



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

## VALORACIÓN DEL GRADO DE AFRICANIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE ABEJAS POR MEDIO DE ADN<sub>mt</sub>

REBECA ALEJANDRA URBINA ROMERO

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe REBECA ALEJANDRA URBINA ROMERO, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. FERNANDO CASTILLO GONZÁLEZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "VALORACIÓN DEL GRADO DE AFRICANIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE ABEJAS (*Apis mellifera*) POR MEDIO DE ADNmt" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 1 de marzo de 2018



Firma del  
Alumno (a)



Dr. Fernando Castillo González  
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

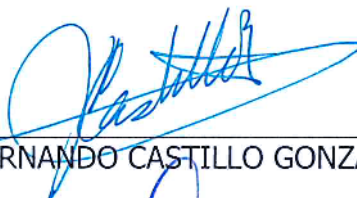
La presente tesis titulada: **“Valoración del grado de africanización de una población de abejas (*Apis mellifera*) por medio de ADN<sub>mt</sub>”** realizada por la alumna: Rebeca Alejandra Urbina Romero bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-GENÉTICA

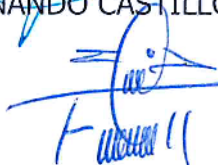
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. FERNANDO CASTILLO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS



DR. FERNANDO UTRERA QUINTANA

ASESOR



DR. MANUEL LIVERA MUÑOZ



DR. IGNACIO BENÍTEZ RIQUELME

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Marzo del 2018.

# VALORACIÓN DEL GRADO DE AFRICANIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE ABEJAS POR MEDIO DE ADN<sub>mt</sub>

Rebeca Alejandra Urbina Romero, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2018

## RESUMEN

Las abejas africanizadas son más tolerantes a varroasis que las europeas. La presente investigación planteó los objetivos: 1) valorar los niveles de infestación, conducta higiénica y acicalamiento, y 2) estudiar el origen materno del apiario mediante su ADN<sub>mt</sub>, en una población *euroafricana* que se integró mediante la recombinación genética de reinas vírgenes africanizadas provenientes de una población seleccionada para mansedumbre, sedentarismo y productividad apícola, con zánganos de otra población de abejas europeas también bajo selección, cuyas generaciones segregantes se han mantenido sin aplicar acaricidas en los últimos 22 años. La amplitud de los porcentajes de infestación fueron: para la prueba de nitrato (**PNit**) 1.2 a 8 % ácaros foréticos por abeja; caída por muerte natural (**Cmnat**) 7 a 30 ácaros diarios; acicalamiento, 13 a 61 % de ácaros con lesiones causadas por abejas; conducta higiénica por la prueba de pinchado (**Pin**), 62 a 99 % celdas aseadas por las obreras; conducta higiénica por la prueba de congelado (**Con**) 38 a 96 % de celdas aseadas. Los resultados indican respuesta favorable del apiario a la presencia de varroa, puesto que el 96% de las colmenas presentaron de alta a moderada conducta higiénica por la prueba de **Pin**, mientras que por la prueba **Con** el 74% de las colmenas presentaron tal comportamiento; por otro lado, la **PNit** indicó que la infestación forética se mantiene en niveles bajos (72% de las colmenas por debajo de 5% y las restantes no rebasan el 8% de infestación); los niveles de infestación no son explicados por la conducta higiénica y el acicalamiento; también el número de ácaros caídos naturalmente no presenta asociación con la conducta de acicalamiento. El análisis de ADN<sub>mt</sub> confirma que el linaje materno corresponde al africano, tal y como se infería de los antecedentes del establecimiento de la población estudiada. El 74 % de las colmenas corresponden a la subespecie *A. m. scutellata* y el 26 % al híbrido *A. m. scutellata* x *A. m. capensis*.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, ADN<sub>mt</sub>, higiénica, acicalamiento, euroafricana.

# ASSESSMENT OF THE DEGREE OF AFRICANIZATION OF A BEE POPULATION THROUGH ADN<sub>mt</sub>

Rebeca Alejandra Urbina Romero, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2018

## ABSTRACT

Africanized bees had shown more tolerance to *Varroa destructor* than European bees. This research was carried out under the objectives: 1) assessment of levels of infestation, hygienic behavior and grooming, and 2) study the maternal origin through its mtDNA polymorphism, of an *Euroafrican* population, which was integrated by genetic recombination of Africanized virgin queens from a population that had been under selection for less aggressiveness, reduced swarming and greater beekeeping productivity, with drones from an European bee population also under selection, whose segregant generations have been under selection without any acaricide application for more than 22 years. Ranges for infestation were: nitrate test (**PNit**) 1.2 to 8% phoretic mite per bee; natural mite-death (**Cmnat**) 7 to 30 mites daily; grooming, 13 to 61% injured mites by the honey bees; hygienic performance by puncture test (**Pin**), 62 to 99% cleaned cells; hygienic behavior by freezing test (**Con**) 38 to 96% cleaned cells. This results show favorable response of the experimental apiary to mite presence, because 96% of the beehives showed high to moderate hygienic performance with the **Pin** test, meanwhile with the **Con** test 75% of the beehives had such performance; on the other hand, with **PNit** test, phoretic infestation was low (72% of the beehives under 5% and the other beehives were under 8%). Levels of mite infestation are not explained by hygienic behavior and grooming; neither the number of death mites fallen naturally has association with the grooming behavior. The mtDNA analysis confirms that the maternal lineage in the apiary corresponds to the African, such as it was expected from the history of the integration of the experimental population. 74% of the beehives analyzed correspond to subspecies *A. m. scutellata* and 26% to the hybrid *A. m. scutellata* x *A. m. capensis*.

**Key words:** *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, mtDNA, hygienic, grooming, Euro-African bees.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

Al **Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas** y al **Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética**.

A **MVZ María de los Ángeles Flores** por su gran esfuerzo y trabajo en la primera etapa de esta investigación.

A **Dr. Fernando Utrera** y **Dr. Fernando Castillo** por darme la oportunidad de llevar a cabo el proyecto bajo su dirección y a su infinita paciencia en la revisión este trabajo.

A **Sr. José de la Riva Zúñiga** por compartir su conocimiento y experiencia de nuestra gran amiga, la abeja.

A **Sra. Dalila Torres†**, por ser la primera persona en recibirme con una sonrisa dentro del Postgrado y por su característico apoyo ofrecido durante el proceso.

A **Sra. Martha Patricia “Paty” Campos Palacios** por apoyarme siempre desde su trinchera. Gracias por su orientación en todo trámite realizado.

A la **Dr. Hilda Silva** por abrirme las puertas en el laboratorio de Biotecnología de semillas y por su orientación durante la investigación.

Al **Consejo Particular** por sus valiosas observaciones del proyecto.

A mi **familia** por su eterno apoyo incondicional que me brinda para lograr alcanzar mis metas. A ustedes que son mi más grande ejemplo a seguir. ¡Gracias!

A mis **amig@s**, porque pese a la distancia nunca me han abandonado ni dejado de apoyar. ¡Gracias!

## DEDICATORIA

*“Atrévete a soñar y valdrá la pena despertar”*

-Nadhín

Fue la curiosidad la que me trajo al inicio de este camino. El mundo de las abejas me parece inmenso como lo numeroso de sus colonias, trabajan y funcionan como un súper organismo perfectamente regulados y coordinados, son organismos con un comportamiento totalmente altruistas. Día a día de estudiar y trabajar con esta pequeña amiga reafirmó mi decisión de dedicarme a ellas.

Hoy, puedo decir felizmente que he finalizado otra etapa más en mi vida persiguiendo algo que me satisface y no lo hubiese podido descubrir sin esas grandes personas y pequeñas experiencias que conocí en el transcurso de mi vida. Por eso agradezco y dedico el esfuerzo de este trabajo a cada una de ellas, que me acercan más a la meta final.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
CAPITULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2 HIPOTESIS	6
1.3 OBJETIVOS	6
1.4 LITERATURA CITADA	7
CAPITULO II	12
NIVELES DE AFRICANIZACIÓN	12
2.1 RESUMEN	12
2.2 ABSTRAC	13
2.3 INTRODUCCIÓN	14
2.4 MATERIALES Y METODOS	17
2.4.1 Origen del Material genético	17
2.4.2 Análisis molecular	18
2.4.2.1 Extracción de ADN	18
2.4.2.2 Datos y análisis filogenético	19
2.5 RESULTADOS	21
2.5 DISCUSIÓN	26
2.7 CONCLUSIÓN	28
2.8 LITERATURA CITADA	29
CAPITULO III	35
CONDUCTA HIGIÉNICA Y NIVELES DE INFESTACIÓN DE <i>Varroa destructor</i> EN UNA POBLACIÓN DE ABEJAS EUROAFRICANAS	35
3.1 RESUMEN	35
3.2 ABSTRACT	36
3.3 INTRODUCCIÓN	37
3.4 MATERIALES Y METODOS	43
3.4.1 Origen del material genético	43
3.4.2 Prueba de infestación de varroa	45
3.4.2.1 Prueba de nitrato de amonio	45
3.4.2.2 Prueba de caída diaria	46
3.4.3 Evaluación de conducta de acicalamiento	46
3.4.4 Evaluación de conducta higiénica	47
3.4.4.1 Prueba de pinchado de cría	47
3.4.4.2 Prueba de congelado de cría	48
3.4.5 Análisis estadístico	49
3.5 RESULTADOS	50
3.6 DISCUSIÓN	55
3.7 CONCLUSIONES	58
3.8 LITERATURA CITADA	59



## LISTA DE CUADROS CAPÍTULO II

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 2.1.</b> Clasificación de 26 subespecies de <i>Apis mellifera</i> en cinco linajes evolutivos	16
<b>Cuadro 2.2.</b> Diferencia en polimorfismo en secuencias concatenadas de la región intergénica <i>COI-COII</i> y el gen <i>ND5</i> de 19 colmenas del Apiario Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo	23
<b>Cuadro 2.3.</b> Diferencia en polimorfismo en secuencias concatenadas de la región intergénica <i>COI-COII</i> y el gen <i>ND5</i> de testigos incluidos en el análisis filogenético	23

## LISTA DE CUADROS CAPÍTULO III

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 3.1.</b> Eigenvalores del análisis de componentes principales para higiene e infestación de colmenas en respuesta a varroa. Apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, 2015	51
<b>Cuadro 3.2.</b> Eigenvectores de los componentes principales para higiene e infestación de colmenas en respuesta a varroa. Apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, 2015	51
<b>Cuadro 3.3.</b> Medias por colmena para conducta higiénica, conducta de acicalamiento e infestación para cada método utilizado separados por agrupamiento. Apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, 2015	54

**LISTA DE FIGURAS  
CAPÍTULO II**

	<b>Página</b>
<b>Figura 2.1.</b> Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 19 colmenas del Apiario Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El dendrograma fue construido usando secuencias concatenadas de <i>ND5</i> y <i>COI-COII</i> , la desviación estándar final fue de 0.009608	22

**LISTA DE FIGURAS  
CAPÍTULO III**

	<b>Página</b>
<b>Figura 3.1.</b> Estructura de la correlación entre las variables y dispersión de colmenas, en el plano determinado por el CP1 (46 % de la variabilidad total) y CP2 (25 % de la variabilidad total). Cmnat = Caída por muerte natural diaria; PNit = Prueba de nitrato, Co6 = Congelado de panal a 6 h, Co24 = Congelado de panal a 24 h, Pin6 = Pinchado a 6 h, Pin24 = Pinchado a 24 h, Acica = Conducta de acicalamiento	53

## CAPITULO I

### 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La abeja *Apis mellifera* L. tiene origen en África y Eurasia, de donde se ha dispersado en todo el mundo por la actividad humana (Whitfield *et al.*, 2006). Antes del siglo XVI no existían abejas del género *Apis* en el continente americano. Sin embargo, tras el descubrimiento y colonización de América se introdujeron colmenas de *A. mellifera mellifera* al estado de Florida a finales del siglo XVII por su alta productividad de miel y cera (Calkins, 1974; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). Debido a que la apicultura tomó gran importancia, la abeja melífera se dispersó rápidamente en el continente y actualmente se puede encontrar en todos aquellos lugares donde las condiciones climáticas hayan hecho posible su explotación (Márquez, 1994; Whitfield *et al.*, 2006).

La introducción de *A. m. mellifera* en México se dio desde Cuba en 1764, después de pasar por Florida y llegó a la región central de México en 1770. A partir de ese momento, la actividad apícola creció en el país. Actualmente además de ser explotada para producción de miel y derivados, es utilizada como proveedora del servicio de polinización de cultivos agrícolas (Potts *et al.*, 2010).

Desde tiempos prehispánicos, la población indígena que habitaron la costa del Golfo de México explotaban abejas nativas sin aguijón del género *Melipona* (*Melipona beecheii*) y *Trigona* para obtener miel y cera. En la actualidad siguen siendo aprovechadas tradicionalmente, sin embargo, después de la introducción de la abeja melífera se ha reducido de manera paulatina el número de colmenas de meliponas (Márquez, 1994; James y Pitts-Singer, 2008). El cambio de la meliponicultura por la apicultura se debió principalmente al crecimiento de la industria azucarera y porque la abeja melífera produce más miel y cera que las meliponas (de un cuarto a un litro de miel por cosecha en *Melipona beecheii* contra 20 litros en *A. mellifera*) (Márquez, 1994).

La apicultura en México es una actividad de importancia socioeconómica; el país ocupa el sexto lugar mundial como productor de miel y el tercero como exportador. Se tiene registro de casi 43 mil productores apícolas, la generación de alrededor de 100 mil empleos directos y la producción de 57 mil toneladas de miel al año; el estado de Yucatán es el principal productor. La miel de nuestro país es considerada de alta calidad y de las más cotizadas. El 68 % de la miel se exporta, siendo Alemania el principal comprador; otra parte se envía a Estados Unidos, Reino Unido, Japón y Arabia Saudita (SIAP, 2016). En el año 2015 se presentó la mayor exportación de miel de los últimos 25 años con alrededor de 42 mil toneladas (SIAP, 2016). La rentabilidad de la actividad apícola es de 38 centavos por cada peso invertido; es decir, por colmena asciende a 158 pesos (Magaña y Leyva, 2011).

La abeja melífera es de importancia ecológica, porque ayuda a mantener el equilibrio en diversos ecosistemas al realizar la polinización de las diferentes especies de plantas silvestres. Entre los cultivos polinizados en México por abejas melíferas se encuentran: Caducifolios (manzana y pera) y perennifolios (aguacate y cítricos); Cucurbitáceas: melón, sandía, pepino y calabacita; Hortalizas: cebolla y fresa; Industriales: algodón, cártamo, girasol y soya (Pantoja, 2014; Reyes y Cano, 2000).

La apicultura mexicana es afectada por una variedad de problemas, entre ellos la africanización de las poblaciones de abejas. La abeja africana (*Apis mellifera scutellata*) llegó a América en 1956 como parte de un programa de mejoramiento genético establecido en Brasil; sin embargo, desde el escape de reinas africanas en 1957 el germoplasma africano se expandió rápidamente en el continente (Taylor, 1977). Se cree que su llegada a México fue a finales 1986 en el estado de Chiapas (Moffet *et al.*, 1987; PNCAA, 1988). Actualmente la abeja africanizada se encuentra distribuida en todo el territorio nacional (Quezada-Euán, 2007). A la recombinación genética de las abejas africanas con las europeas e invasión de colmenas en su proceso de dispersión se ha denominado como africanización.

El principal efecto indeseable de la abeja africanizada es el comportamiento altamente defensivo y tendencia a enjambrar (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011; Guzmán-Novoa y Page, 1994). El proceso de africanización ocurrió de Brasil a México en un lapso relativamente corto (30 años); Smith *et al.* (1989) atribuyen esta capacidad de expansión a una rápida introgresión de genes africanos en genotipos europeos. Debido a esto, se sugiere la necesidad de conocer la composición genética actual de las poblaciones mexicanas (Rinderer *et al.*, 1993). Anteriormente, era difícil mantener control selectivo en contra de la abeja africanizada debido a que pertenece a la misma especie que la abeja europea (Gary *et al.*, 1985).

La distinción entre las diferentes subespecies de abejas era complicada; actualmente se puede inferir su historia evolutiva mediante herramientas moleculares. Entre estas técnicas se encuentra el estudio del ADN mitocondrial (ADN<sub>mt</sub>). El ADN<sub>mt</sub> se hereda vía materna por lo que revela la identidad genética de la reina mediante la determinación en obreras, sin tomar en cuenta la herencia paterna (Hall y Muralidhara, 1989). El análisis del ADN<sub>mt</sub> permite diferenciar con base en la variación de longitud y secuencia dentro del genoma mitocondrial y discriminar entre los diferentes linajes evolutivos de *A. mellifera* (Hall y Smith, 1991; Garnery *et al.*, 1992). A partir de estudios morfométricos y moleculares se han reconocido 29 subespecies de *A. mellifera*, que se agrupan en cinco linajes. Estos son: linaje A, incluye a las subespecies africanas; el linaje M, formado por subespecies de Europa Occidental; linaje C formado por las subespecies de Europa Oriental; el linaje O que abarca a las subespecies de Medio Oriente y linaje Y que incluye a la subespecie de Etiopía (Ruttner, 1975; Ruttner, 1988; Rahimi, 2015; Özdil y İlhan, 2012, Valido *et al.*, 2014). Esta clasificación por linajes agrupa a genotipos que son resultados de la selección natural de las subespecies en su distribución geográfica de origen (Ruttner, 1975).

Otro de los problemas en la apicultura es la presencia de la varroasis, patología causada por el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* (Anderson y Trueman, 2000). En México, fue reportado por primera vez en 1992 en el estado de Veracruz (Chihu *et al.*, 1992) y actualmente está distribuido en todo el país

(Dietemann *et al.*, 2012). Para combatirlo las abejas presentan las conductas de acicalamiento e higiénica que le permite resistir su ataque (Le Conte *et al.*, 2007; Sammataro *et al.*, 2000). Los niveles de infestación de varroa varían según el genotipo de abeja. Las abejas africanas presentan menores porcentajes de infestación que las de origen europeo, como lo demuestran estudios en Brasil, donde se observó una resistencia natural al ácaro en abejas africanizadas (Page y Guzmán-Novoa, 1997). Así mismo, dichos efectos en poblaciones africanizadas dependerán también del ambiente ecológico en el que se encuentren (Medina *et al.*, 2014).

Una de las soluciones viables para combatir los problemas antes mencionados es obtener poblaciones africanizadas mejoradas para aprovechar sus caracteres deseables como tolerancia a varroasis. Villanueva (1990), Guzmán-Novoa y Page (1993) encontraron que es posible reducir caracteres no deseados en colonias africanizadas, después de dos a tres generaciones de cruzamiento de reinas africanizadas con zánganos europeos. Así mismo, al realizar recombinación genética de poblaciones africanizadas y europeas y selección, permite reducir los niveles de infestación por varroa. Como lo encontrado en una población euroafricana procedente de la cruce de abejas europeas (*A. m. ligústica*) con africana (*A. m. scutellata*) (Utrera, 1998) debido a que las segundas son más tolerantes a varroa que las primeras (Guzmán *et al.*, 1996).

En 1988 Cervantes-Santana inició un programa de mejoramiento genético para aprovechar la variabilidad genética de las abejas africanizadas mediante su recombinación genética con abejas europeas. El apiario experimental del Colegio de Postgraduados en Montecillo, municipio de Texcoco, Estado de México, se inició con abejas europeas domesticadas en 1978, colectadas de diferentes partes del país. En 1993 se introducen en el apiario abejas africanizadas semidomesticadas, que habían estado sujetas a selección por cuatro generaciones para mansedumbre, producción de miel y sedentarismo (Cervantes y Cruz, 1997); para su recombinación genética se hicieron cruces de reinas vírgenes africanizadas semidomesticadas con zánganos europeos mejorados en 1993.

Derivado de este proceso y 22 años de continua selección, el Colegio de Postgraduados cuenta con una población de abejas denominadas *euroafricanas* por Pérez-Sato y Cervantes-Santana (2001) que es diferente a las llamadas africanizadas por otros autores (Schneider *et al.*, 2004), llamadas así por la recombinación genética de abejas reinas africanas semidomesticadas con zánganos europeos (Utrera, 1998). La población se mantiene en continuo mejoramiento genético bajo los criterios de selección de mansedumbre, producción de miel y otros criterios apícolas. En 1994 se reportó la presencia de varroa en el área (Espinoza-Montaña y Guzmán-Novoa, 2007) con lo que la tolerancia al ácaro se incorporó a los criterios de selección. Si bien, se ha evaluado el grado de africanización e hibridación en esta población por métodos morfométricos (Utrera, 1998; Pérez, 2015), no se tiene información sobre el origen del material genético.

Con base en lo anterior, se realizaron estudios del ADN<sub>mt</sub> para identificar el origen materno del material genético presente en la población euroafricana del Programa de Mejoramiento Genético Apícola del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Así mismo, se evaluó la actual tolerancia a varroa en dicha población.

## 1.2 HIPOTESIS

La población euroafricana generada por el Programa de Mejoramiento Genético Apícola del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos se integró con linaje materno africanizado que se ha mantenido desde su establecimiento.

La población euroafricana, por provenir de la recombinación genética del linaje africanizado como línea materna y de linaje europeo como línea paterna, es tolerante al ácaro *Varroa destructor*.

## 1.3 OBJETIVOS

- a. Caracterizar molecularmente una población experimental euroafricana de abejas establecida en el Colegio de Postgraduados mantenida bajo selección a tolerancia a varroasis mediante la secuenciación de la región intergénica *COI-COII* y el gen *ND5* del ADN<sub>mt</sub>.
- b. Valorar los niveles de infestación de *Varroa destructor* con base en las pruebas de nitrato de amonio y caída natural.
- c. Evaluar conducta higiénica y acicalamiento para conocer los porcentajes de infestación.



#### 1.4 LITERATURA CITADA

- Anderson D L, W. J. Trueman. (2000)** *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp. Appl. Acarol. 24, 165-189.
- Calkins Ch. (1974)** Beekeeping in Yucatan: A Study in Historical-Cultural Zoogeography. The University of Nebraska-Lincoln, Ph. D. Geography. pp 224.
- Cervantes S. T., A. M. Cruz P. (1997)** Avances en la domesticación y el mejoramiento de abejas africanas. Memorias XI Seminario Americano de Apicultura. Acapulco, Guerrero, septiembre de 1997. Méx. pp. 34-36.
- Chihu A. D., L. M. Rojas A., S. R. Rodríguez D. (1992)** Presencia en Veracruz, México, del ácaro *Varroa jacobsoni*, causante de la varroasis de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). Tec. Pec. Méx. 30: 133-135.
- Dietemann V., J. Pflugfelder, D. Anderson, J. D. Charrière, N. Chejanovsky, B. Dainat, J. Miranda, K. Delaplane, F. X. Dillier, S. Fuch, P. Gallmann, L. Gauthier, A. Imdorf, N. Koeniger, J. Kralj, W. Meikle, J. Pettis, P. Rosenkranz, D. Sammataro, D. Smith, O. Yañez, P. Neumann. (2012)** *Varroa destructor*: Research avenues towards sustainable control. J. Api. Res. 51(1):125-132.
- Espinoza-Montaño L. y Guzmán-Novoa E. (2007)** Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México, México. Vet. Méx., 38 (1): 9-19.
- Garnery L., J. M. Cornuet, M. Solignac. (1992)** Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Mol. Ecol. 1: 145–154.

- Gary E. N., H. V. Daly, S. Locke, M. Race. (1985)** The Africanized honeybee: Ahead of schedule. *California Agriculture* 39(11): 4-7.
- Guzmán-Novoa E., A. Correa B., L. G. Espinosa M., G. Guzmán N. (2011)** Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Vet. Méx.* 42(2):149-178.
- Guzmán-Novoa E., R. Page E. (1994)** The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Am Bee J.* 134:101-106.
- Guzmán-Novoa E., R. Page E. Jr. (1993)** Backcrossing Africanized honey bee queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 352-355.
- Guzmán-Novoa E., Sánchez A., Page R. E., and García T. (1996)** Susceptibility of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 27: 93-103.
- Hall G. H., D. R. Smith. (1991)** Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4548-4552.
- Hall G. H., K. Muralidharan. (1989)** Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. *Nature* 339: 211-213.
- James R. J., T. Pitts-Singer. (2008)** *Bee Pollination in Agricultural Ecosystems.* Oxford University Press. New York, USA. 248 p.
- Labougle R. J., J. A. Zozaya. (1986)** La apicultura en México. *Ciencia y Desarrollo.* 69(12):17-36.
- Le Conte Y., G. De Vaublanc, D. Crauser, F. Jeanne, J. C. Rousselle, J. M. Bécard. (2007)** Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie* 38: 566-572.

- Magaña M. M. A., C. E. Leyva M. (2011)** Costos y rentabilidad del proceso de producción apícola en México. *Contad. Adm.* 235: 99-119.
- Márquez L. (1994)** Meliponicultura en México. *Dugesiana* 1(1):3-12.
- Medina F. C. A., E. Guzmán-Novoa, M. Mamiduzzaman M., C. F. Aréchiga, M. A. López C. (2014)** Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. *Genet Mol Res.* 13(3):7182-7193.
- Moffett J. O., D. L. Maki, T. Andere, M. M. Fierro. (1987)** The Africanized bee in Chiapas, Mexico. *Am. Bee J.* 127:517-520.
- Özdil F., F. İlhan. (2012)** Genetic divergence of Turkish *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of ND5 mitochondrial segment. *Sociobiology* 59(1):2012.
- Page R. E., E. Guzmán-Novoa. (1997)** The genetic basis of disease resistance. In: *Honey Bee Pests, Predators and Diseases* (Morse R A, K Flottum). 3ra Ed. The A. I. Root Company. Ohio, USA. 469-492.
- Pantoja A. (2014)** Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y El Caribe. Manual. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Santiago, Chile. 56 p.
- Pérez M. N. (2015)** Efecto de la selección en *Apis mellifera* recombinada con abejas africanizadas para tolerancia a *Varroa destructor*. Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 79 p.
- Pérez-Sato J. A. y T. Cervantes-Santana. (2001).** Selección para tolerancia a *Varroa jacobsoni* Oud. en una población de abejas euroafricanas. *Agrociencia* 35: 413-421.
- PNCAA (Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana). (1988)** La abeja africana ya está en México. Circular SARH, Mexico.

- Potts G. S., J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger, W. E. Kunin. (2010)** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Ecol. Evol.* 25: 345-353.
- Quezada-Euán J. J. (2007)** A retrospective history of the expansion of Africanized honeybees in Mexico. *J. Apic. Res.* 46:295-300.
- Rahimi A. (2015)** Study of the genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations using the mtDNA COI-COII intergenic region. *Biologija* 61(2):54-59.
- Reyes C. J. L., P. Cano R. (2000)** Manual de Polinización Apícola: La polinización de los cultivos por abejas. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); Gobierno de México: Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. 52 p.
- Rinderer E. T., S. M. Bucco, W. L. Rubink, Daly H. V., J. A Stelzer, R. M. Riggio, F. C. Baptista. (1993)** Morphometric identification of Africanized and European honey bees using large reference populations. *Apidologie* 24:569-585.
- Ruttner F. (1975)** Razas de abejas. *En: La colmena y la abeja melífera* (Dadant R). Capítulo 2. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. pp. 45-70.
- Ruttner F. (1988)** Biogeography and Taxonomy of Honey Bees. Springer Verlag, Heidelberg. New York, USA. 284 p.
- Sammataro D., U. Gerson, G. Needham. (2000)** Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 519-548.
- Schneider S. S., G. DeGradi-Hoffman, D. R. Smith. (2004)** The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 351-376.

**SIAP. (2016)** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [base de datos en Internet]. Servicio de información estadística agroalimentaria [citado 2016 ago 28]. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.

**Smith D. R., O. R. Taylor, W. M. Brown. (1989)** Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature* 339: 213-215.

**Taylor O. R. (1977)** The past and possible future spread of Africanized honeybees in the Americas. *Bee World* 65 (1): 38-47.

**Utrera Q. F. (1998)** Análisis de la transmisión a la descendencia de la tolerancia a *Varroa Jacobsoni* O., de una población de abejas. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Edo. de México. 60 p.

**Valido A., M. C. Rodríguez R., P. Jordano. (2014)** Impacto de la introducción de la abeja doméstica (*Apis mellifera*, Apidae) en el Parque Nacional del Teide (Tenerife, Islas Canarias). *Ecosistemas* 23(3):58-66.

**Villanueva B. T. (1990)** Caracterización y selección de abejas africanas bajo manejo apícola en Chontalpa, Tabasco. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma. Edo. de México, México. 92 p.

**Whitfield C. W., S. K. Behura, S. H. Berlocher, A. G. Clark, J. S. Johnston, W. S. Sheppard, D. R. Smith, A. V. Suarez, D. Weaver, N. D. Tsutsui. (2006)** Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314: 642-645.

## CAPITULO II

### GRADO DE AFRICANIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN EUROAFRICANA DE ABEJAS MEDIANTE ADN<sub>mt</sub>

#### 3.1 RESUMEN

En el Colegio de Postgraduados se integró un apiario experimental mediante la recombinación de germoplasma europeo y africanizado, con propósitos de mejoramiento genético, el cual se ha mantenido sin aplicación de acaricidas contra varroasis por más de 20 años. La población formada, denominada: población euroafricana, se generó mediante cruzamientos de abejas europeas (*Apis mellifera ligústica*) que habían estado bajo mejoramiento genético por alrededor de 15 años (fuente de zánganos) con abejas africanizadas (*A. m. scutellata*) que habían estado sujetas a selección para su semidomesticación y mejoramiento genético apícola (fuente de reinas). Con el objeto de tener información sobre el origen materno de la población euroafricana, se realizó la secuenciación de las regiones intergénicas *COI-COII* y el gen *ND5* del ADN<sub>mt</sub> en una muestra de 19 colmenas. Se confirmó el origen materno africano de *A. m. scutellata* (74 %) y se reveló la presencia de colmenas de origen híbrido de *A. m. scutellata* x *A. m. capensis* (26 %), no reportado en México antes de esta investigación.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, ADN<sub>mt</sub>, abeja africanizada, euroafricana, *COI-COII*, *ND5*.

## CHAPTER II

### 3.2 ABSTRACT

An experimental apiary was integrated at the Colegio de Postgraduados by recombination of European and Africanized germplasm, with the aim of genetic improvement, which has been without pesticides to *Varroa destructor* control for more than 20 years. Such population was generated by controlled mating of European bees (*Apis mellifera ligustica*) that had been under genetic improvement for about 15 years (source of drones) with africanized bees (*A. m. scutellata*) that had been under selection for semi-domestication and beekeeping genetic improvement purposes (source of queens). Sequencing and concatenation of COI-COII intergenic regions y ND5 gene of the ADN<sub>mt</sub>, on a sample of 19 beehives was carried out. African *A. m. scutellata* maternal origin was confirmed (74 %), and also presence of hybrid *A. m. scutellata* x *A. m. capensis* origin (26 %) was found; this the first report of such hybrid origin in México.

**Index words:** *Apis mellifera*, ADN<sub>mt</sub>, africanized honeybees, euroafricana, COI-COII, ND5.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

La subespecie *Apis mellifera scutellata* se introdujo del sur de África a Brasil en 1956 para realizar recombinaciones genéticas y generar segregantes adaptados a zonas tropicales (Kerr, 1967). Sin embargo, en 1957 veintiséis colonias escaparon y con ello se inició un proceso de africanización en el Continente Americano (Padilla *et al.*, 1992; Kerr, 1967). La abeja africanizada se reconoce como el resultado del apareamiento, en primera instancia, de reinas de apiarios locales con zánganos de origen africano escapados del Brasil, y en segunda instancia, por la invasión de colmenas por reinas de origen africano (Clarke *et al.*, 2002); la dispersión hacia el norte se da con esta dinámica; los primeros enjambres en México se detectaron a finales de 1986 (Winston, 1992), provocando pérdidas económicas en la apicultura por su comportamiento altamente defensivo, migratorio y fuerte tendencia a enjambrar (Guzmán-Novoa y Page 1994a; Seeley, 1985; Stort, 1974).

En 1984 se creó el Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana para prevenir y controlar su diseminación en México. La estrategia que se planteó para hacer frente a la invasión de la abeja africanizada consistió en establecer trampas y su consecuente eliminación y así preservar los apiarios locales con germoplasma europeo (Cajero, 1990; Rodríguez, 1989). La experiencia de más de dos décadas de dispersión mostraba que las trampas eran parcialmente efectivas y la abeja continuó su dispersión a través de territorio mexicano y se localizó en Texas, USA, en 1990 (S.A.R.H., 1990; Sugden *et al.*, 1991) por lo que el programa de control de la abeja africanizada terminó siendo un programa de monitoreo de su avance en el territorio mexicano (Winston, 1992).

Una estrategia alternativa la planteó el Dr. Tarcicio Cervantes-Santana, quien en 1988 inició un programa de mejoramiento genético considerando el aprovechamiento de la variabilidad genética que representaba la incorporación de genes de abejas africanas. El apiario experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México se integró inicialmente con abejas reinas europeas en 1978, colectadas de diferentes partes del país, para aplicar selección



con criterios de sanidad y buen comportamiento apícola. En 1993 se introducen al apiario abejas africanizadas que habían estado sometidas a un proceso de semidomesticación mediante la selección, en Cárdenas, Tab. por cuatro generaciones, para mansedumbre, producción de miel y sedentarismo (Cervantes y Cruz, 1997). Se criaron reinas de las mejores colmenas africanizadas semidomesticadas, que se recombinaron genéticamente controlando la fecundación por zánganos europeos mejorados de las colmenas iniciales.

Derivado de este proceso y más de 20 años de selección continua, en el Colegio de Postgraduados se cuenta con una población de abejas denominadas euroafricanas (Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001), obtenidas por la recombinación genética de abejas reinas africanizadas semidomesticadas con zánganos europeos (Utrera, 1998). Dicha población, por su obtención dirigida, resulta diferente a las africanas o africanizadas mencionadas por otros (Schneider *et al.*, 2004).

Aunque se conoce la manera en que construyó el acervo genético de la población, no se tiene información a nivel de ADN que respalde su naturaleza genética. Es importante realizar estudios que permitan tener información confiable sobre el origen materno de este material genético. Es conveniente señalar que este apiario experimental se ha mantenido sin aplicar ningún tipo de tratamiento contra varroasis por más de 20 años, y que su capacidad de sobrevivencia puede ser atribuible a la contribución del germoplasma africanizado con la mejora genética señalada.

Anteriormente, era difícil mantener control selectivo en la abeja africanizada debido a la homogeneidad en morfología de la especie (Gary *et al.*, 1985) hoy en día un método eficiente para detectar la africanización es la amplificación de un fragmento de ADN<sub>mt</sub>; debido a que se hereda vía materna, revela la identidad genética de la reina a través de las obreras sin tomar en cuenta la herencia paterna (Hall y Muralidhara, 1989). Con información de morfometría, de polimorfismo isoenzimático y de ADN<sub>mt</sub>, actualmente se reconocen 29 subespecies de *A.*

*mellifera*, que se agrupan en cinco linajes: linaje A, incluye a las subespecies africanas, el linaje M, formado por subespecies de Europa Occidental, linaje C formado por las subespecies de Europa Oriental, el linaje O que abarca a las subespecies de Oriente Próximo y linaje Y que incluye a la subespecie de Etiopía (Özdil y İlhan 2012; Rahimi, 2015; Ruttner, 1988; Valido *et al.*, 2014) (Cuadro 1).

**Cuadro 2.1.** Clasificación de 26 subespecies de *Apis mellifera* en cinco linajes evolutivos.

<b>Linaje evolutivo</b>			
	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>C</b>
<b>Distribución</b>	<b>(Africana)</b>	<b>(Europa Occidental)</b>	<b>(Europa Oriental)</b>
	<i>A. m. adansonii</i>	<i>A. m. iberensis</i>	<i>A. m. carnica</i>
	<i>A. m. capensis</i>	<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. cecropia</i>
	<i>A. m. intermissa</i>		<i>A. m. ligústica</i>
	<i>A. m. lamarckii</i>		<i>A. m. macedónica</i>
	<i>A. m. litorea</i>		<i>A. m. sossimai</i>
	<i>A. m. monticola</i>		<i>A. m. pomonella</i>
	<i>A. m. sahariensis</i>		
	<i>A. m. scutellata</i>		
	<i>A. m. unicolor</i>		
	<i>A. m. siciliana</i>		
	<i>A. m. ruttneri</i>		

<b>Linaje evolutivo</b>		
	<b>O</b>	<b>Y</b>
<b>Distribución</b>	<b>(Oriente Próximo)</b>	<b>(Etiopía)</b>
	<i>A. m. adamii</i>	<i>A. m. jemenitica</i>
	<i>A. m. anatoliaca</i>	
	<i>A. m. caucasia</i>	

...Continuación.

*A. m. cypria*

*A. m. meda*

*A. m. syriaca*

---

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es analizar la región intergénica *COI-COII* y el gen *ND5* del ADN<sub>mt</sub> para determinar el origen materno de la población euroafricana, con la expectativa de que corresponde al linaje africano que se empleó en el establecimiento de la población experimental.

## **2.4 MATERIALES Y METODOS**

La investigación se realizó durante los meses de febrero a julio del 2015 en el apiario experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Texcoco, Estado de México (Longitud: 98°54'17.53"O, Latitud: 19°27'50.01"N, Altitud de 2,250 msnm). El clima predominante es templado semiseco, con temperatura media anual de 15.9°C, y heladas poco frecuentes en el otoño - invierno.

### **2.4.1 Origen del Material genético**

La población provino de cruas efectuadas en Montecillo, Edo. de México en 1993, de abejas europeas mejoradas con abejas africanizadas que habían sido sujetas a un proceso de semidomesticación (Guzmán-Novoa, 1996; Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001; Utrera, 2011). Las abejas africanizadas semidomesticadas procedieron de una población en proceso de mejoramiento genético en Cárdenas, Tab. La población de abejas africanizadas se formó con enjambres recolectados en Tabasco, Campeche y Veracruz en 1988. Esta población de enjambres fue seleccionada durante cuatro generaciones, una por año, para los caracteres: mansedumbre, sedentarismo y productividad apícola mediante la cría artificial de reinas y fecundación natural.

La población de abejas europeas también mejoradas, se integró de la siguiente forma: 1) En 1978 se introdujeron reinas europeas fecundadas provenientes de 10 localidades de México al apiario en Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx., para criar reinas hijas; 2) la progenie resultantes se fecundó en apareamiento natural para obtener la primera generación recombinante; 3) después de dos generaciones de recombinación, la población se seleccionó durante 13 generaciones (una por año) hacía características asociadas con la productividad de miel, la sanidad y la uniformidad de postura, realizando cría artificial de reinas y con apareamiento natural; posteriormente el apiario se trasladó de Chapingo a Montecillo, Edo. de Méx.

En 1993 se tomaron 20 reinas africanizadas semidomesticadas de Cárdenas, Tab. que se introdujeron al apiario de Montecillo, integrado con colonias de abejas europeas mejoradas. De las reinas africanizadas introducidas se seleccionaron seis cuyas colonias presentaron los mejores atributos apícolas, tales como: mansedumbre, calidad de postura, desarrollo en su población y productividad de miel. De estas reinas se obtuvieron reinas hijas por cría artificial, las cuales se fecundaron en forma natural con zánganos europeos que predominaban en el tiempo referido. Las cruces entre reinas vírgenes africanizadas con zánganos africanizados se evitaron colocando trampas en la piquera de cada colmena y destruyendo pupas de zánganos. La población resultante se mantuvo bajo selección durante tres ciclos para docilidad, calidad de postura y producción de miel. Este proceso de selección se mantuvo de manera permanente por las generaciones correspondientes a una por año hasta el inicio de este estudio.

## **2.4.2 Análisis molecular**

### **2.4.2.1 Extracción de ADN.**

El apiario está integrado por más de 100 colmenas tipo Jumbo de 10 bastidores en cámara de cría; se eligieron 19 colmenas al azar para su valoración molecular. Se colectaron al menos 30 obreras de cada una de las 19 colonias, que se depositaron en frascos de plástico para ser conservados bajo refrigeración a -

20°C hasta su uso. El ADN total se extrajo del cuerpo completo de cada abeja obrera (cinco individuos por colmena) con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). El análisis del ADN<sub>mt</sub> se llevó a cabo mediante la ampliación de una cadena por reacción de la polimerasa (PCR) de la región intergénica *COI-COII* y el *gen ND5*, según protocolo descrito por Garnery *et al.* (1992). Los iniciadores utilizados para *COI-COII* fueron: E2 forwards (5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3') y H2 reverse (5'-CAATATCATTGATGACC-3') que amplifica un fragmento de 530 a 1,230bp (pares de bases, por sus siglas en inglés) (Magnus *et al.*, 2014); para *ND5* los iniciadores fueron: *ND5* forward (5'- CGAAATGAATAGGATACAG -3') y *ND5* reverse (5'-TTAGGATTTGGTAGAGTTGG -3') que amplifica un fragmento de aproximadamente 822 bp (Bouga *et al.*, 2005; Özdil y İlhan, 2012). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 15 µL, integrado por: 7.86 µL de HPLC, 3 µL de buffer, 0.6 µL de dNTPs, 0.18 de cada iniciador, 3 µL de ADN genómico y 0.18 µL de Taq polimerasa (Promega, USA). Las condiciones de amplificación de PCR de *COI-COII* fueron: desnaturalización a 94°C por 4 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, y 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 6 min; y para *ND5*: una desnaturalización a 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 45 s, alineamiento a 46°C por un min, y una extensión a 72°C por 5 min. La amplificación de los genes se verificó en geles de agarosa al 1.5 % con 1x TAE buffer. El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT Affymetrix®. La secuenciación se realizó en ambas direcciones con el secuenciador Genetic Analyzer modelo 3230® (Applied Biosystem®, USA).

#### **2.4.2.2 Datos y análisis filogenético.**

El ensamble de secuencias se obtuvo mediante la aplicación del programa de cómputo BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999) y alineadas con el procedimiento Profile Mode Muscle (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el programa Mega7 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias consenso fueron comparadas con las depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), mediante la opción BLASTN 2.2.19

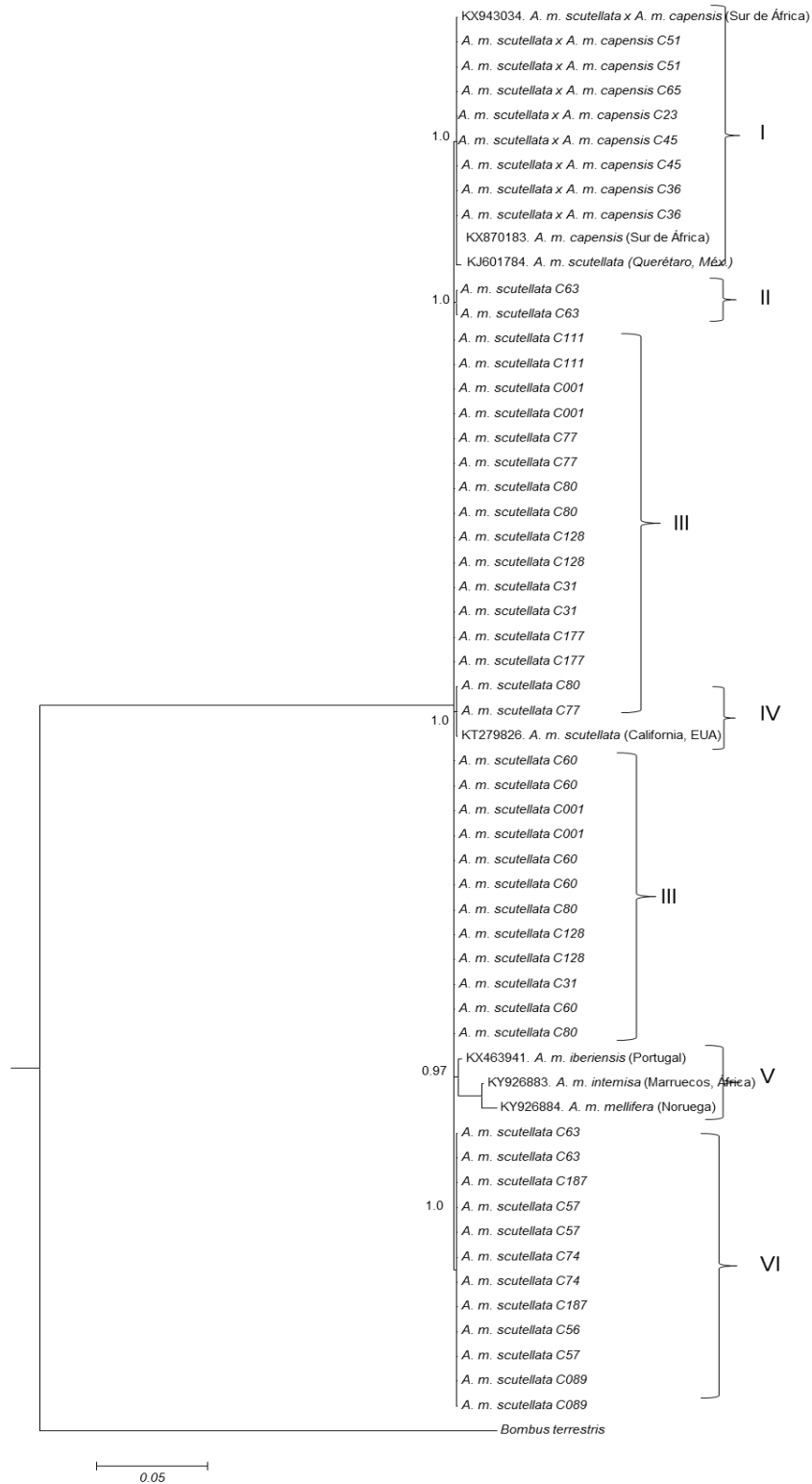
(Zhang *et al.*, 2000). Se obtuvieron un total de 95 secuencias de las cuales 50 se utilizaron para el análisis Bayesiano.

La región intergénica *COI-COII* y el gen *ND5* se concatenaron para realizar el análisis filogenético Bayesiano utilizando el software MrBayes v.3.2.0. (Ronquist y Huelsenbeck, 2003); el número de generaciones de cadenas de Markov de Montecarlo (MCMC) fue de  $3 \times 10^6$  con un muestreo cada 1000 generaciones, y una desviación estándar final de 0.009608. El árbol filogenético se construyó a partir de la con la secuencia de *B. terrestris* como grupo externo, tomada de la base de datos de secuencias depositadas en el Genbank (número de accesión DQ870926.1), y como testigos se utilizaron secuencias de genomas mitocondriales de miembros de los linajes *A* (africano) y *M* (europeo): KJ601784 *A. m. scutellata* (*A*), KX870183 *A. m. capensis* (*A*), KX943034 *A. m. scutellata x capensis* (*A*), KT279826 *A. m. scutellata* (*A*), KY926883 *A. m. intermisa* (*A*), KX463941 *A. m. iberiensis* (*M*) y KY926884 *A. m. mellifera* (*M*).

## 2.5 RESULTADOS

De acuerdo con los antecedentes, el apiario experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo está conformado por una población denominada *euroafricana* por Pérez-Sato y Cervantes-Santana (2001); el término viene de considerar que se dirigió la recombinación genética de reinas de origen africanizado, que provenían de un proceso de selección durante cuatro generaciones, en Tabasco, para los atributos: menor agresividad, menor tendencia a enjambrar y otros criterios deseables en apicultura, como productividad y uniformidad de postura, fecundadas por zánganos de una población de abejas de origen europeo –que también habían estado bajo selección por alrededor de 15 años para sanidad, uniformidad de postura y productividad de miel– (Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001); a diferencia de las que se señalan en la literatura como africanizadas o africanas por otros autores (Schneider *et al.*, 2004), que son el resultado de la invasión de apiarios por enjambres africanizados. Es decir, Pérez-Sato y Cervantes-Santana (2001) llamaron a la población *euroafricana*, porque fue el resultado de la recombinación genética dirigida de reinas africanizadas semidomesticadas con zánganos europeos, ambos, reinas y zánganos procedentes de poblaciones en proceso de mejoramiento genético (Utrera, 1998).

La longitud de las secuencias concatenadas de la región intergénica *COI-COII* y el gen *ND5* varió de 993 a 1235 pb derivado de inserciones y deleciones en los fragmentos analizados (Cuadro 2). El análisis concatenado dio un dendrograma que permitió separar las colmenas en estudio, en base a las secuencias analizadas, y tomando como grupo externo a la secuencia del abejorro (*B. terrestris*) dando una topología de seis subclados (Figura 1), en cinco subclados (I, II, III, IV, VI) se agrupan las 19 colmenas analizadas y separa un subclado (V) conformado por tres testigos *A. m. iberiensis* (M), *A. m. intermisa* (A), *A. m. mellifera* (M).



**Figura 2.1.** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 19 colmenas del apiario experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El dendrograma fue construido usando secuencias concatenadas de *ND5* y *COI-COII*, la desviación estándar final fue de 0.009608



**Cuadro 2.2.** Diferencia en polimorfismo en secuencias concatenadas de la región intergénica *COI-COII* y el gen *ND5* de 19 colmenas del apiario experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Sub-clado	No. Secuencias	Longitud de secuencias (pb)	Cantidad de sitios conservados/ %	Cantidad de sitios variables/ %	Cantidad de sitios únicos (singletons)/ %	Inserciones/delecciones con respecto a <i>A. m. scutellata</i> KJ601784
I	11	1041	1039/1233 (84.2 %)	2(0.16 %)	2(0.16 %)	Delección 191 pb
II	2	1234	1232/1235 (99.7 %)	3(0.24 %)	3(0.24 %)	Inserción 4 pb
III	26	1234	1232/1234 (99.8 %)	2(0.16 %)	2(0.16 %)	Delección 2 pb
IV	3	1252	1232/1234 (99.8 %)	2(0.16 %)	2(0.16 %)	Inserción 2 pb
VI	12	993	1232/1234 (80.3 %)	2(0.16 %)	2(0.16 %)	Delección 240 pb

**Cuadro 2.3.** Diferencia en polimorfismo en secuencias concatenadas de la región intergénica *COI-COII* y el gen *ND5* de testigos incluidos en el análisis filogenético.

Testigos	Longitud de secuencias (pb)	Cantidad de sitios conservados/ %	Cantidad de sitios variables/ %	Inserciones/delecciones con respecto a <i>A. m. scutellata</i> KJ601784
<i>A. m. capensis</i> KX870183	1042	1038/1233 (84.18 %)	2/1233 (0.16 %)	Delección 191 pb
<i>A. m. mellifera</i> KY926884	1069	1035/1232 (84 %)	33/1232 (2.6 %)	Delección 163 pb

...Continuación.

<i>A. m.</i> <i>iberiensis</i> KX463941	1261	1211/1277 (94.83 %)	4/1277 (0.32 %)	Inserción 44 pb
<i>A. m. intermisa</i> KY926883	1072	1046/1231 (84.97 %)	26/1231 (2.11 %)	Delección 159 pb
<i>A. m.</i> <i>scutellata</i> KT279826	1034	1229/1234 (99.59 %)	2/1234 (0.16 %)	Inserción 2 pb
<i>A. m.</i> <i>scutellata x A.</i> <i>m. hibrido</i> KX943034	1041	1040/1232 (84.4 %)	0	Delección 191 pb

El subclado I agrupa a secuencias de ocho ejemplares, pertenecientes a cinco colmenas (C51, C65, C23, C45 y C36), así como a las secuencias de tres testigos: el híbrido: *A. m. scutellata x A. capensis*, *A. m. capensis* y *A. m. scutellata*; estos testigos están caracterizados como linaje A, de origen africano. Dicho grupo se distingue por presentar una delección de 191 pb con respecto al testigo africano *A. m. scutellata* (KJ601784, africanizada colectada en Querétaro, Méx.) manteniendo el 84.2 % de los sitios conservados y con dos sitios variables. El subclado II, agrupa a dos ejemplares de una colmena, C63, con una inserción de 4 pb con respecto al testigo africanizado anterior. El subclado III, agrupa a 26 ejemplares de nueve colmenas (C001, C31, C60, C77, C80, C111, C117, C128, C177). El grupo tiene una delección de 2 pb y el 99.8 % de los sitios conservados con relación al testigo *A. m. scutellata* (KJ601784, africanizada colectada en Querétaro, Méx.). El subclado IV, agrupa a 2 ejemplares, uno de cada una de dos colmenas (C80 y C77) y al testigo *A. m. scutellata* (KT279826, africanizada colectada en California, EUA). El grupo presenta 99.83 % de sitios conservados en su secuencia y una inserción de 2 pb con relación al testigo *A. m. scutellata*

(KJ601784, africanizada colectada en Querétaro, Méx.), de acuerdo a la base de datos del GenBank.

El subclado V, agrupa a tres testigos: *A. m. iberiensis* (KX463941, europeo, linaje M, colectada en Portugal), *A. m. intermissa* (KY926883, africano, linaje A, colectado en Marruecos) y *A. m. mellifera* (KY926884, europeo, linaje M, colectado en Noruega), que difieren por presentar una inserción de 44 pb, una delección de 159 pb y una delección 163 pb, con respecto al testigo africanizado (KJ601784, africanizada colectada en Querétaro, Méx.); además de las inserciones/delecciones, se detectaron el 0.32, 2.11 y 2.6 % de sitios variables con respecto al testigo africanizado de referencia (Cuadro 3). El subclado VI, agrupa a 12 ejemplares de ocho colmenas (C63, C187, C57, C74, C187, C56, C57, C89) las cuales presentan una delección de 240 pb y dos sitios variables (0.16 %) con relación al testigo *A. m. scutellata* de Querétaro.

El subclado V, agrupó a los dos testigos del linaje europeo M, así como a un testigo africano del linaje A, pero que provino de Marruecos, en el norte de África. Después *B. terrestres*, como testigo fuera de grupo, este subclado se separó de manera relevante al resto de unidades de estudio, con magnitud de 0.3 unidades de tasa de sustitución por sitio, determinadas por las delecciones/inserciones, así como por la mayor diferencia en sitios variables; lo cual permite aseverar que el material de estudio presenta ADN<sub>mt</sub> de origen africano.

La mayor parte del material de estudio (14 de 19 colmenas) formó subclados con testigos africanizados colectados en México y en California; también, en la comparación con la base de datos del GenBank se corroboró la identidad con *A. m. scutellata*. Las cinco colmenas restantes se identificaron como híbridos de *A. m. scutellata* x *A. m. capensis*.

## 2.6 DISCUSIÓN

El haber encontrado estos dos tipos de germoplasma: de *A. m. scutellata* y del híbrido *A. m. scutellata* x *A. m. capensis*, pudiera explicarse por el hecho de que las seis reinas africanizadas con las que se formó la población *euroafricana* (Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001), fue el resultado de la captura de 177 enjambres africanizados (Palos, 1989), de lo que venía migrando desde el escape en Sao Paulo, Brasil, en 1957 (Kerr, 1967; Padilla *et al.*, 1992). Según lo descrito, el germoplasma africanizado fue colectado de enjambres en Tabasco, parte de Campeche y Veracruz entre 1987 y 1989 justo después de la entrada de la abeja *A. m. scutellata* a México (Moffet *et al.*, 1987). El origen geográfico de las abejas que llegaron al Brasil fue: Tabora, Tanzania, y Pretoria y Johannesburgo, Sudáfrica (Nogueira, 1964); *A. m. scutellata* tiene una distribución geográfica en el centro y el oeste de África, mientras que *A. m. capensis* se localiza al sur de Sudáfrica (Beekman *et al.* 2008), por lo que es probable que al menos alguna de las reinas introducidas a Brasil, haya sido variante híbrida de *A. m. scutellata* x *A. m. capensis*, de Sudáfrica.

La población de estudio se formó con reinas vírgenes de origen africanizado (seleccionado por mansedumbre y criterios apícolas), que se cruzaron con zánganos de origen europeo (también seleccionado) (Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001). El propósito de realizar la recombinación genética de esa manera fue el aprovechamiento de atributos apícolas deseables de ambos tipos de abejas (Guzmán-Novoa *et al.*, 1996b; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). De las africanizadas, atributos tales como: alta postura de reinas, tolerancia a enfermedades (entre ellas varroasis), alta producción de polen y propóleo; así mismo, con la selección hacia mansedumbre, sedentarismo y otros criterios de importancia apícola, antes de la recombinación genética, se habían contrarrestado efectos negativos como: alta tendencia a enjambrar, pillaje y alto comportamiento defensivo que implicaba alto costo de manejo de colmenas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011); en la recombinación con zánganos europeos se trató de aprovechar la capacidad productiva de miel, mansedumbre y uniformidad de postura. El resultado ha sido favorable debido a que

el comportamiento defensivo es altamente heredable (Stort 1975; Guzmán-Novoa y Page 1993; Guzmán-Novoa y Page, 1992; Guzmán-Novoa y Page, 1999) y puede ser afectado por efectos de dominancia genética (Degrandi-Hoffman *et al.*, 1998; Guzmán-Novoa y Page 1994b; Guzmán-Novoa *et al.*, 2002; Stort, 1975) y los efectos paternos hacia mansedumbre son más relevantes que los maternos (Degrandi-Hoffman *et al.*, 1998; Guzmán-Novoa *et al.*, 2002).

Es conocido que las abejas africanizadas (*A. m. scutellata*) son más resistentes a varroa (Guzmán-Novoa *et al.*, 1996; De Jong, 1997; Mondragón *et al.*, 2006;) por su conducta higiénica y de acicalamiento, además de la baja fertilidad del ácaro en las celdas de cría de obreras (Guzmán-Novoa *et al.*, 1999; Arechavaleta y Guzmán-Novoa, 2001; Vandame *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2010).

Es conveniente resaltar que, desde su establecimiento como población recombinante de abejas africanizadas con europeas, hasta la fecha el apiario experimental del Colegio de Postgraduados es una de las pocas poblaciones experimentales que muestran tolerancia natural a varroa, y se ha mantenido sin aplicar acaricidas, lo cual puede ser atribuible a la contribución del germoplasma africanizado, y con capacidad productiva de miel sobresaliente como contribución del germoplasma europeo.

## 2.7 CONCLUSIÓN

El análisis de ADN<sub>mt</sub> confirma que el linaje materno del apiario del Colegio de Postgraduados, Montecillo Edo. México corresponde al africano (*A*) como se infería de antecedentes del establecimiento de dicha población. Los resultados indican que el 74 % de las colmenas analizadas corresponden a la subespecie *A. m. scutellata* y el 26 % al híbrido *A. m. scutellata* x *A. m. capensis*.

## 2.8 LITERATURA CITADA

- Arechavaleta M.E., E. R. Guzmán–Novoa. (2001)** Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 32:157-174.
- Beekman M., M. H. Allsopp, T. C. Wossler and B. P. Oldroyd. (2008)** Factors affecting the dynamics of the honeybee (*Apis mellifera*) hybrid zone of South Africa. *Heredity* 100:13-18.
- Bouga M., P. C. Harizanis, G. Kiliyas, S. Alahiotis. (2005)** Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie* 36:335-344.
- Cajero A. S. (1990)** Avances en las Acciones Para el Control de la Abeja Africana en México, Antecedentes. *In: Memorias 3er. Seminario Americano de Apicultura.* Acapulco, Gro. México. p. 1.
- Calderón R. A., J. W. Veen, M. J. Sommeijer, L. A. Sánchez. (2010)** Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.* 50:281-297.
- Cervantes S. T., A. M. Cruz. (1997)** Avances en la domesticación y el mejoramiento de abejas africanas. *In: Memorias XI Seminario Americano de Apicultura.* Acapulco, Guerrero, México. Septiembre. pp: 34-36.
- Clarke K. E., T. E. Rinderer, P. Franck, J. G. Quezada-Euán and B. P. Oldroyd. (2002)** The africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution* 56: 1462-1474.
- De Jong D. (1997)** Mites: Varroa and other parasites of brood. *In: Honey Bee Pests, Predators, and Diseases* (Morse, R.A. and Flottum, K., eds.). 3rd edn. Root Publishing, Medina, OH, pp. 279-327.

- Degrandi-Hoffman G., A. M. Collins, J. H. Martin, J. O. Schmidt, H. G. Spangler. (1998)** Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). J. Insect. Behav. 11:37-45.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle. (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19:11-15.
- Garnery L., J. M. Cornuet, M. Solignac. (1992)** Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Mol. Ecol. 1: 145-154.
- Gary E. N., H. V. Daly, S. Locke, M. Race. (1985)** The Africanized honeybee: Ahead of schedule. Calif. Agric. 39: 4-7.
- Guzmán-Novoa E. (1996)** La apicultura en México y Centro América. *In: Memorias del V Congreso Ibero Latinoamericano Apícola.* Mercedes Uruguay. Mayo-junio. Uruguay. Intendencia Municipal de Soriano Central de Apicultura Cooperativa. pp 14-17.
- Guzmán-Novoa E., A. Corre, L. Espinosa, G. Guzmán-Novoa. (2011)** Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. Veterinaria México 42:149-178.
- Guzmán-Novoa E., A. Sánchez, R. E. Page, T. García. (1996)** Susceptibility of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 27:93-103.
- Guzmán-Novoa E., G. J. Hunt, J. L. Uribe, C. Smith, M. E. Arechavaleta (2002)** Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honey bee defensive behavior: results of colony and individual behavioral assays. Behav. Genet. 32:95-102.
- Guzmán-Novoa E., R. E. Page. (1992)** Breeding Honey Bees in Africanized Areas. *In: R. Hoopingarner, L. Connor, editors. Apiculture for the 21st Century.* Wicwas Press. Cheshire, USA 1999:12-14.



- Guzmán-Novoa E., R. E. Page. (1993)** Backcrossing Africanized honey bee queens to European drones reduces colony defensive behavior. *Ann Entomol Soc Am.* 86:352-355.
- Guzmán-Novoa E., R. E. Page. (1994b)** Genetic dominance and worker interactions affect honey bee colony defense. *Behav. Ecol* 5:91-97.
- Guzmán-Novoa E., R. E. Page. (1999)** Selective breeding of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in Africanized areas. *J Econ Entomol.* 92:521-525.
- Guzmán-Novoa E., R. E. Page Jr. (1994a)** The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Am. Bee J.* 134:101-106.
- Guzman-Novoa E., R. Vandame, M. E. Arechavaleta. (1999)** Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie* 30:173-182.
- Hall T. A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall, G. H., K. Muralidharan. (1989)** Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. *Nature* 339: 211-213.
- Kerr W. E. (1967)** The history of the introduction of African bees to Brazil. *S. Afr. J. Sci.* 39:5-5.
- Magnus M. R., A. D. Tripodi, A. L. Szalanski. (2014)** Mitochondrial DNA Diversity of Honey Bees (*Apis mellifera*) from Unmanaged Colonies and Swarms in the United States. *Biochem. Genet.* 52:245-257.
- Moffett J., D. L. Maki, T. Andere, M. M. Fierro. (1987)** The Africanized bee in Chiapas, Mexico. *Am. Bee J.* 127:517-520.

- Mondragon L., S. J. Martin, R. Vandame. (2006)** Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in a population of Africanized bees. *Apidologie* 37:67-74.
- Nogueira-Neto P. (1964)** The spread of a fierce African bee in Brazil. *Bee World* 45(3): 119-121.
- Özdil F., F. İlhan. (2012)** Genetic divergence of Turkish *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of ND5 mitochondrial segment. *Sociobiology* 59:225-234.
- Padilla A. F., F. P. Puerta, J. M. Flores, M. R. Bustos. (1992)** Bees, apiculture and the new word. *Archivos de Zootecnia*. 41: 563-567.
- Palos D. A. (1989)** Selección de abejas europeas y recolección de una población de abejas africanas en la Chontalpa, Tab. Tesis profesional. UACH, Mex. 92 p.
- Pérez-Sato J. A. y T. Cervantes-Santana. (2001)** Selección para tolerancia a *Varroa jacobsoni* Oud. en una población de abejas euroafricanas. *Agrociencia* 35: 413-421.
- Rahimi A. (2015)** Study of the genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera* Meda Skorikow, 1829) populations using the mtDNA COI-COII intergenic region. *Biologija* 61(2):54-59.
- Rodríguez H.G. (1989)** Programa Nacional Para el Control de la Abeja Africana: Organización y Desarrollo. *In: Memorias Simposio Nacional de Apicultura*. Oaxtepec, Mor. México. pp. 1-3.
- Ronquist F., J. Huelsenbeck. (2003)** MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Ruttner F. (1988)** Biogeography and Taxonomy of honey bees. Springer, Heidelberg. New York, USA. 284 pp.
- S.A.R.H. (1990)** Las Abejas Africanas y su control. Manual No.2 de Orientaciones Técnicas. Edit. P.N.C.A.A. - S.A.R.H. México. pp. 9-26

- Schneider S. S., G. DeGradi-Hoffman, D. R. Smith. (2004)** The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. *Annu Rev Entomol.* 49: 351-376.
- Seeley T. D. (1985)** Honeybee Ecology. Princeton University. Press. Princeton, New Jersey. USA. 214 p.
- Stort A. C. (1975)** Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil. V. Number of stings in the leather ball. *J. Kans. Entomol. Soc.* 48:381-387.
- Stort, A. C. (1974)** Genetic study of the aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brazil 1. Some test to measure aggressiveness. *J Apic Res.* 13(1):33-38.
- Sugden E. A., K. R. Williams. (1991)** October 15: the day the bee arrived. *Glean. Bee Cult.* 119:18-21.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. (2013)** MEGA7 molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Thompson J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson. (1994)** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Utrera Q F. (2011)** Variación morfológica y enzimática en una población de abejas (*Apis mellifera*) en proceso de africanización. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Edo. de México. 60p.
- Utrera Q. F. (1998)** Análisis de la transmisión a la descendencia de la tolerancia a *Varroa Jacobsoni* O., de una población de abejas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Edo. de México. 60 p.
- Valido A., M. C. Rodríguez-Rodríguez, P. Jordano. (2014)** Impacto de la introducción de la abeja doméstica (*Apis mellifera*, Apidae) en el Parque Nacional del Teide (Tenerife, Islas Canarias). *Ecosistemas* 23(3):58-66.

**Vandame R. M. S., M. Colin, L. P. Belzunces. (2002)** Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 33:433-445.

**Winston M. L. (1992)** Killer Bees: The Africanized Honey Bee in the American. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA. 162 p.

**Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller. (2000)** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7:203-214.

## CAPÍTULO III

### CONDUCTA HIGIÉNICA Y NIVELES DE INFESTACIÓN DE *Varroa destructor* EN UNA POBLACIÓN DE ABEJAS EUROAFRICANAS

#### 3.1 RESUMEN

Se evaluaron 25 colmenas de una población experimental de abejas euroafricanas que se ha mantenido bajo selección de reinas bajo los criterios de mansedumbre, productividad de miel, tolerancia a enfermedades sin aplicar acaricidas en los últimos 22 años. El objetivo fue conocer los niveles de infestación de varroa y valorar la conducta de acicalamiento e higiénica de la población *euroafricana* del apiario experimental del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Edo. de Méx. Los niveles de infestación se estimaron con las pruebas caída diaria del ácaro y la de nitrato; del total de ácaros caídos por muerte natural se cuantificó el porcentaje de ácaros mordidos por las abejas para evaluar la conducta de acicalamiento; la conducta higiénica fue evaluada con las pruebas de pinchado y congelado de cría. La amplitud de las mediciones de los porcentajes de infestación fueron: en la prueba de nitrato (PNit), 1.2 a 8 %; caída por muerte natural (Cmnat), 7 a 30 ácaros diarios; acicalamiento, 13 a 61 %; conducta higiénica con prueba de pinchado (Pin), 62 a 99 %; conducta higiénica con prueba de congelado (Con) 38 a 96 %. Si bien la población experimental ha adquirido tolerancia a varroa por su sobrevivencia por más de 22 generaciones, los resultados indican que tal tolerancia no presenta asociación con la conducta de acicalamiento; en igual forma, la variabilidad en los niveles de infestación no son explicados por la conducta higiénica y el acicalamiento. Los resultados indican respuesta favorable del apiario a la presencia de varroa, puesto que el 96% de las colmenas presentaron de alta a moderada conducta higiénica por la prueba de **Pin**, mientras que por la prueba **Con** el 74% de las colmenas presentaron tal comportamiento; por otro lado, la **PNit** indicó que la infestación forética se mantiene en niveles bajos (72% de las colmenas por debajo de 5% y las restantes no rebasan el 8% de infestación).

**Palabras clave:** *Varroa destructor*, euroafricana, infestación, conducta higiénica, conducta de acicalamiento.

## CHAPTER III

### 3.2 ABSTRACT

#### **HYGIENIC BEHAVIOR AND LEVELS OF INFESTATION OF *Varroa destructor* IN AN EURO-AFRICAN BEE POPULATION**

Twenty-five beehives were evaluated from an experimental population of *euroafrican* bees that have been kept under selection of queens under the criteria of less aggressiveness, productivity of honey, tolerance to diseases without any application of acaricide for the last 22 years, since recombination of genetically improved female Africanized bees with genetically improved European drones. The objective of this research was the assessment of levels of *Varroa destructor* infestation, as well as grooming and hygiene behavior of the experimental *euroafrican* population. Infestation levels were determined with nitrate tests and daily fall of death mites; the percentage of bitten mites out of the fallen death mites evaluated the grooming behavior; hygienic behavior was evaluated based on the punctured and frozen breeding tests. Percentages of infestation were: for nitrate test (PNit), 1.2 to 8%; mite fallen due to natural death (Cmnat), 7 to 30 mites per day; grooming, 13 to 61%; hygienic behavior with puncture test (Pin), 62 to 99%; hygienic behavior with freezing test (Con) 38 to 96%. Although the experimental population has gained tolerance to mite through more than 22 generation of selection and coevolution, the results indicate that such tolerance has no association with grooming behavior; neither variability for infestation is explained by the hygienic behavior and grooming. This results show favorable response of the experimental apiary to mite presence, because 96% of the beehives showed high to moderate hygienic performance with the **Pin** test, meanwhile with the **Con** test 75% of the beehives had such performance; on the other hand, with **PNit** test, phoretic infestation was low (72% of the beehives under 5% and the other beehives were under 8%).

**Key words:** *Varroa destructor*, Euro-African bees, infestation, hygienic behavior, grooming behavior.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

La infestación en colmenas de abejas por el ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000) es un problema de la apicultura a nivel mundial, por los daños que causa y por el incremento de los costos por los tratamientos contra el ácaro (Boecking y Generch, 2008). *Varroa* o *V. destructor* se encuentra estrechamente vinculada a su hospedero *Apis mellifera* porque carece de una etapa de vida libre. El ciclo de vida de varroa tiene dos etapas: durante la etapa forética permanece sobre la abeja adulta (zángano u obrera) y la reproductiva en la que invade a la celda de cría de obrera o zángano, y en infestaciones muy severas puede infestar celdas de reina (Rosenkranz *et al.*, 2010).

*Varroa* se alimenta de la hemolinfa de abejas, tanto en estado adulto como en abejas en desarrollo (Oldroyd, 1999), provocando: disminución de peso en obreras y zánganos, debido a la pérdida de hemolinfa durante su ontogenia (Schatton-Gadelmayer y Engels 1988; Duay *et al.*, 2003); malformaciones en alas, patas y abdomen en abejas recién emergidas (Boecking y Genersch, 2008); menor capacidad de aprendizaje y desorientación durante el retorno a la colmena (Kralj *et al.*, 2007); además actúa como vector de agentes patógenos tales como hongos, bacterias y virus (Chen y Siede, 2007); Además es considerado como un factor desencadenante del CCD (Colony Collapse Disorders o Síndrome de Despoblamiento de Colmenas) por los altos niveles de infestación que puede alcanzar y debilitamiento que provoca de la colmena (Oldroyd, 2007).

La abeja *A. mellifera*, no es hospedero natural de varroa, pero a principios de este siglo entraron en contacto colonias de abejas europeas exportadas a Asia con colonias silvestres de *Apis cerana* (huésped original) donde se infestaron con este parásito (Oldroyd, 1999). A partir de este hecho, la rápida adaptación a su nuevo hospedero y el movimiento indiscriminado de colonias provenientes de áreas infestadas provocó su dispersión por distintas regiones de Europa, África y Sudamérica, a excepción de Australia, en donde hasta la fecha no se tiene reporte (Rosenkranz *et al.*, 2010). *Varroa* fue introducida a América en 1971, cuando

Paraguay importó de Japón abejas infestadas con este ácaro, provocando dispersión en el Continente. La varroasis en México se detectó por primera vez en el año 1992 en apiarios del Rancho Torreón del Molino, propiedad de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Veracruzana en el estado de Veracruz (Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 1992); al estado de México el ácaro llegó a principios de 1994. Actualmente se encuentra distribuida en todo el país (Espinosa-Montaño y Guzmán-Novoa, 2007).

Varroa no provoca daños graves en *A. cerana*, debido a que mantienen una relación de coevolución por ser su huésped natural (Oldroy, 1999). Se describen tres factores que controlan el crecimiento de la población de varroa en esta especie: i) su reproducción se limita a la parasitación de crías de zánganos (Boot *et al.*, 1999), ii) la conducta de acicalamiento o “grooming” y conducta higiénica (Peng *et al.*, 1987a, b; Rath, 1999), iii) sepultar o “entombing” de crías de zánganos, refiriéndose al cierre y refuerzo del operculado de celdilla para evitar que emerja el adulto infestado, provocando su muerte junto con el ácaro (Rath, 1992).

Por el contrario, la interacción entre varroa y *A. mellifera* no se encuentra en equilibrio. En esta especie de abeja, el ácaro tiene la capacidad de reproducirse con éxito tanto en celdas de cría de zánganos como de obreras (Boot *et al.*, 1999) y no existe el comportamiento de sepultar a zánganos (Fries *et al.*, 1996). Así, en las abejas melíferas occidentales pueden llegar a causar la muerte de la colonia en poco tiempo, a menos que se aplique acaricida.

La sobrevivencia de poblaciones de *A. mellifera* a varroasis puede ser explicada, entre otras razones, por su tolerancia al ácaro. La tolerancia hacia varroa se define como la capacidad de una colonia de abejas melíferas de coexistir con el ácaro sin necesidad de aplicar acaricidas (Rosenkranz, 1999). La abeja *A. mellifera* al igual que en *A. cerana*, presenta dos mecanismos de resistencia: conducta higiénica y acicalamiento, que le permiten tolerar a varroa en la colonia, pero con menor eficiencia que en su huésped natural (Fries *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1987b).



La primera componente de tolerancia se refiere a la conducta higiénica (CH), que es la habilidad que poseen las abejas obreras, para detectar, desopercular y remover de sus celdas a crías parasitadas o muertas, interrumpiendo la multiplicación, maduración o dispersión del patógeno en la colmena (Boecking y Spivak, 1999).

La segunda componente, presente en abejas adultas, y es conocida como acicalamiento. Flores *et al.* (1998) lo describen como la capacidad de las abejas de detectar, morder y eliminar a varroa en etapa forética. Este comportamiento puede ser sobre sí misma (autogrooming) cepillando su cuerpo con sus extremidades, o puede ser sobre otras abejas (allogrooming) en el cuál una o más abejas buscan al ácaro en la abeja infestada, tomándolo con sus mandíbulas y arrojándolos al piso.

Las abejas africanizadas (*A. m. scutellata*) son más tolerantes a varroa que las abejas europeas (Mondragón *et al.*, 2006) porque expresan con más eficiencia la conducta higiénica y de acicalamiento (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). Moretto *et al.* (1993) observaron que las abejas africanizadas consiguen desprender a los ácaros más rápido que las abejas italianas (*A. m. ligústica*) por medio del acicalamiento. Por otro lado, Aumeier (2001) comparó esta misma conducta en la abeja europea (*A. m. cárnica*) y encontró que las abejas africanizadas manifiestan con mayor frecuencia comportamientos de acicalamiento. Por otro lado, Contreras *et al.* (2016) no encontraron diferencias en el comportamiento higiénico y conducta de acicalamiento entre ambos grupos de abejas.

Para combatir la varroasis se emplean diversos métodos como control biológico, productos químicos y sustancias orgánicas. Una alternativa de control biológico, consiste en utilizar bastidores con cría de zánganos como trampa para evitar el crecimiento de la población de ácaro (Calderone y Kuenen, 2003) sin embargo, si no se monitorea correctamente este método puede convertirse en un propagador más en la colonia (Froylán *et al.*, 2011).

En el control químico se emplean plaguicidas como: Apistan® (fluvalinato), Bayvarol® (flumetrina), Apivar® y Colmesa® (amitraz) y CheckMite® (coumafós);

sin embargo, tienen la desventaja de dejar residuos químicos en productos derivados de la colmena, llegando a ser tóxicos tanto para las colmenas como para las personas (Vandame, 2000). Además, el manejo inadecuado de estos productos, ha traído como consecuencia que el ácaro se vuelva resistente a los acaricidas en diferentes países (Vandame, 2000; Rodríguez *et al.*, 2007). En México, Rodríguez-Dehaibes *et al.* (2005) observaron la generación de resistencia a flumetrina y amitraz en una población de varroa ubicada en un apiario en la Universidad Veracruzana en Veracruz, México.

Actualmente se utilizan productos alternativos en el control de varroa, como son sustancias orgánicas (ácido fórmico, oxálico, láctico) y aceites esenciales (timol, alcanfor y eucalipto). Estos productos son de fácil aplicación, y por ser de origen natural, tienen bajo riesgo de contaminación en los derivados de colmena y los ácaros no desarrollan resistencia a estos (Imdorf *et al.*, 2003). Sin embargo, la eficiencia de tales sustancias varía de acuerdo con las condiciones climáticas de cada región (Baggio *et al.*, 2004).

Para evitar que se desarrolle resistencia en las poblaciones del ácaro se recomienda combinar o hacer una rotación de los productos químicos con tratamientos alternativos (Froylán *et al.*, 2011).

Debido a inconvenientes en métodos de control químico y dificultades para sostener un manejo integral, se plantea conducir programas de mejoramiento genético seleccionando hacia expresión deseable de conducta higiénica (capacidad de eliminación de cría infestada) y de acicalamiento (detectar, morder y eliminar varroa de su cuerpo o de otra abeja), que permitan generar abejas tolerantes a varroa (Arachaveleta-Velasco y Guzmán-Novoa; 2001; Harris, 2007). Este tipo de proyectos ofrecería una solución a largo plazo, disminuyendo la incidencia de varroa en las colonias y evitando el uso de acaricidas (Andere *et al.*, 2001).

Existen ejemplos de poblaciones de abejas en diferentes partes del mundo que han sobrevivido de manera natural al ácaro varroa.

En la isla de Gotland, Suecia, se estableció una población de abejas infestadas artificialmente por *V. destructor* que ha sobrevivido por más de siete años sin tratamiento contra el ácaro (Fries *et al.* 2003). Fries y Bommarco (2007) compararon el crecimiento de la población de varroa en la colonia de abejas sin tratar durante siete años con colonias tratadas contra varroasis. Observaron una reducción del 82 % del crecimiento de la población de varroa en las abejas que no fueron tratadas, lo que sugiere una respuesta adaptativa a la presión de los ácaros en dicha población.

Le Conte *et al.* (2007) reportan colonias de abejas en Aviñón y Le Mans, Francia, que durante la década de 1990 no fueron tratadas contra varroa durante al menos tres años. Al compararlas la mortalidad de la población de Aviñón con colonias cercanas tratadas para varroasis, no se observó diferencia significativa entre ambas poblaciones. Meixner *et al.* (2015) sugieren un efecto ambiental en la resistencia de esta población.

En Arnot, en la reserva del sur de Ithaca, Nueva York, EE. UU, se reporta una población que muestra supervivencia continua durante 15 años después de la llegada de varroa a la región (Seeley, 2007).

En EE. UU, se estableció un programa de reproducción de abejas resistentes a varroa proveniente de poblaciones resistentes de Rusia. Actualmente las reinas están disponibles con fines comerciales (Rinderer *et al.* 2010).

Buenos Aires, en el INTA existe un programa de investigación, dirigida a la selección de colonias tolerantes, con base en su origen geográfico con distintas poblaciones de *A. mellifera* (Giacobino *et al.*, 2011).

En el Colegio de Postgraduados, Estado de México a través de un programa de mejoramiento genético se obtuvieron abejas euroafricanas producto de cruce de reinas vírgenes africanizadas en proceso de domesticación con zánganos europeos mejoradas (Utrera, 1998). Esta población se mantiene en selección continua bajo los criterios de mansedumbre, productividad de miel y tolerancia a enfermedades,

incorporando el criterio de tolerancia a varroa desde 1994 (año en el que se reporta la presencia de varroa en el Estado de México). Se ha mantenido sin aplicar acaricidas en los últimos 22 años. En dicha población Utrera (1998) evaluó niveles de infestación de varroa y heredabilidad de tolerancia realizando prueba de nitrato de amonio y caída diaria, encontrando que por selección es posible reducir el nivel de infestación de varroa. En el 2015, Pérez (2015) estimó la heredabilidad de los porcentajes de infestación y conducta higiénica (evaluada por primera vez) con su posible efecto en la producción de miel en esta población, sus resultados sugieren que existe una coevolución entre el huésped y el ácaro, en la población evaluada.

Con base en los antecedentes señalados, el presente trabajo tuvo como objetivo conocer los porcentajes de infestación a varroa, con dos pruebas diferentes y su relación con la conducta de limpieza, en una muestra de colmenas de la población euroafricana de abejas que han estado sin tratamiento durante 22 años.

### 3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los meses de marzo a julio del 2015 en el apiario experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Texcoco, Estado de México, con coordenadas geográficas GPS: Longitud: 98°54'17.53"O, Latitud (dec): 19°27'50.01"N y altitud de 2,250 metros sobre el nivel del mar (msnm); el clima en Texcoco es templado, semiseco, con una temperatura media anual de 15.9°C, con heladas poco frecuentes.

El apiario del Colegio cuenta con una población integrada por más de 100 colmena de abejas recombinadas entre abejas europeas (*A. m. mellifera*) y abejas africanas (*A. m. scutellata*) de las cuales se eligieron 25 colmenas al azar.

#### 3.4.1 Origen del material genético

El material genético corresponde a una población de abejas euroafricanas, producto de la recombinación genética de abejas reinas africanizadas semidomesticadas en el Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, con zánganos europeos mejorados en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo (Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001).

El germoplasma europeo establecido en el apiario Campus Montecillo tuvo su origen en 1978, cuando se obtuvieron reinas europeas colectadas de 10 diferentes localidades de México, a partir de las cuales se criaron reinas que se aparearon de manera natural con zánganos de la misma población dando lugar a la primera generación recombinante ( $G_1$ ); después de dos años de recombinación aleatoria, la población se sometió a un proceso de selección (una generación por año) aplicando criterios de selección asociados a enfermedades; ésta se mantuvo mediante la cría artificial de reinas y fecundación natural en Montecillo, Estado de México (Pérez-Sato y Cervantes-Santana 2001).

El germoplasma africano, se conjuntó en 1988 de la captura de enjambres africanizados silvestres, de reciente ingreso a México, en el estado de Tabasco y parte de Campeche y Veracruz (Palos, 1989). La población se mantuvo bajo

mejoramiento genético, seleccionando los caracteres de docilidad, sedentarismo y productividad, en la localidad de Cárdenas, Tab. Ésta fue mantenida mediante cría artificial de reinas y apareamiento natural durante cuatro generaciones; una generación en cada año.

La recombinación de ambas fuentes de germoplasma se llevó acabo en el apiario de Montecillo, Estado de Méx., en 1993 y se realizó, como a continuación se indica. Se seleccionaron 20 reinas africanas semidomesticadas fecundadas en Cárdenas, Tab., que se llevaron al apiario de Montecillo, éste compuesto por abejas europeas mejoradas. De las reinas africanas introducidas se seleccionaron seis que mostraron un buen desarrollo en su población, mansedumbre y buena calidad en la postura; de estas colmenas se criaron reinas hijas de manera artificial, las cuales se fecundaron por zánganos europeos predominantes. Para evitar la cruce entre reinas vírgenes africanas con zánganos africanos se destruyeron sus pupas y se colocaron trampas para evitar la salida de los que llegaron a adulto. La población resultante se mantuvo bajo selección durante tres ciclos, para docilidad, sedentarismo, buena postura, sanidad, caracteres de buen manejo apícola y productividad de miel. A la población que resultó de la recombinación genética durante los tres ciclos de selección se le llamó *euroafricana*, diferente a africanizada, término utilizado por otros autores.

En el año 1994 se reportó la presencia de varroa en el Estado de México (Espinosa-Montaño y Guzmán-Novoa, 2007) y en 1995 se incorporó al programa de mejoramiento genético el criterio de sanidad para varroa en la población. Utrera en 1998, evaluó niveles de infestación y heredabilidad de tolerancia a varroa durante dos generaciones con la prueba de nitrato (una por año) en colmenas seleccionadas bajo los criterios de menor infestación al ácaro, uniformidad de postura y menor agresividad. En 2015 Pérez (2015) estimó la heredabilidad de los porcentajes de infestación y evaluó por primera vez la conducta higiénica con su posible efecto en la producción de miel.

Hasta la fecha la población se mantiene mediante la cría artificial de abejas de reinas, de las colmenas en las que se observa menor porcentaje de infestación evaluadas con pruebas de nitrato, prueba de caída. La población de abejas mencionada, no ha recibido tratamiento de ningún tipo contra el ácaro varroa.

### **3.4.2 Prueba de infestación de varroa**

#### **3.4.2.1 Prueba de nitrato de amonio**

La evaluación del grado de infestación en cada colmena se realizó utilizando la prueba de nitrato, con la cual se valoran los porcentajes de infestación de ácaros foréticos (Pérez-Sato y Cervantes-Santana, 2001), en los meses de marzo a julio, haciendo cinco repeticiones. Se utilizó nitrato de amonio (fosfonitrato) de marca comercial Omagro® que ejerce un efecto de anestesia en las abejas.

En un recipiente de plástico con tapa con un diámetro de 16.5 cm en el que el fondo fue sustituido por malla metálica, que funciona como criba para permitir pasar los ácaros, pero no las abejas. Se tomaba un bastidor del centro de la cámara de cría, se agitaba sobre el recipiente de manera que cayeran de 300 a 500 abejas dentro de él, y se tapaba. Se agregaban a un ahumador encendido 10 g de nitrato de amonio, se esperaban aproximadamente 5 segundos para que el nitrato comenzara a hacer combustión y entonces el humo producto de esta combustión se aplicaba sobre las abejas a través de la malla metálica, aplicando una pequeña agitación para que la distribución del humo fuera uniforme.

Cuando las abejas estaban anestesiadas, se agitaba el recipiente sobre una charola de aluminio de 34 por 50 cm para que en ella cayeran los ácaros. En otra charola de las mismas dimensiones, se depositaban las abejas para su conteo, tratando de hacerlo de manera rápida para evitar que las abejas y los ácaros reaccionaran.

Se determinó el porcentaje de infestación de ácaros en la colmena mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de infestación} = \frac{\text{Número de ácaros totales}}{\text{Número de abejas totales}} (100)$$

Los porcentajes fueron comparados con los parámetros establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-056-ZOO-1995). Las colonias que presentaron menos del 5 % de infestación forética se les consideró dentro del rango de ligera infestación, aquellas con un porcentaje mayor o igual al 5 % pero menor al 10%, corresponden al rango medio de infestación, mayor o igual al 10 % son consideradas como una alta infestación.

#### **3.4.2.2 Prueba de caída diaria**

Esta prueba se realizó utilizando la metodología propuesta por Calatayud y Verdu (1995) que consiste en contar el número de ácaros que caen en una charola durante 24 horas. Se utilizó una charola de acero inoxidable de 34 cm de ancho por 50 cm de largo en la que se impregnaba vaselina neutra y se cubría con un marco de madera del mismo tamaño de la charola; sobre este marco se colocaba una malla de ocho cuadros por pulgada cuadrada, con la finalidad evitar la remoción de los ácaros por parte de las abejas. La charola con el marco y la malla encima se colocaba en la parte inferior (en el piso de la colmena) durante 24 horas; posteriormente se retiraba y se contaban los ácaros.

La interpretación de la caída diaria de varroa, según lo propuesto por Goodwin y Van Eaton (2001) e Imdorf *et al.* (2003): con caídas naturales de 0 a 10 varroas/día tienen alta sobrevivencia, 11 a 20 media y mayor a 20 baja sobrevivencia.

#### **3.4.3 Evaluación de conducta de acicalamiento**

Para evaluar el acicalamiento a través de las lesiones ocasionadas por las abejas obreras al ácaro, se aprovechó a las varroas recolectadas en la prueba de caída por muerte natural. Las varroas se recolectaron con la ayuda de un pincel y se depositaron en una caja Petri identificada con los datos de la colmena y la fecha de



la recolección. Para detectar a los ácaros que presentaban lesiones se utilizó un microscopio estereoscópico Leica DM750.

$$\text{Acicalamiento} = \frac{\text{Número de varroas lesionadas}}{\text{Total de varroas en muestra}} (100)$$

### **3.4.4 Evaluación de conducta higiénica**

#### **3.4.4.1 Prueba de pinchado de cría**

La técnica de pinchado de la cría descrito por Newton y Ostasiewski (1986) modificada por Gramacho y Gonçaves (2002) es una prueba que permite evaluar la conducta higiénica de la colmena. Consiste en perforar con una aguja de disección 100 celdillas con cría operculada y contar el número de crías removidas a determinado periodo de tiempo. Para esta prueba se realizaron cinco repeticiones en los meses de marzo a junio con intervalos de 7 días.

Se escogió un bastidor central de la cámara de cría y se eligió un área de diez por diez celdillas operculadas (total de 100 celdillas); con ayuda de un alfiler entomológico se puncionó para sacrificar a las pupas en el área elegida. El alfiler se introdujo en el centro de cada celda hasta tocar el fondo para asegurar la muerte de las pupas. Con el propósito de facilitar la identificación de las celdas perforadas se insertaron alfileres en los extremos del área evaluada; el bastidor también era marcado antes de regresarlo a la cámara de cría; después de 6 h se contó el número de celdillas limpiadas por las obreras y se introdujo nuevamente el bastidor a la cámara de cría para realizar un segundo conteo 18 h después, para contar el número de celdillas limpias porque la cría muerta había sido removida a las 24 h. El porcentaje de celdas limpias como indicador del comportamiento higiénico se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de limpieza} = \frac{\text{Número de celdas limpias}}{\text{Número de celdas pinchadas}} (100)$$

#### 3.4.4.2 Prueba de congelado de cría

La evaluación de la conducta de limpieza se realizó con la técnica de congelamiento de Rothenbuhler (1964) que consiste en la introducción de una sección de panal con crías operculadas en un congelador a -18°C por 24 h.

Después de un periodo de cinco días posteriores a la prueba de pinchado, se inició con la prueba de congelado de panal, realizando cinco repeticiones.

De cada colmena se escogió un bastidor central de la cámara de cría, del cual se hizo un corte rectangular de panal que tuviera al menos 100 celdillas operculadas; el bastidor era identificado con un número antes de ser regresado a la cámara de cría. Las secciones de panal se guardaron en una bolsa de polietileno debidamente identificadas, y se trasladaron a un refrigerador tipo nevera marca Lab. Tech (-28°C) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las secciones se reinsertaron en el bastidor correspondiente; después de 6 y 18 h se contó el número de celdillas limpias (sólo considerando celdas totalmente limpias) por la actividad higiénica de las abejas de la colmena.

El porcentaje de celdas limpias como indicador del comportamiento higiénico se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Comportamiento Higiénico} = \frac{\text{Número de celdas limpias}}{\text{Total de celdas operculadas}} (100)$$

La interpretación de comportamiento higiénico se realizó siguiendo la metodología de Spivak (1996). Las colonias cuyas abejas obreras removieron más del 95 % de crías muertas son consideradas altamente higiénicas (AH), aquellas colonias cuyas abejas removieron entre el 75 a 95 % de la cría muerta fueron consideradas moderadamente higiénicas (MH) y las colonias cuyas obreras removieron la cría con una tasa menor al 75 % fueron consideradas levemente higiénicas (LH).

### **3.4.5 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con el programa SAS (Statiscal Analysis System Vers. 9.4) realizando un análisis de varianza y de componentes principales, para valorar la estructura de la correlación y agrupación de las pruebas y colmenas.

### 3.5 RESULTADOS

El análisis de los niveles de infestación mostró diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre colmenas con una variación de 1.2 a 8 % estimada con la prueba de nitrato y con un promedio de 7 a 30 ácaros caídos diariamente durante el periodo de evaluación. Para la conducta de acicalamiento hubo diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre colmenas con una variación del 13 a 61 %. En cuanto al análisis de varianza de la conducta higiénica también hubo diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre las 25 colmenas evaluadas a las 6 y a las 24 h. La amplitud de variación en la remoción de cría muerta para la prueba de pinchado fue de 62-99 % y para la prueba de congelado de panal de 38-96 %.

Los eigenvalores (Cuadro 1) del análisis componentes principales (ACP) muestra que los primeros tres componentes explican el 82 % de la variabilidad total para las siete variables en estudio, donde para el primer componente (CP1) (Cuadro 2) las variables que más explicaron la variación fueron las pruebas de conducta higiénica, pinchado y congelado. Para el segundo componente (CP2) la variable que más explicó fue la prueba de nitrato segunda acicalamiento y caída de muerte natural diaria; para el tercer componente (CP3) la variable de mayor explicación fue la conducta de acicalamiento, el cuarto componente (CP4) depende de la prueba de nitrato.

**Cuadro 3.1.** Eigenvalores del análisis de componentes principales para higiene e infestación de colmenas en respuesta a varroa. Apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, 2015.

Eigenvalores de la matriz de Correlación				
CP1	3.22258905	1.45916927	0.4604	0.4604
CP2	1.76341977	0.99162304	0.2519	0.7123
CP3	0.77179673	0.21521364	0.1103	0.8225
CP4	0.5565831	0.24863064	0.0795	0.9021
CP5	0.30795245	0.05738682	0.044	0.946
CP6	0.25056563	0.12347237	0.0358	0.9818
CP7	0.12709327		0.0182	1

**Cuadro 3.2.** Eigenvectores de los componentes principales para higiene e infestación de colmenas en respuesta a varroa. Apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, 2015.

Eigenvectores				
	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4
<b>P_6</b>	0.84018	-0.06682	-0.29231	0.09777
<b>P_24</b>	0.88608	0.11313	0.12414	0.14995
<b>Co_6</b>	0.74870	0.52680	-0.08332	-0.16033
<b>Co_24</b>	0.81326	0.41112	0.25497	-0.17362
<b>Acic</b>	0.31806	-0.62596	0.68562	0.03966
<b>PN</b>	-0.31699	0.72237	0.21780	0.56562
<b>Cmnat</b>	-0.55496	0.62127	0.28544	-0.38365

Pin6 = Pinchado a 6 h; Pin24 = Pinchado a 24 h; Co6 = Congelado de panal a 6 h; Co24 = Congelado de panal a 24 h; Acic = Conducta de acicalamiento; PNit = Prueba de nitrato; Cmnat= Caída por muerte natural diaria.

En la Figura 1 se observa que con base a la información de los dos primeros componentes principales, las pruebas de conducta higiénica (pinchado y congelado) presentan cierta colinealidad (cuadrante II y III) pero presentan cierto grado de independencia con respecto a las pruebas que valoran el grado de infestación de

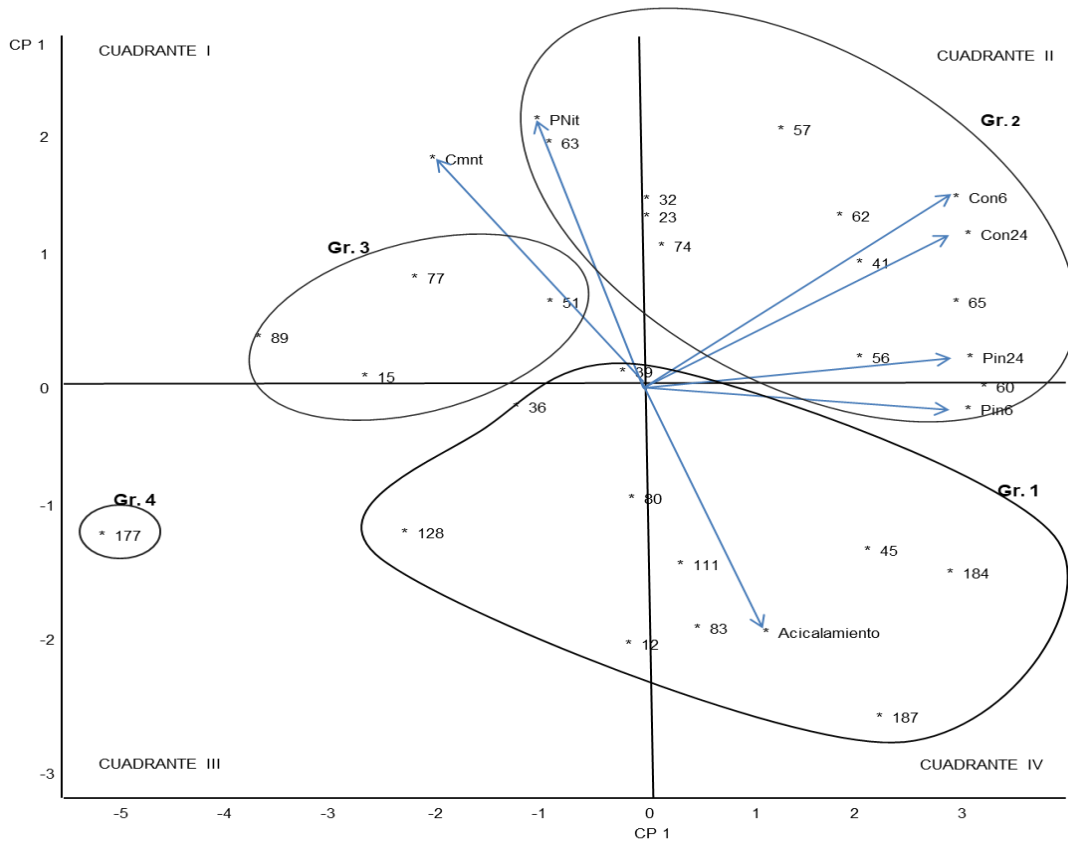
varroa (prueba de nitrato y caída diaria) (cuadrante I). De igual forma las pruebas caída diaria y nitrato presentan colinealidad (cuadrante I). Por el contrario, la conducta de acicalamiento se ubica en el cuadrante IV alejada del resto de las pruebas.

Por otro lado la dispersión de las colmenas sobre el plano dado por los primeros dos componentes principales tiende a formar cuatro grupos (Cuadro 3): El primer grupo se caracteriza principalmente por presentar mejor acicalamiento integrado por 10 colmenas (12, 45, 184, 187, 184, 36, 39, 80, 83, 111, 128); Conducta higiénica por la prueba de pinchado de cría fue media a alta (MH: AH) (89.6 a 97.7 %) mientras que por prueba de congelado de panal fueron de ligera a alta (LH a AH) (52.5 a 96.7 %). En cuanto a los niveles de infestación, las colmenas presentan ligera infestación de 1.2 a 4 %, con excepción de la colmena 128 que tiene rango medio de infestación de 5.9 %. La caída de muerte natural diaria de varroa varió 15.1 a 49.2 de los cuales el 13.5 a 30 % presentaba daño determinado por la conducta de acicalamiento.

El segundo grupo estuvo formado por diez colmenas 23, 32, 57, 62, 63, 74, 41, 56, 65, 60) caracterizado principalmente por mejor conducta higiénica (Pin y Con); de acuerdo a las pruebas, hubo mayor frecuencia de colmenas AH, con una variación de 75.5 a 99.6 %. El grado de infestación fue variado, las colmenas 60, 56, 41, 65 y 57 tienen ligera infestación (2.5 a 4.7 %) mientras que las otras cinco colmenas presentaron mediana infestación (5.6 a 8 %). La caída de muerte natural diaria varió de 13 a 56.4 de los cuales sólo el 7 a 20.3 % mostraba daño provocado por la conducta de acicalamiento.

El grupo 3 estuvo formado por cuatro colmenas (15, 89, 51, 77) caracterizado principalmente por mayor caída diaria de varroa. La conducta higiénica tiende a ser MH (77.1 a 87.1 %) con excepción de la colmena 89 que es LH. Los niveles de infestación son ligeros para las colmenas 15, 89, 51 y medio para la colmena 77. Los valores de caída por muerte natural diaria variaron de 42.6 a 61.2 de los cuales solo 3.7 a 19.3 % mostró daño derivado de la conducta de acicalamiento.

El cuarto grupo estuvo formado por la colmena 177 que tiene los valores más bajos de conducta higiénica. Su nivel de caída diaria fue 45.4 ácaros de los cuales sólo el 13.7 % mostraron daños.



**Figura 3.1.** Estructura de la correlación entre las variables y dispersión de colmenas, en el plano determinado por el CP1 (46 % de la variabilidad total) y CP2 (25 % de la variabilidad total). Cmnt = Caída por muerte natural diaria; PNit=Prueba de nitrato, Co6=Congelado de panal a 6 h, Co24=Congelado de panal a 24 h, Pin6= Pinchado a 6 h, Pin24= Pinchado a 24 h, Acica=Conducta de acicalamiento.

**Cuadro 3.3.** Medias por colmena para conducta higiénica, conducta de acicalamiento e infestación para cada método utilizado separados por agrupamiento. Apiario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, 2015.

Colmena	Conducta Higiénica				Acic (%)	Infestación	
	Pin6 (%)	Pin24 (%)	Con6 (%)	Con24 (%)		Cmnat (caída/día)	PNit (%)
<b>Grupo 1</b>							
12	41.10	91.93	31.97	73.87	28.16	22.0	3.24
45	65.56	97.74	35.82	96.74	22.72	17.4	3.03
184	69.40	95.48	49.22	95.43	26.06	17.4	2.20
187	64.22	97.02	33.88	87.76	30.52	21.4	1.26
36	44.84	92.02	33.40	69.76	13.53	44.8	3.39
39	59.74	95.39	30.00	77.94	13.90	49.2	3.58
80	53.13	94.13	27.17	77.96	17.52	24.6	4.04
83	62.15	92.65	33.74	66.04	17.79	15.4	2.16
111	74.17	89.71	30.56	61.11	15.07	16.6	3.30
128	41.22	89.67	18.29	52.52	19.12	24.0	5.99
<b>Grupo 2</b>							
23	55.00	94.31	49.36	75.53	7.97	32.2	6.03
32	51.25	94.29	45.39	89.24	11.47	43.2	5.65
57	58.09	99.08	59.53	96.28	12.98	56.4	4.79
62	66.22	96.85	55.29	95.54	18.71	32.6	6.83
63	51.82	87.18	44.84	87.71	15.30	50.6	8.00
74	61.45	96.18	31.20	93.04	17.97	45.2	7.05
41	67.99	95.48	57.12	95.87	10.78	32.0	3.74
56	60.19	97.17	54.96	99.33	15.92	31.2	2.72
65	69.90	98.62	60.62	98.09	10.88	13.0	4.09
60	73.59	99.32	57.29	99.60	20.37	31.8	2.57
<b>Grupo 3</b>							
15	36.93	80.03	24.25	78.49	9.64	42.6	3.78
89	37.47	77.17	24.57	64.43	10.89	60.2	4.17
51	55.80	87.14	38.00	81.46	19.34	61.2	4.92
77	31.59	84.41	39.00	79.23	19.36	57.4	5.66
<b>Grupo 4</b>							
177	43.54	62.42	18.90	38.08	13.73	45.4	4.06

**Nota:** \*Pin6: pinchado a 6 h; \*Pin24: pinchado a 24 h; \*Con6: Congelado a 6 h; Con24: Congelado a 24 h; Acic: Conducta de acicalamiento; Cmnat: caída diaria; PNit: prueba de nitrado.



### 3.6 DISCUSIÓN

Sin tratamiento contra varroa, las colmenas normalmente mueren dentro de dos a tres años (Fries *et al.*, 2006). En abejas *A. m. mellifera* de México se han observado tasas de infestación entre 4.7 y 11.5 % en apiarios que reciben tratamiento acaricida por lo menos una vez al año (Aguirre, 2005; Medina-Flores, 2014). Los niveles de infestación en la población experimental de estudio variaron de ligera a media sin llegar a un estado crítico. Es un hecho remarcable que este apiario experimental ha sobrevivido sin ningún tipo de tratamiento contra varroa en los últimos 22 años. De acuerdo a los datos obtenidos por ADN<sub>mt</sub> la población pertenece a un linaje materno africano por lo que le estaría confiriendo resistencia contra el ácaro como lo menciona Stephen Medina (2004) donde se atribuye la supervivencia a la africanización.

Los resultados de este estudio son similares a los encontrados en un apiario experimental en Cuba que no ha recibido tratamiento para varroasis en cuatro años y su nivel de infestación es de 2.1 a 5.5 % (Sanabria *et al.*, 2015). En abejas africanizadas los valores de infestación tienden a ser más bajos. Ejemplo de esto es Brasil, en donde se reportan sus valores de parasitación en abejas adultas africanizadas de 2 a 4 % (Estevão *et al.*, 2014; Brito, 2014). En México, este tipo de abejas presentan niveles de infestación de 3.5 % (Medina-Flores, 2015).

Los porcentajes de conducta higiénica en las colmenas evaluadas fueron variados, siendo ubicados dentro de valores aceptables para ser consideradas de moderadamente a altamente higiénicas. La expresión positiva de conducta higiénica en la población de estudio se le atribuye a tener genes africanos que les hace más tolerante a varroa. La resistencia en abejas africanizadas está bien documentada demostrando que remueven significativamente mayor proporción de ácaros en crías parasitadas y exhibiendo mayor tolerancia (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

La población experimental *euroafricana* por provenir de linaje materno africanizado se espera una correlación positiva entre los niveles de infestación y conducta higiénica. Por el contrario, los resultados no muestran una relación entre

ambas variables. Los niveles de infestación variaron, pero se mantuvieron de ligera a media sin llegar a un estado crítico; sin embargo los datos no mostraron que la conducta higiénica fuera un factor importante en la tolerancia varroa debido a que no contrarrestó los niveles de infestación. Esto concuerda con lo encontrado con Nganso *et al.* (2017), quienes no encontraron asociación entre la tasa de eliminación de cría muerta en celdillas con los niveles de infestación de varroa.

Con respecto a la conducta de acicalamiento fue la primera vez que se evaluó en la población experimental euroafricana y tuvieron porcentajes variados. Con altos valores de caída de varroa diaria registrados se esperaba encontrar un alto número de ácaros dañados como resultado de la conducta de acicalamiento, sin embargo, los resultados no muestran una correlación entre ambas variables. La relación negativa entre los niveles de infestación y los ácaros dañados producto de la conducta de acicalamiento se ha observado en diferentes investigaciones (Arechavaleta -Velasco y Guzmán-Novoa, 2001; Mondragon *et al.*, 2005) la cual no encuentra del todo clara (Lodensani *et al.*, 2002).

Estos resultados sugieren que la conducta de acicalamiento no explica la variabilidad en los niveles de infestación de las colmenas (Nganso *et al.*, 2017). Diversos autores señalan otros factores, como la reproducción de ácaros, que para explicar la variabilidad en los niveles de infestación de ácaros entre colonias (Martin y Medina, 2004; Mondragon *et al.*, 2005; Locke y Fries, 2011). Además, la prueba de la conducta de acicalamiento puede no ser lo suficientemente sensible como para evaluar comportamiento de la eliminación de ácaro por las obreras en una colmena (Corrêa-Marques *et al.*, 2000), es importante considerar que no todos los ácaros eliminados por acicalamiento presentan daños, ya que algunos pueden caer debido a movimientos o perturbaciones por las abejas (Rosenkranz, 1997).

La evaluación a las 6 y 24 h con la prueba de pinchado y congelado de panal permitió monitorear el progreso de la conducta higiénica de las abejas obreras. De acuerdo a los resultados los porcentajes de limpieza a las 6 h fueron menores a los observados por Palacios *et al.* (2005), quienes reportan que a las seis horas

posteriores del pinchado aproximadamente el 70 % de la cría había sido eliminado y a las 24 h el 99 % de cría muerta había sido eliminada en colmenas higiénicas. Por el contrario, se obtuvieron mayores porcentajes a los obtenidos por Gramacho (1999) que registró sólo del 1 al 31.6 % de remoción de cría muerta a las 6 h. De acuerdo a Gramacho (1990), en intervalos de observación más cortos permiten proporcionar mayor capacidad de discriminación del comportamiento higiénico que las evaluaciones realizadas a 24 o 48 h. Si bien la eficiencia de las abejas obreras en desopercular y remover cría muerta a las seis horas no fueron altas, se observa una correlación a la observación realizada a las 24 h, es decir, si las colmenas tienen un porcentaje de limpieza de 90 %, cerca del 45 % fue removido a en las primeras seis horas.

### 3.7 CONCLUSIONES

Si bien la población experimental ha adquirido tolerancia a varroa por su sobrevivencia por más de 22 años. Los resultados indican que tal tolerancia no tiene asociación con la conducta acicalamiento; en igual forma, la variabilidad de los niveles de infestación no es explicada por los mecanismos de resistencia de conducta higiénica y acicalamiento.

La población de abejas experimentales mostró una correlación en la remoción de cría muertas a las 6 y 24 horas lo que indica una eficiencia en la conducta higiénica de la población euroafricana.

La población *euroafricana* muestra alta proporción de colmenas con moderado a alto comportamiento higiénico, por las pruebas de pinchado y de congelamiento del panal. Además, alta proporción de las colmenas presenta niveles bajos de infestación forética.

### 3.8 LITERATURA CITADA

**Aguirre J. L. (2005)** La varroosis en colmenas de Baja California Sur. El agente etiológico y opciones para su control. Tesis Doctorado en Ciencias Veterinaria. Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), México - Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Cuba. 118 p.

**Andere C., M. A. Palacio, P. Delgado, E. Figini, E. M. Rodriguez, M. Colombani, E. Bedascarrasbure. (2001)** Relationship between defensive and hygienic behavior in a honeybee (*Apis mellifera* L) population. [En línea]: Proceedings of the 37th International Apicultural Congress, 28 October - 1 November, Durban, South Africa. Documento obtenido de internet. [fecha de consulta: 25 de mayo 2006]. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/alter/apic/apismell.pdf>

**Anderson D. L., W. J. Trueman. (2000)** *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp. Appl. Acarol. 24: 165-189.

**Arechavaleta V. M. E., E. Guzman-Novoa. (2001)** Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 32 (2): 157–174.

**Arechavaleta-Velasco M. E., E. Guzmán-Novoa. (2001)** Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 32:157-174.

**Aumeier P. (2001)** Bioassay for grooming effectiveness toward *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. Apidologie. 32:81-90.

**Baggio A., P. Arculeo, A. Nanetti, E. Marineli, F. Mutinelli. (2004)** Field trials with different thymol-based products for the control of varroosis. Am Bee J. 144:395-400.

- Boecking O., E. Genersch. (2008)** Varroosis the ongoing crisis in bee keeping. J.Consum. Protect. Food Safety 3(2): 221-228.
- Boecking O., M. Spivak. (1999)** Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud., Apidologie. 30:141-15.
- Boot J. B., J. N. Calis, J. Beetsma, D. M. Hai, N. K. Lan, T. V. Toan, L. Q. Trung, N. H. Minh. (1999)** Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. Exp. Appl. Acarol. 23(2):133-144.
- Brito R. L. (2014)** Sistema de Informação Geográfica aplicado ao diagnóstico do ácaro *Varroa destructor* em apiários na região nordeste do Brasil. Dissertação apresentada ao Programa do PósGraduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos. Área de concentração: Saúde Animal. Salvador-Bahia. Fevereiro. p. 63.
- Calatayud F., M. Verdu (1995)** Cómputo de ácaros en los detritus de la colmena. Vida Apícola 69:41-45.
- Calderone N. W., L. P. S. Kuenen (2003)** Differential tending of worker and drone larvae of the honeybee, *Apis mellifera*, during the 60 hour prior to cell capping. Apidologie. 34:543-552.
- Chen Y. P., R. Siede. (2007)** Honey bee viruses. Adv. Virus Res. 70:33-80.
- Contreras R. D. N., M. I. Pérez L., E. Payró C., G. Rodríguez O., E. Castañeda H., R. M. Gómez U. (2016)** Comportamiento defensivo, sanitario y producción de ecotipos de *Apis mellifera* L. en Tabasco, México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 7(8):1867-1877.

- Corrêa-Marques M. H., Issa M. R. C., De Jong D. (2000)** Classification and quantification of damaged *Varroa jacobsoni* found in the debris of honeybee colonies as criteria for selection? Am. Bee J. 140: 820-824.
- Duay P., D. De Jong, W. Engels. (2003)** Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiplies infested by *Varroa destructor* mites. Apidologie 34:61–65.
- Espinosa-Montaño L., E. Guzmán-Novoa (2007)** Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México, México. Vet. Méx. 38(1):9-19.
- Estevão F., G. Valadares, R. Strapazzon, G. Moretto G.(2014)** Reproductive ability and level of infestation of the *Varroa destructor* mite in *Apis mellifera* apiaries in Blumenau, State of Santa Catarina, Brazil. Acta Sci. Biol. Sci. 36(1):109.
- Flores J. M., J. A. Ruiz, J.M Ruz, F. Puerta, F. Campono, F. Padilla, M. Bustos. (1998)** El grooming en *Apis mellifera Iberica* frente a *Varroa jacobsoni* Oud. Archivos de Zootecnia (47):213-218.
- Fries I., A. Imdorf, P. Rosenkranz. (2006)** Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. Apidologie 37: 564–570.
- Fries I., H. Wie, W. Huazhen, S. Wei, C. S. Jun. (1996)** Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. Apidologie 34:3-11.
- Fries I., H. Hansen, A. Imdorf, P. Rosenkranz. (2003)** Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. Apidologie 34(4):389-397.

- Fries I., R. Bommarco. (2007)** Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 38(6):525-533.
- Froylán M. J., K. I. Alcalá E., M. Leal H., J. A. Vivas R., E. Martínez A. (2011)** Prevención de varroosis y suplementación. Folleto Técnico No. 6 INIFAP. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, Cuajimalpa, D.F. pp:28.
- Giacobino A., C. Bulacio, J. Merke, E. Orellano, M. L. Signorini, C. Salto. (2011)** Aspectos generales de la biología de *Varroa destructor* (Acari: varroidae) y situación actual de la Varroosis en la provincia de Santa Fe. *FAVE-Ciencias Veterinarias*. 10(1):19-31.
- Goodwin, M. and C Van Eaton. (2001)** Control of varroa, A guide for New Zealand Beekeepers. New Zealand, Ministry of Agriculture and Forestry. (MAF). Wellington, New Zealand.
- Gramacho K., L. Gonçalves. (2002)** Melhoramento Genético de Abelhas com Base no Comportamento Higiénico. XIV Congresso Brasileiro de Apicultura Conbrapi Brasil 2002. pp. 188-190.
- Gramacho K. P. (1999)** Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera*. Ph. D. Thesis, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- Guzmán-Novoa E., A. Correa B., L. G. Espinosa M., G. Guzmán N. (2011)** Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Vet. Méx.* 42(2):149-178.
- Harris W. J. (2007)** Bees with Varroa sensitive hygiene preferentially removed mite infested pupae aged 65 days post capping. *J. Apicult. Res.* 46(3):134-139.



- Imdorf A., J. Charriere, V. Kilchenmann, S. Bogdanov, P. Fluir. (2003)** Alternative strategy in central Europe for the control of *Varroa destructor* in honey bee colonies. *Apiacta*. 38:258-285.
- Imdorf, A. R. Bogdanov R, N. Ibáñez and W. Calderone (1999).** Use of the essential oils for the control of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 30 (2-3):209-228.
- Kralj J., A. Brockman, S. Fuch, J. Tautz. (2007)** The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J Comp Physiol A*. 193(3):363-379.
- Le Conte Y., G. De Vaublanc, D. Crauser, F. Jeanne, J. Rousselle, J. M. Bécard. (2007)** Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie* 38(6):566-572.
- Locke B., I. Fries. (2011)** Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie* 42:533-542.
- Lodensani M., K. Crailsheim, R. F. A. Moritz. (2002)** Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L. colonies and results of a bi-directional selection. *J. Appl. Entomol.* 126:130-137
- Martin S. J., L. M. Medina. (2004)** Africanized honeybees have unique tolerance to *Varroa* mites. *Trends Parasitol.* 20:112-114.
- Medina-Flores C. A., E. Guzmán-Novoa, M. M. Hamiduzzaman, C. F. Aréchiga-Flores, C. M. López. (2014)** Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. *Genet. Mol. Res.*13 (3):7282-7293.
- Meixner M. D., P. Kryger, C. Costa. (2015)** Effects of genotype, environment, and their interactions on honey bee health in Europe. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10: 177-184.

- Mondragon L., M. Spivak, R. Vandame. (2005)** A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie* 36:345-358.
- Mondragón L., S. Martin, R. Vandame. (2006)** Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in population of Africanized bees. *Apidologie*. 37(1):67-74.
- Moretto G., L. S. Goncalves, D. De Jong. (1993)** Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Rev. Brasil. Genet.* 16:71-77.
- Newton D., Ostasiewski N. (1986)** A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.*126:278-281.
- Nganso B. T., A. T. Fombong, A. A. Yusuf, C. W. W. Pirk, C. Stuhl, B. Torto. 2017.** Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees- New damage categories in *Varroa destructor*. *PLoS ONE* 12(6):14.
- Oldroyd B. P. (1999)** Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology and Evolution* 14(8):312-315.
- Oldroyd B. P. (2007)** Whats killing American honey Bees? *Plos. Biol.* 5(6):1195-1199.
- Palacio M. A., J. M. Flores, E. Fignini, S. Ruffinengo, A. Escande, E. Bedascarrasbure, E. Rodríguez, L. S. Gonçalves (2005)** Evaluation of the time of uncapping and removing dead brood from cells by hygienic and non-hygienic honey bees. *Genet. Mol. Res.* 4 (1): 105-114.
- Palos D. A. (1989).** Selección de abejas europeas y recolección de una población de abejas africanas en la Chontalpa, Tab. Tesis Profesional. UACH, Mex. 92 p.

**Peng Y. S. C., Y. Fang, S. Xu, L. Ge, M. E. Nasr. (1987b)** Response of foster Asian honeybee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honeybee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. J. Invertebr. Pathol. 49:259-264.

**Peng Y. S., Y. Fang, S. Xu, L. Ge (1987a)** The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. J. Invertebr. Pathol. 49:54-60.

**Pérez M. N. (2015)** Efecto de la selección en *Apis mellifera* recombinada con abejas africanizada para tolerancia a *Varroa destructor*. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 79 p

**Pérez-Sato J. A. y T. Cervantes-Santana (2001)** Selección para tolerancia a *Varroa jacobsoni* Oud. en una población de abejas euroafricanas. Agrociencia 35: 413-421.

**Rath W. (1992)** The key to Varroa: the drones of *Apis cerana* and their cell cap. Am. Bee J. 132(5):329-331.

**Rath W. (1999)** Coadaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 30(2-3):97-110.

**Rinderer T. E., J. W. Harris, G. J. Hunt, L. De Guzman (2010)** Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. Apidologie 41(3):409-424.

**Rodríguez-Dehaibes S. R., G. Otero-Colina, V. Pardo S., J. A. Villanueva J. (2005)** Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. J. Apic. Res. 44(3):124-125.

**Rodríguez-Dehaibes S., G. Otero-Colina, P. C. Martínez R., J. A. Villanueva J., V. C. Chávez. (2007)** Resistencia de *Varroa destructor* a los plaguicidas usados para su control en las regiones Golfo, Centro Altiplano y Península

de Yucatán, México. Memorias del Primer Congreso Apícola del Estado de México. 3-4 de agosto, Ixtapan de la Sal, Estado de México, México. Gobierno del Estado.

**Rodríguez-Dehaibes, S. R., J. Moro and G. Otero-Colina. (1992)** Varroa found in Mexico. Amer. Bee J. 132(11): 728–729

**Rosenkranz P. (1999)** Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. Apidologie. 30:159-172.

**Rosenkranz P., I. Fries, O. Boecking and M. Stürmer (1997)** Damaged Varroa mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L) colonies with and without hatching brood. Apidologie 28:427-437.

**Rosenkranz P., I. Fries., O. Boecking, M. Stuermer. (1997)** Damaged Varroa mites in the debris of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies with and without hatching brood. Apidologie 28: 427–437.

**Rosenkranz P., P. Aumeier, B. Ziegelmann. (2010)** Biology and control of *Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 103:96-119.

**Rothenbuhler W. C. 1964.** Behavior genetics of the nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. Am. Zoo., 4: 111-123.

**Sanabria J. L., J. Demedio, T. Pérez, I. Peñate, D. Rodríguez, W. Lóriga. (2015)** Índices de infestación por *Varroa destructor* en colmenas sin medidas de control. Rev. Salud Anim. 37( 2):118-124.

**Schatton-Gadelmayer K., W. Engels. (1988)** Blood proteins and body weight of newly-emerged worker honeybees with different levels of parasitization of brood mites. Entomol. Gen. 14:93-101.

**Seeley T. D. (2007)** Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie* 38(1):19–29.

**Spivak M. (1996).** Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*; 27: 245-260.

**Stephen S. J., M. L. Medina. (2004)** Africanized honeybees have unique tolerance to *Varroa* mites. *Trends. Parasitol.* 20(3):112-114.

**Utrera Q. F. (1998)** Análisis de la transmisión a la descendencia de la tolerancia a *Varroa jacobsoni* O. de una población de abejas. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.  
60 p

**Vandame R. (2000)** Control alternativo de *Varroa* en apicultura. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). Chiapas, MX.