbridas con línea materna africana (AE) se aparearon con una proporción mayor de zánganos de haplotipo africano, mientras que las reinas europeas e híbridas de línea materna europea se aparean con una proporción mayor de zánganos de haplotipo no africano.

Considerando la importancia de controlar los apareamientos en los programas de mejoramiento genético en abejas se plantea el presente estudio para evaluar en qué magnitud se puede ejercer un control sobre los apareamientos a través de saturar el medio ambiente con zánganos seleccionados.

### **Objetivo**

Determinar y cuantificar si es posible influir sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas a través de producir en forma artificial zánganos de colonias seleccionadas.

### **Hipótesis.**

Se puede ejercer control sobre el origen genético de los zánganos que se aparean con una reina a través de producir en forma artificial zánganos de colonias seleccionadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo se desarrolló en el apiario experimental y en el laboratorio de genética molecular de abejas del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, ubicado en Ajuchitlán, Querétaro.

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron reinas de cuatro grupos genéticos: europeo (EE), africanizado (AA) y sus híbridos recíprocos (AE y EA). Las reinas de los cuatro grupos genéticos se aparearon bajo dos condiciones. En la primera se permitió que las reinas se aparearan en forma natural sin que se produjeran zánganos de origen europeo en forma artificial. En la segunda condición se permitió que las reinas se aparearan en forma natural, produciendo zánganos de origen europeo en forma artificial para tratar de influir sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparearon las reinas.

### **Generación de reinas progenitoras de los cuatro grupos genéticos**

Para producir las reinas de los cuatro grupos genéticos: europeo (EE), africanizado (AA) y sus híbridos recíprocos (EA y AE), se generaron reinas progenitoras de cada grupo genético por medio de inseminación instrumental, cruzando reinas y zánganos de las líneas de abejas europeas y africanizadas que se mantienen en el Banco de Germoplasma Apícola del INIFAP. Cada reina progenitora se inseminó con el semen de seis zánganos, todos provenientes de la misma colonia.

### **Cría y apareamiento de reinas sin la producción artificial de zánganos de origen europeo.**

Se criaron reinas vírgenes a partir de las reinas progenitoras de cada uno de los cuatro grupos genéticos (AA, AE, EA y EE) utilizando larvas de tres días de edad. Las larvas se traslalararon a 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 núcleos de fecundación.

Cada núcleo de fecundación estuvo formado por un bastidor de alimento, un bastidor con cría y un alimentador interno. Tres días después de la introducción de la celda real se revisaron los núcleos para verificar que las reinas hubieran emergido. Las reinas vírgenes se aparearon con los zánganos que se encontraban en la zona, sin que se produjeran zánganos de origen europeo en forma artificial. Una vez que las reinas iniciaron la postura de huevos se mantuvieron en los núcleos de fecundación durante dos semanas y al finalizar este periodo se recolectaron las reinas para extraerles la espermateca y recuperar el semen de los zánganos con los que se aparearon.

Se obtuvo un total de 43 reinas de las cuales 12 reinas fueron del grupo genético AA, 10 reinas del grupo genético EE, 10 reinas del grupo genético híbrido AE y 11 reinas del grupo genético híbrido EA.

### **Producción artificial de zánganos de origen europeo.**

Se utilizaron 50 colonias de abejas de origen europeo para producir zánganos en forma artificial con el objetivo de saturar el medio ambiente con zánganos de origen europeo. Para la producción artificial de zánganos se introdujeron dos bastidores con panal con celdas de zángano en cada colmena y se estimuló a la colonia para que produjera zánganos proporcionándole alimento, en forma de jarabe de azúcar con una concentración 1:1 de azúcar y agua, se proporcionó 1 litro por colonia una vez a la semana. Adicionalmente se alimenta con pasta de polen elaborada con polen y miel de abeja una vez cada 15 días, se proporcionó 200 gramos a cada colonia.

Para cuantificar la cantidad de zánganos de origen europeo que se produjeron en las 50 colonias, se realizaron tres muestreos, con un intervalo de 24 días entre cada muestreo. En cada muestreo se tomó una fotografía de cada uno de los

bastidores con celdas para cría de zángano de las colonias y posteriormente se contaron las celdas con cría abierta y las celdas con cría operculada de zángano en cada colonia. Los muestreos se realizaron cada 24 días con el fin de no sobreestimar la producción de cría de zángano ya que el periodo de desarrollo de la cría de los zánganos desde huevo hasta emerger como insecto adulto dura aproximadamente 24 días (Winston,1991). Se calculó el número de zánganos que se produjeron en cada colonia con base al número de celdas con cría de zángano de cada colonia y un porcentaje de viabilidad para la cría de zángano de 96% (Page y Metcalf, 1982). Se estimó que las 50 colonias de abejas produjeron en total 71,198 zánganos de origen europeo.

Para estimar el número de zánganos que salían a realizar vuelos de apareamiento de las colonias, se realizaron muestreos entre las 15:00 y las 16:30 horas en los que se observó la entrada de las colmenas de cada una de las colonias durante siete minutos y se contó el número de zánganos que salieron y volaron fuera de la colmena. Los muestreos se realizaron en días que presentaron condiciones ambientales adecuadas para que los zánganos realizaran vuelos de apareamiento. Utilizando los datos del número de zánganos que realizaron vuelos de apareamiento durante un minuto en cada colonia, se estimó el número de zánganos que realizaron vuelos de apareamiento por día en cada colonia considerando que los zánganos que salen de la colonia para realizar vuelos de apareamiento lo hacen durante tres horas aproximadamente al día. Se estimó que en promedio en cada colonia 100 zánganos realizaron vuelos de apareamiento en cada día, por lo que, al considerar a las 50 colonias, se estimó que en promedio 5000 zánganos de origen europeo realizaron vuelos de apareamiento en cada día.

### **Cría y apareamiento de reinas bajo la producción artificial de zánganos de origen europeo.**

Se criaron reinas vírgenes a partir de las reinas progenitoras de cada uno de los cuatro grupos genéticos (AA, AE, EA y EE) utilizando larvas de tres días de edad.

Las larvas se trasladaron a 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 núcleos de fecundación.

Cada núcleo de fecundación estuvo formado por un bastidor de alimento, un bastidor con cría y un alimentador interno. Tres días después de la introducción de la celda real se revisaron los núcleos para verificar que las reinas habían emergido, las reinas vírgenes que se introdujeron a los núcleos de fecundación se aparearon con los zánganos que se encontraban en la zona bajo la producción artificial de zánganos de origen europeo en 50 colonias. Una vez que las reinas iniciaron la postura de huevos se mantuvieron en los núcleos de fecundación durante dos semanas y al finalizar este período se recolectaron para extraerles la espermateca y recuperar el semen de los zánganos con los que se aparearon.

Se obtuvo un total de 48 reinas de las cuales 11 reinas fueron del grupo genético AA, 11 reinas del grupo genético EE, 16 reinas del grupo genético AE y 10 reinas del grupo genético EA.

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

Se realizó una disección para obtener la espermateca de las reinas utilizando un microscopio estereoscópico. Para realizar la disección, se fijó a la reina en forma ventral con alfileres sobre una superficie de unicel, se realizaron incisiones en ambos lados del abdomen utilizando unas tijeras, se separó de la parte dorsal del abdomen con unas pinzas evitando dañar los órganos subyacentes y se obtuvo la espermateca separándola de la red de tejido que la envuelve (Carreck *et al.*, 2013; Ramírez, 2017).

Para extraer el semen, 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 se perforó la pared de la espermateca permitiendo que el semen saliera sobre el agua bidestilada. Se recuperaron los 20  $\mu$ l de agua bidestilada junto con el semen

utilizando una micropipeta y se almacenaron en tubos de 0.5 ml a -80° C. (Tripet *et al.*, 2001; Delaney *et al.*, 2010; Ramírez, 2017).

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

### **Cuantificación del origen genético de ADN del semen.**

Para determinar el origen africano y europeo del semen que se obtuvo de la espermateca de cada reina, se utilizó el método desarrollado por Ramírez (2017), este método permite estimar la proporción de zánganos de origen africano y europeo con los que se aparean las reinas, a través de determinar la frecuencia relativa de dos alelos de un marcador del tipo de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) ubicado en el ADN mitocondrial por medio de un ensayo de cuantificación por curva estándar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. El marcador SNP se localiza en el sitio 689 del gen del Citocromo b en donde las abejas de origen africano tienen una Citosina y las abejas de origen europeo presentan una Timina (Pinto *et al.*, 2003; Gibson y Hunt, 2014).

El ensayo de cuantificación por curva estándar se lleva a cabo utilizando una PCR en tiempo real anidada (Ramírez 2017), para lo cual se amplificó un fragmento de 485 pb del gen 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 25 μl con 0.5X de buffer, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, .2 de M de dNTP´s, 0.5 μM de cada iniciador, 0.8 U de Taq polimorasa 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 minutos (Pinto *et al.*, 2003).

Utilizando el producto de la PCR 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 europeo en forma individual, amplificando un fragmento de 174 pb que contenía al marcador SNP. Los iniciadores que se utilizaron fueron: 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 europeo 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') (Ramírez, 2017).

Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µl con 1X 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 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 minuto y 72°C por 30 s (Ramírez, 2017).

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 (Pinto *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2000). A partir del ADN de estos dos zánganos 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 0.5X de buffer, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, .2 de M 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° por 15 s, 50°C por 15 s y 68°C por 5 s, terminando con un ciclo a 72°C por 10 minutos. Se cuantificó la concentración de ADN en el producto de la amplificación utilizando un espectrofotómetro y se realizaron diluciones seriadas en una concentración de 9.54x10<sup>10</sup>, 9.54x10<sup>8</sup>,

$9.54 \times 10^6$ ,  $9.54 \times 10^4$ ,  $9.54 \times 10^2$  copias/ $\mu\text{l}$  para construir la curva estándar (Ramírez, 2017).

Las muestras de ADN que se obtuvieron del semen de las espermatecas de las 91 reinas se corrieron por duplicado para cada alelo utilizando el ensayo de cuantificación por curva estándar. Utilizando el programa StepOne 2.3 de 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 europeo (Ramírez, 2017). Utilizando los valores de las medias se estimó la frecuencia relativa del número de copias del alelo europeo presente en el ADN que se obtuvo del semen que se recuperó de las espermatecas de cada una de las reinas.

### **Análisis estadístico**

Para determinar si es posible influir sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas a través de producir en forma artificial zánganos de colonias seleccionadas, se comparó la frecuencia relativa del número de copias del alelo europeo en el semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos cuando se aparearon sin producir zánganos europeos en forma artificial y cuando se aparearon produciendo zánganos europeos en forma artificial, por medio de un análisis de varianza utilizando un modelo factorial en donde se incluyó el efecto de producir o no producir zánganos en forma artificial, el efecto del grupo genético de la reina y el efecto de la interacción entre estas dos variables. Para detectar diferencias entre las medias de los grupos se utilizó la prueba t de Student.

## RESULTADOS

No se encontraron diferencias en la frecuencia relativa del número de copias del alelo europeo en el ADN del semen que se obtuvo de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos cuando estas se aparearon sin que se produjeran zánganos de origen europeo de forma artificial o cuando se produjeron zánganos de origen europeo en forma artificial ( $F=2.18$ ;  $gl=1$ , 83;  $p>0.05$ ). La frecuencia relativa promedio del número de copias del alelo europeo presente en el ADN del semen que se obtuvo de las reinas que se aparearon cuando se produjeron zánganos de origen europeo en forma artificial fue de  $0.34 \pm 0.06$ , mientras que para las reinas que se aparearon cuando no se produjeron zánganos de origen europeo en forma artificial la frecuencia relativa fue de  $0.46 \pm 0.06$

Se encontraron diferencias en la frecuencia relativa del número de copias del alelo europeo en ADN del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos ( $F=11.75$ ;  $gl=3$ , 83;  $p<0.01$ ). Las reinas del grupo genético EE tuvieron una frecuencia relativa promedio mayor que las reinas de los otros tres grupos ( $p<0.05$ ), las reinas del grupo EA tuvieron una frecuencia del alelo europeo superior a las reinas de los grupos AE y AA ( $p<0.05$ ), mientras que entre las reinas de los grupos AE y AA no hubo diferencias ( $p>0.05$ ). Las frecuencias relativas promedio estimadas fueron  $0.75 \pm 0.09$ ,  $0.49 \pm 0.09$ ,  $0.19 \pm 0.08$  y  $0.17 \pm 0.08$  para los grupos genéticos EE, EA, AE y AA, respectivamente.

No se encontró que exista interacción entre el que las reinas se aparearan cuando se produjeron o no produjeron zánganos de origen europeo en forma artificial y el grupo genético de las reinas para la frecuencia relativa del número de copias del alelo europeo en el ADN del semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas. ( $F=0.73$ ;  $GL:3,83$ ;  $P>0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados del estudio indican que no fue posible influir sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas a través de producir en forma artificial zánganos de colonias seleccionadas ya que no hubo diferencias en la frecuencia relativa del alelo de origen europeo en el semen que se recuperó de las espermatecas de las reinas de los cuatro grupos genéticos cuando se aparearon sin que se produjeran en forma artificial zánganos de origen europeo y cuando se produjeron en forma artificial zánganos de origen europeo. Estos resultados difieren de dos estudios que indican que se puede ejercer control sobre los apareamientos entre reinas y zánganos mediante la producción artificial de zánganos. (Hellmich y Waller, 1990; (Hellmich *et al.*, 1993). A diferencia con el presente estudio, en el que se determinó si es posible influir en el origen de los zánganos con los que se aparean las reinas utilizando un marcador molecular del tipo SNP localizado en el ADN mitocondrial, en los otros dos estudios se utilizó como marcador el fenotipo Cordovan, que se expresa por homocigosis recesiva.

Algunos estudios indican que en una zona de congregación se pueden encontrar entre 10,000 y 15,000 zánganos en un día (Page y Metcalf, 1982; Koeniger, 2005). En el presente estudio se utilizaron 50 colonias de abejas para producir zánganos en forma artificial, los resultados estiman que se produjeron 71,198 zánganos, de los cuales aproximadamente 5000 realizaron vuelos de apareamiento cada día cuando las reinas se aparearon bajo las condiciones de producción artificial de zánganos., los resultados de este estudio indican que aun con estos niveles de producción artificial de zánganos de origen europeo no se pudo influir en el origen genético de los zánganos con los que se aparearon las reinas de los cuatro grupos genéticos.

En este estudio se encontraron diferencias entre los grupos genéticos de reinas en la frecuencia relativa del alelo europeo en el ADN del semen que se recuperó de las espermatecas independientemente de que se aparearan cuando se produjeron o no en forma artificial zánganos de origen europeo. Ramírez (2017)

encontró que el grupo genético de la reina influye sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparea, en ese estudio se encontró que las reinas africanizadas y las híbridas de madre africanizada se aparearon con mayor frecuencia con zánganos africanizados, mientras que las reinas de europeas y las híbridas de madre europea se aparearon con mayor frecuencia con zánganos europeos. Existen otros estudios que indican que en las abejas melíferas existe un apareamiento preferencial entre las reinas y zánganos de su propia raza (Koeniger 1989; Kerr y Bueno 1970), que se puede deber a un proceso de selección sexual que podría ejercer la reina hacia los zánganos durante los vuelos de apareamiento (Baer 2005; Winston 1991; Strassman 2001; Koeniger y Koeniger 1991).

Es posible que el apareamiento preferencial entre reinas europeas e híbridas EA con zánganos europeos y entre reinas africanizadas e híbridas AE con zánganos africanizados, que se encontró en este estudio y en el estudio de Ramírez (2017), sea la razón por la cual no fue posible influir en el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas cuando se produjeron zánganos de colonias seleccionadas en formar artificial.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

No se pudo influir en el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas cuando se produjeron zánganos de colonias seleccionadas en forma artificial. El grupo genético de las reinas influyó sobre el origen genético de los zánganos con los que éstas se aparearon, las reinas africanizadas y las híbridas de madre africanizada se aparearon preferentemente con zánganos africanos, mientras reinas europeas y las híbridas de madre europea se aparearon preferentemente con zánganos de origen europeo.

## 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, Robles Ríos CA, García Fernández F, Correa Benítez A. 2008. Mejoramiento genético de poblaciones de colonias de abejas para alta producción de miel y bajo comportamiento defensivo en zonas africanizadas. Memorias del 2º. Simposium mundial de criadores de abejas reinas e inseminación artificial. 31-34. Nuevo Vallarta, Nay. México. APIMONDIA.
- Baer B. Sexual selection in Apis bees. *Apidologie*. 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.
- 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.
- 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
- Dade HA. *Anatomy and Dissection of the Honeybee*. 4<sup>ta</sup> ed. The Alden Press, Oxford 1994.
- 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.

- Estoup A, Solignac M, Cournuet JM. Precise assessment of the number of patriline 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 genome of the invasive Africanized honey bee *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016;27(1):561-562. doi:10.3109/19401736.2014.905858
- Guzmán-Novoa E, Page REJ. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Ann Bee J.* 1994; 124(2): 101-106.
- Guzmán-Novoa E, Page REJ. Selective breeding of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in africanized areas. *J. Economic Entomol.* 1999; 92 (3): 521-525.
- Guzmán-Novoa E, Correa AB, Espinoza LM, Guzmán-Novoa G. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Vet Mex.* 2011;42(2):149-178.
- Hellmich, RL, Waller GD. Preparing for africanized Honey bees: Evaluating control in mating apiaries. *American Bee Journal.* 1990; 130(8): 537-542.
- Hellmich R, Ibarra J, Mejía M, Rinderer T, Gutierrez N. 1993. *American Bee Journal.* 133(3): 207-211.
- Howell, DE, Usinger RL. Observations on the flight and length of life of drones bees. *Ann Entomol Soc Amer* 1933; 26:239-246.
- Hunt GJ. Insect DNA extraction protocol. In fingerprinting methods based on arbitrary primed PCR, MR Michelli y R. Bova (eds.). Springer, Berlin Germany 1997: 21-24.
- Hunt G, Guzmán-Novoa E, Fondrk MK, Page RE. Quantitative Trait Loci for Honey Bee Stinging Behavior and Body Size. *Genetics.* 1998;149: 1203-1213.
- Jensen AB, Palmer KA, Chaline N, Raine NE, Tofilsky A, Martin SJ, *et al.* Quantifying Honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics.* 2005; 6:227-527.

- Kerr WE, Bueno D. Natural crossing between *Apis mellifera adansonii* and *Apis mellifera ligustica*. *Evolution* 1970;24:145–148.
- Koeniger N, Koeniger G, Gries M, Tingek S. Drone competition at drone congregation areas in four *Apis* species. *Apidologie*. 2005;36(2):211-221.
- Koeniger N, Koeniger G. An evolutionary approach to mating behavior and drone copulatory organs in *Apis*. *Apidologie*. 1991; 22(6): 581-590.
- Koeniger G, Koeniger N, Pechhacker H, Ruttner F, Berg S. Assortative mating in a mixed population of European honeybees *Apis mellifera ligustica* and *Apis mellifera carnica*, *Insectes Soc.* 1989;36:129–138
- Kraus FB, Neumann P, Moritz RFA. Genetic Variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insect. Soc.* 2005; 52:1-5.
- 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.
- Oertel E. Observations on the flight of drone honeybees. *Ann Entomol Soc Amer.* 1956; 49:497-50019.
- Page RE, Metcalf RA. Multiple mating, sperm utilization and social evolution. *Amer. Nat.* 1982; 124:680-281.
- 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.
- Ramirez FE. Efecto del genotipo de la reina sobre el origen genético de los zánganos con los que se aparean las reinas de las abejas melíferas. 2017. Tesis para obtención de grado de Maestría en Ciencias de la producción y de la salud animal. UNAM, Ciudad de México.
- Ruttner F. The life and flight activity of drones. *Bee World* 1966;47: 93-100.
- Strassmann J. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes. Soc.* 2001; 48:1–13.

- Taber S. The frequency of multiple mating of queen honeybees. *J Econ Entomol* 1954. 47:995-998.
- Taber S, Wendel J. Concerning the number of times queen bees mate. *J Econ Entomol*. 1958; 51:786-789.
- 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.
- Taylor OR, Kingsolver RW, Otis GW. A neutral mating model for honeybees (*Apis mellifera* L.) *Apic Res*. 1986; 23: 21-24.
- Tripet F, Toure 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.
- Winston ML. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press. EUA 1991.
- Winston ML. The biology and management of the Africanized honey bees. *Annu Rev Entomol* 1992; 37:173-193.
- Witherell PC. Duration of flight and interflight time of drone bees, *Apis mellifera*. *Ann Ent Soc Am* 1971;64: 609-612.
- Woyke J. Natural and artificial insemination of queen honey bees. *Bee World* 1960; 11:65-75.