

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Optimización de la Población de *Apis mellifera*: Reducción de
Africanización mediante Inseminación Artificial validado por Análisis
Moleculares (DNA barcoding) y Morfométricos en Bee Products S.A.C**

Tesis presentada por el Bachiller:

Farfán Rodríguez, Esteban Matthew

ORCID: 0009-0002-0581-5287

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor (a):

Ing. Barreda del Carpio, Jaime Ernesto

ORCID: 0000-0003-4050-7466

Arequipa - Perú

2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 13 de Octubre del 2024

Dictamen: 012058-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 012058, presentado por:

2019222091 - FARFAN RODRIGUEZ ESTEBAN MATTHEW

Titulado:

**OPTIMIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE APIS MELLIFERA: REDUCCIÓN DE AFRICANIZACIÓN
MEDIANTE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL VALIDADO POR ANÁLISIS MOLECULARES (DNA
BARCODING) Y MORFOMÉTRICOS EN BEE PRODUCTS S.A.C**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29520165 - TORRES VELA FERNANDO ANTERO
DICTAMINADOR**



**00476696 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR
DICTAMINADOR**



**71093620 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO
DICTAMINADOR**



Optimización de la Población de Apis mellifera: Reducción de Africanización mediante Inseminación Artificial validado por Análisis Moleculares (DNA barcoding) y Morfométricos en Bee Products S.A.C

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
2	1library.co Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
5	revistas.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
7	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	<1%

repositorio.undac.edu.pe

Dedicatoria

Quiero dedicarle esta tesis a mi familia, a mi madre Margot, por siempre haberme apoyado y amado incondicionalmente durante toda mi vida. A mi padre Juan Pablo, por sus grandes enseñanzas, de él aprendí a hacer de todo un poco. A mi hermano Juan Kervy por ser esa persona con la cual puedo divertirme, reírme y siempre pasarla bien. A mi enamorada Marian, por ser la persona más extraordinaria y razonable que conozco, gracias por estar siempre a mi lado. Y no menos importante a mi abuelo Fortunado, mi abuela Margarita, mi abuela Nery, mi abuelo Juan, mi tía Joaly, mi tío Erick, mi tía Giuly, mi tía Diana, mi tía Nena, mi tía Paty, mi tío Coco, mi tío Miguel y a todos mis primos por todos los momentos y recuerdos felices que vivimos, gracias por ser siempre buenas personas y ser un ejemplo a seguir. Finalmente agradezco a el ingeniero Victor Valdivia por darme esta extraordinaria oportunidad, a Ursula por ser siempre bondadosa y comprensiva, a Sofía, Verónica, Alexis, por ser los mejores amigos que se puede desear. Gracias a todos.

Agradecimiento

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la culminación de este proyecto. A mi familia, por su amor incondicional y apoyo constante, que ha sido fundamental a lo largo de este viaje. A mi enamorada, Marian, por su apoyo emocional y comprensión, que me han mantenido motivado y centrado.

Mi agradecimiento también va para mi jefe, Víctor, y su familia, por su respaldo y confianza, que han sido una gran fuente de inspiración y apoyo. Finalmente, a mi asesor, Jaime Barreda, por su orientación, comprensión y dedicación.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento.

RESUMEN

En el entorno de la apicultura peruana, se ha identificado y estudiado la contaminación por cruzamientos de la abeja africana, estando ligado a efectos negativos como un mayor comportamiento de enjambrazón (abandono de colmenas), pillaje (robo de alimento y ataque a otras colmenas de abejas) y de agresividad (registrando un mayor número de incidentes graves por picaduras en animales y humanos) creando un riesgo latente en la salud seres humanos y animales de granja y/o domésticos que se encuentren dentro del rango de cría de esta especie de abejas.

El objetivo principal de este trabajo fue reducir el porcentaje de africanización de la abeja (*Apis mellifera*), mediante la inseminación artificial, validada mediante análisis moleculares y morfométricos, por ende, se evaluó la eficacia de este enfoque para conservar características deseables en nuevas generaciones de abejas, considerando aspectos genéticos, morfológicos, comportamentales y de producción. Para ello, se registraron análisis de 5 colmenas, empezando con el comportamiento, que se controló mediante una escala (dócil, nervioso y agresivo) y de la productividad, que se controló con la cantidad de marcos llenados de miel por cada colmena en el alza del segundo piso, ambos análisis fueron registrados mediante registros de manejo que se llevan en el campo, donde se detallan estas características. Además, se realizó análisis morfométricos del ala delantera derecha y del fémur de la pata trasera derecha de la abeja (obrero) debido a que estas características son las más destacables para diferenciar a la abeja africanizada según el método FABIS (*Fast Africanized Bee Identification System*), para poder complementar la identificación de la africanización se realizó análisis moleculares de 8 muestras (obreros), 2 provenientes de la genética abuelas, las cuales son encargadas de brindar los huevos y larvas para la crianza de las futuras reinas y las otras 6 muestras provenientes de la genética padres, encargados de brindar los zánganos para la fecundación de las reinas, el análisis se realizó por el método (*DNA Barcoding*) la técnica empleada para la identificación de la especie a la cual pertenece un espécimen biológico, usando una secuencia corta de ADN (región de 485 pb del gen citocromo b), se comparó con una secuencia de referencia, finalmente se realizó la inseminación artificial de las colmenas elegidas en base a los resultados anteriores, verificando su postura en el fecundador y garantizando la inseminación.

Palabras claves: Africanización, inseminación, análisis, secuenciación, *FABIS*.

ABSTRACT

In the Peruvian beekeeping environment, contamination by crossbreeding of the African bee has been identified and studied, being linked to negative effects such as increased swarming behavior (abandonment of hives), pillage (theft of food and attack on other bee hives) and aggressiveness (registering a greater number of serious stinging incidents in animals and humans) creating a latent health risk to humans and farm and/or domestic animals that are within the breeding range of this species of bees.

The main objective of this work was to reduce the africanization of honey bees (*Apis mellifera*), by the application of artificial insemination, validated by molecular and morphometric analyses, therefore, the efficacy of this approach to conserve desirable characteristics in new generations of bees was evaluated, considering genetic, morphological, behavioral and production aspects. For this purpose, analyses of 5 hives were recorded, starting with behavior, which was controlled by a scale (docile, nervous and aggressive) and productivity, which was controlled by the number of frames filled with honey per hive on the second floor elevation, both analyses were recorded by means of management records kept in the field, where these characteristics are detailed; In addition, morphometric analysis of the right front wing and femur of the right hind leg of the bee (worker) was carried out because these characteristics are the most important to differentiate the africanized bee according to the *FABIS* method (*Fast Africanized Bee Identification System*), in order to complement the identification of africanization, molecular analysis of 8 samples (workers) was carried out, 2 from the grandmother genetics, which are responsible for providing the eggs and larvae for the breeding of future queens and the other 6 samples from the parent genetics, responsible for providing the drones for the fertilization of the queens, the analysis was performed by the method (*DNA Barcoding*) the technique used for the identification of the species to which a biological specimen belongs, using a short DNA sequence (485 bp region of the cytochrome b gene), it was compared with a reference sequence. Finally, the artificial insemination of the hives chosen on the basis of the previous results was carried out, verifying their position in the fertilizer and guaranteeing the insemination.

Key words: Africanization, insemination, analysis, sequencing, *FABIS*.

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	3
1.1 Descripción del problema.....	3
1.2 Justificación	3
1.2.1 Justificación Tecnológica.....	3
1.2.2 Justificación Ambiental.....	4
1.2.3 Justificación Económica.....	4
OBJETIVOS.....	5
HIPÓTESIS	6
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Generalidades	7
2.1.1 Abejas melífera (<i>Apis mellifera</i>)	7
2.1.2 Comportamiento social y organización de la colmena.....	7
2.1.3 Tipos de colmenas y núcleos fecundadores	8
2.1.4 Ciclo de vida de abejas obreras	10
2.1.5 Ciclo de vida y madurez sexual de abejas reina y zánganos	11
2.1.5.1 Aparato reproductor de la abeja reina.....	13
2.1.5.2 Fecundación y ovoposición	13
2.1.5.3 Aparato reproductor de los zánganos	14
2.1.6 Citología Apícola	15
2.1.6.1 Partenogénesis	16
2.1.6.2 Alelos sexuales	16
2.1.6.3 Supervivencia	18
2.1.6.4 Genotipo y Fenotipo	19
2.1.7 Abejas Africanizadas.....	20
2.1.8 Inseminación Artificial.....	21
2.1.9 Análisis morfométrico <i>FABIS</i> (<i>Fast africanized bee identification system</i>)..	22

2.1.10	Antecedentes de análisis molecular en abejas	23
2.1.11	Código de Barras de la Vida (<i>DNA Barcode of Life</i>)	24
CAPITULO II	26
1.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
1.1	Lugar de Ejecución	26
1.2	Materiales	26
1.2.1	Material biológico	26
1.2.2	Reactivos químicos	26
1.2.3	Materiales de laboratorio	27
1.2.4	Aparatos y equipos	27
1.2.5	Software	27
1.2.6	Otros	27
1.3	Métodos	28
1.3.1.	Selección de colmenas.....	28
1.3.2	Evaluación del comportamiento de colmenas	29
1.3.3	Evaluación de la productividad de las colmenas.....	30
1.3.4	Análisis Morfométrico	30
1.3.5.	Análisis molecular (<i>DNA barcoding</i>).....	34
1.3.5.1.	Elección de colmenas.....	34
1.3.5.2.	Recolección y preservación de las muestras	34
1.3.5.3	Obtención del material genético	34
1.3.5.4.	Amplificación por PCR.....	36
1.3.5.5.	Evaluación de calidad y cantidad de ADN	36
1.3.5.6.	Secuenciación	37
1.3.6	Obtención y recolección del esperma de zángano.....	38
1.3.7	Elección e inseminación artificial de la reina.....	38
CAPITULO III	41
1.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
1.1	Temperamento de las colmenas.....	41
1.2	Productividad de las colmenas.....	45
1.3	Análisis Morfológico	52
1.3.1	Colmena N° 6	52
1.3.2	Colmena N° 3	54
1.3.3	Colmena N° 27	56

1.3.4 Colmena N° 4.....	57
1.3.5 Colmena N° 8.....	58
1.4 Análisis Molecular (<i>DNA BARCODING</i>)	61
1.4.1 Evaluación de calidad general de los resultados de secuenciación por SANGER.....	61
1.4.2 Resultados de BLASTn.....	62
1.5 Inseminación Artificial	75
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS.....	90



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Ciclo de vida y desarrollo de las abejas obreras (<i>Apis mellifera</i>).....	11
Tabla 2.	Características de abejas africanizadas y europeas	21
Tabla 3.	Morfotipos de abejas africanizadas y europeas	22
Tabla 4.	Características de la colmena n°4	28
Tabla 5.	Características de la colmena n°8.....	28
Tabla 6.	Características de la colmena n°27	29
Tabla 7.	Características de la colmena n°3	29
Tabla 8.	Características de la colmena n°6.....	29
Tabla 9.	Escala de comportamiento de colmenas de abejas.....	30
Tabla 10.	Escala de productividad de colmenas de abejas.....	30
Tabla 11.	Morfotipos de abejas africanizadas y europeas.....	33
Tabla 12.	Registro de temperamento de colmenas seleccionadas.....	44
Tabla 13.	Registro de temperamento de abejas criollas.....	44
Tabla 14.	Productividad por colmena del estudio	51
Tabla 15.	Productividad de colmenas en diferentes estados de México.....	51
Tabla 16.	Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 6.....	53
Tabla 17.	Determinación de la africanización mediante el método <i>FABIS II</i>	54
Tabla 18.	Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 3.....	55
Tabla 19.	Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 27.....	56
Tabla 20.	Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 4.....	57
Tabla 21.	Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 8.....	59
Tabla 22.	Porcentaje de africanización en municipios de México.....	60
Tabla 23.	Evaluación de calidad general de los resultados de secuenciación por SANGER.....	61
Tabla 24.	Resultados de BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A1.....	63

Tabla 25. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A2.	64
Tabla 26. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A3.1.	65
Tabla 27. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A3.2.	66
Tabla 28. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A4.1.	67
Tabla 29. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A4.2.	68
Tabla 30. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A5.1.	69
Tabla 31. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A5.2.	70
Tabla 32. Secuencias de referencia de subespecies identificadas.	72
Tabla 33. Número y proporción (%) de colonias clasificadas el mitotipo del ADNmt, identificado como africanizado - europeo en las subregiones del estado de Tabasco.....	74
Tabla 34. Estudio comparativo entre reinas apareadas naturalmente y reinas inseminadas artificialmente.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	3 días (huevo).....	12
Figura 2.	3 días (huevo).....	12
Figura 3.	5 1/2 días (larva).....	12
Figura 4.	6 1/2 días (larva).....	12
Figura 5.	7 días (operculado).....	12
Figura 6.	10 días (operculado).....	12
Figura 7.	8 días (pupa).....	12
Figura 8.	14/15 días (pupa).....	12
Figura 9.	15/16 días (emergencia).....	12
Figura 10.	24 días (emergencia).....	12
Figura 11.	21-23(madurez sexual).....	12
Figura 12.	36 días (madurez sexual).....	12
Figura 13.	Aparato reproductor de la abeja reina.	13
Figura 14.	Aparato reproductor de los zánganos.	15
Figura 15.	Partenogénesis en abejas.	16
Figura 16.	Representación de las posibles combinaciones de las crías entre los alelos distintos de una abeja reina y un macho zángano.	17
Figura 17.	Representación de las combinaciones posibles de las crías entre los alelos de una abeja reina con 2 de sus hermanos zánganos.....	18
Figura 18.	Procedimiento para realizar el <i>DNA barcoding</i>	25
Figura 19.	Ubicación geográfica del laboratorio de inseminación artificial CGIA.....	26
Figura 20.	Frasco ámbar con 10 muestras de la colmena 3 (padre) y alcohol al 70%.....	31
Figura 21.	Medición correcta del ala de la abeja.	31
Figura 22.	Medición correcta del fémur de la abeja.	31
Figura 23.	Visualización del ala y fémur correctamente diseccionados.....	32
Figura 24.	Alas y fémures colocados en papel manteca listos para la medición con el programa JMicrovision v1.3.4.	32
Figura 25.	Calibración y uso del programa JMicrovision v1.3.4.	33
Figura 26.	Bandas de ADN en la posición 485 pb.	37
Figura 27.	Extracción del semen de zángano.	38
Figura 28.	Introducción del semen recolectado de zánganos.	39

Figura 29.	Fecundador número 185.....	40
Figura 30.	Colmena padre n°27 destapada en la cámara de cría.....	41
Figura 31.	Colmena padre n°3 destapada en la cámara de cría.....	42
Figura 32.	Colmena padre n°6 destapada en la cámara de cría.....	42
Figura 33.	Colmena abuela n°8 destapada en la cámara de cría.....	43
Figura 34.	Colmena abuela n°4 destapada en la cámara de cría.....	43
Figura 35.	Marco de miel de la colmena padre n°27.....	45
Figura 36.	Número total de marcos llenados de miel.....	46
Figura 37.	Marco de miel de la colmena padre n°3.....	46
Figura 38.	Número total de marcos llenados de miel.....	47
Figura 39.	Marco de miel de la colmena padre n°6.....	47
Figura 40.	Número total de marcos llenados de miel.....	48
Figura 41.	Marco de miel de la colmena abuela n°4.....	48
Figura 42.	Número total de marcos llenados de miel.....	49
Figura 43.	Marco de miel de la colmena abuela n°8.....	49
Figura 44.	Número total de marcos llenados de miel.....	50
Figura 45.	Resultados de africanización de la colmena número 6 con el método <i>FABIS</i> I.....	53
Figura 46.	Resultados de africanización de la colmena número 3 con el método <i>FABIS</i> I.....	55
Figura 47.	Resultados de africanización de la colmena número 27 con el método <i>FABIS</i> I.....	56
Figura 48.	Resultados de africanización de la colmena número 4 con el método <i>FABIS</i> I.....	58
Figura 49.	Resultados de africanización de la colmena número 8 con el método <i>FABIS</i> I.....	59
Figura 50.	Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A1.....	63
Figura 51.	Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A2.1.....	64
Figura 52.	Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A3.1.....	65
Figura 53.	Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A3.2.....	66

Figura 54. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A4.1.....	67
Figura 55. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A4.2.....	68
Figura 56. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A5.1.....	69
Figura 57. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A5.2.....	70
Figura 58. Árbol filogenético tomando todos los contig generados empleando Maximum Likelihood.....	73
Figura 59. Marco llenado con cría operculada.....	76
Figura 60. Reina inseminada con bajo porcentaje de africanización.....	77
Figura 61. Equipo de disección.....	90
Figura 62. Ala y fémur diseccionados y colocados en la plataforma del Estereoscopio.....	90
Figura 63. Muestras rotuladas en frascos de color ámbar.....	90
Figura 64. Muestras en microtubos.....	90
Figura 65. Buffers utilizados en el proceso de lavado.....	90
Figura 66. Preparación del equipo de PCR.....	90
Figura 67. Abertura parcial de la reina.....	91
Figura 68. Ajustamiento de la válvula de tanque de CO ₂	91
Figura 69. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°6....	91
Figura 70. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°6.....	91
Figura 71. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°6....	91
Figura 72. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°6.....	92
Figura 73. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°6....	92
Figura 74. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°6.....	92
Figura 75. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°6....	92
Figura 76. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°6.....	92
Figura 77. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°6....	93

Figura 78.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°6.	93
Figura 79.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°6....	93
Figura 80.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°6.	93
Figura 81.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°6....	94
Figura 82.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°6.	94
Figura 83.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°6....	94
Figura 84.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°6.	94
Figura 85.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°6....	94
Figura 86.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°6.	95
Figura 87.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°6..	95
Figura 88.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°6.....	95
Figura 89.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°3....	95
Figura 90.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°3.	95
Figura 91.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°3....	96
Figura 92.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°3.	96
Figura 93.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°3....	96
Figura 94.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°3.	96
Figura 95.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°3....	96
Figura 96.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°3.	97
Figura 97.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°3....	97
Figura 98.	Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°3.	97
Figura 99.	Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°3....	97

Figura 100. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°3.	97
Figura 101. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°3....	98
Figura 102. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°3.	98
Figura 103. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°3....	98
Figura 104. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°3.	98
Figura 105. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°3....	99
Figura 106. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°3.	99
Figura 107. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°3..	99
Figura 108. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°3.....	99
Figura 109. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°27.	100
Figura 110. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°27.....	100
Figura 111. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°27.	100
Figura 112. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°27.....	100
Figura 113. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°27.	100
Figura 114. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°27.....	101
Figura 115. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°27.	101
Figura 116. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°27.....	101
Figura 117. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°27.	101
Figura 118. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°27.....	101
Figura 119. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°27.	102
Figura 120. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°27.....	102
Figura 121. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°27.	102

Figura 122. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°27.....	102
Figura 123. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°27.103	
Figura 124. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°27.....	103
Figura 125. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°27.103	
Figura 126. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°27.....	103
Figura 127. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°27.103	
Figura 128. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°27.....	104
Figura 129. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°4..	104
Figura 130. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°4.	104
Figura 131. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°4..	105
Figura 132. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°4.	105
Figura 133. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°4..	105
Figura 134. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°4.	105
Figura 135. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°4..	105
Figura 136. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°4.	106
Figura 137. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°4..	106
Figura 138. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°4.	106
Figura 139. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°4..	106
Figura 140. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°4.	106
Figura 141. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°4..	107
Figura 142. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°4.	107
Figura 143. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°4..	107

Figura 144. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°4.	107
Figura 145. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°4..	107
Figura 146. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°4.	108
Figura 147. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°4.	108
Figura 148. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°4.....	108
Figura 149. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°8..	108
Figura 150. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°8.	108
Figura 151. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°8..	109
Figura 152. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°8.	109
Figura 153. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°8..	109
Figura 154. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°8.	109
Figura 155. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°8..	109
Figura 156. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°8.	110
Figura 157. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°8..	110
Figura 158. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°8.	110
Figura 159. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°8..	110
Figura 160. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°8.	110
Figura 161. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°8..	111
Figura 162. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°8.	111
Figura 163. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°8..	111
Figura 164. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°8.	111
Figura 165. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°8..	111

Figura 166. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°8.
..... 112

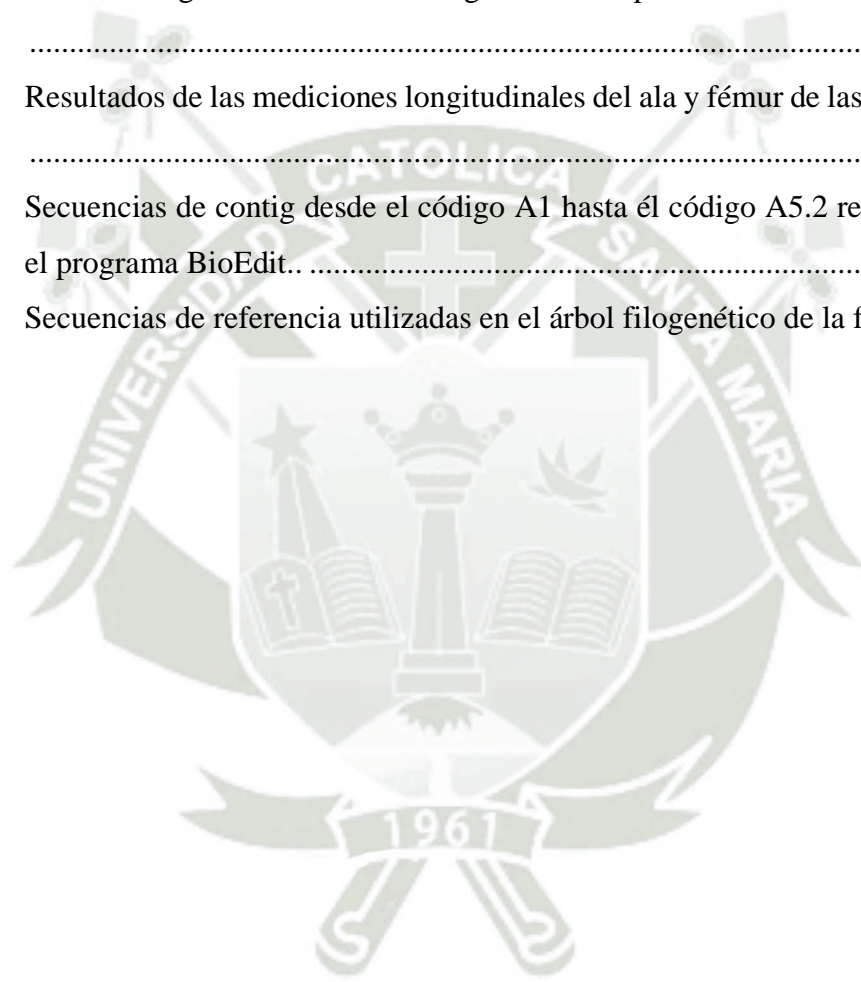
Figura 167. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°8.112

Figura 168. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena
N°8..... 112



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Galería fotográfica de la metodología realizada para la obtención de los resultados de las mediciones morfológicas.	90
Anexo 2.	Galería fotográfica de la metodología realizada para la obtención de los resultados de los análisis moleculares.	90
Anexo 3.	Galería fotográfica de la metodología realizada para la inseminación artificial.	91
Anexo 4.	Resultados de las mediciones longitudinales del ala y fémur de las 5 colmenas.	91
Anexo 5.	Secuencias de contig desde el código A1 hasta el código A5.2 realizados con el programa BioEdit.	113
Anexo 6.	Secuencias de referencia utilizadas en el árbol filogenético de la figura 58. .	116



INTRODUCCIÓN

La subespecie *Apis mellifera scutellata* fue exportada desde el sur de África a Brasil en 1956 con el propósito de realizar un cruce entre especies, con el objetivo de obtener una nueva generación que se adapten a las condiciones tropicales; sin embargo, en un giro inesperado un aproximado de 26 colonias escaparon en el año 1957, dando inicio a un proceso de africanización en el continente americano, el cual consiste en el establecimiento de las características dominantes de esta subespecie frente a otras colonias de abejas (1). La abeja africanizada se originó principalmente a través del apareamiento inicial de reinas de origen europeo, provenientes de apiarios locales, con zánganos de origen africanizado que se habían escapado de Brasil; en una segunda instancia, se observó la invasión de colmenas por reinas de origen africanizado, lo que contribuyó aún más a la africanización de las poblaciones de abejas. En el año 1975 y 1976 se manifestó la africanización de abejas en el Perú, principalmente a lo largo de la selva baja y la costa norte, este fenómeno se propagó tan rápido que a fines de 1986 (2), se detectaron los primeros enjambres que llegaron hasta México, este proceso ha causado considerables pérdidas económicas en la apicultura, debido al comportamiento altamente defensivo, registrándose varios casos de fallecimiento tanto en animales como en seres humanos con un alto número de picaduras, resalta también su fuerte tendencia a enjambrar de las abejas africanizadas, trayendo como consecuencia la pérdida de la colmena y el difícil manejo sanitario y nutricional perjudicando en gravedad al apicultor (3).

La inseminación artificial es la técnica que se aplica para hacer un control genético de los progenitores, dando la capacidad de elegir características deseables como de producción, comportamiento y de resistencia (4), permitiendo realizar cruzamientos controlados al 100%; sin embargo, para la selección previa de estas colmenas progenitoras se necesita realizar análisis de las características deseables, es debido a esto que se utilizan registros de manejo de colmenas, los cuales pueden facilitar el control de producción, genética y de comportamiento de colmenas en un apiario (5).

Es importante mencionar también, que para evitar un posible cruzamiento no deseado entre abejas africanizadas y europeas es necesario realizar análisis morfométricos, los cuales gracias a la técnica *FABIS* (*Fast Africanized Bee Identification System*) pueden determinar mediante valores críticos de la longitud del ala y del fémur que abejas son posiblemente africanizadas o europeas (6), cabe resaltar que es necesario realizar un análisis molecular,

debido a que el método anteriormente mencionado no es preciso al 100%. La región que es clave para visualizar si existe el mitotipo africanizado o mitotipo europeo es el polimorfismo del gen mitocondrial de la región de 485 pb del citocromo b, gracias a esto podemos discriminar estos dos grupos de abejas (50).

VARIABLES INDEPENDIENTES

Variables independientes	Indicadores
Análisis molecular por <i>DNA barcoding</i> (AM)	Identificación de las 8 muestras libres de africanización.
Análisis morfométrico del ala (AMA) y Análisis morfométrico del fémur (AMF)	Medidas del ala delantera derecha (mm) y medidas del fémur posterior derecho (mm) de 10 muestras.
Comportamiento de las Colonias (CC)	Escala de comportamiento: dócil, nervioso, agresivo.
Productividad de Miel (PM)	Cantidad de marcos llenados por cosecha (1-8).

VARIABLES DEPENDIENTES

Inseminación Artificial (IA)	Identificación de postura de la reina inseminada.
------------------------------	---

CAPÍTULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1 Descripción del problema

En la actualidad, la actividad de la apicultura en el Perú tiene grandes aportes para el ámbito económico, social y ecológico en el país (7); sin embargo, existe un problema al cual se tienen que enfrentar los apicultores peruanos, este inconveniente es la africanización, que consiste en la contaminación genética de la *Apis mellifera scutellata* en colmenas del Perú. Es decir, que las características fenotípicas de esta subespecie comienza a ganar predominancia, ocasionando como resultado que se generen características específicas negativas en las colmenas, como el enjambrazón que por la genética de la africanización lo realizan de manera natural, abandonando totalmente la colmena y causando la pérdida total de la población de una colmena para el apicultor (8), perjudicando la producción de miel y otras actividades apícolas (polinización, hidromiel, crianza de reinas, etc.); el pillaje, en el cual consiste en el saqueo de provisiones (miel y polen) y ataque a otras colmenas de abejas, lo cual es otra característica principal de las abejas africanizadas, trayendo como consecuencia una dificultad al apicultor al momento de realizar el manejo sanitario y nutricional de la colmena; por último, la característica común de la abeja africanizada es su comportamiento agresivo, defensivo e hiperactivo, son propensas a reaccionar de una manera mucho más rápida y enérgica frente a situaciones de posible amenaza, siendo más sensibles al ruido (vibraciones) o movimiento rápido desencadenando un mayor número de incidentes por picadura en los apicultores y animales que se encuentren cerca de la zona, generando un riesgo de acumulación de veneno debido a múltiples picaduras, provocando una reacción tóxica y generando síntomas como náuseas, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, y picazón e hinchazón, hasta incluso la muerte (9).

1.2 Justificación

1.2.1 Justificación Tecnológica

La tecnología de inseminación artificial permitirá hacer los cruces genéticos, los cuales servirán para poder seleccionar a las abejas más productivas y dóciles en conjunto con los resultados de los análisis del comportamiento, productividad,

moleculares y morfométricos, para poder seleccionar rasgos deseables, mejorando la conducta y la productividad de las colonias. La implementación del análisis molecular y morfométrico proporcionará herramientas tecnológicas avanzadas para evaluar la eficacia de las intervenciones genéticas, garantizando resultados precisos y reproducibles. Este enfoque tecnológico no solo optimizará la gestión de colmenas, sino que también contribuirá al desarrollo de prácticas apícolas más eficientes y sostenibles.

1.2.2 Justificación Ambiental

La tesis aborda preocupaciones ambientales al enfocarse en la docilidad de las abejas africanizadas, que a menudo se asocian con comportamientos agresivos y riesgos para la biodiversidad. Al mejorar genéticamente la docilidad, se reduce el impacto negativo en el entorno natural, disminuyendo el riesgo de conflictos entre las abejas y otros organismos (humanos y animales). Además, las prácticas de inseminación artificial ofrecen la oportunidad de preservar y fortalecer poblaciones de abejas sin afectar negativamente a las colonias salvajes.

1.2.3 Justificación Económica

La mejora genética de la docilidad de las abejas tiene implicaciones económicas sustanciales para la apicultura. Las colonias más dóciles son más fáciles de manejar, por lo cual hay una revisión más constante de las colmenas, evitando su abandono y mejorando el manejo para su preservación. Además, la productividad mejorada de las colonias dóciles se traduce en un aumento en la producción de miel y otros servicios apícolas. Estos aspectos contribuyen a los Objetivos de Desarrollo Sostenible: ODS 1 (Fin de la Pobreza) al fortalecer la seguridad alimentaria y al ODS 8 (Trabajo Decente y Crecimiento Económico) al impulsar la economía apícola, brindando oportunidades de empleo.

OBJETIVOS

GENERAL

Reducir el nivel de africanización mediante análisis y estrategias aplicadas para optimizar las poblaciones *Apis Mellifera*.

ESPECÍFICOS

1. Analizar la efectividad del comportamiento (dócil, nervioso, agresivo) de las colmenas seleccionadas.
2. Analizar la efectividad de producción de miel (1-8 marcos llenados) de las colmenas seleccionadas.
3. Analizar las características de los resultados morfológicos y moleculares (*DNA barcoding*) de las colmenas seleccionadas para categorizar abejas africanizadas y europeas.
4. Aplicar la inseminación artificial en abejas reina libres de africanización.

HIPÓTESIS

Dado que se reporta características negativas y perjudiciales en poblaciones de abejas (*Apis mellifera*) es probable que la aplicación de la inseminación artificial de colmenas seleccionadas en base a análisis de comportamiento y productividad, resultados de análisis moleculares (*DNA barcoding*) y morfométricos, contribuyan significativamente a la reducción del nivel de africanización, generando resultados positivos para la apicultura y la biodiversidad local.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

2.1.1 Abejas melífera (*Apis mellifera*)

Alrededor del mundo existen un aproximado de 20.000 especies diferentes de abejas, de las cuales, una gran parte de ellas son solitarias o están acostumbradas a vivir en pequeñas poblaciones; sin embargo, 1250 de especies de abejas son con las que más socializamos y con el paso del tiempo hemos aprendido a poder convivir con ellas (10). En el continente americano las abejas que son más conocidas son las europeas y africanizadas (*Apis mellifera*), que es originaria de Europa, África y parte de Asia, esta abeja fue clasificada en el año 1758 por el científico sueco Carlos Linneo, a partir de aquí nace la apicultura, el cual es la actividad del cuidado y la crianza de abejas para obtener productos como la miel, jalea real, propóleo, polen y venta de reinas (11).

2.1.2 Comportamiento social y organización de la colmena

La colmena de las abejas son un fascinante ejemplo de organización social en el reino animal, que ha sido objeto de estudio durante siglos, en su interior, se desarrolla un complejo sistema de interacciones que permite a sus miembros trabajar de manera coordinada, asegurando la supervivencia y el éxito de la colonia, el cual se divide en: La Abeja Reina: Exhibe una longevidad extendida en comparación con los otros miembros de la colmena (hasta los 6 años en un estado natural), cuyos ciclos vitales son considerablemente más cortos. Su papel distintivo en la comunidad es crucial para la supervivencia, ya que se dedica principalmente a la puesta de huevos, generando más de 1,000 diariamente (12). Estos huevos se transforman en machos (zánganos) y hembras (obreras). La mayoría de las larvas hembras se desarrollan como abejas obreras, a excepción de cinco o seis, que son alimentadas exclusivamente con jalea real pura y pueden evolucionar para convertirse en abejas reinas (13).

Los Zánganos: Como abejas macho, su única función es la fertilización de la reina, una vez cumplida esta función, los zánganos mueren, debido que al momento de copular con la reina desprenden su aparato genital; además, estos carecen de la capacidad de alimentarse por sí mismos en el campo, debido a que no poseen un mecanismo mandibular igual al de la obrera, ya que su lengua no es del mismo

tamaño sino más corta; sin embargo, si tienen la capacidad de alimentarse a través de los marcos de miel que acopian las obreras, aunque en época de escasez, las obreras suelen matar y desechar a los zánganos fuera del panal para así poder almacenar más alimento para la colmena (14).

Las Obreras: Son hembras estériles que desempeñan diversas funciones cruciales a lo largo de su vida, que abarca solo unos meses. En sus primeros días, realizan tareas domésticas, incluyendo la limpieza de celdas, alimentación de la reina, de los zánganos y las obreras recién nacidas, de la protección de la entrada de la colmena contra posibles amenazas y la producción de cera para la construcción colectiva de nuevas celdas, contribuyendo al crecimiento del panal. Al alcanzar los veinte días, se convierten en obreras adultas capaces de trabajar fuera de la colmena, recolectando néctar, polen y agua. Durante sus expediciones de búsqueda de alimento, se orientan mediante el sol y las características del entorno, garantizando su regreso exitoso a la colmena (15).

2.1.3 Tipos de colmenas y núcleos fecundadores

Los apiarios especializados en la crianza e inseminación artificial de reinas tienen una manera especial de distribución de sus colmenas en sus apiarios, donde cada una cumple una función específica y vital para el funcionamiento correcto y eficaz para lograr sus objetivos planteados (16), la distribución y clasificación se realiza de la siguiente manera:

a. Abuelas

Las colmenas que son denominadas abuelas son el pilar para la crianza e inseminación artificial de reinas, cada una de estas colmenas poseen reinas especialmente seleccionadas tanto por su temperamento dócil y su gran productividad, en cada colmena la reina estará en constante postura de huevos en la primer alza o caja llamada cámara de cría, a partir de esta cría (específicamente las larvas más pequeñas) se hará la crianza de reinas, el cual consiste en trasladar las larvas de estas reinas selectas a recipientes especiales llamados cúpulas, los cuales están diseñados para la crianza de reinas, por lo cual estas colmenas van a cumplir con la función de poder dar futuras reinas con características deseables para el apicultor (17).

b. Criadoras

Las criadoras son las colmenas receptoras y desarrolladoras de las crías (futuras reinas) de las abuelas, en las cuales hay que destacar un importante detalle, el cual es el proceso de orfanización:

Cada una de estas colmenas antes de recibir la cría de las abuelas, sufre por este proceso, el cual consiste en retirar a la reina de una colmena, dejando a la colmena huérfana y con la necesidad de tener otra reina, es por esto que a partir del día que se extrae la reina y pasada una semana, la colmena realizará celdas reales a partir de las larvas más jóvenes, otorgándoles una alimentación especial con únicamente jalea real, desarrollando a las larvas y transformándolas en futuras reinas, el apicultor encargado al momento de visualizar las celdas reales, las extraerá y eliminará, imposibilitando a la colmena de obtener una reina naturalmente e incapacitándolas de crear nuevas celdas reales, debido a que ya no existen crías jóvenes, en este momento la cría de las abuelas son trasladadas a las cúpulas y colocadas en 2 marcos especiales que se introducirán dentro de estas colmenas criadoras (en cada marco puede haber hasta un máximo de 20 reinas), como la colmena huérfana se encuentra en total desesperación por conseguir una reina, las larvas jóvenes que han sido trasladadas serán aceptadas y empezarán su proceso de crianza para su transformación en futuras reinas (18). Una vez pasado 10 días después de este proceso, el cual se le denomina “traslarve”, dentro de las cúpulas se habrán desarrollado las larvas y se habrán creado celdas reales completamente cerradas, en este décimo día se procederá a colocar ruleros (recipiente especial para el nacimiento de las reinas), este paso para la crianza de reinas es sumamente importante, debido a que al colocar los ruleros se imposibilita la posible eliminación de la primera reina nacida hacia las demás no nacidas, finalmente a los 13 días de haber hecho el traslarve, se obtendrán las reinas nacidas (18).

c. Padres

En cada una de estas colmenas denominadas padres, hay una reina que será la encargada de engendrar a los futuros zánganos los cuales serán encargados de la fecundación tanto natural como en inseminación artificial de las reinas nacidas en las criadoras, cada colmena posee dos marcos especiales conocido como

“marco zanganero”, el cual es un marco con una cera ligeramente más amplia para incentivar únicamente la postura de zánganos y no de obreras (19).

d. Núcleos Fecundadores

Una vez que las reinas nacidas han sido extraídas de las colmenas criadoras, serán colocadas en rúleros con *candy* (alimento hecho a base de miel y azúcar en polvo) para su posterior introducción en estos núcleos fecundadores (20). El objetivo de estos núcleos es recibir a las reinas vírgenes y tener un ambiente y población adecuados para su posterior fecundación con los zánganos, a esto se le conoce como el “vuelo nupcial”, una reina al ser liberada por las obreras del núcleo hará aproximadamente 3 vuelos de reconocimiento por su zona (21), esto debido a 3 razones:

- Orientación y Familiarización: Las jóvenes reinas efectúan vuelos de orientación para conocer el entorno de la colmena antes de sus vuelos de apareamiento, lo que les permite recordar la ubicación de su núcleo y regresar a ella con facilidad (22).
- Apareamiento: En los vuelos de apareamiento, las reinas abandonan la colmena para copular con zánganos en zonas específicas llamadas "zonas de congregación de zánganos". Estos vuelos facilitan la diversidad genética al permitir que la reina se aparee con múltiples zánganos de distintas colmenas (23).
- Evaluación del Entorno: Estos vuelos también permiten a la reina inspeccionar las condiciones externas y el área cercana a la colmena, algo esencial para la salud y el éxito de la colonia en su conjunto (23).

Una vez llegada la madurez sexual de las reinas, volarán hacia las zonas de congregación de zánganos, pudiendo realizar un apareamiento en promedio con 8 zánganos y regresando a su núcleo para comenzar con la postura de huevos.

2.1.4 Ciclo de vida de abejas obreras













Esta tabla resume las principales etapas del ciclo biológico de las abejas (*Apis mellifera*) con su correspondiente duración. Cabe destacar que las abejas adultas pueden tener una vida variable dependiendo de su función dentro de la colmena y las condiciones ambientales (24). En la siguiente tabla 1 se mostrará el ciclo de vida y desarrollo de las abejas:

Tabla 1. Ciclo de vida y desarrollo de las abejas obreras (*Apis mellifera*)

Etapa	Descripción	Duración de la etapa y nacimiento
Huevo	La reina deposita huevos en las celdas de la colmena.	3 días
Larva	Las larvas eclosionan de los huevos y son alimentadas con jalea real impura.	5-6 días
Pupa	La larva se transforma en pupa dentro de una celda sellada.	12 días
Emergencia (obrero)	De la pupa emerge una obrera, que realiza diversas tareas dentro de la colmena.	21 días
Adulto	Las abejas adultas participan en la recolección y polinización.	Variable hasta su muerte, aproximadamente 45 días.

2.1.5 Ciclo de vida y madurez sexual de abejas reina y zánganos

En la crianza e inseminación artificial de reinas, la coincidencia de la madurez sexual entre los zánganos y las reinas es un punto vital para la correcta concepción, en las siguientes figuras 1 – 12 se observa su ciclo biológico:

ABEJA REINA	ZÁNGANO
 <p data-bbox="403 416 671 450">Figura 1. 3 días (huevo)</p>	 <p data-bbox="997 416 1265 450">Figura 2. 3 días (huevo)</p>
 <p data-bbox="389 696 686 730">Figura 3. 5 1/2 días (larva)</p>	 <p data-bbox="983 707 1279 741">Figura 4. 6 1/2 días (larva)</p>
 <p data-bbox="376 967 699 1001">Figura 5. 7 días (operculado)</p>	 <p data-bbox="962 967 1299 1001">Figura 6. 10 días (operculado)</p>
 <p data-bbox="408 1256 671 1290">Figura 7. 8 días (pupa)</p>	 <p data-bbox="978 1256 1283 1290">Figura 8. 14/15 días (pupa)</p>
 <p data-bbox="352 1512 724 1545">Figura 9. 15/16 días (emergencia)</p>	 <p data-bbox="954 1512 1310 1545">Figura 10. 24 días (emergencia)</p>
 <p data-bbox="352 1762 724 1796">Figura 11. 21-23(madurez sexual)</p>	 <p data-bbox="930 1762 1331 1796">Figura 12. 36 días (madurez sexual)</p>

2.1.5.1 Aparato reproductor de la abeja reina

La abeja reina posee un aparato reproductor bien estructurado, el cual está constituido por dos grandes ovarios en la cavidad abdominal, los cuales poseen un total de 150 túbulos llamados ovariolos, estos ovariolos se fusionan en su parte distal para lograr crear los oviductos laterales, que al mismo tiempo se unen para constituir el oviducto medio, que desagua otro conducto proveniente de la espermateca, por el cual los espermatozoides de los zánganos ascienden después de la fecundación y terminan descendiendo para juntarse con los huevos provenientes de los ovariolos (25). El aparato reproductor de la abeja reina se observa en la siguiente figura 13:

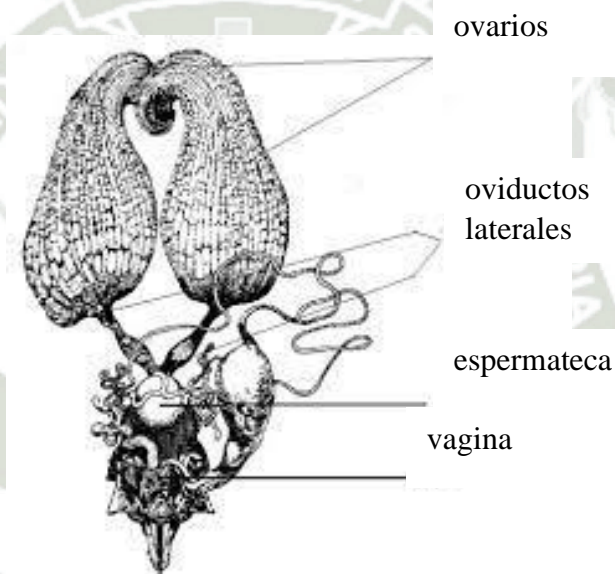


Figura 13. Aparato reproductor de la abeja reina.

2.1.5.2 Fecundación y ovoposición

Como se pudo observar en el ciclo de vida, las reinas van a madurar sexualmente una vez emergida de la pupa, entre estos cinco días las reinas harán un vuelo de reconocimiento de aproximadamente 2 – 3 minutos, seguidamente a esto entre los 6 a 8 días realizan sus vuelos nupciales en la zona de congregación de zánganos, como ya se mencionó anteriormente, las abejas reinas serán copuladas por aproximadamente 8 zánganos, los zánganos que fecundan a las reinas liberan su aparato reproductor, lo que en consecuencia ocasiona su posterior muerte, cabe mencionar que cada zángano puede aportar

hasta 10 millones de espermatozoides, por lo cual la reina durante la fecundación puede llegar a recibir hasta 80 millones de espermatozoides, de los cuales se localizarán en la vagina y oviducto medio listos para moverse hacia el espermateca (26); sin embargo, únicamente podrá almacenar aproximadamente 6.2% del total, llegando a expulsar el resto al exterior. Una vez fecundada la reina, regresará a su colmena; sin embargo, cabe mencionar que, si la reina no logra captar la cantidad suficiente de espermatozoides, puede salir a realizar otros vuelos nupciales para copular por una segunda hasta una tercera vez, hasta llegar a una cantidad de más de 5 millones de espermatozoides, los necesarios para asegurar la supervivencia de la colmena (27).

Las abejas reinas fecundas pueden depositar hasta un aproximado de 2000 huevos por día, aunque este ritmo depende de varios factores, como ambientales, la raza y la disponibilidad de polen y miel en la zona. La reina produce una feromona, llamada la sustancia real, la cual actúa sobre las obreras inhibiendo sus instintos de crear celdas reales y de ovopositar huevos por su cuenta, también tiene la característica de atraer zánganos, por lo cual es muy importante para mantener la consistencia de la colmena (27).

2.1.5.3 Aparato reproductor de los zánganos

Los zánganos producen los espermatozoides en sus testículos cuando se encuentran dentro de la pupa y después de 3 días de su nacimiento pasan por las vesículas seminales, las cuales crean sustancias nutritivas para la madurez de los espermatozoides, los zánganos poseen dos cornículas de color blanquecino al nacer, y con el paso del tiempo se van oscureciendo hasta alcanzar un color amarillento y anaranjado, esto es una manera de poder identificar si un zángano este maduro o no. Los vuelos para identificar la zona de congregación se realizan 7 días después de su nacimiento y pueden alcanzar un alto de hasta 6 metros (28). El aparato reproductor del zángano se observa en la figura 14:

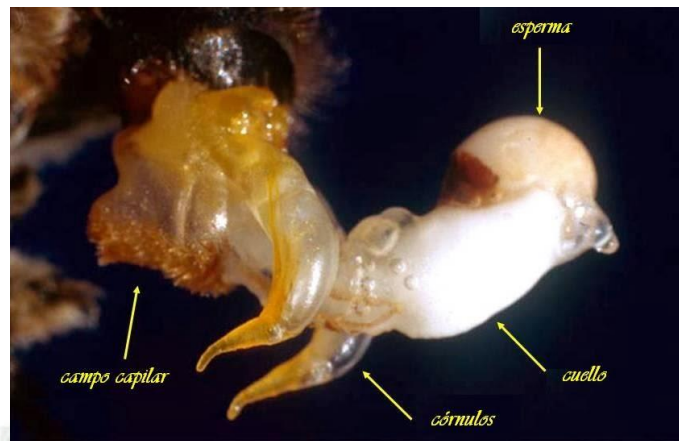


Figura 14. Aparato reproductor de los zánganos.

2.1.6 Citología Apícola

La formación de un ser vivo se da gracias a las células germinales pertenecientes tanto a los ovarios de la hembra y los espermatozoides del macho, la célula resultante está determinada por tres partes las cuales son el protoplasma, la membrana y el núcleo, el núcleo es la parte de más interés, debido a que en él se encuentra la información genética del nuevo individuo que se ha formado (29).

Un óvulo formado en el interior de una abeja reina es fecundado por la célula germinal masculina (espermatozoide), en el cual únicamente se introduce la cabeza del espermatozoide, logrando aportar 16 cromosomas, que, junto con los 16 cromosomas del óvulo, forman a un huevo diploide (32 cromosomas) (29), los 16 pares de cromosomas se dividen en dos grupos iguales dirigiéndose a los polos de la célula. En la mayoría de individuos el proceso de su formación ocurre primero con la división del núcleo y después de la célula; sin embargo, algo muy distinto ocurre en las abejas, ya que para su formación únicamente se dividirá el núcleo más no la célula, primero se divide de uno en dos, luego de dos en cuatro, luego de cuatro ocho y continuamente de esta manera hasta alcanzar los 60 núcleos dentro del corion o cáscara de huevo depositados en la pared, como ya se mencionó en el ciclo de vida de las abejas, el huevo completa su fase al tercer día de haber sido depositado dentro de la celda del panal, en estos tres días el huevo se va adelgazando, llegando hasta su punto máximo en el tercer día, en este punto el embrión toma una pose de arco y se puede visualizar una pequeña gota de líquido compuesto por varias enzimas que es el encargado de disolver el corión, al ocurrir esto, una abeja nodriza (encargada de cuidar a las crías) deposita una gota de jalea real en la celda donde se encuentra el huevo, seguidamente otras abejas nodrizas hacen lo mismo hasta formar un

pequeño charco en el cual queda suspendido el huevo, al momento que la jalea toca el huevo, la larva que se encuentra en el interior sale del corión y queda suspendida en el pequeño charco de jalea real (30).

2.1.6.1 Partenogénesis

La partenogénesis es un tipo de reproducción asexual, principalmente presente en animales que son pequeños e invertebrados, como la hormiga, avispa, pulgones y abejas, que tienen la capacidad de alternar una reproducción tanto sexual como asexual. En las abejas en esta forma de reproducción ocurre el desarrollo o la división sucesiva únicamente de los gametos femeninos o óvulos de la reina hasta llegar a formar a un nuevo individuo, sin la necesidad de ser fecundados por los gametos masculinos o espermatozoides, el individuo creado por este proceso es el zángano (abeja macho), que es destacado a diferencia de la abeja hembra obrera o reina por tener solamente 16 cromosomas, lo que lo convierte en un organismo haploide, por lo tanto, heredará únicamente el ADN de la abeja reina progenitora (31). A continuación, se muestra la figura 15, representativa de la reproducción sexual y asexual de la abeja reina:

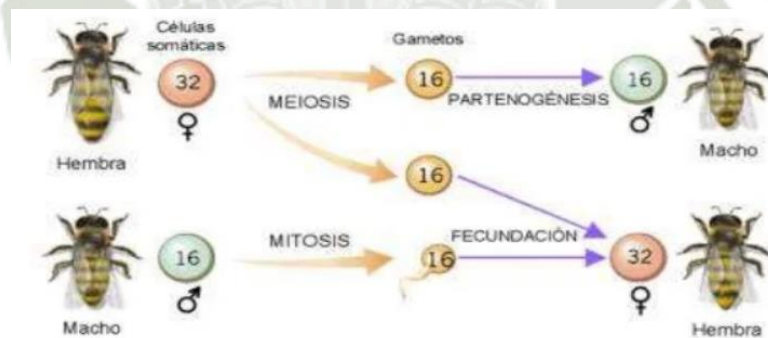


Figura 15. Partenogénesis en abejas.

2.1.6.2 Alelos sexuales

En diferentes animales y plantas dentro de su núcleo se encuentran cromosomas distintivos que darán origen a una hembra o macho, esta pareja se denominan como alelos sexuales que están representados por las letras X/Y; sin embargo, en las abejas ocurre algo muy distintivo, debido a que no solo poseen dos alelos sexuales, sino que tienen entre 8 a 18 alelos sexuales, es debido a esto que en un solo sitio o locus podemos encontrar un gen que puede ser XA, XB o XC, esto puede variar entre 12 o más (32).

La reina siempre será heterocigota, por lo cual siempre tendrá dos copias diferentes como AB, XA, XB, en este caso, si la reina se fecunda con un zángano que tiene un alelo sexual distinto, los huevos infértiles darán resultados a zánganos con alelos sexuales A y B, en otras palabras, zánganos haploides. Los zánganos que son haploides están representados con 1 N debido a que todos sus cromosomas son homólogos en cada par (iguales), en el caso de las hembras que son diploides están representadas por 2 N, debido a que cada par de cromosomas son diferentes o también se les podría llamar heterocigotos (33). A continuación, se observa la figura 16 con la representación de las posibles combinaciones genéticas entre los huevos no fecundados y los huevos fecundados de una abeja reina:

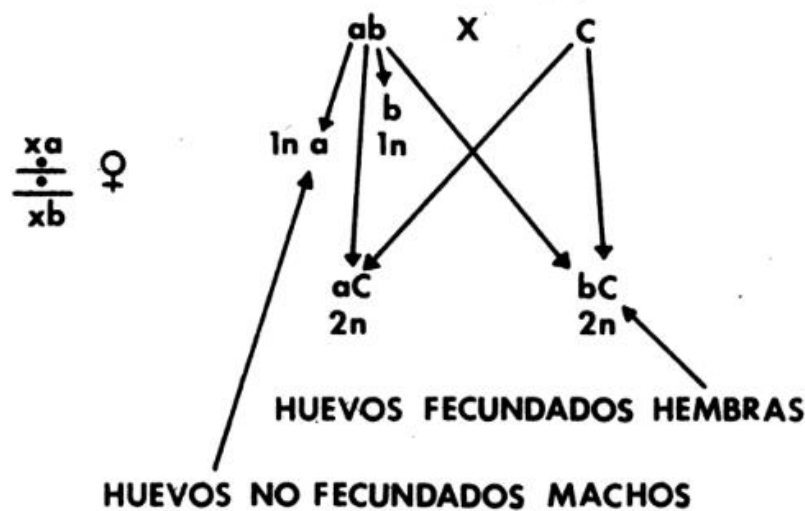


Figura 16. Representación de las posibles combinaciones de las crías entre los alelos distintos de una abeja reina y un macho zángano.

Existen casos en los cuales una reina con alelos AC se cruza con sus hermanos, zánganos que poseen un alelo A y el otro un alelo B, por lo consecuente se obtendría lo siguiente en la figura 17:

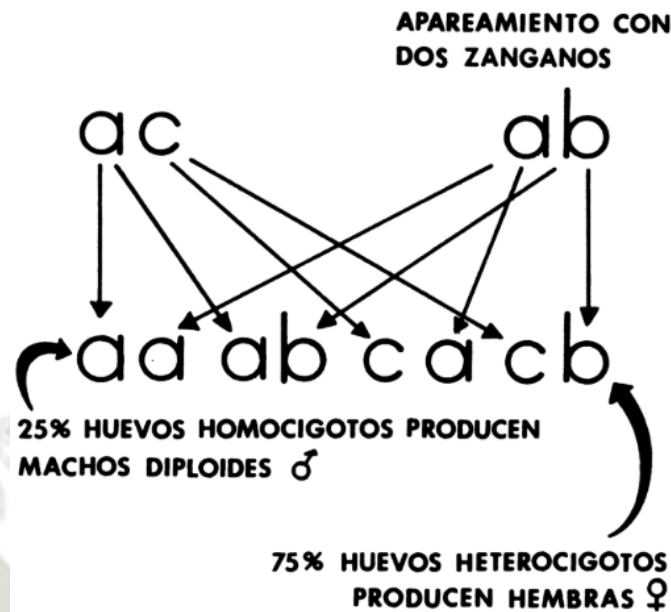


Figura 17. Representación de las combinaciones posibles de las crías entre los alelos de una abeja reina con 2 de sus hermanos zánganos.

Lo que se observa en la figura 17 es un 75% de huevos heterocigotos, en otras palabras de huevos de los cuales nacerán hembras obreras; sin embargo, el otro 25% represente a huevos homocigotos, con el mismo alelo, de los cuales nacerán zánganos diploides, lo que puede perjudicar a la colmena, debido a que las obreras nodrizas encargadas de cuidar a la cría evitan el nacimiento de este tipo de cría, comiéndose la larva una vez eclosionada, es por esto que el cruzamiento de hermanos entre abejas puede ser perjudicial, y si es en una mayor cantidad, como por ejemplo 50% de machos diploides y 50% de hembras, ocurre la postura salteada, debido a que las obreras retirarán a las larvas que no son hembras (34).

2.1.6.3 Supervivencia

La cantidad de número de alelos sexuales dentro de un apiario es de vital importancia, debido a que esto definirá la supervivencia de las colmenas, si la cantidad de alelas disminuye, también disminuirá el porcentaje de supervivencia (34).

Por ejemplo, cuando el apiario tiene únicamente 2 alelos sexuales disponibles en su genética, el porcentaje de supervivencia sería del 50%, por ejemplo:

$AB \times A, B = AA - AB - BA - BB$ (50% de supervivencia)

En este ejemplo, dos de las 4 combinaciones posibles son homocigotos (zánganos diploides) por lo cual las abejas matarán a esa cría y solo la mitad de la población vivirá.

Con tres alelos sexuales o, en otras palabras, con un tercer zángano que aporte otro alelo tendremos más combinaciones posibles.

$AB \times A, B, C = AA - AB - AC - BA - BB - BC$ (67% de supervivencia)

De este modo, se observa un incremento del porcentaje de supervivencia de la colmena, ya que al igual que el anterior caso obtendremos dos alelos homocigotos; sin embargo, hay una mayor cantidad de alelos heterocigotos, haciendo un total de 4 (34).

2.1.6.4 Genotipo y Fenotipo

Los genes o información genética que se encuentran dentro de una célula sexual son las características genéticas que va a expresar un ser vivo, esta información se transmite de generación en generación, a todo este conjunto se le llama genotipo (35).

El fenotipo en cambio, es la expresión tanto física como comportamiento o en otras palabras todo lo que se puede visualizar de un ser vivo, como por ejemplo el color de ojos o el color del cuerpo en el caso de las abejas (35).

El fenotipo también se puede expresar por la siguiente fórmula:

$\text{Genotipo} + \text{Medio Ambiente} = \text{Fenotipo}$

Esto es debido a que muchas características como lo puede ser el comportamiento o la producción de miel dependen mucho del medio ambiente, por ejemplo:

Una colmena de abejas puede producir de 10 a 100 kg de miel, en este caso la colmena productora produce 60 kilos de miel por su genotipo; sin embargo, por su mismo entorno el valor es un poco bajo debido a la falta de floración, entonces la colmena se traslada a un medio ambiente donde es temporada de floración, es debido a esto que la colmena productora aumenta su producción a 90 kilos, por lo cual el medio ambiente ha otorgado 30 kilos de más a la producción, por lo cual su fenotipo de producción de miel es de 90 kilos (36).

2.1.7 Abejas Africanizadas

Las abejas africanizadas tienen un genotipo con un flujo mayor de genes africanos y son el producto entre un cruce de abejas africanas y europeas, estas surgieron en Sudamérica en 1957 gracias al trabajo del biólogo Warwick Estevam Kerr, quien trató de crear una raza de abejas más adecuada para las condiciones tropicales en comparación con las abejas europeas presentes en Norteamérica y Sudamérica; sin embargo, este híbrido no fue muy exitoso debido a problemas en el proceso de selección, conservando muchos de los comportamientos negativos de su antecesor africano. En particular, en comparación con las abejas europeas, las abejas africanizadas cambian de lugar con más frecuencia, tienden a migrar para compensar la disminución de alimentos y, sobre todo, son mucho más agresivas, con una zona de alarma más amplia alrededor de la misma, y persiguen amenazas percibidas hasta distancias inconcebibles, logrando superar los 150 metros (37).

El gran número de personas y animales que han fallecido por causa de estas picaduras de abejas ha sido debido a una reacción tóxica o anafiláctica, por consecuencia de la gran cantidad de piquetes en un periodo relativamente corto, la cantidad estimada de veneno que se introduce a las víctimas es muy elevado (38), cabe resaltar que el veneno de las abejas africanizadas no es diferente al de las europeas, ya que su grado de toxicidad es el mismo, para que una dosis sea considerada letal en humanos, con un rango de 50 – 100 picaduras puede causar un riesgo alto de envenenamiento, mientras que una cantidad elevada a 500 picaduras, puede causar una alta probabilidad de muerte, en el caso de los animales (39), por el momento no existen datos que sean precisos a la susceptibilidad de la toxicidad del veneno de las abejas; sin embargo, las picaduras de abejas ocasionan un mayor número de accidentes por animales, llegando incluso a superar la mortalidad producidos por serpientes, escorpiones y arañas, las especies que son más afectadas son las aves y los equinos (40,41).

Esta contaminación por parte de la abeja africanizada siguió en aumento y se propagó debido a que las colonias africanizadas producen una mayor cantidad de zánganos que las europeas. Los zánganos africanizados dominan en el apareamiento de las reinas, debido a su gran número, permanecen una mayor cantidad de tiempo en la congregación de aparición, todos estos factores favorecen la predominancia paterna de genes africanos sobre los europeos (41).

La diferencia entre las características de la abeja africanizada y la europea se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de abejas africanizadas y europeas

Características	Africanizada	Europea
Longitud total	12.7 mm	13.9 mm
Peso	62 mg	93 mg
Dimensión de celdas	5.2 – 5.5 mm	4.6 mm – 5.0 mm

2.1.8 Inseminación Artificial

La historia de la inseminación artificial en las abejas melíferas inició a principios de la mitad del siglo XX, el cual fue clave para una nueva visión en la investigación para el futuro de la crianza de abejas (42), esto dio cimiento al mejoramiento de caracteres hereditarios positivos y gracias a los avances en biología y biología molecular (43). Se ha facilitado varios puntos a tomar en cuenta al momento de practicar la inseminación artificial, incluyendo el tiempo de exposición a la narcosis, la edad óptima de maduración sexual de la reina y de los zánganos; además, la biología interna de la reina, permitiendo tener las partes que serán claves al momento de realizar la inseminación, como lo es la glándula del espermateca que sirve para almacenar el semen una vez realizada la fecundación (43).

En el año 1927 se realizó la primera inseminación artificial desarrollada con éxito por Watson; además, en el año 1944 Liadlaw describió que es muy importante la identificación del pliegue valvular (cresta de tejido que cubre la entrada de la vagina) para lograr con éxito la introducción de la punta de inseminación en la vagina (44). Los rasgos que pueden ser mejorados de manera directa o indirecta a través de la inseminación artificial son principalmente los siguientes:

Rasgos productivos: incluyendo la cantidad de miel producidos en kilos (44).

Rasgos de comportamiento: los cuales abarcan la reducción de su defensivo de las abejas y, por ende, su agresividad, así como la disminución de la tendencia a enjambración (44).

Rasgos de resistencia: que se refieren a la tolerancia a diversas enfermedades como la el loque europeo y la varroa destructor, que son las principales enfermedades que atacan a las abejas (44).

En la actualidad, la inseminación artificial es una técnica completamente desarrollada y aplicada en la apicultura, desarrollándose a lo largo de los años diversos equipos de inseminación, los cuales ayudan a prosperar y facilitar la técnica con materiales innovadores (45), un ejemplo de este tipo de dispositivo es el modelo Schley, que está compuesto por un soporte y dos columnas que sostienen ganchos dorsal y ventral. Estos ganchos permiten la apertura de los segmentos abdominales, facilitando el acceso a la bolsa copuladora, donde se localiza el orificio vaginal. Además, cuenta con un receptáculo para la reina que se conecta a una fuente de narcosis, así como una microjeringa destinada al almacenamiento del semen de los zánganos (46).

Finalmente, las recomendaciones más importantes post – inseminación son el mantenimiento de la reina tras la inseminación se lleva a cabo en un núcleo baby, el cual cuenta con un excluidor de reina en la entrada para impedir que la reina realice el vuelo de fecundación, es esencial controlar la puesta de huevos, asegurándose de que se trate de puesta de obreras, lo que indicaría que la inseminación fue exitosa. Si, por el contrario, se observan huevos de zángano, esto sugiere que el esperma no se ha almacenado adecuadamente en la espermateca, en tal caso, se procederá a retirar a la reina del núcleo (44).

2.1.9 Análisis morfométrico *FABIS* (*Fast africanized bee identification system*)

El método *FABIS*, cuyo nombre proviene de "*Fast Africanized Bee Identification System*" (Sistema Rápido para la Identificación de Abejas Africanizadas), fue desarrollado por el Dr. Rinderer en 1986 (47). Este sistema se basa en la selección de características morfológicas específicas, como la longitud de ala anterior derecho y la longitud de fémur posterior derecho. Estas características fueron identificadas a partir del Método Morfométrico desarrollado por el Dr. Howard Daly, que analiza 25 características morfológicas de las abejas. El Dr. Rinderer determinó que la longitud de ala delantera y la longitud del fémur de la pata trasera son las más representativas, ya que muestran una mayor discriminación entre las abejas africanas y europeas (48).

A continuación, se muestra la tabla 3 con los valores críticos anteriormente mencionados:

Tabla 3. Morfotipos de abejas africanizadas y europeas

Morfotipo					
Africanizado		Abejas sospechosas		Europeo	
Ala interior derecha (mm)	Fémur posterior derecho (mm)	Alas de abejas sospechosas (mm)	Fémures de abejas sospechosas (mm)	Ala interior derecha (mm)	Fémur posterior derecho (mm)
<8.690	>2.099	8.691-9.030	0.564-2.098	>9.040	<0.563

2.1.10 Antecedentes de análisis molecular en abejas

En el artículo titulado "Variabilidad genética del ADN mitocondrial de poblaciones de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en Colombia", publicado en 2009 por Guillermo Salamanca Grosso, detalla el estudio del análisis del ADN mitocondrial de *Apis Mellifera* en 105 colmenas recolectadas en 7 áreas geográficas de Colombia, abarcando 14 departamentos. Se empleó la técnica de PCR para amplificar un fragmento de dos regiones genéticas específicas, ARNtleu (ARN de transferencia de leucina) y citocromo oxidasa II (COII), seguido se utilizó la enzima DraI para la digestión, tras este proceso, se identificó 13 haplotipos, de los cuales 8 estaban asociados al linaje africano A (representando el 90,5% del total), 4 al linaje europeo M (7,6%) y 1 al linaje C de Europa del Este (1,9%). En contraste, los linajes europeos tienen una representación mínima en la población estudiada, lo que sugiere una fuerte dependencia de colonias africanizadas en la actividad apícola colombiana (49).

En el artículo titulado "Análisis morfométrico y molecular ADN mitocondrial (ADNmt) de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en el estado de Tabasco, México", publicado en 2022 por Emeterio Payró de la Cruz y colaboradores, detalla el estudio de la comparación de la técnica morfométrica *FABIS* con el diagnóstico basado en el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (ADNmt). Se utilizó muestras de abejas de 135 colonias comerciales (CC), 15 colonias de cría (CPC) y 3 colonias silvestres (CS) de diferentes municipios en Tabasco (N=153). Ambos métodos identificaron correctamente a las CPC como europeas y a las CS como africanizadas; sin embargo, el método *FABIS* no pudo definir claramente 9 colonias CC, etiquetándolas como sospechosas (S), y hubo 50

casos donde los resultados de este método no coincidieron con los del método molecular. Se recomendó el uso del método molecular para distinguir entre abejas europeas y africanizadas, ya que no se ve afectado por factores ambientales (50).

2.1.11 Código de Barras de la Vida (*DNA Barcode of Life*)

Con el paso de los años se ha ido descubriendo nuevas especies y se les ha podido clasificar debido a la taxonomía; sin embargo, la biología molecular ha ido creciendo con el paso del tiempo y se ha convertido en un instrumento más que valioso para la identificación de diversas especies debido a su estudio de parentesco filogenético de diferentes organismos (51). Lo que hace valiosa a esta herramienta es el hecho de poder obtener información genética a partir de un pequeño fragmento del organismo a analizar. Por ejemplo, una herramienta eficaz utilizada para el reconocimiento e identificación de especies crípticas o individuos es el código de barras o *DNA barcoding*, que hace el uso de una base de datos de secuencias de ADN ya estandarizados (52).

En definición, es una técnica de biología molecular creada para poder identificar de manera correcta y precisa a especies simplemente a partir de una pequeña secuencia de ADN, cabe destacar que esta secuencia o región del genoma debe distinguirse entre especies cercanamente relacionadas y entre la misma especie (53).

En el artículo titulado “Base de datos de la Iniciativa de Códigos de Barras InBIO: códigos de barras de ADN de abejas ibéricas” en la Península Ibérica se han registrado alrededor de 1,100 especies de abejas, con casi 100 de ellas siendo endémicas y se ha desarrollado una colección de referencia que utiliza códigos de barras de ADN, basada en especímenes identificados morfológicamente, representando un total de 514 especies ibéricas. La base de datos titulada "InBIO Barcoding Initiative Database: DNA Barcodes of Iberian bees" incluye un total de 1,059 especímenes que han sido secuenciados. Este conjunto abarca aproximadamente el 47% de la diversidad de especies de abejas en la región y el 21% de las especies endémicas. Para Portugal peninsular, la cobertura se eleva al 71% en términos de diversidad general y al 50% en especies endémicas, los ejemplares fueron recolectados entre 2014 y 2022, y se encuentran depositados en varias colecciones, incluyendo la de Thomas Wood en el Naturalis Biodiversity Center en los Países Bajos, la colección FLOWer Lab de la Universidad de Coimbra en Portugal, la colección de Andreia Penado en el Museo de Historia Natural y Ciencias

de la Universidad de Oporto, así como en la colección de referencia de la InBIO Barcoding Initiative (54). El procedimiento *DNA barcoding* se observa en la Figura 18:

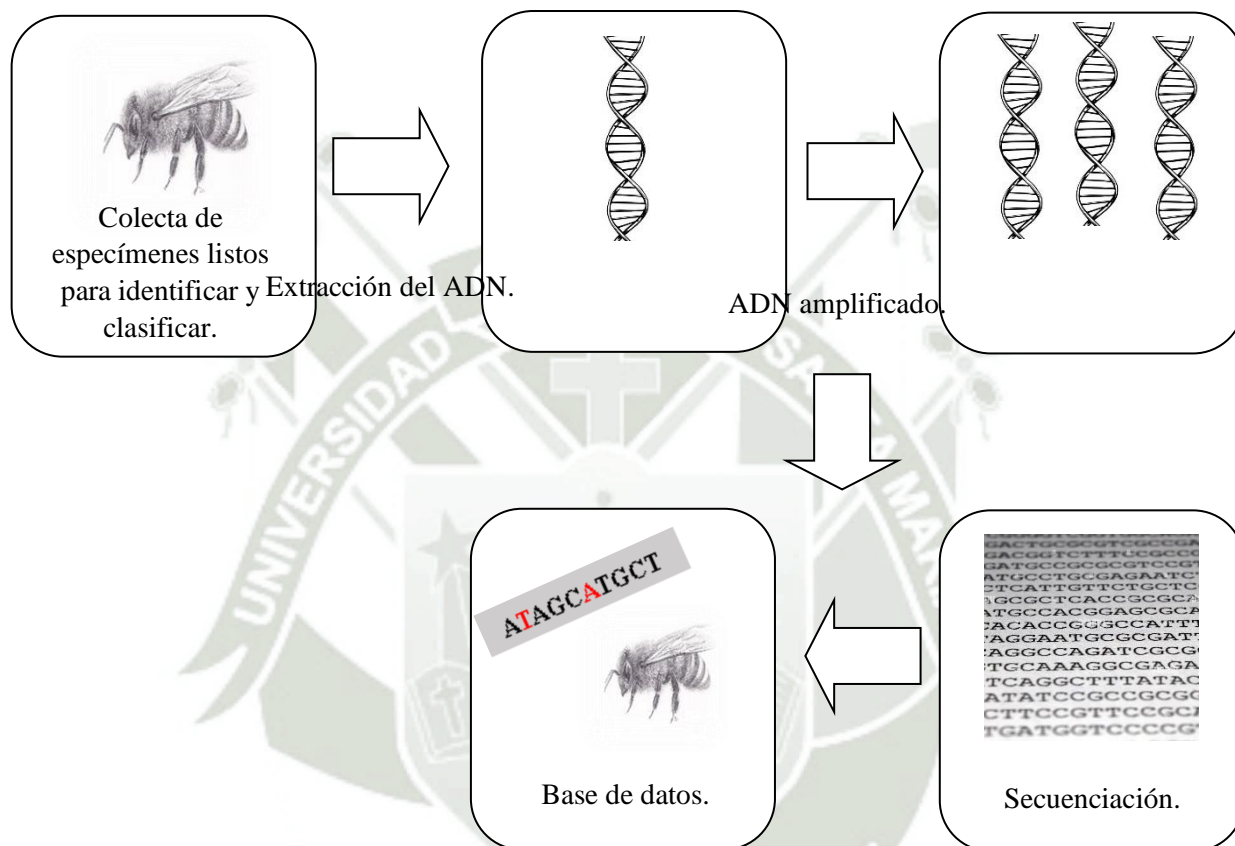


Figura 18. Procedimiento para realizar el *DNA barcoding*.

CAPITULO II

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Lugar de Ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio CGIA (Centro Genético de Investigación Apícola del Perú) de la empresa BEE PRODUCTS S.A.C. Arequipa (Vitor) – Perú.



Figura 19. Ubicación geográfica del laboratorio de inseminación artificial CGIA

1.2 Materiales

1.2.1 Material biológico

- Esperma de zángano
- Muestra de abejas

1.2.2 Reactivos químicos

- Suero fisiológico
- Buffer GST
- Proteinasa K
- Buffer GSB
- Etanol absoluto
- Buffer W1
- Wash Buffer
- Buffer de elución
- Etanol 70 %

1.2.3 Materiales de laboratorio

- Capilar de vidrio de 10 uL
- 2 lámparas pequeñas
- Cubreobjetos de 22 x 40
- Frasco de vidrio 30 mL
- Matraz 250 mL

1.2.4 Aparatos y equipos

- Microscopio digital 1920 x 1080P resolution- 300 x de zoom óptico (equipo de inseminación artificial) Schley
- Tanque de CO₂
- Gancho ventral
- Pinza para aguijón
- Depósito para la solución
- Estereoscopio EUROTECH – 405D
- Equipo de disección
- Centrifuga
- Vortex
- Micropipetas
- PCR
- Equipo de electroforesis

1.2.5 Software

- Programa de medición JMicrovision 1.3.4.v

1.2.6 Otros

- Rulero (transportador de reinas)
- Algodón
- Programa de medición ImageJ
- Microtubos eppendorf 1.5 mL
- Columnas GS

1.3 Métodos

1.3.1. Selección de colmenas

Se seleccionó 5 colmenas, de las cuales 2 de la genética abuelas, debido a que ellas otorgaron los huevos y larvas (cría) para la realización de la crianza de las reinas que serán sometidas a inseminación artificial en las colmenas criadoras, la obrera que se seleccionó de cada colmena es hija de madres extranjeras de genética chilena (G-CHI), ambas colmenas seleccionadas se representaron en referencia a registros de manejo llevados en el apiario en la tabla 4 y 5:

Tabla 4. Características de la colmena n°4

COLMENA N°4	
REINA FECUNDA	✓
GENÉTICA	(G-CHI)
NACIMIENTO	OCT – 2022
REINA ENUMERADA	N°31

Tabla 5. Características de la colmena n°8

COLMENA N°8	
REINA FECUNDA	✓
GENÉTICA	(G-CHI)
NACIMIENTO	OCT – 2022
REINA ENUMERADA	N°29

Se seleccionó las 3 colmenas restantes que de la genética padres, debido a que estas colmenas proporcionaron los zánganos para la fecundación de las reinas sometidas a inseminación artificial, en este caso se eligió dos obreras provenientes de cada colmena, de las cuales 2 colmenas poseen reinas hijas de madres de G-CHI fecundadas naturalmente por zánganos de la zona del apiario; por último, se elegirá a 1 colmena con una reina nieta de abuelas de genética de G-CHI fecundada naturalmente por zánganos de la zona del apiario, las tres colmenas seleccionadas se representarán en referencia registros de manejo en la tabla 6, 7 y 8:

Tabla 6. Características de la colmena n°27

COLMENA N°27	
REINA FECUNDA	✓
GENÉTICA	(HGCH-5)
NACIMIENTO	MAR – 2024
REINA ENUMERADA	SIN ENUMERAR

Tabla 7. Características de la colmena n°3

COLMENA N°3	
REINA FECUNDA	✓
GENÉTICA	(HGCH-11)
NACIMIENTO	MAR – 2024
REINA ENUMERADA	SIN ENUMERAR

Tabla 8. Características de la colmena n°6

COLMENA N°6	
REINA FECUNDA	✓
GENÉTICA	(HGCH-3)
NACIMIENTO	ENE – 2024
REINA ENUMERADA	SIN ENUMERAR

1.3.2 Evaluación del comportamiento de colmenas

Se evaluó el comportamiento de las 5 colmenas, se destapó la tapa sin la utilización de un ahumador (el humo reduce el nerviosismo en las abejas y además enmascara feromonas de alarma que emiten las abejas al ser atacadas desde fuera de la colmena) debido a que de esta manera se pudo identificar verdaderamente que colmenas tenían un comportamiento dócil, nervioso y agresivo. Se registró y se evaluó los datos obtenidos mediante la siguiente tabla 9:

Tabla 9. Escala de comportamiento de colmenas de abejas.

DÓCIL	NERVIOSO	AGRESIVO
Las abejas permanecen dentro de la colmena y no tienen intenciones de volar o querer picar al apicultor.	Las abejas comienzan a volar alrededor del apicultor y se pegan a su careta con intenciones de picar.	Las abejas pican al apicultor y lo persiguen varios metros de manera hostil.

1.3.3 Evaluación de la productividad de las colmenas

Se evaluó la productividad de miel de las 5 colmenas seleccionadas en un periodo de tiempo de 2 meses, se manejó la productividad mediante la cantidad de marcos llenados en la cámara de miel de cada colmena (alza localizada en el segundo piso) y se registró los datos mediante la escala de 1-8 marcos llenados por colmena. Se clasificó la productividad de las colmenas por la siguiente tabla 10:

Tabla 10. Escala de productividad de colmenas de abejas.

INEFICIENTE	MEDIANAMENTE PRODUCTIVA	PRODUCTIVA
Se detectó una cantidad de 1 a 2 marcos en la cámara de miel localizada en el segundo piso.	Se detectó una cantidad de 3 a 5 marcos en la cámara de miel localizada en el segundo piso.	Se detectó una cantidad de 6 a 8 marcos en la cámara de miel localizada en el segundo piso.

1.3.4 Análisis Morfométrico

El análisis morfométrico consistió en seleccionar 10 abejas obreras de las 5 colmenas a evaluar, contabilizando un total de 50 muestras, seguidamente las muestras fueron colocadas en frascos de vidrio ámbar de 30 mL con alcohol al 70% para su preservación, a continuación, se puede observar un ejemplo de recolección en la siguiente figura 20:

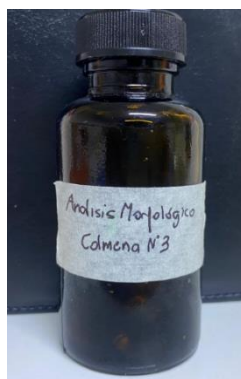


Figura 20. Frasco ámbar con 10 muestras de la colmena 3 (padre) y alcohol al 70%.

A continuación, se realizó la disección cuidadosamente del ala delantera derecha (extrayendo toda su parte completa) y de la pata posterior derecha, se tomó en cuenta como referencia las siguientes figuras 21 y 22:

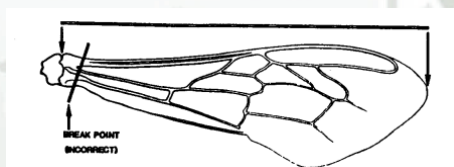


Figura 21. Medición correcta del ala de la abeja.

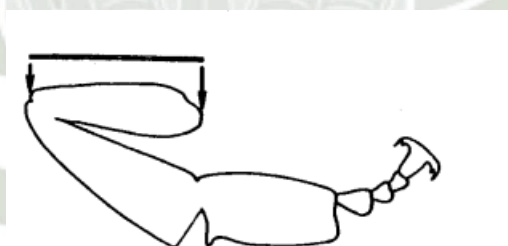


Figura 22. Medición correcta del fémur de la abeja.

El proceso de disección se realizó con la ayuda de un estereoscopio para poder visualizar bien el corte y para así evitar resultados falsos, a continuación, se puede observar el ala y fémur diseccionados en el lente del estereoscopio, presentado en la siguiente figura 23:

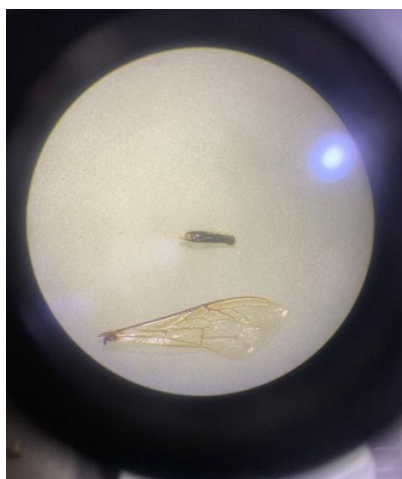


Figura 23. Visualización del ala y fémur correctamente diseccionados.

Seguidamente, ambas partes fueron colocadas en papel manteca junto con un vernier en pulgadas (inches), eso se realizó debido a que cuando se llevó la fotografía al programa JMicrovision v1.3.4. se pudo obtener una medida estándar con la ayuda del vernier, como se visualiza en la siguiente figura 24:

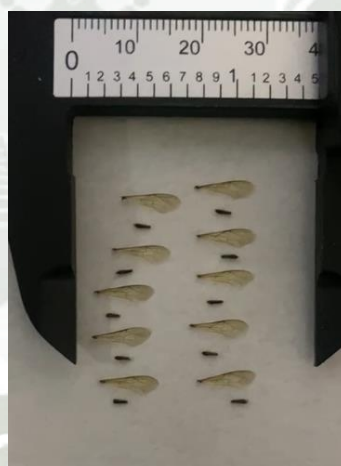


Figura 24. Alas y fémures colocados en papel manteca listos para la medición con el programa JMicrovision v1.3.4.

Este programa utilizó puntos en cada extremo de las muestras en pulgadas midiendo la longitud del fémur y del ala respectivamente, como se puede observar en la figura 25:

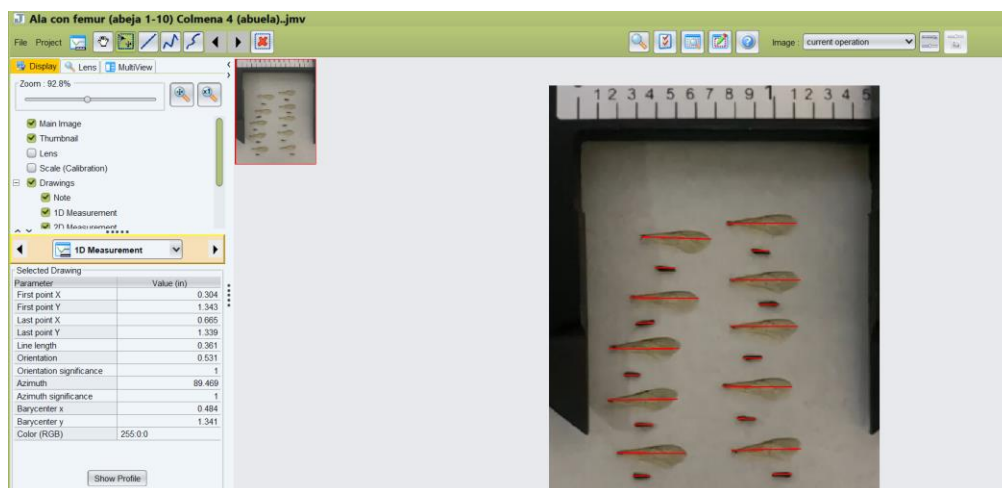


Figura 25. Calibración y uso del programa JMvision v1.3.4.

Finalmente, se transformó las pulgadas en milímetros y se hizo un promedio de las mediciones de cada muestra para comparar con los valores críticos de procedimiento discriminatorio de abejas africanizadas y europeas de *FABIS I*. Los valores críticos se observan en la tabla 11:

Tabla 11. Morfotipos de abejas africanizadas y europeas.

Morfotipo					
Africanizado		Abejas sospechosas		Europeo	
Ala interior derecha (mm)	Fémur posterior derecho (mm)	Alas de abejas sospechosas (mm)	Fémures de abejas sospechosas (mm)	Ala interior derecha (mm)	Fémur posterior derecho (mm)
<8.690	>2.099	8.691-9.030	0.564-2.098	>9.040	<0.563

Según *FABIS II*, si el promedio de longitud de alas es igual o se encuentra en el rango de cualquiera de los valores críticos antes mencionados, entonces el proceso fue dado como finalizado; sin embargo, los resultados de las muestras que estuvieron entre el rango de abejas sospechosas, fueron sometido al análisis de los fémures, de los cuales el promedio de los fémures de la colmena fue comparado con la siguiente fórmula:

$$INDICE = 71.6675 - (2.58472 \times PROM. LONG DE ALAS) - (18.065 \times PROM LONG. DE FÉMUR)$$

El promedio de la longitud de alas y longitud de fémures únicamente es de las abejas que fueron reconocidas como sospechosa. Este índice discriminatorio, nos ayudó a determinar la diferencia entre las abejas europeas (*Apis mellifera lingüística*) y las africanizadas (*Apis mellifera scutellata*); sin embargo, el resultado puede concluir también como abejas sospechosas.

1.3.5. Análisis molecular (*DNA barcoding*)

1.3.5.1. Elección de colmenas

Se seleccionó las mismas colmenas del paso de análisis morfométrico para que exista una correlación entre los resultados, de las cuales se realizó el análisis molecular por el método *DNA barcoding* a 8 muestras (obreras), 2 provenientes de la genética abuela (colmena n°4 y colmena n°8) las cuales fueron encargadas de brindar los huevos y larvas para la crianza de las futuras reinas y las otras 6 muestras se extrajeron de la genética padres (colmena n°27, colmena n°3, colmena n°6) que fueron encargadas de brindar los zánganos para la inseminación artificial de las reinas.

1.3.5.2. Recolección y preservación de las muestras

Las muestras se recolectarán de las 5 colmenas antes mencionadas en 5 frascos de color ámbar y con una capacidad de 30 mL y con alcohol al 70% para conservar el material genético, seguidamente se protegerá la tapa con cinta Parafilm para asegurar el transporte y se procederá a rotular correctamente con información vital como la fecha de recolección, el número de muestra, la colmena de donde proviene y por último la genética (55).

1.3.5.3 Obtención del material genético

1.3.5.3.1 Extracción de ADN genómico

El aislamiento del ADN genómico de las abejas (obreras) se llevó a cabo en la empresa BTS Consultores SAC debido a que no se contaban con los equipos y condiciones en CGIA, se siguió el protocolo detallado del gSYNC™ DNA Extraction Kit (GS004, Geneaid) (55).

Este método aseguró la obtención de ADN de alta calidad para su posterior análisis de barcoding. A continuación, se describe el procedimiento:

1.3.5.3.2. Preparación de la muestra

Se preparó la cabina de flujo laminar para mantener aséptico en todo momento la obtención del material genético, seguidamente se extrajo únicamente hasta 50 mg de tejido de la muestra de abejas, debido a que un valor mayor > 50 podría saturar a la columna de centrifugación. La parte que se seleccionó fueron las 6 patas completas de las 8 muestras de las abejas que fueron colocadas en un microtubo de 1.5 mL y se rotuló en la parte lateral y superior dependiendo de donde provenga la muestra. Se añadió 200 μ L de Buffer GST y se molió lo mayor posible las patas con un micropistilo dentro del microtubo. Se llevó a una centrifugación rápida para que la parte sólida se separe de la líquida y se añadió la proteinasa K y se mezcló por vortex durante 10 segundos.

Por último, se incubó a 60°C durante 2 horas aproximadamente hasta que el lisado deje de estar turbio y se aclare, cada 15 minutos se invirtió el tubo ocasionalmente para garantizar la homogeneidad en todas las muestras (55).

1.3.5.3.3. Lisis celular

Como se observó material insoluble, se centrifugó de 1-5 minutos (dependiendo de la cantidad de restos insolubles) a $14-16,000 \times g$ (fuerza de centrífuga relativa) y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se agregó 200 μ L de Buffer GSB y agitó vigorosamente durante 10 segundos para asegurar una solución homogénea (55).

1.3.5.3.4. Unión del ADN

Añadió 200 μ L de etanol absoluto (grado molecular) al lisado de la muestra y se mezcló inmediatamente en el vortex durante 10 segundos, seguidamente se transfirió toda la mezcla a una Columna GS, aproximadamente de 600-700 μ L que es el volumen máximo de la columna, posteriormente se centrifugó a $14-16,000 \times g$ durante 1 minuto, se aumentó el tiempo de centrifugado hasta que pase la solución completamente a través de la membrana de la Columna GS, finalmente se descartó el tubo de colección que contiene el sobrenadante y se transfirió la Columna GS a uno nuevo tubo de colección (55).

1.3.5.3.5. Lavado

Se agregó 400 μ L de Buffer W1 a la Columna GS y se centrifugó a $14-16,000 \times g$ durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado agregando

600 μ L de Wash Buffer, se centrifugó y luego se secó la matriz de la columna durante 3 minutos a 14-16,000 x g (55).

1.3.5.3.6. Elución del ADN

Se transfirió la Columna GS seca a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 100 μ L de Buffer de Elución (despegar el ADN de la membrana de sílica) precalentado al centro de la matriz de la columna; por último, se centrifugó a 14-16,000 x g durante 30 segundos para la elución del ADN purificado (55).

1.3.5.4. Amplificación por PCR

En la región 485 pb del gen citocromo b se hizo la amplificación, la cual utilizó la técnica de PCR convencional, según el trabajo realizado por Gomez J. et al, se utilizó los oligonucleotidos CytbA-F (5'TATGTACTACCATGAGGACAAATATC) y CytbA-R (5'ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT) a una concentración final de 10 μ M, una temperatura de annealing de 48°C y con la enzima Taq DNA Polymerase (High Purity) de BioBasic. Según el trabajo de Gomez J. et al, para la amplificación se utilizó un equipo termociclador de la marca BIOER y se programó las siguientes condiciones de corrida: 94 °C (2 min), seguida por 30 ciclos 94 °C (1 min), 50 °C (1 min) y 72 °C (1 min), después del ciclo final 72 °C (7 min) (64).

La amplificación generó productos específicos que se pueden verificar mediante electroforesis en gel de agarosa, comparando con un marcador de peso molecular. El análisis de la cantidad y calidad de los productos de ADN amplificados se evaluó tal como se detalla en el punto 1.3.4.4 (55).

1.3.5.5. Evaluación de calidad y cantidad de ADN

1.3.5.5.1. Electroforesis en gel agarosa

La evaluación de la calidad del ADN extraído se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa, permitiendo una visualización de la integridad y tamaño del ADN obtenido, para ello se realizó la preparación del gel de agarosa al porcentaje adecuado según las especificaciones del experimento.

Se realizó la carga de los pocillos con un marcador de peso molecular y las muestras de ADN extraído diluido en el tampón de carga y el Loading Dye. La electroforesis se realizó a 90V por 50 minutos, seguidamente se visualizó la migración de las bandas de ADN y la comparación con el marcador de peso molecular para determinar

el tamaño aproximado del ADN extraído. Las imágenes del gel se registraron y documentaron mediante un transiluminador de luz UV Fast Gene y una cámara fotográfica para el análisis posterior (55). Los resultados se evidenciaron en la siguiente figura 26:

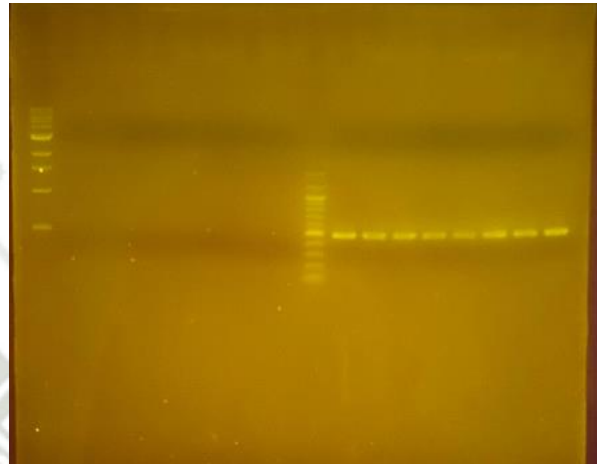


Figura 26. Bandas de ADN en la posición 485 pb.

Se cargó correctamente la muestra en el gel agarosa, en el primer carril se observa el marcador del peso molecular con tamaño conocido de 1000 pb, en la escalera se observa una marca en la posición 500 pb; por lo cual, de las 8 extracciones de ADN realizadas, están presentes en la altura correcta debido a que la posición que se esperaba es de 485 pb, la primera banda es la muestra de la colmena número 4 (abuela), seguidamente, la colmena número 8 (abuela), la colmena número 27 (padre), la colmena número 27 (padre), la colmena número 3 (padre), la colmena número 3 (padre), la colmena número 6 (padre) y finalmente la colmena número 6 (padre).

1.3.5.6. Secuenciación

Los productos amplificados por PCR se enviaron a un laboratorio especializado en secuenciación embalado y sellado correctamente por vía aérea, el servicio de secuenciación es tercerizado y confidencial, el procedimiento se llevó a cabo utilizando la tecnología Sanger.

Se obtuvo la secuenciación por Sanger tanto del Forward como del Reverse de mis secuencias analizadas, y se armaron los Contig en el programa BioEdit alineando ambas secuencias para corregir errores y asegurar la correcta orientación, empalmado ambas secuencias para obtener una secuencia completa y continua.

Finalmente, la secuenciación permitió obtener la secuencia de nucleótidos del marcador genético amplificado, facilitando su identificación y análisis posterior para el proceso de barcoding.

1.3.6 Obtención y recolección del esperma de zángano

Se obtuvo esperma de zánganos 14/15 días después de su nacimiento debido a que es la edad de su madurez sexual y producción de semen, al momento de seleccionar los zánganos que se usaron para la inseminación artificial, se giró su cabeza y se decapitó, expulsando su órgano reproductor y junto con eso el esperma y moco.

Se seleccionó de una manera cuidadosa el esperma (destacó por tener un color marmoleado) sin tocar el moco (color blanquecino) para no contaminar el esperma recolectado, cada zángano puede dar aproximadamente 1,4 uL de esperma, para nuestra recolección y correcta inseminación, se recolectó 8 uL de semen de zángano con el capilar de vidrio de 10 uL el cual estuvo conectado con la jeringa Harbo (jeringa micrométrica) para poder regular la recolección, cada vez que se terminó de extraer semen de un zángano, se colocó una cantidad mínima de suero fisiológico para evitar que el semen se seque dentro del capilar, se continuó con esta recolección hasta que se observe el capilar casi lleno. Como se puede observar en la figura 27:



Figura 27. Extracción del semen de zángano.

1.3.7 Elección e inseminación artificial de la reina

Una vez que se hayan obtenido todos los resultados, se eligió una abuela y un padre para la inseminación artificial, los más dóciles, productivos y libres de africanización y/o con menor porcentaje de africanización.

Se preparó el equipo de inseminación artificial, se abrió la llave del tanque de CO₂, y se ajustó a una presión no mayor a 40 para colocar a la reina en el ducto ventral aproximadamente a 45° boca abajo suministrando CO₂ constantemente para anestésiarla.

Una vez realizado esto, se procedió a encender el microscopio digital modelo Andonstar y se calibró hasta poder ver una imagen nítida del abdomen de la reina, con el gancho ventral y la pinza se logró una abertura de los órganos sexuales, el gancho ventral sostuvo una parte del abdomen de la reina, mientras que la pinza jaló hacia un extremo y sostuvo el aguijón de la reina.

Se procedió a colocar el capilar unido a la jeringa Harbo al órgano sexual expuesto y se introdujo con mucho cuidado evitando tocar el pliegue valvular y con el movimiento de la jeringa Harbo se introdujo el semen recolectado, el cual ingresó por la vagina y el oviducto mediano y llenó la glándula del espermateca de la reina, proceso que se visualiza en la figura 28:



Figura 28. Introducción del semen recolectado de zánganos.

Cuando se culminó con la introducción del esperma, se cerró el abdomen de la reina y se procedió a colocarla en un ruler con un algodón para llevarla al fecundador. Finalmente se hizo un control semanal de la postura de la reina en el fecundador elegido, presentado en la siguiente figura 29:



Figura 29. Fecundador número 185.

La postura demoró aproximadamente entre 10 a 15 días, confirmando con éxito la inseminación artificial y otorgando unas crías con las características ideales de docilidad y productividad.

CAPITULO III

1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1 Temperamento de las colmenas

Se preparó al apicultor con las debidas prevenciones para comenzar la evaluación del temperamento de las colmenas seleccionadas, como ya se mencionó, cada una de estas colmenas se destapó sin la utilización de un ahumador, en la figura 30 se observó la colmena padre n°27 con una reina hija sin enumerar de una de G-CHI nacida en el mes de marzo del presente año, se pudo observar que esta colmena es dócil, debido a que las abejas permanecieron dentro de la colmena al momento de destaparlo y mover los marcos, no tuvo intenciones de volar o querer picar al apicultor que hacía el trabajo.



Figura 30. Colmena padre n°27 destapada en la cámara de cría.

En la figura 31 se observa la colmena padre n°3 con una reina hija sin enumerar de una de G-CHI nacida en el mes de marzo del presente año, se pudo observar que esta colmena es dócil, debido a que las abejas permanecieron dentro de la colmena al momento de destaparlo y mover los marcos, no tuvo intenciones de volar o querer picar al apicultor que hacía el trabajo.



Figura 31. Colmena padre n°3 destapada en la cámara de cría.

En la figura 32 se observa la colmena padre n°6 con una reina nieta sin enumerar de una abeja reina de G-CHI nacida en el mes de enero del presente año, se especuló que esta colmena podría ser nerviosa o agresiva, debido a que la reina presente no es una reina hija directamente de una de G-CHI, sino una nieta, se pudo observar que esta colmena es nerviosa, debido a que las abejas comenzaron a volar alrededor del apicultor y se pegaron a su careta con intenciones defensivas y de querer picar.



Figura 32. Colmena padre n°6 destapada en la cámara de cría.

En la figura 33 se observa la colmena abuela n°8 con una reina enumerada n°29 de G-CHI nacida en el mes de octubre del año 2022, se pudo observar que esta colmena es dócil, debido a que las abejas permanecieron dentro de la colmena al momento de destaparlo y mover los marcos, no tuvo intenciones de volar o querer picar al apicultor que hacía el trabajo.



Figura 33. Colmena abuela n°8 destapada en la cámara de cría.

En la figura 34 se observa la colmena abuela n°4 con una reina enumerada n°31 de G-CHI nacida en el mes de octubre del año 2022, se pudo observar que esta colmena es dócil, debido a que las abejas permanecieron dentro de la colmena al momento de destaparlo y mover los marcos, no tuvo intenciones de volar o querer picar al apicultor que hacía el trabajo.



Figura 34. Colmena abuela n°4 destapada en la cámara de cría.

El temperamento de las colmenas fue variado en 20%, debido a que de las 5 colmenas de las cuales se realizó la revisión de temperamento, únicamente la colmena número 6 resultó ser nerviosa en comparación con las demás que resultaron dóciles, la escala de temperamento de las colmenas se puede visualizar en la siguiente tabla 12:

Tabla 12. Registro de temperamento de colmenas seleccionadas.

Escala	Número de colmenas	%
Dócil	4	80.00
Nerviosa	1	20.00
Agresiva	0	00.00
TOTAL	5	100.00

Según Vásquez O (56), en un estudio que se llevó a cabo en la ciudad de Chiclayo, Lambayeque – Perú, se registraron el temperamento de 10 muestras de las colmenas en la Universidad Cesar Vallejo, de las cuales el 33.33% fueron clasificadas como agresivas y el 53.33% fueron clasificadas como muy agresivas, haciendo un total de 86.66% de temperamento agresivo en abejas criollas, lo cual represente un gran porcentaje de agresividad comparado con el resultado de 0% en el estudio realizado previamente, debido a que según la escala la colmena no fue clasificada como agresiva, sino como nerviosa, teniendo un comportamiento ligeramente más tranquilo que el agresivo, la gran diferencia que se observa es debido a que en el norte del Perú existe más porcentaje de africanización, debido a que la abeja africanizada está más adaptada a un clima cálido y húmedo. El registro de los comportamientos se vio evidenciado en esta tabla 13:

Tabla 13. Registro de temperamento de abejas criollas.

Escala	Número de colmenas	%
Muy Dócil	0	0.00
Dócil	0	0.00
Poco dócil	2	13.33
Agresiva	5	33.33
Muy agresiva	8	53.33
TOTAL	15	100.00

Nota: Tomado de Vásquez O. (2016) (56).

Según Benavidez R (57), en un estudio que se llevó a cabo en la ciudad de Managua - Nicaragua, demuestra que las abejas de los distintos apiarios muestreados presentan un grado de defensividad medio exceptuando el apiario de mateares que presento un grado de defensividad muy agresivas; así mismo, en comparación con la escala que se realizó en este estudio, se contabilizó el número de agujones y la distancia que siguieron al observador, y su escala se realizó por la siguiente clasificación: (D)

Dócil: No pican, solamente sobre vuelan alrededor de la colmena, (PD) Poco dócil: Reaccionan cuando se realizan movimientos bruscos, (A) Agresiva: Reaccionan al momento del manejo de la colmena, (MA) Muy agresiva: Gran cantidad de abejas volando al momento de revisión y número alto de agujijones dejados en los guantes. Colmenas de los cuatro departamentos muestreados presentaron una fortaleza alta con un promedio de 42.86% pertenecen a categoría I es decir colmenas con fortaleza alta. En comparación con nuestros resultados obtenidos del temperamento, el estudio anteriormente mencionado demostró que en 3 apiarios se obtuvo una escala agresiva y un apiario con una escala muy agresiva; así mismo, en comparación con nuestro estudio, se obtuvo 0% de agresividad, por lo cual descartamos una de las características principales de la *Apis mellifera scutellata* la cuál es la agresividad.

1.2 Productividad de las colmenas

Se evaluó la productividad de miel de las 5 colmenas seleccionadas) y se registró los datos mediante la escala de 1-8 marcos llenados por colmena. Se clasificó la productividad de las colmenas por la escala anteriormente mencionada en el punto 1.3.3.

En la figura 35 y 36 se visualiza la colmena número 27 proveniente de la genética padres en el cual se muestra un marco lleno de miel en su totalidad, por lo cual se tendrá en cuenta este como referencia para registrar el número total de marcos llenados en la cámara de miel.



Figura 35. Marco de miel de la colmena padre n°27.



Figura 36. Número total de marcos llenados de miel.

Se logró registrar un total de 6 marcos llenados en la colmena número 27 en la cámara de miel, por lo cual, según la escala anteriormente mencionada, la colmena se determinó como productiva debido a que se detectó una cantidad igual a los 6 marcos.

En la figura 37 y 38 se visualiza la colmena número 3 proveniente de la genética padres en el cual se muestra un marco lleno de miel en su totalidad, por lo cual se tendrá en cuenta este como referencia para registrar el número total de marcos llenados en la cámara de miel.



Figura 37. Marco de miel de la colmena padre n°3.



Figura 38. Número total de marcos llenados de miel.

Se logró registrar un total de $5 \frac{1}{2}$ marcos llenados en la colmena número 3 en la cámara de miel, por lo cual, según la escala anteriormente mencionada, la colmena se determinó como medianamente productiva debido a que se detectó una que no igualó ni superó los 6 marcos como se pudo observar en la revisión.

En la figura 39 y 40 se visualiza la colmena número 6 proveniente de la genética padres en el cual se muestra un marco lleno de miel en su totalidad, por lo cual se tendrá en cuenta este como referencia para registrar el número total de marcos llenados en la cámara de miel.



Figura 39. Marco de miel de la colmena padre n°6.

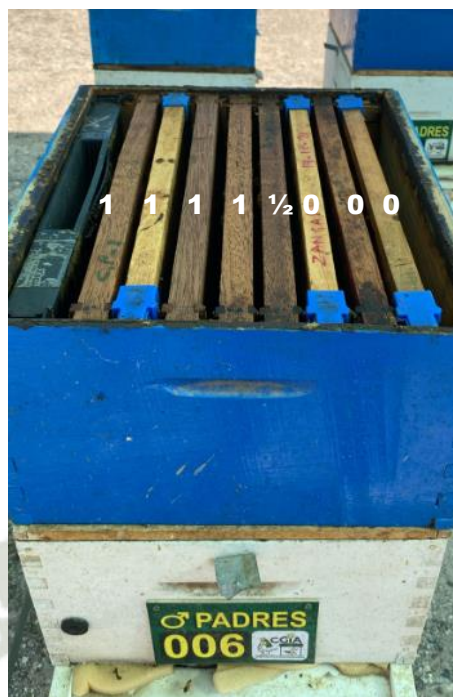


Figura 40. Número total de marcos llenados de miel.

Se logró registrar un total de 4 ½ marcos llenados en la colmena número 6 en la cámara de miel, por lo cual, según la escala anteriormente mencionada, la colmena se determinó como medianamente productiva debido a que se detectó una cantidad superior a los 3 marcos; sin embargo, no pudo sobrepasar los 5 marcos de miel llenados en la cámara de miel localizada en el segundo piso, siendo esta la colmena con menos productividad de miel de la genética padres.

En la figura 41 y 42 se visualiza la colmena número 4 proveniente de la genética abuelas en el cual se muestra un marco lleno de miel en su totalidad, por lo cual se tendrá en cuenta este como referencia para registrar el número total de marcos llenados en la cámara de miel.



Figura 41. Marco de miel de la colmena abuela n°4.



Figura 42. Número total de marcos llenados de miel.

Se logró registrar un total de 7 marcos llenados en la colmena número 4 en la cámara de miel, por lo cual, según la escala anteriormente mencionada, la colmena se determinó como productiva debido a que se detectó una cantidad superior a los 6 marcos de miel, siendo la colmena más productiva de la genética abuelas y también incluyendo de la genética padres.

En la figura 43 y 44 se visualiza la colmena número 8 proveniente de la genética abuelas en el cual se muestra un marco lleno de miel en su totalidad, por lo cual se tendrá en cuenta este como referencia para registrar el número total de marcos llenados en la cámara de miel.



Figura 43. Marco de miel de la colmena abuela n°8.



Figura 44. Número total de marcos llenados de miel.

Se logró registrar un total de $5 \frac{1}{2}$ marcos llenados en la colmena número 8 en la cámara de miel, por lo cual, según la escala anteriormente mencionada, la colmena se determinó como medianamente productiva debido a que se detectó una cantidad entre los rangos 3 a 5 marcos llenados; sin embargo, no alcanzó el rango para determinarla como una colmena productiva.

La cantidad de miel que puede producir un marco lleno depende de varios factores, incluyendo el tipo de colmena, la temporada, el tiempo, y el estado de salud de la colonia; sin embargo, para esta comparación que se realizó se tomó en cuenta que todas las colmenas se encontraban en una misma zona y en un periodo de tiempo de 2 meses, por lo tanto con la misma cantidad de floración; además, se realizó un manejo previo con 2 semanas de anticipación a la medición de la productividad de las colmenas, para que todas tengan la misma condición de salud; por último, todas las colmenas son multi-hive, por lo cual todas se encontraron con las mismas condiciones de manejo, ambientales y de sanidad. En general, un marco de cera (de tamaño estándar, como el Langstroth) lleno de miel puede contener un aproximado de 2 kilogramos de miel, un promedio de 2 kilogramos de miel por marco, en consecuencia, se realizó la siguiente tabla 14:

Tabla 14. Productividad por colmena del estudio

Productividad por colmena			
	Marcos llenos	Kg por colmena	Tipo
Colmena padre n°27	6	12	Productiva
Colmena padre n°3	5 ½	11	Medianamente productiva
Colmena padre n°6	4 ½	9	Medianamente productiva
Colmena abuela n°4	7	14	Productiva
Colmena abuela n°8	5 ½	11	Medianamente productiva

Según Magaña M. (58), la medición de productividad por colmena que realizó en diferentes estados de México fueron las siguientes:

Tabla 15. Productividad de colmenas en diferentes estados de México.

Referencia	Colmena (kg)
Promedio est.	29.1
Campeche	30.4
Chiapas	25.4
Guerrero	24.8
Jalisco	25.3
Quintana roo	30.6
Veracruz	36.6
Yucatán	35.6

Nota: Tomado de Magaña M, (2016) (58).

Se evidenció que la mayor productividad de miel fue en el estado de Veracruz con un total de 36.6 kg por colmena. El resultado obtenido en el presente estudio tiene una producción muy por debajo del anteriormente mencionado, siendo la colmena número 4 con un aproximado de 14 kg de miel; sin embargo, se tiene que tomar en consideración el territorio, la floración y el clima de las zonas en donde se encuentran las abejas, la joya es una zona muy calurosa y con poca floración debido a que es una zona casi desértica y únicamente se obtiene floración en base a riego por goteo, el tiempo de acopio de las colmenas, las colmenas en este estudio estuvieron únicamente 2 meses en el territorio de la joya, pero en el estudio de las colmenas en México – Veracruz, su periodo de acopio fue de 1 año; además, se debe de tomar en

cuenta la edad de la reina, la reina de la colmena número 4 nació en el mes de octubre del año 2022, mientras más joven sea una reina, más productividad de cría y miel tendrá la colmena; además, las colmenas de los diferentes estados de México son productoras, en otras palabras solo están dedicadas a la producción de miel; sin embargo, las colmenas evaluadas están destinadas a la producción de zánganos y reinas.

Según Beyene T. et al (59), en un estudio que se llevó a cabo en la ciudad de Adami Tulu en el país de Etiopía, demuestra que el rendimiento anual de las colmenas que fueron prueba de estudio, que fue de 23.18 kg por colmena moderna, la colmena de transición produjo un promedio de 13,88 kg por colmena, mientras que la colmena tradicional presentó una producción peso más ligera, alcanzando solo 6,08 kg de miel por colmena, un punto muy importante a considerar es que las abejas originarias de este país son africanas, por lo cual al hacer un estudio comparativo entre la colmena más productiva de este estudio (abuela número 4) y la colmena más productiva del estudio a que se está haciendo referencia, la productividad se consideraría casi igual; sin embargo, hay que considerar que en el estudio que se está haciendo referencia, utilizó colmenas modernas, en comparación con las del apiario donde se realizó el estudio, que fueron colmenas tradicionales; por lo tanto, las abejas europeas del estudio presentarían una mayor productividad en las mismas condiciones.

1.3 Análisis Morfológico

El análisis morfológico se realizó en 10 muestras de cada colmena tomando únicamente en consideración el ala anterior derecha y el fémur posterior derecho, ambos medidos en (mm) para todos los casos y se comparó utilizando los valores críticos del método *FABIS*, todos los valores se plasmaron en una tabla para obtener los promedios totales y compararlos con los valores críticos.

1.3.1 Colmena N° 6

Se puede observar las mediciones de la colmena padre número 6 realizadas en el programa JMicroVision v1.3.4, las cuales se tomaron valores en pulgadas (inch) para transformarlos en milímetros (mm). En la siguiente tabla 16 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 16. Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 6.

Colmena N°6			
	Longitud del ala (AD) (mm)	Longitud del fémur (PD) (mm)	Tipo
Muestra 1	8,5090	2,667	Africanizada
Muestra 2	8,9154	2,7432	Sospechosa
Muestra 3	9,1694	2,5146	Europea
Muestra 4	8,7884	2,6162	Sospechosa
Muestra 5	8,7376	2,54	Sospechosa
Muestra 6	8,4074	2,2098	Africanizada
Muestra 7	8,636	2,54	Africanizada
Muestra 8	9,1186	2,5908	Europea
Muestra 9	8,9154	2,5908	Sospechosa
Muestra 10	9,1186	2,794	Europea
Promedio	8,83158	2,58064	Sospechosa

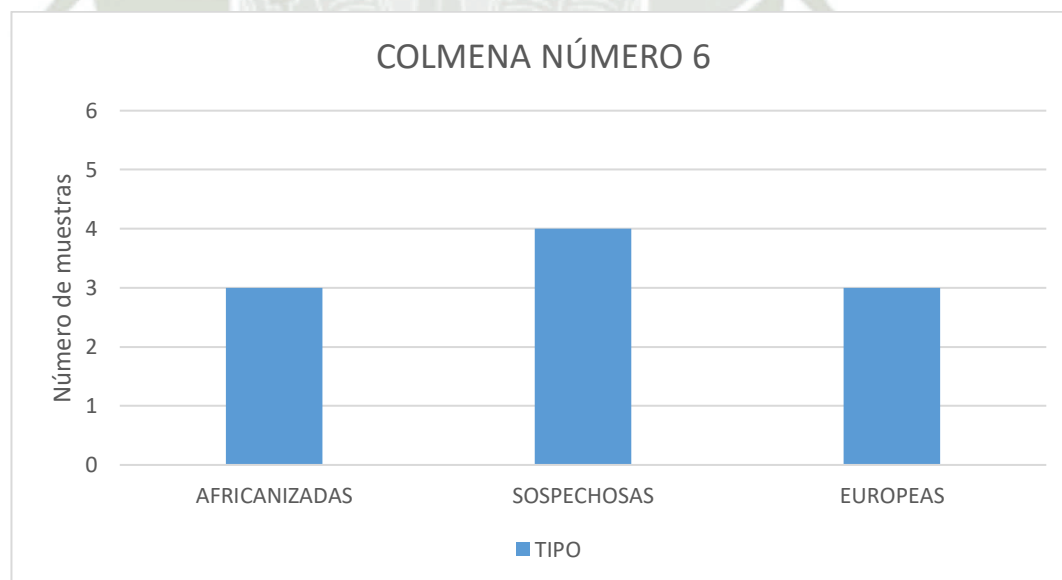


Figura 45. Resultados de africanización de la colmena número 6 con el método *FABIS I*.

Según los resultados del promedio de la longitud de alas, la colmena se determinó como sospechosa, debido a que se encontraron en el rango de 8.691 – 9,030, se

determinó que esta colmena presenta un 30% de africanización, finalmente las muestras que fueron determinadas como sospechosas fueron sometidas al análisis de los fémures (*FABIS II*) para descartar africanización utilizando la siguiente fórmula:

PROMEDIO DE LAS ALAS Y FÉMURES DE LAS SOSPECHOSAS

$$INDICE = 71.6675 - (2.58472 \times PROM. LONG DE ALAS)$$

$$- (18.065 \times PROM LONG. DE FÉMUR)$$

$$\text{Promedio de longitud de alas sospechosas} = \frac{(8,9154+8,7884+8,7376+8,9154)}{4} = 8,8392$$

$$\text{Promedio de longitud de fémures sospechosos} = \frac{(2,7432+2,6162+2,54+2,5908)}{4} = 2,6225$$

$$INDICE = 71.6675 - (2.58472 \times 8.8392) - (18.065 \times 2.6225) = 1.4442$$

Tabla 17. Determinación de la africanización mediante el método *FABIS II*.

MUESTRA	FÉMUR (mm)	ÍNDICE	TIPO
2	2,7432	1,4442	Sospechosa
4	2,6162	1,4442	Sospechosa
5	2,54	1,4442	Sospechosa
9	2,5908	1,4442	Sospechosa

Según los resultados, la colmena de genética padre número 6 resultó como sospechosa, no pudiendo identificar o cerciorar si es africanizada o europea.

1.3.2 Colmena N° 3

Se puede observar las mediciones de la colmena padre número 3 en la tabla 18 realizadas en el programa JMicroVision v1.3.4, las cuales se tomaron valores en pulgadas (inch) para transformarlos en milímetros (mm). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 18. Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 3.

Colmena N°3			
	Longitud del ala (AD) (mm)	Longitud del fémur (PD) (mm)	TIPO
Muestra 1	8,7740	2,286	Sospechosa
Muestra 2	8,7122	2,286	Sospechosa
Muestra 3	8,9662	2,4638	Sospechosa
Muestra 4	9,1948	2,5146	Europea
Muestra 5	8,763	2,5146	Sospechosa
Muestra 6	9,0424	2,6416	Europea
Muestra 7	9,2456	2,5654	Europea
Muestra 8	8,6109	2,7686	Europea
Muestra 9	8,8392	2,5908	Sospechosa
Muestra 10	9,2202	2,5908	Europea
Promedio	9,14256	2,5222	Europea

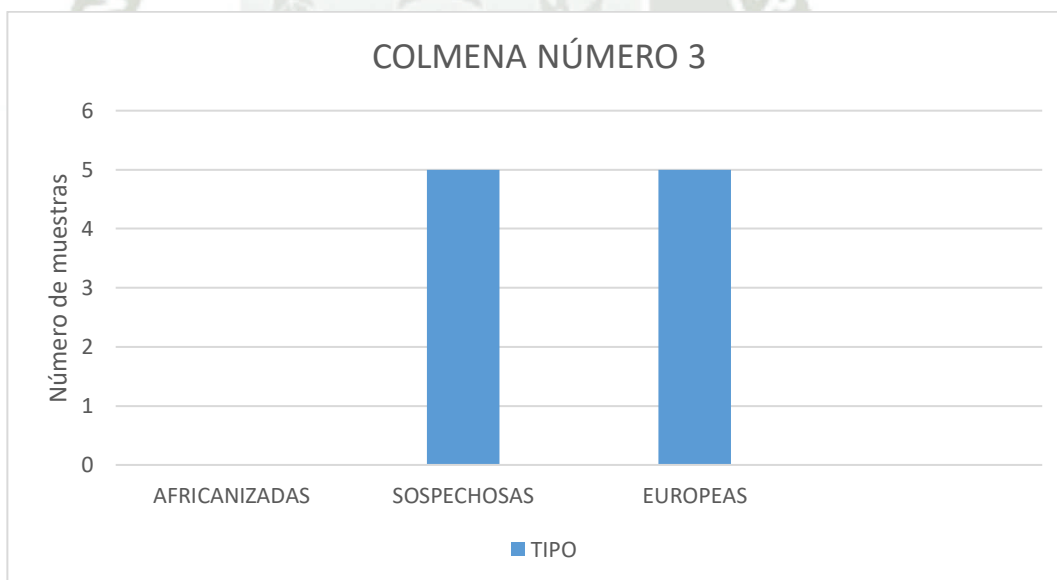


Figura 46. Resultados de africanización de la colmena número 3 con el método *FABIS I*.

Según los resultados del promedio de la longitud de alas, la colmena se determinó como europea, debido a que al hacer una comparación con los valores críticos se determinó que supero el valor de >9.040 , por lo cual la colmena esta apta para realizar el proceso de inseminación, en esta colmena no se determinó abejas africanizadas, por lo cual el porcentaje de africanización es del 0%.

1.3.3 Colmena N° 27

Se puede observar las mediciones de la colmena padre número 27 en la tabla 19 realizadas en el programa JMicroVision v1.3.4, las cuales se tomaron valores en pulgadas (inch) para transformarlos en milímetros (mm). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 19. Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 27.

Colmena N°27			
	Longitud del ala (AD) (mm)	Longitud del fémur (PD) (mm)	TIPO
Muestra 1	8,763	2,4384	Sospechosa
Muestra 2	8,763	2,5146	Sospechosa
Muestra 3	8,9154	2,6162	Sospechosa
Muestra 4	8,636	2,54	Africanizada
Muestra 5	9,0678	2,4892	Europea
Muestra 6	9,2202	2,413	Europea
Muestra 7	9,2202	2,4638	Europea
Muestra 8	9,0678	2,4892	Europea
Muestra 9	9,4488	2,4113	Europea
Muestra 10	9,4488	2,54	Europea
Promedio	9,0551	2,49157	Europea

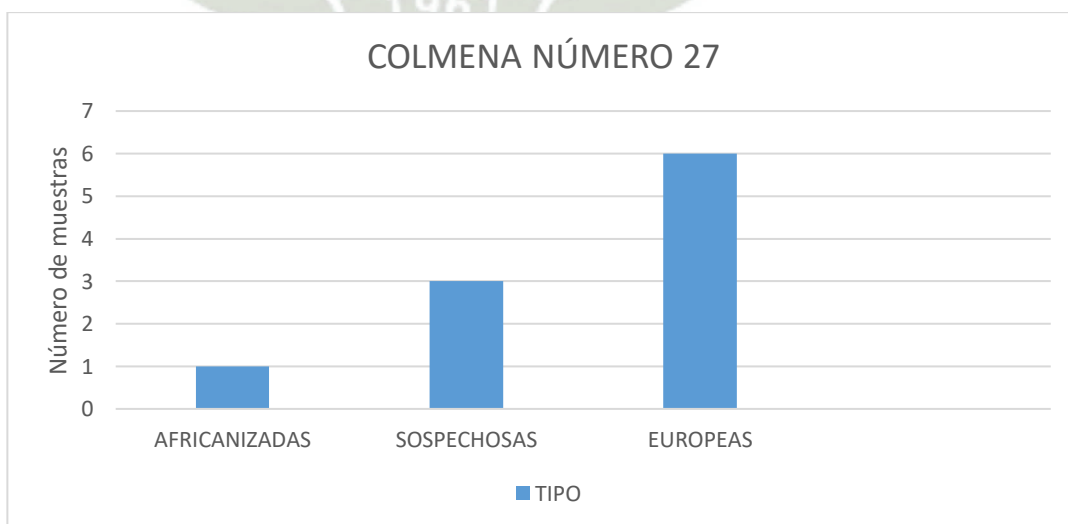


Figura 47. Resultados de africanización de la colmena número 27 con el método *FABIS I*.

Según los resultados del promedio de la longitud de alas, la colmena se determinó como europea, debido a que al hacer una comparación con los valores críticos se determinó que supero el valor de >9.040 , por lo cual la colmena esta apta para realizar el proceso de inseminación; sin embargo, en comparación con la colmena número 3, se determinó que hubo una abeja africanizada, que representa un 10% de africanización en la colmena.

1.3.4 Colmena N° 4

Se puede observar las mediciones de la colmena abuela número 4 en la tabla 20 realizadas en el programa JMicroVision v1.3.4, las cuales se tomaron valores en pulgadas (inch) para transformarlos en milímetros (mm). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 20. Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 4.

Colmena N°4			
	Longitud del ala (AD) (mm)	Longitud del fémur (PD) (mm)	TIPO
Muestra 1	9,1694	2,6416	Europea
Muestra 2	8,9916	2,4638	Sospechosa
Muestra 3	9,1694	2,1336	Europea
Muestra 4	9,1694	2,54	Europea
Muestra 5	8,9154	2,286	Sospechosa
Muestra 6	9,0678	2,4638	Europea
Muestra 7	9,0678	2,54	Europea
Muestra 8	8,8138	2,54	Sospechosa
Muestra 9	9,0678	2,4638	Europea
Muestra 10	9,0678	2,54	Europea
Promedio	9,05002	2,46126	Europea

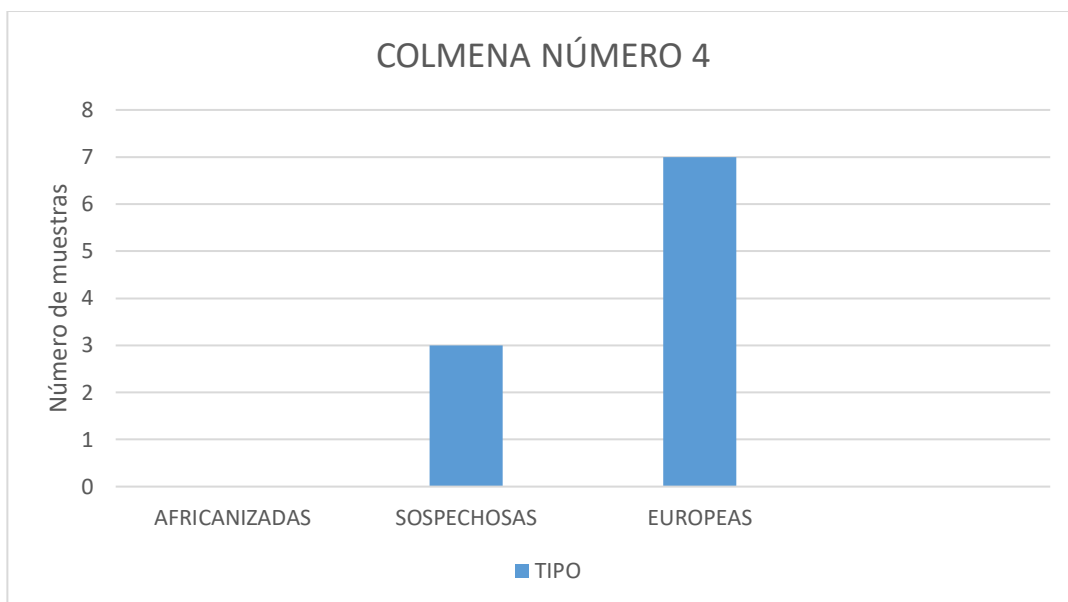


Figura 48. Resultados de africanización de la colmena número 4 con el método *FABIS I*.

Según los resultados del promedio de la longitud de alas, la colmena se determinó como europea, debido a que al hacer una comparación con los valores críticos se determinó que supero el valor de >9.040 , por lo cual la colmena esta apta para realizar el proceso de inseminación.

1.3.5 Colmena N° 8

Se puede observar las mediciones de la colmena abuela número 8 en la tabla 21 realizadas en el programa JMicroVision v1.3.4, las cuales se tomaron valores en pulgadas (inch) para transformarlos en milímetros (mm). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 21. Promedio total del número de muestras de longitudes de alas y fémures de la colmena 8.

Colmena N°8			
	Longitud del ala (AD) (mm)	Longitud del fémur (PD) (mm)	TIPO
Muestra 1	9,0424	2,413	Europea
Muestra 2	9,0424	2,4638	Europea
Muestra 3	9,2964	2,286	Europea
Muestra 4	9,2964	2,6162	Europea
Muestra 5	9,4488	2,54	Europea
Muestra 6	8,8392	2,4348	Sospechosa
Muestra 7	9,3726	2,3622	Europea
Muestra 8	9,2964	2,159	Europea
Muestra 9	9,5504	2,1082	Europea
Muestra 10	9,2202	2,6162	Europea
Promedio	9,24052	2,39994	Europea

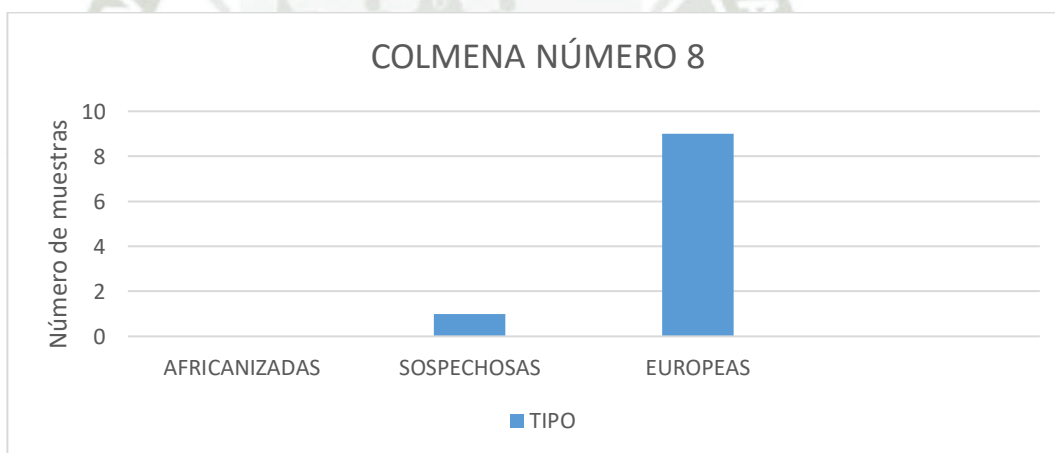


Figura 49. Resultados de africanización de la colmena número 8 con el método *FABIS I*.

Según los resultados del promedio de la longitud de alas, la colmena se determinó como europea, debido a que al hacer una comparación con los valores críticos se determinó que superó el valor de >9.040 , por lo cual la colmena está apta para realizar el proceso de inseminación.

Según Gutiérrez L. et al (60), se realizó un estudio en México, Baja California, en el que se analizaron 47 colonias en Mexicali y 34 en Ensenada, así como 11 enjambres silvestres migratorios en Mexicali y cuatro en Ensenada. Se escogieron 10 abejas de cada colonia y enjambre para medir la longitud del ala delantera y del fémur de la

pata trasera derecha, con el fin de distinguir entre morfotipos europeos y africanizados mediante la técnica morfométrica *FABIS*, como el análisis realizado en este estudio. Los resultados mostraron que en Mexicali el 91.49% de las colonias presentaron morfotipos africanizados, en contraste con el 67.65% en Ensenada. Esta variación en los niveles de africanización podría estar vinculada a las diferencias en condiciones climáticas, geográficas y prácticas de manejo, esto también explicaría el bajo nivel de africanización que se presentó en este estudio, ya que se obtuvo un 0% de identificación de africanización en las colmenas seleccionadas y un 20% se determinó como abejas sospechosas, de las cuales no se podría definir si son africanizadas o europeas; por último, el material genético de origen europeo es lo que más predomina en el apiario y anualmente se realiza un cambio de reinas para mantener este origen cuidadosamente seleccionado.

Tabla 22. Porcentaje de africanización en municipios de México.

Municipio	Número de colonias	Morfotipo	
		Africanizado	Europeo
Ensenada	34	67.65%	32.35%
Mexicali	47	91.49%	8.51%

Nota: Tomado de Gutiérrez L. et al. (2016) (60).

En comparación con los resultados obtenidos por Hernández C, los cuales se realizaron en Torreón – Coahuila, México, se analizaron 116 muestras de abejas obtenidas de apiarios en la Comarca Lagunera. Al utilizar el método *FABIS* I en las colmenas para identificar la presencia de abejas africanas, se pudo evidenciar en la totalidad de muestras, 103 pertenecen a abejas europeas, lo que corresponde a un 88.7%; además, se registraron 11 casos sospechosos, que representan el 9.4%, y 2 casos de abejas africanas, equivalentes al 1.7%, estos valores al compararlos con nuestro estudio nuevamente hay una diferencia significativa, debido a que de todas las colmenas que se hizo la evaluación en nuestro estudio hubo un 0% de africanización por colmena; sin embargo, el muestreo que se realizó en el estudio referenciado, es muy diferente al estudio realizado, ya que la colecta de las muestras no especifica exactamente de donde proviene cada muestra ni de que colmena se hizo la recolección, demostrando que este estudio tuvo una mayor organización y clasificación para el muestreo (61).

1.4 Análisis Molecular (*DNA BARCODING*)

1.4.1 Evaluación de calidad general de los resultados de secuenciación por SANGER

La siguiente tabla representa la evaluación de la calidad de los resultados en la secuenciación obtenida, las muestras fueron representadas por los siguientes códigos:

A1: Colmena número 4 (abuela)

A2: Colmena número 8 (abuela)

A3.1: Colmena número 27 (padre)

A3.2: Colmena número 27 (padre)

A4.1: Colmena número 3 (padre)

A4.2: Colmena número 3 (padre)

A5.1: Colmena número 6 (padre)

A5.2: Colmena número 6 (padre)

Tabla 23. Evaluación de calidad general de los resultados de secuenciación por SANGER.

Codigo	Organismo	Nombre de Amplicon	Tamaño de Amplicon	Q20	Q30	#pb
A1	Abeja	cytbA	485	439 (95,2%)	430 (93,3%)	461
A1	Abeja	cytbA	485	428 (93,2%)	422 (91,9%)	459
A2	Abeja	cytbA	485	436 (95,0%)	431 (93,9%)	459
A2	Abeja	cytbA	485	433 (94,1%)	423 (92,0%)	460
A3.1	Abeja	cytbA	485	433 (94,1%)	427 (92,8%)	460
A3.1	Abeja	cytbA	485	429 (94,1%)	424 (93,0%)	456
A3.2	Abeja	cytbA	485	434 (94,1%)	421 (91,3%)	461
A3.2	Abeja	cytbA	485	431 (94,7%)	423 (93,0%)	455
A4.1	Abeja	cytbA	485	436 (94,8%)	425 (92,4%)	460
A4.1	Abeja	cytbA	485	430 (94,3%)	423 (92,8%)	456
A4.2	Abeja	cytbA	485	438 (95,0%)	431 (93,5%)	461
A4.2	Abeja	cytbA	485	431 (94,3%)	423 (92,6%)	457
A5.1	Abeja	cytbA	485	438 (94,8%)	429 (92,9%)	462
A5.1	Abeja	cytbA	485	420 (92,1%)	414 (90,8%)	456
A5.2	Abeja	cytbA	485	438 (95,0%)	427 (92,6%)	461
A5.2	Abeja	cytbA	485	416 (95,2%)	413 (94,5%)	437

Como se pudo observar en la tabla se repiten 2 valores de cada muestra, esto es debido que para la secuenciación se realizó tanto para el primer forward, primer código de cada muestra, como para el reverse, segundo código de cada muestra, dentro de la secuenciación se está flanqueando las 2 cadenas, de 5' prima a 3' prima y de 3' prima a 5' prima.

Los valores de Q20 indican que la probabilidad de error en la lectura de una base específica es del 1% (es decir, hay una probabilidad del 99% de que la base esté correcta).

Los valores de Q30 indican que la probabilidad de error es del 0.1% (es decir, hay una probabilidad del 99.9% de que la base esté correcta), el Q30 es generalmente considerado como un nivel de calidad muy alto, lo que significa que las lecturas son bastante fiables.

Las muestras A1, A2, A3, A4 y A5 muestran consistentemente valores altos en Q20 y Q30, con la mayoría de las muestras superando el 90% en ambos parámetros, esto sugiere que las lecturas de secuenciación son muy precisas y confiables, el tamaño del amplicón es consistentemente de 485 pb, lo que indica que se ha secuenciado un fragmento específico del ADN mitocondrial de las abejas, correspondiente al gen *cytbA*. La cantidad de pares de bases (#pb) varía ligeramente entre las muestras, con valores que van desde 437 hasta 462 pb, estos son los pares de bases que se han logrado amplificar, es inusual que se obtenga la misma cantidad de pares de bases, debido a que se realizan posibles cortes al inicio de la secuenciación.

1.4.2 Resultados de BLASTn

Se tomaron en cuenta las secuencias tanto del forward como el reverse para formar una secuencia única denominada “contig”, para cada muestra se obtuvo una sola secuencia en el programa BioEdit, esta secuencia única se tomó en cuenta para la realización de la búsqueda en BLAST.

En la tabla se incluyen columnas como " Género, Puntuación máxima., Puntuación total, Recuperación de consultas (*Query Recover*), Valor E, Porcentaje de identidad, Longitud de la secuencia, Acceso". Estas columnas proporcionan información detallada sobre el grado de coincidencia de las secuencias de las muestras con las secuencias de referencia en la base de datos, lo que permite identificar la especie más cercana.

Se debe de tomar más en consideración los valores de Recuperación de Consultas (*Query Cover*) y el porcentaje de identidad:

Query Cover: Nos permite saber si la secuencia que se ha ingresado a BLAST tiene un 100% de reconocimiento con el resultado de BLAST, es decir, cada nucleótido tiene su match con otro.

Porcentaje de identidad: Indica si las secuencias que han hecho un match en el

resultado de la porción de la secuencia de los resultados de BLAST, tienen una similitud al *Query Cover*.

La mayoría de especies resultantes que hacen un match con la secuencia analizada pertenecen a la subespecie *Apis mellifera ligustica*, la cual es una abeja europea; sin embargo, se encontró otras entradas de otras subespecies.

A continuación, se representa los resultados de BLASTn de todos los contig desde el A1 hasta el A5.2 en las siguientes tablas y figuras:

Tabla 24. Resultados de BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A1.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	865	865	1	0.0	100.00%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	865	865	1	0.0	100.00%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	865	865	1	0.0	100.00%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	865	865	1	0.0	100.00%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	865	865	1	0.0	100.00%	477	MZ268403.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	865	865	1	0.0	100.00%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera carnica</i>	863	863	0,99	0.0	100.00%	476	JQ778297.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	859	859	1	0.0	99.79%	16336	AP018403.1

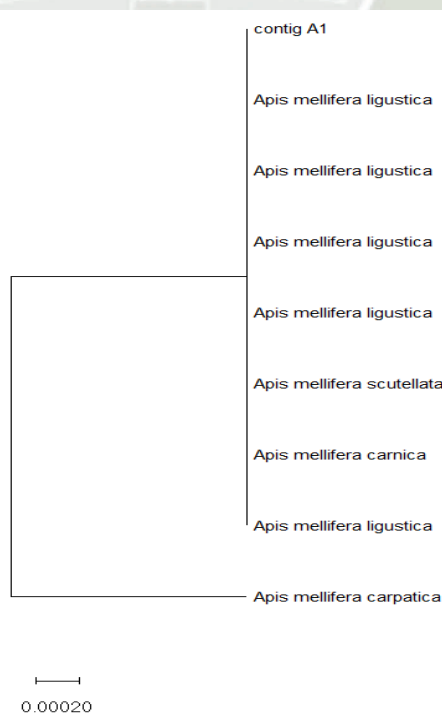


Figura 50. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A1.

Tabla 25. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A2.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	16336	AP018434.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	859	GU979492.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	870	870	0,98	0.0	99.58%	16336	AP018403.1

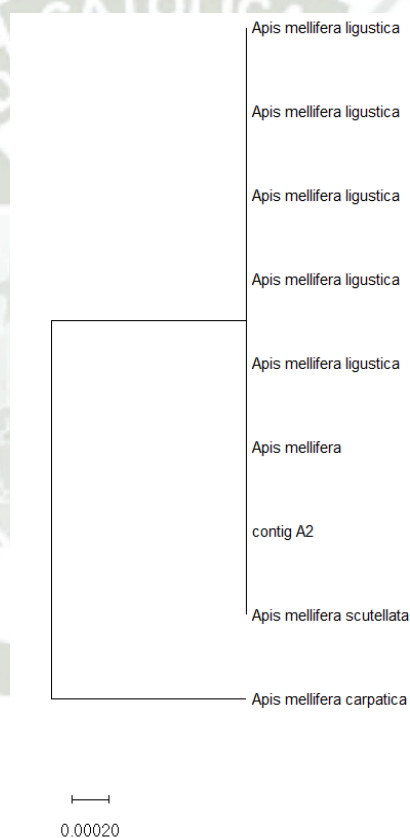


Figura 51. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A2.1

Tabla 26. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A3.1.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	15512	OM203330.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	859	GU979492.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	876	876	0,98	0.0	99.79%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	870	870	0,98	0.0	99.58%	16336	AP018403.1

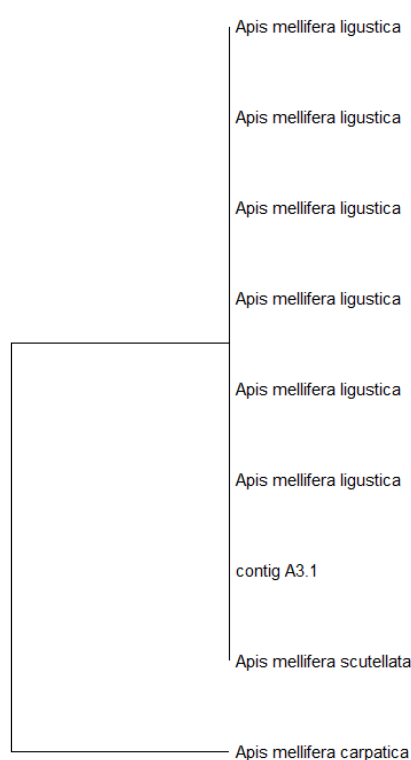


Figura 52. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A3.1.

Tabla 27. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A3.2.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	15512	OM203330.1
<i>Apis mellifera carnica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	476	JQ778297.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	859	GU979492.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	854	854	0,97	0.0	99.78%	16336	AP018403.1

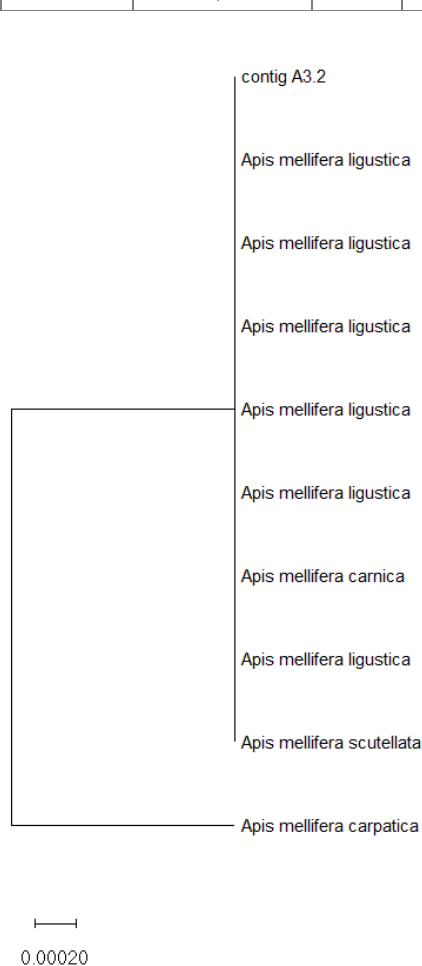


Figura 53. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A3.2.

Tabla 28. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A4.1.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera carnica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	476	JQ778297.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	859	859	0,97	0.0	100.00%	16343	NC_001566.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	854	854	0,97	0.0	99.78%	16336	AP018403.1

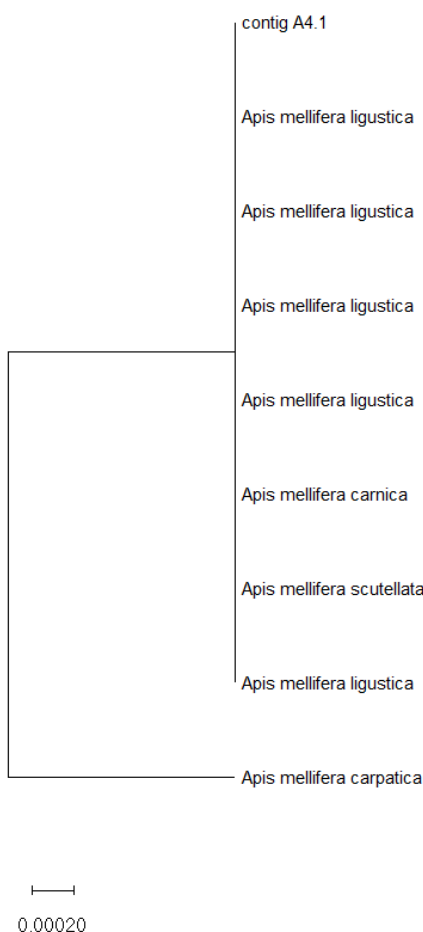


Figura 54. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A4.1.

Tabla 29. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A4.2.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	477	MZ268403.1
<i>Apis mellifera carnica</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	476	JQ778297.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	867	867	0,97	0.0	100.00%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	861	861	0,97	0.0	99.79%	16336	AP018403.1

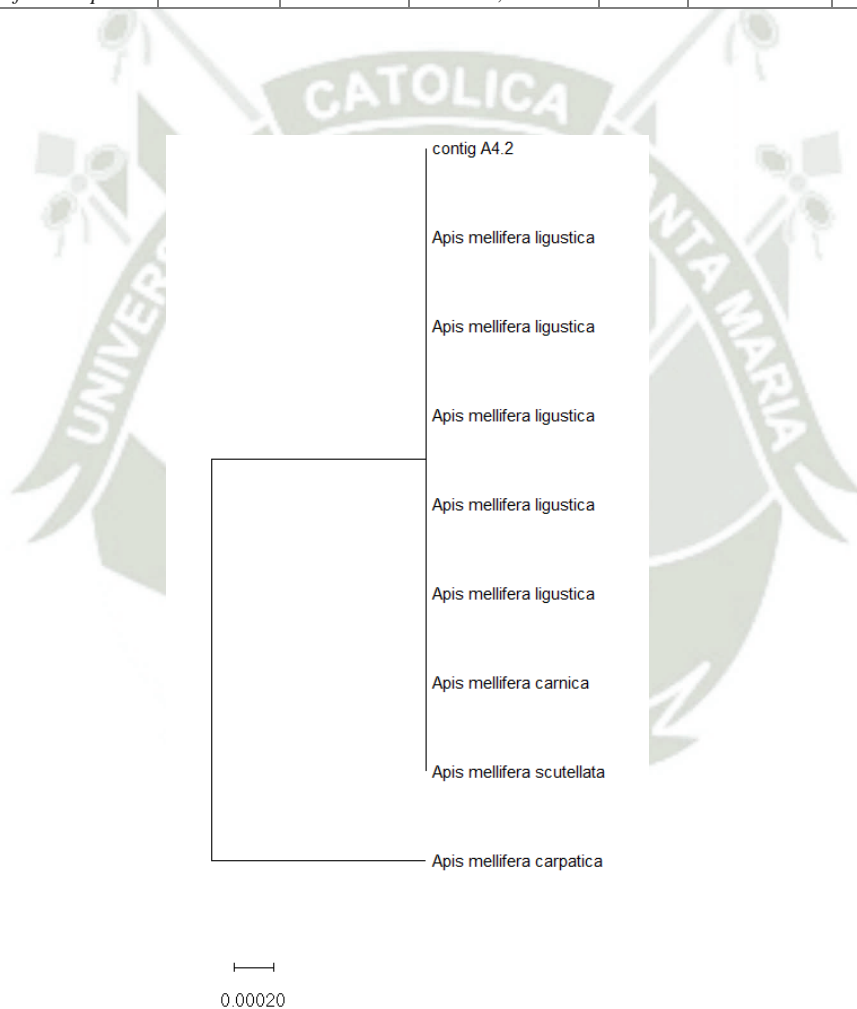


Figura 55. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A4.2.

Tabla 30. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A5.1.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera carnica</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	476	JQ778297.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	859	GU979492.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	848	848	0,98	0.0	100.00%	743	EF184040.1

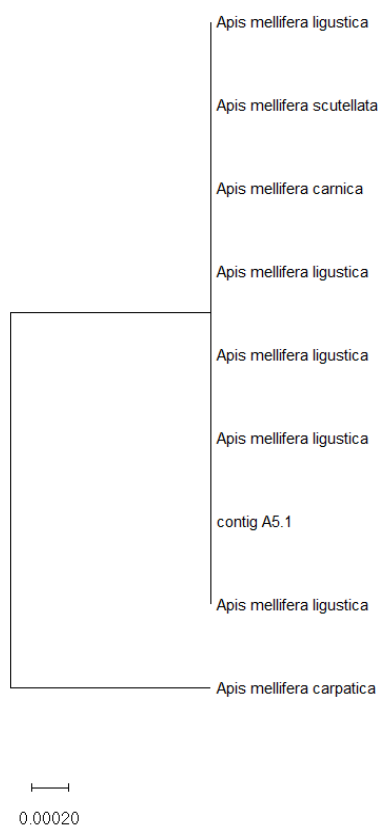


Figura 56. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A5.1.

Tabla 31. Resultados del BLASTn de especies relacionadas a la secuencia query contig A5.2.

Género / Especie	Puntuación máxima	Puntuación total	Recuperación de consultas (Query Recover)	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud de la secuencia	Acceso
<i>Apis mellifera ligustica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	16449	MH341407.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	16465	KX908209.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	15514	OM203344.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	15504	OM203331.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	477	MZ268403.1
<i>Apis mellifera carnica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	476	JQ778297.1
<i>Apis mellifera ligustica</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	859	GU979492.1
<i>Apis mellifera scutellata</i>	857	857	0,96	0.0	100.00%	743	EF184040.1
<i>Apis mellifera carpatica</i>	852	852	0,96	0.0	99.78%	16336	AP018403.1

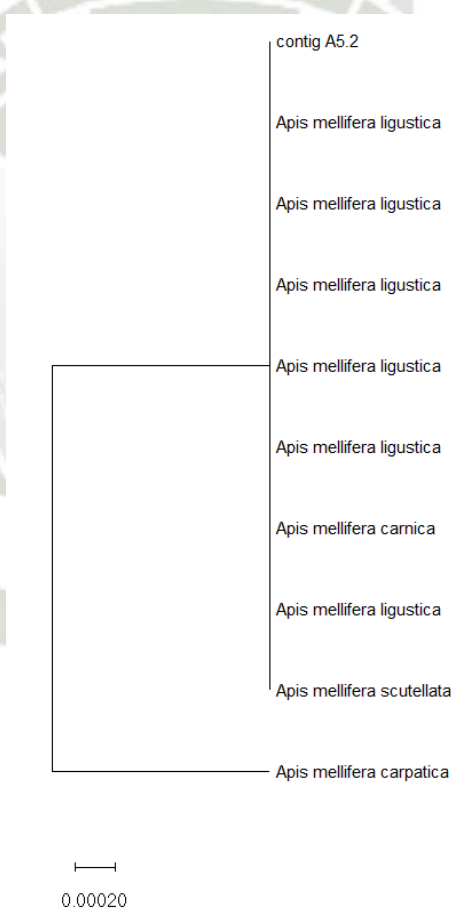


Figura 57. Árbol Filogenético basado en Maximum Likelihood para la secuencia query contig A5.2.

La metodología usada para la construcción de este árbol es Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), un método estadístico que estima la probabilidad de obtener el conjunto actual de datos, dados diferentes modelos de evolución genética.

Como se puede observar en todos los resultados de los contig del 1 - 5.2 anteriormente mostrados, la mayoría de entradas son pertenecientes a *Apis mellifera ligustica*; sin embargo, se debe de tomar en consideración que existen otras entradas que dificultan la identificación de las muestras. Se encontraron entradas de subespecies como:

Apis mellifera carpatica: La abeja rumana (*Apis mellifera carpatica*) se desarrolló en las condiciones pedoclimáticas particulares y en la base melífera de la región de los Cárpatos. Desde el punto de vista morfométrico, las principales características de las abejas rumanas son: la longitud de la probóscide varía entre 6,02 mm y 6,64 mm, la longitud del ala anterior está entre 9,4 mm y 9,6 mm, el índice cubital oscila entre 2,12 y 3,70, y el índice tarsal se encuentra entre 54,97% y 58,56%, esta raza de abejas se caracteriza por su docilidad y un comportamiento especialmente tranquilo en los panales. Desde el aspecto productivo, *Apis mellifera carpatica* es bastante eficaz, con colonias que pueden alcanzar rendimientos excepcionales en condiciones de cosecha ideales, con una producción promedio de miel de entre 50 y 60 kg por colmena a lo largo de varios años (62).

Apis mellifera cárnica: La abeja cárnica (*Apis mellifera cárnica*) se desarrolló en las condiciones específicas del clima y suelo de la región alpina de Europa Central. En términos morfométricos, las principales características de las abejas cárnicas incluyen: la longitud de la probóscide que varía entre 5,80 mm y 6,20 mm, la longitud del ala anterior que oscila entre 9,0 mm y 9,5 mm, el índice cubital que se sitúa entre 2,30 y 3,00, y el índice tarsal que varía entre 55% y 60%, esta raza de abejas es conocida por su carácter apacible y su comportamiento calmado en los panales. Desde una perspectiva productiva, la *Apis mellifera cárnica* es eficaz en la producción de miel, con colonias que pueden alcanzar una producción de entre 40 y 50 kg por colmena en condiciones óptimas durante varios años (63).

Todos los árboles filogenéticos en todos los contig desde el A1 hasta el A5.2 muestran que la subespecie *Apis mellifera carpatica* tiene un menor porcentaje de identidad, por lo cual se encuentra ubicada dentro del árbol, descartándola como una posible identificación de nuestras muestras. Otro dato a destacar que es de vital importancia es la identificación continua de la *Apis mellifera scutellata* en las muestras analizadas, la cual está presente como una entrada en todas las muestras analizadas.

Debido a esto se hizo la búsqueda de secuencias de referencia en las cuales se amplificaba el gen *CytbA*, las secuencias de referencias presentadas en la siguiente tabla no corresponden a los resultados de BLAST obtenidos anteriormente, sino, corresponden a resultados del genoma de las subespecies *scutellata*, *cárnica* y *lingüística*.

Se realizó una búsqueda por primer-BLAST para identificar las posibles secuencias identificadas por los cebadores empleados *cytbA_Fw*: 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' y *cytbA_Rv*: 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'. Entre los resultados brindados por Primer BLAST se optaron por tomar a las siguientes entradas como secuencias de referencia en la siguiente tabla 32:

Tabla 32. Secuencias de referencia de subespecies identificadas.

Código Asignado	ID Genbank	Descripción	Posición de hibridación
<i>Apis mellifera scutellata</i> _referencia	MG552703.1	<i>Apis mellifera scutellata</i> voucher VR mitochondrion, complete genome	<pre> product length = 485 Forward primer 1 TATGTACTACCATGAGGACAAATATC 26 Template 11497 11522 Reverse primer 1 ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT 26 Template 11981 11956 </pre>
<i>Apis mellifera carnica</i> _referencia	GU979494.1	<i>Apis mellifera carnica</i> cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	<pre> product length = 485 Forward primer 1 TATGTACTACCATGAGGACAAATATC 26 Template 1 26 Reverse primer 1 ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT 26 Template 485 460 </pre>
<i>Apis mellifera ligustica</i> _referencia	GU979492.1	<i>Apis mellifera ligustica</i> cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	<pre> product length = 485 Forward primer 1 TATGTACTACCATGAGGACAAATATC 26 Template 1 26 Reverse primer 1 ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT 26 Template 485 460 </pre>

Tanto en el flaqueo de *Apis mellifera carnica* como de *Apis mellifera lingüística* le pertenece al citocromo b, en la posición 1 del template se ubica mi primer forward y en la posición 460 a 485 se ubica el primer reverse, caso contrario es en el de *Apis mellifera scutellata*, debido a que no solo se está tomando el gen *cytb*, sino se está tomando en consideración el genoma completo.

Estas secuencias fueron descargadas y analizadas empleando el programa de uso libre benchling para identificar la región donde cada cebador hibrida, identificando esta secuencia para cada código asignado se tomó la porción flanqueada. Estas secuencias fueron tomadas para realizar un alineamiento múltiple tomando en cuenta

todos los contig generados para las muestras A1-A5.2, además se adicionaron al alineamiento múltiple 4 secuencias resultantes de BLASTn correspondientes a 4 especies.

Cabe destacar que no se realizó una búsqueda para la especie *Apis mellifera carpatica* dado que en todos los árboles filogenéticos se ubica lejana a los contig para cada muestra.

Con todas las secuencias previamente alineadas se armó el siguiente árbol filogenético representado en la figura 58:

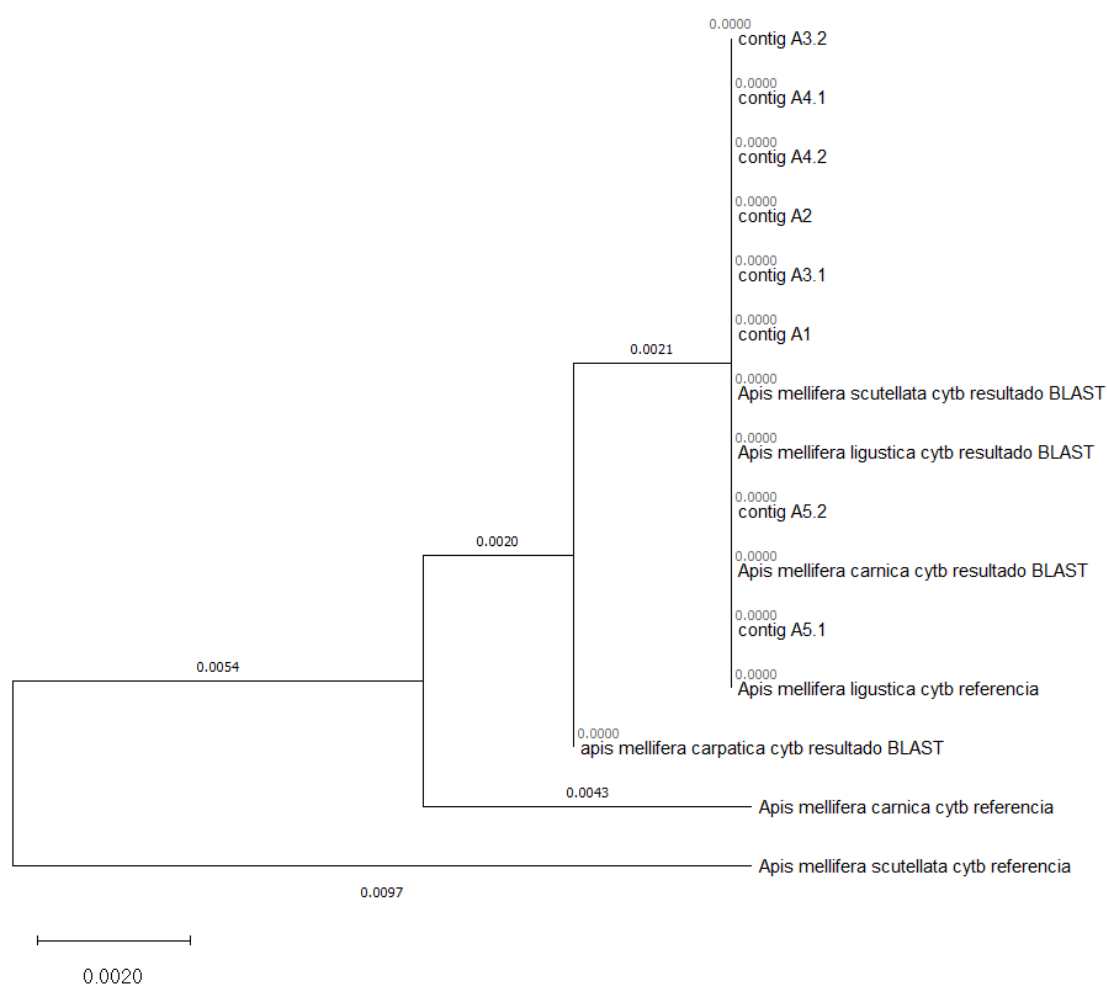


Figura 58. Árbol filogenético tomando todos los contig generados empleando Maximum Likelihood.

En el árbol filogenético, se agrupó todos los contig, desde el A1 hasta A5.2 y se observó en base a un alineamiento múltiple que se formó un único claster que agrupó a todos los contig y a los resultados de BLAST, pero también agrupó a *Apis mellifera linguística* de referencia. Las otras secuencias como la carpatica se ubica afuera del claster y también se encuentra fuera del alineamiento la subespecie cárnica y mucho más lejana la scutellata de referencia.

Se evidenció que la *Apis mellifera scutellata* que sale en el resultado de blast tiene la misma secuencia que los contig; por el contrario, *Apis mellifera scutellata* de referencia se encuentra afuera del árbol filogenético.

Según Gomez J. et al (64), se llevó a cabo la amplificación por PCR del ADN mitocondrial, enfocándose en la región de 485 pb del gen citocromo b. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos CytbA-F (5' TATGTACTACCATGAGGACAAATATC) y CytbA-R (5' ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT); sin embargo, en vez de realizar una secuenciación de Sanger como en el estudio realizado, empleó la amplificación de las muestras, y 10 µl de los productos de PCR fueron sometidos a digestión con 1 U de la enzima de restricción Bgl II (Invitrogen) a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, la digestión se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, visualizándolo bajo luz ultravioleta. Los sitios de restricción se interpretaron como mitotipo europeo (E) si se observaba un patrón de dos fragmentos (194 y 291 pb) o mitotipo africanizado (A) si se veía un único fragmento de 485 pb sin digerir. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 33. Número y proporción (%) de colonias clasificadas el mitotipo del ADNmt, identificado como africanizado - europeo en las subregiones del estado de Tabasco.

Mitotipo (ADN mitocondrial)	Centro	Chontalpa	Pantanos	Ríos	Sierra	Total
Africanizado	15 (48.39)	36 (52.94)	18 (75.0)	5 (41.67)	12 (66.67)	86 (56.21)
Europeo	16 (51.61)	32 (47.06)	6 (25.0)	7 (58.33)	6 (33.33)	67 (43.79)

Nota: Tomado de Gomez J. et al (2021) (64).

El estudio anteriormente mencionado, logró con eficacia identificar abejas africanizadas o europeas; sin embargo, en el estudio realizado, aunque se obtuvo una mayor cantidad de entradas europeas, esto puede ser debido a las adaptaciones locales y variabilidad genética, las poblaciones de abejas pueden tener variaciones

genéticas locales que afectan los patrones observados en diferentes regiones. Las diferencias entre las abejas en México y Perú pueden ser suficientes para que los métodos de identificación molecular tengan resultados distintos.

En comparación con otro estudio que se realizó en Colombia, según Salamanca G. (65), el fragmento en que se realizó el estudio presentó un tamaño de 16.343 pb; además, en vez de evaluar el ADN mitocondrial del citocromo b, se evaluó el gen del citocromo c oxidasa subunidad II, esto debido a que puede proporcionar una mayor resolución y más información genética, lo que es útil para estudios más detallados de filogenia y variación genética; sin embargo, en este estudio al realizar únicamente un análisis de fragmento de 485 pb puede ser suficiente y más práctico; además de ser menos complicada y menos costosa en la amplificación. Cabe resaltar la diferenciación entre ambos estudios, debido a que el estudio al que se está haciendo referencia utilizó una amplificación con la enzima de restricción DraI, que genera fragmentos de ADN pero no la secuencia completa, esta amplificación es útil para estudios preliminares de diversidad genética o en casos donde la secuenciación no sea viable; en cambio, en este estudio se realizó una secuenciación completa del fragmento 485 pb y se hizo una comparación de porcentaje de identidad con el programa Blast, permitiendo una identificación más precisa de subespecies.

1.5 Inseminación Artificial

Se realizó la selección de la colmena padre número 27, debido a que el análisis morfológico dio como resultado europea para la colmena; sin embargo, el análisis molecular no fue del todo preciso, debido a que en los resultados siempre existió una entrada perteneciente a la abeja *Apis mellifera scutellata*; sin embargo al evidenciarse más entradas y parentesco a *Apis mellifera lingüística*, se definió a estas abejas como europeas o con un mínimo porcentaje de africanización; además, esta colmena presentó un comportamiento dócil al momento de revisarla sin humo y también presentó la mayor productividad de las colmenas padres elegidas, con un total de 6 marcos llenados. Esta colmena se encargó de la producción de zánganos para su posterior captura y extracción de semen para el proceso de inseminación.

Se realizó la selección de la colmena abuela número 4, debido a que el análisis morfológico dio como resultado europea para la colmena; sin embargo, el análisis molecular no fue del todo preciso, debido a que en los resultados siempre existió una

entrada perteneciente a la abeja *Apis mellifera scutellata*; sin embargo al evidenciarse más entradas y parentesco a *Apis mellifera lingüística*, se definió a estas abejas como europeas o con un mínimo porcentaje de africanización; además, presentó un comportamiento dócil al momento de revisarla sin humo y también presentó la mayor productividad de todas las colmenas elegidas a las cuales se realizó los análisis, con un total de 7 marcos llenados. Esta colmena se encargó de brindar las reinas vírgenes para la posterior inseminación artificial que se realizó con los zánganos de la colmena padre número 27.

La inseminación de la reina se verificó en el quinceavo día, dando como resultado una buena postura uniforme. Después de dos semanas se realizó seguimientos para verificar el operculado de la cría de la reina y la postura total en los 3 marcos del fecundador, de los cuales se confirmó que tenía una postura llena como el siguiente marco de cría operculada representado en la figura 59:



Figura 59. Marco llenado con cría operculada.

En las 3 semanas posteriores se realizó la revisión del núcleo y se verificó la docilidad de la nueva cría nacida, se realizó 3 semanas después debido a que en ese tiempo las abejas de la anterior reina en el núcleo llegaron al final de su ciclo de vida y perecieron. Finalmente se confirmó la excelente productividad de la nueva cría nacida, posteriormente esa reina inseminada se convertirá en abuela para la producción de reinas con bajo porcentaje de africanización. La reina está representada en la figura 60:



Figura 60. Reina inseminada con bajo porcentaje de africanización.

Según Khan K. et al (66), desde 1900, se han llevado a cabo estudios comparativos sobre el rendimiento de reinas de abejas que han sido inseminadas artificialmente frente a aquellas apareadas de manera natural. La evaluación de la calidad y el rendimiento de una reina se basa en factores como la productividad de la colonia, diversos estudios han comparado el desempeño de reinas apareadas naturalmente (NMQ) con reinas inseminadas artificialmente (AIQ). La mayoría de las investigaciones indican que las reinas inseminadas artificialmente tienden a ser más productivas que las reinas apareadas naturalmente, aunque algunos estudios sugieren que el rendimiento de ambas puede ser similar. En la siguiente tabla se ven los resultados:

Tabla 34. Estudio comparativo entre reinas apareadas naturalmente y reinas inseminadas artificialmente.

Número de NMQ	Productividad de la colonia	Número de AIQ	Productividad de la colonia
43	52,6 kg de miel	65	95,3 kg de miel
72	39 kg de miel	15	54 kg de miel
137	19,4 kilogramos	612	21,3 kilos

Nota: Tomado de Khan K. et al (2022) (66).

En comparación con el estudio realizado, se hizo de igual manera una selección de las colmenas más productivas y seguidamente el cruzamiento, demostrando la importancia de la inseminación en base a características positivas. La inseminación artificial permite un control más preciso sobre la genética de las reinas, facilitando la selección de características deseables y la mejora continua de las colonias. Sin embargo, la eficacia puede variar según la técnica de inseminación y las condiciones de manejo.

CONCLUSIONES

PRIMERA.

Se analizó la efectividad del comportamiento de las colmenas que fueron seleccionadas en este estudio, obteniendo un comportamiento dócil para la colmena padre n°3, un comportamiento dócil para la colmena padre n° 27, un comportamiento nervioso para la colmena padre n°6, un comportamiento dócil para la colmena abuela n°4 y un comportamiento dócil para la colmena abuela n°8.

SEGUNDA.

Se analizó la efectividad de la productividad de las colmenas que fueron seleccionadas en este estudio, obteniendo un total de 6 marcos llenados para la colmena padre n°27, determinándola como una colmena productiva, un total de 5 ½ marcos llenados para la colmena padre n°3, determinándola como una colmena medianamente productiva, un total de 4 ½ marcos llenados para la colmena padre n°6, determinándola como una colmena medianamente productiva, un total de 7 marcos llenados para la colmena abuela n°4, determinándola como la colmena más productiva del estudio, un total de 5 ½ marcos llenados para la colmena abuela n°8, determinándola como una colmena medianamente productiva.

TERCERA.

Se analizó las características del análisis morfológico y molecular en las colmenas del estudio, obteniendo un promedio de longitud de ala de 8,83158 mm para la colmena padre n°6, determinándola como una colmena sospechosa, debido a este resultado se realizó el método *FABIS II*; sin embargo el resultado no cambio y la colmena se determinó como sospechosa con un índice de 1,4442; se obtuvo un promedio de longitud de ala de 9,14256 mm para la colmena padre n°3, determinándola como una colmena europea, debido a este resultado no se realizó el método *FABIS II*; se obtuvo un promedio de longitud de ala de 9,0551 mm para la colmena padre n°27, determinándola como una colmena europea, debido a este resultado no se realizó el método *FABIS II*; se obtuvo un promedio de longitud de ala de 9,05002 mm para la colmena abuela n°4, determinándola como una colmena europea, debido a este resultado no se realizó el método *FABIS II*; se obtuvo un promedio de longitud de ala de 9,24052 mm para la colmena abuela n°8, determinándola como una colmena europea, debido a este resultado no se realizó el método *FABIS II*. Se evidenció en los resultados de los análisis moleculares que todas las colmenas evaluadas presentaban en su

árbol filogenético a la subespecie *Apis mellifera ligústica* y *Apis mellifera cárnica* (ambas especies europeas), con una mayor cantidad de entradas de la subespecie *Apis mellifera ligústica*, también se evidencio una única entrada de la subespecie *Apis mellifera scutellata* (africana); sin embargo, al realizar un agrupamiento de todos los contig, los resultados de BLAST y también secuencias de referencia se determinó que *Apis mellifera scutella* de referencia se encontró afuera del árbol, pero *Apis mellifera scutellata* de referencia se encontró dentro del árbol filogenético, estos resultados indican que las secuencias de *Apis mellifera scutellata* encontradas en los resultados de BLAST coinciden con los contig analizados, mientras que la *Apis mellifera scutellata* de referencia es significativamente diferente. Este patrón destaca la importancia de considerar las variaciones genéticas entre subespecies y su impacto en la interpretación de resultados filogenéticos.

CUARTA.

Se logró exitosamente la inseminación artificial entre las colmenas de genética padre n°27, la colmena más productiva y con resultados libres de africanización según los análisis y la colmena de genética abuela n°4, la colmena más productiva y con resultados libres de africanización según los análisis realizados en este estudio, la inseminación de la reina se verificó en el quinceavo día, dando como resultado una buena postura uniforme.

RECOMENDACIONES

Estas sugerencias están orientadas a los futuros investigadores y a las investigaciones posteriores vinculadas a este estudio

Se recomienda ampliar el panel de marcadores genéticos utilizados, emplear métodos filogenéticos adicionales como la inferencia bayesiana y la filogenia de distancia, y asegurar que las secuencias de referencia estén actualizadas y sean representativas de la diversidad genética observada, mejorando así la precisión y la confiabilidad de los análisis filogenéticos en *Apis mellifera*.

Se recomienda hacer un muestreo más extenso, incluyendo más muestras en otros apiarios, para tener una mayor cantidad de resultados y verificar en que zonas se encuentra mayor o menor porcentaje de africanización.

Se aconseja seguir otro método de análisis morfométrico más actualizado para obtener resultados más precisos permitiendo una mejor clasificación de la población *Apis Mellifera*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Urbina-Romero Rebeca A., Utrera-Quintana Fernando, Castillo-González Fernando, Livera-Muñoz Manuel, Benítez-Riquelme Ignacio, Villa-Mancera Abel E. et al. Valoración del origen africanizado en la integración de una población experimental de *Apis mellifera* L. Rev. fitotec. mex [Internet]. 2019 [citado el 17 de junio del 2024]; 42(2): 111-118. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802019000200111&lng=es
2. Molina -Lima L, Número P. Boletín apícola del Perú universidad nacional agraria la molina [Internet]. 2016 [citado el 17 de junio del 2024] Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/agronomia/Apicultura/boletin/BOLETIN_APICOLA_nro5.pdf
3. Dávila M, Ortiz M, Hulza I. Presencia de la abeja africanizada en el Perú. Revista Peruana de Entomología [Internet]. 1980 [citado el 17 de junio del 2024]; 23 (1):125–127. Disponible en: <https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v23/pdf/a24v23.pdf>
4. Montes Guevara German E. Bioética y Técnicas de Reproducción Asistida. Rev. cienc. adm. financ. segur.0020soc [Internet]. 2004 [citado el 17 de junio del 2024]; 12(1): 71-78. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-12592004000100008&lng=en.
5. Daniela Farías G. Inseminación de abejas reinas culmina exitosamente. Pontificia Universidad Católica de Chile. Pontificia Universidad Católica [Internet]. 2015 [citado el 17 de junio del 2024]. Disponible en: <https://www.uc.cl/noticias/inseminacion-de-abejas-reinas-culmina-exitosamente/>
6. Universidad autónoma agraria antonio narro unidad laguna división de carreras agronómicas [Internet]. 2019 [citado el 17 de junio del 2024]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/45619/CRIST>

- IAN%20UZIEL%20HERN%20C3%81NDEZ%20SALINAS.pdf?sequence=1&isAll
owed=y
7. MIDAGRI: En Perú existen más de 40 mil productores apícolas que trabajan la miel de abeja en 300 mil colmenas a nivel nacional [Internet]. 2021 [citado el 17 de junio del 2024]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/492753-midagri-en-peru-existen-mas-de-40-mil-productores-apicolas-que-trabajan-la-miel-de-abeja-en-300-mil-colmenas-a-nivel-nacional>
 8. Padilla Alvarez F, Flores Serrano J, Campano F. La Enjambrazón La Enjambrazón [Internet]. 2011 [citado el 17 de junio del 2024]. Disponible en: https://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos_libros/102%20abril-junio2011.pdf
 9. Peña L, Pineda M. E, Hernández M, Rodríguez-Acosta A. Toxinas Naturales: abejas y sus venenos. AVFT [Internet]. 2006 [citado el 17 de junio del 2024]; 25(1): 6-10. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642006000100001&lng=es.
 10. Héros polinizadores: la importancia de las abejas para los cultivos. ConoSur [Internet]. [citado el 17 de junio del 2024]. Disponible en: <https://www.conosur.bayer.com/es/heroes-polinizadores-la-importancia-de-las-abejas-para-los-cultivos>
 11. Baena-Díaz F, Chévez E, Ruiz de la Merced F, Porter-Bolland L. Apis mellifera en México: producción de miel, flora melífera y aspectos de polinización. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias [Internet]. 2022 [citado el 17 de junio del 2024] 13 (2): 525–548.
 12. Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature. [Internet]. 2011 [citado el 17 de junio del 2024] 24 (2): 478–483.
 13. Martínez U. LAS ABEJAS. [artículo de investigación]. Mexico: Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca; 2016. 10 p.
 14. Abejas y apicultura. Gobierno de México [Internet]. 2012 [citado el 17 de junio del 2024] Disponible en: <https://atlas-abejas.agricultura.gob.mx/cap2.html>
 15. SP Honey Bee Biology. Conceptos básicos de biología de la abeja melífera [Internet]. 2022 [citado el 17 de junio del 2024] Disponible en:

- <http://www.usfarad.org/sp-honey-bee-biology-conceptos-baacutesicos-de-biologiacutea-de-la-abeja-meliacutefera.html>
16. Luis E, Wiechers G, Leonardo L, Vanegas, Castañeda A, Agustín L, et al. Cría 2 Directorio Universidad Nacional Autónoma de México [Internet]. [citado el 17 de junio del 2024] Disponible en: https://papimes.fmvz.unam.mx/proyectos/cria_reinas/Cria_Reinas.pdf
 17. Vista de Tres tipos de colmenas relacionado a la crianza y el desarrollo biológico de reinas Apis mellifera. La Molina. [Internet]. 2024 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/1636/pdf_269
 18. Manual Básico de Apícola Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. Coordinación General de Apicultura. 1ª. ed. México: Secretaría de agricultura, ganadería, de sarrollo rural, pesca y alimentación. Sin fecha.
 19. Antonio M, Navarro S, Miguel M, Parra Galindo A. Generalidades del Mejoramiento Genético. Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Costa de Hermosillo. [Internet]. 2008 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://atlasabejas.agricultura.gob.mx/pdfs/Generalidades%20del%20mejoramiento%20genetico%20de%20las%20abejas.pdf>
 20. Redacción. Cómo introducir reinas en colmenas o núcleos: técnica y consejos para una introducción segura [Internet]. 2021 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://apiculturaymiel.com/apicultura/como-introducir-reinas-en-colmenas-nucleos-tecnica-consejos-introduccion-segura/>
 21. Laterza A. Introducción abeja reina: consejos siempre válidos [Internet]. 2020 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.apiculturallaterza.com/es/introduccion-abeja-reina-consejos-siempre-validos>
 22. Orlando P, Don A. Cría de reinas Primera Parte: Métodos Sin Traslارve Segunda Parte: Método Doolittle Tercera Parte: Variantes del Método Doolittle Cuarta Parte: Bajo los Impulsos de la Enjambrazón Quinta Parte: Fecundación de Reinas introducción: Ciclo Biológico de la abeja obrera [Internet]. Apícola Don Guillermo. [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.apiservices.biz/documents/articulos-es/cria_de_reinas.pdf
 23. Galindo a, Quiroga b, Bianchi e. Primer reporte de un Área de Congregación de Zánganos de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) de Argentina. Revista de la

- Sociedad Entomológica Argentina [Internet]. 2017 [citado 06 de agosto de 2024] 76(1-2): 50–53. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/3220/322050328001/html/>
24. Osorio Ulla R. El ciclo de vida de las abejas - Fases y esquema [Internet]. Ecología verde. Disponible de: <https://www.ecologiaverde.com/el-ciclo-de-vida-de-las-abejas-3650.html>
25. Gallardo C, Tapia S, Agostini -Omar S, Medina D. Zoología agrícola: Los insectos: una mirada desde las Ciencias Agrarias Primera Parte [Internet]. 2022 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: https://fca.unju.edu.ar/media/publicaciones/Zoolog%C3%ADa_Agricola_Los_insectos_-_Gallardo_-_Tapia_-_Agostini_-_Medina_-EDIUNJU.pdf
26. Redacción. Área de Congregación de Zánganos – apigranca.es [Internet]. 2021 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://apigranca.es/area-de-congregacion-de-zanganos>
27. Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana [Internet]. [citado el 6 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.miieldemalaga.com/data/cria_de_reinas.mex.pdf
28. Apuntes Apicultura. Juntadeandalucia [Internet]. [citado el 12 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337170092Apicultura.pdf>
29. Gametogénesis y espermatogénesis | Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. 2012 [citado el 12 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1476§ionid=95222997>
30. Iica.int. Mejoramiento genético de las abejas [Internet]. [citado el 6 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/9351/BVE20048019e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
31. Partenogénesis en las abejas. SlideShare. [Internet]. 2019 [citado el 6 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/slideshow/partenogenesis-en-las-abejas/176471135>

32. Repaso de herencia ligada al sexo (artículo) [Internet]. Khan Academy. 2019 [citado el 6 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-classical-genetics/hs-sex-linkage/a/hs-sex-linkage-review>
33. Identifican el gen sexual de las abejas. Fapespbr. [Internet]. 2024 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://revistapesquisa.fapesp.br/es/identifican-el-gen-sexual-de-las-abejas/>
34. Padilla Alvarez F, Flores Serrano J, Cabanes F, Gómez M. La Mejora Genética en la Apicultura. Universidad de Rabanales. [Internet]. 2010 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos_libros/2010_Mejora_abejas_1_El_Colmenar.pdf
35. Medina Flores Carlos A., Guzmán Novoa Ernesto, Hamiduzzaman M., Aguilera Soto Jairo, López Carlos Marco A. Africanización de colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en tres regiones climáticas del norte de México. Veterinaria México. [Internet]. 2015 [citado 06 de agosto de 2024] 2(4): 1-9. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S244867602015000400001&lng=es.
36. ¿Cuánta miel puede producir una abeja? - Abejas en la agricultura [Internet]. 2021 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://abejasenagricultura.org/cuanta-miel-puede-producir-una-abeja/>
37. Picaduras de abejas Síntomas y causas. Mayo Clinic. [Internet]. 2022 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/bee-stings/symptoms-causes/syc-20353869>
38. Fraccaro E. La abeja melífera, africana y africanizada: 5 cosas que hay que saber [Internet]. 3bee.com. 2024 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://blog.3bee.com/es/abeja-africana-y-africanizada-5-cosas-que-hay-que-saber/#next-1>
39. Laguna U. Universidad autónoma agraria antonio narro división regional de ciencia animal detección de abeja africana (*apis mellifera scutellata*) en region lagunera del estado de coahuila por gloria brisa nieves dorantes tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de: médico veterinario zootecnista torreón, coahuila junio 2012 [Internet]. [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3335/GLORIA%20BRISA%20NIEVES%20DORANTES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

40. Roodt AR, Salomón OD, Orduna TA, Robles LE, Paniagua JF, Alagón A. Envenenamiento por picaduras de abeja. *Gaceta médica de México*. [Internet]. 2005 1;141(3):215–222. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132005000300008
41. Guzmán-Novoa E, Correa Benítez, Adriana, Laura, Novoa G. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Veterinaria México* [Internet]. 2022 [citado 06 de agosto de 2024] 42(2): 149–178. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000200005#:~:text=Las%20abejas%20africanizadas%20son%20aproximadamente
42. Pires S, Josa A, Costa A. Comparación entre la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente. 2005 [citado 06 de agosto de 2024] 101(3):192–200. Disponible en: https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/itea/revistas/2005/101-3/ITEA_101-3_192-200.pdf
43. Instrumental insemination of queen bees cm < agriculture handbook no. 390 agricultural research service united states department of agriculture in cooperation with louisiana state university [Internet]. 2003 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/GOVPUB-A-PURL-gpo24346/pdf/GOVPUB-A-PURL-gpo24346.pdf>
44. Flores J, Ruíz J, Puerta F, Campano F, Padilla F, Bustos M. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL. *Arch de Zoo*. 1998; 47 (178): 343–345
45. Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of Animal Science* [Internet]. 2002 80(2):1–10. Disponible en: https://www.asas.org/docs/defaultsource/midwest/mw2020/publications/footehist.pdf?sfvrsn=59da6c07_0
46. Gillard TL, Oldroyd BP. Chapter One - Controlled reproduction in the honey bee (*Apis mellifera*) via artificial insemination. *ScienceDirect*. [Internet]. 2020. 1(59):1–42. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065280620300199>
47. Metodología Fabis | PDF | Naturaleza [Internet]. Scribd. 2024 [citado el 10 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/438538453/METODOLGIA-FABIS>

48. FABIS Manual - *Fast Africanized Bee Identification System*. Beesource Beekeeping Forums. [Internet]. 2016 [citado 06 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.beesource.com/threads/fabis-manual-fast-africanized-bee-identification-system.365505/>
49. Salamanca G. Variabilidad genética del ADN mitocondrial de poblaciones de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en Colombia. *Zootecnia Tropical* [Internet]. 2009 [citado el 10 de mayo del 2024]; 27(4): 82 – 373. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079872692009000400003
50. Gómez Leyva JF, Argüello Nájera O, Vázquez Encino PJ, Hernández Hernández LU, Payró de la Cruz E. Análisis morfométrico y molecular (ADNmt) de abejas melíferas (*Apis mellifera* L) en el estado de Tabasco, México. *Rev Mex de Cien Pec* [Internet]. [citado el 10 de mayo del 2024] 12(4):1188–1207. Disponible en: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5144>
51. Paz A, Gonzalez M, Crawford AJ. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana* [Internet]. [citado el 10 de mayo del 2024]. 16(3):161–176. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120548X2011000300011
52. Altamirano-Benavides M, M PY. El código de barras de adn(barcoding): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en el ecuador. *La granja* [Internet]. 2016 [citado el 10 de mayo del 2024] 23(1): 5–14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/4760/476051461001/html/>
53. Secuenciación del ADN. Khan Academy. [Internet]. 2015 [citado el 10 de mayo del 2024] Disponible en : <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>
54. Wood T, Gaspar H, Romain Le Divelec, Penado A, Teresa Luísa Silva, Mata V, et al. The InBIO Barcoding Initiative Database: DNA barcodes of Iberian Bees. *Biodiversity data journal*. 2024 Mar 5;12.
55. Guerrero J. Metodología - DNA barcoding de Insectos [protocolo de DNA barcoding]. Perú: CavBio; 2021. 6 p.
56. Vista de Características morfométricas, comportamiento higiénico y agresividad de abejas criollas *Apis mellifera* sp. [Internet]. Universidad Cesar Vallejo. 2024 [citado el 10 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://revistas.ucv.edu.pe/index.php/ucv-hacer/article/view/751/736>

57. Caracterización morfológica y comportamiento higiénico-defensivo de los apiarios de abejas Melíferas (*Apis mellifera*) en cuatro municipios del departamento de Managua, octubre 2023. Universidad Nacional Agraria. 2023 [Internet]. [citado el 10 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnl01b456ca.pdf>
58. Forestales A, México P, Magaña M, Tavera Cortés M, Salazar Barrientos M. Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad [Internet]. [citado el 10 de mayo del 2024]. 7(5):1103–1115. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263146723011.pdf>
59. Beyene T, D Abi, G Chalchissa, Mekonen WM. Evaluation of transitional and modern hives for honey production in the Mid Rift Valley of Ethiopia. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa* [Internet]. 2016 [citado el 10 de mayo del 2024] 64(1):157–165. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/bahpa/article/view/150474#:~:text=The%20overall%20average%20annual%20honey>
60. Gutiérrez L, Torres N, Ali C, Velazco J. Frecuencia de morfotipos africanizados y europeos de *Apis mellifera* en Ensenada y Mexicali, Baja California [Internet]. [citado el 10 de mayo del 2024]. 3(9):421–426. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3586/358646832015.pdf>
61. Hernández C. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. [Internet]. 2016 [citado el 10 de setiembre del 2024]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7940/CARLOS%20MONTES%20HERN%20C%20NDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
62. Valega O, Don A. Especies y subespecies de abejas [Internet]. [citado el 10 de mayo del 2024]. Disponible en: https://apiculture.com/fr/?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=27&id=1175&Itemid=1000000000000
63. Wayback Machine [Internet]. Archive.org. 2023 [citado el 10 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://web.archive.org/web/20160307172104/http://www.apimondiafoundation.org/foundation/files/261s.pdf>
64. Vista de Análisis morfométrico y molecular (ADNmt) de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en el estado de Tabasco, México [Internet]. Inifap. 2024 [citado el 10

- de mayo del 2024]. Disponible en:
<https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/5144/4669>
65. Salamanca Grosso G. Variabilidad genética del ADN mitocondrial de poblaciones de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en Colombia. *Zootecnia Tropical* [Internet]. 2009 Dec 1;27(4):373–382. Disponible en:
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079872692009000400003
66. Khan KA, Rafique MK, Lashari MA, Iqbal A, Mahmood R, Ahmed AM, et al. Instrumental insemination: A nontraditional technique to produce superior quality honey bee (*Apis mellifera*) queens. *Journal of King Saud University - Science*. 2022. Jul;34(5):102-177.



ANEXOS

Anexo 1. Galería fotográfica de la metodología realizada para la obtención de los resultados de las mediciones morfológicas.



Figura 61. Equipo de disección.

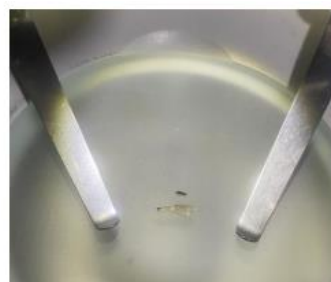


Figura 62. Ala y fémur diseccionados y colocados en la plataforma del Estereoscopio.

Anexo 2. Galería fotográfica de la metodología realizada para la obtención de los resultados de los análisis moleculares.



Figura 63. Muestras rotuladas en frascos de color ámbar.

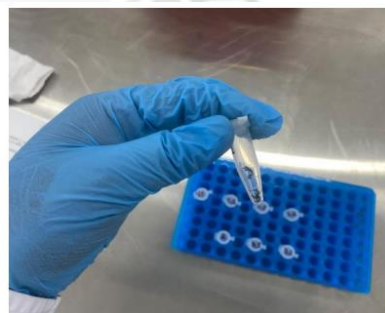


Figura 64. Muestras en microtubos.



Figura 65. Buffers utilizados en el proceso de lavado.



Figura 66. Preparación del equipo de PCR.

Anexo 3. Galería fotográfica de la metodología realizada para la inseminación artificial.



Figura 68.
Ajustamiento de la
válvula de tanque de
CO₂.

Figura 67. Abertura
parcial de la reina.

Anexo 4. Resultados de las mediciones longitudinales del ala y fémur de las 5 colmenas.

Colmena N°6

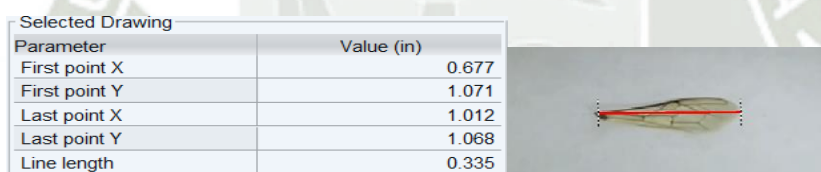


Figura 69. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°6.



Figura 70. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°6.

Muestra 2

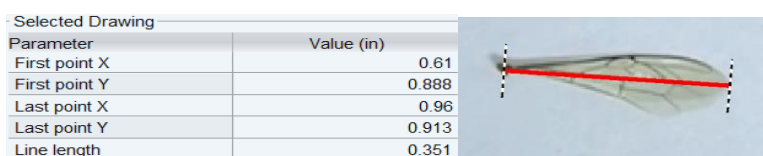


Figura 71. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.621
First point Y	1.245
Last point X	0.729
Last point Y	1.245
Line length	0.108



Figura 72. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°6.

Muestra 3

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.639
First point Y	0.549
Last point X	1
Last point Y	0.549
Line length	0.361




Figura 73. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.778
First point Y	0.97
Last point X	0.877
Last point Y	0.97
Line length	0.099



Figura 74. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°6.

Muestra 4

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.641
First point Y	0.844
Last point X	0.987
Last point Y	0.844
Line length	0.346



Figura 75. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.577
First point Y	1.134
Last point X	0.681
Last point Y	1.134
Line length	0.103



Figura 76. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°6.

Muestra 5

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.564
First point Y	0.946
Last point X	0.908
Last point Y	0.946
Line length	0.344



Figura 77. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.764
First point Y	1.227
Last point X	0.864
Last point Y	1.227
Line length	0.1



Figura 78. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°6.

Muestra 6

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.761
First point Y	0.571
Last point X	1.091
Last point Y	0.571
Line length	0.331



Figura 79. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.876
First point Y	1.461
Last point X	0.79
Last point Y	1.461
Line length	0.087



Figura 80. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°6.

Muestra 7

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.408
First point Y	0.998
Last point X	0.748
Last point Y	1.005
Line length	0.34




Figura 81. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.87
First point Y	0.828
Last point X	0.969
Last point Y	0.828
Line length	0.1




Figura 82. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°6.

Muestra 8

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.579
First point Y	0.726
Last point X	0.938
Last point Y	0.73
Line length	0.359




Figura 83. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°6.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.649
First point Y	0.947
Last point X	0.751
Last point Y	0.947
Line length	0.102



Figura 84. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°6.

Muestra 9

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.469
First point Y	1.179
Last point X	0.82
Last point Y	1.179
Line length	0.351




Figura 85. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°6.

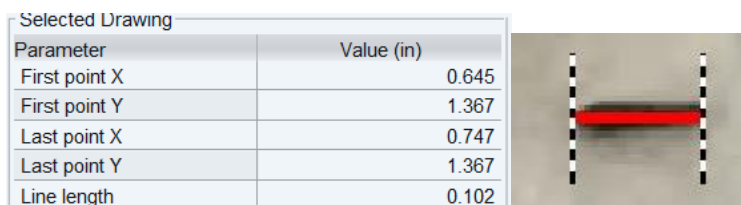


Figura 86. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°6.

Muestra 10

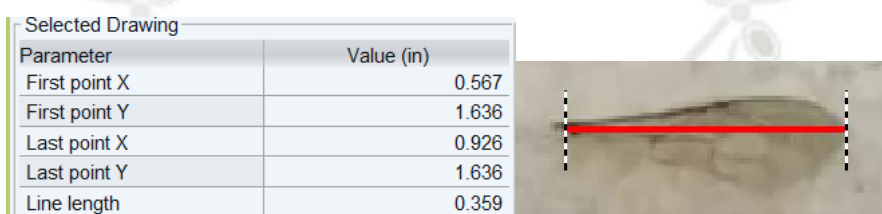


Figura 87. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°6.

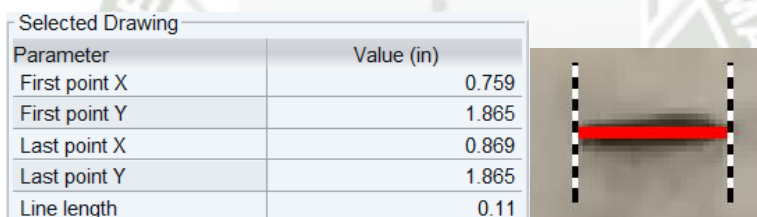


Figura 88. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°6.

Colmena N°3

Muestra 1

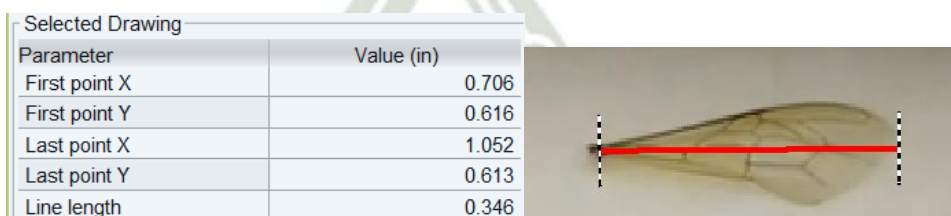


Figura 89. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°3.

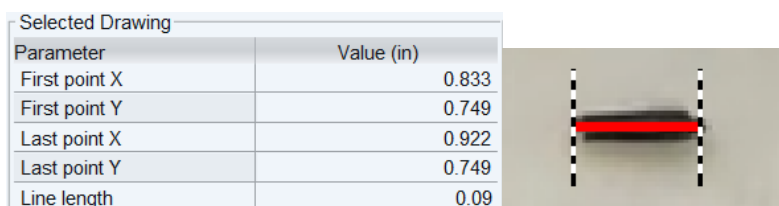


Figura 90. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°3.

Muestra 2

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.656
First point Y	0.909
Last point X	0.999
Last point Y	0.906
Line length	0.343

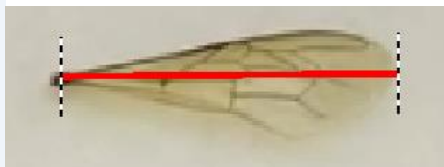


Figura 91. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.833
First point Y	0.749
Last point X	0.922
Last point Y	0.749
Line length	0.09



Figura 92. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°3.

Muestra 3

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.613
First point Y	1.262
Last point X	0.966
Last point Y	1.262
Line length	0.353



Figura 93. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.576
First point Y	1.472
Last point X	0.673
Last point Y	1.472
Line length	0.097

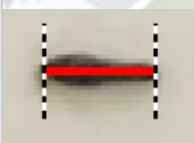


Figura 94. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°3.

Muestra 4

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.498
First point Y	0.575
Last point X	0.86
Last point Y	0.575
Line length	0.362



Figura 95. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.559
First point Y	0.767
Last point X	0.657
Last point Y	0.767
Line length	0.099

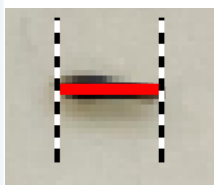


Figura 96. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°3.

Muestra 5

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.526
First point Y	0.975
Last point X	0.871
Last point Y	0.975
Line length	0.345



Figura 97. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.433
First point Y	1.145
Last point X	0.531
Last point Y	1.145
Line length	0.099



Figura 98. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°3.

Muestra 6

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.477
First point Y	1.413
Last point X	0.833
Last point Y	1.413
Line length	0.356

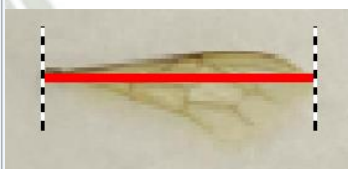


Figura 99. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.646
First point Y	1.682
Last point X	0.75
Last point Y	1.682
Line length	0.104

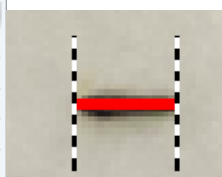


Figura 100. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°3.

Muestra 7

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.607
First point Y	0.594
Last point X	0.969
Last point Y	0.562
Line length	0.364



Figura 101. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.152
First point Y	0.7
Last point X	1.252
Last point Y	0.684
Line length	0.101

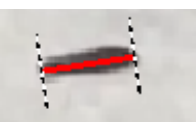


Figura 102. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°3.

Muestra 8

Selected Drawing	
Parameter	Value (m)
First point X	0.567
First point Y	0.552
Last point X	0.906
Last point Y	0.552
Line length	0.339



Figura 103. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.985
First point Y	0.924
Last point X	1.095
Last point Y	0.918
Line length	0.109

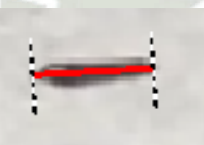


Figura 104. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°3.

Muestra 9

Selected Drawing	
Parameter	Value (m)
First point X	0.33
First point Y	0.876
Last point X	0.678
Last point Y	0.876
Line length	0.348



Figura 105. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.983
First point Y	0.919
Last point X	1.085
Last point Y	0.912
Line length	0.102

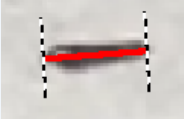


Figura 106. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°3.

Muestra 10

Selected Drawing	
Parameter	Value (m)
First point X	0.297
First point Y	1.191
Last point X	0.66
Last point Y	1.191
Line length	0.363




Figura 107. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°3.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.877
First point Y	1.26
Last point X	0.979
Last point Y	1.26
Line length	0.102



Figura 108. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°3.

Colmena N°27.

Muestra 1

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.568
First point Y	0.581
Last point X	0.913
Last point Y	0.581
Line length	0.345




Figura 109. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.637
First point Y	0.761
Last point X	0.733
Last point Y	0.761
Line length	0.096

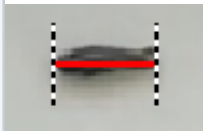


Figura 110. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°27.

Muestra 2

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.562
First point Y	1.006
Last point X	0.907
Last point Y	1.006
Line length	0.345

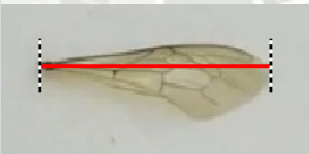


Figura 111. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.599
First point Y	1.19
Last point X	0.699
Last point Y	1.19
Line length	0.099

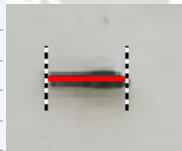


Figura 112. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°27.

Muestra 3

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.59
First point Y	1.357
Last point X	0.941
Last point Y	1.357
Line length	0.351



Figura 113. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.606
First point Y	1.537
Last point X	0.708
Last point Y	1.531
Line length	0.103

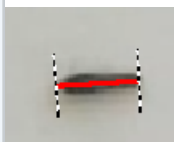


Figura 114. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°27.

Muestra 4

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.452
First point Y	0.431
Last point X	0.792
Last point Y	0.425
Line length	0.34



Figura 115. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.851
First point Y	0.461
Last point X	0.951
Last point Y	0.464
Line length	0.1



Figura 116. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°27.

Muestra 5

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.452
First point Y	0.739
Last point X	0.809
Last point Y	0.736
Line length	0.357



Figura 117. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.892
First point Y	0.756
Last point X	0.99
Last point Y	0.759
Line length	0.098

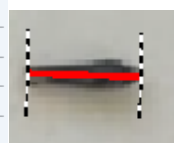


Figura 118. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°27.

Muestra 6

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.346
First point Y	1.007
Last point X	0.709
Last point Y	1.004
Line length	0.363



Figura 119. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.839
First point Y	1.01
Last point X	0.933
Last point Y	1.01
Line length	0.095

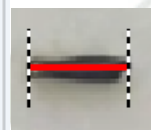


Figura 120. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°27.

Muestra 7

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.417
First point Y	1.229
Last point X	0.78
Last point Y	1.229
Line length	0.363



Figura 121. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.898
First point Y	1.247
Last point X	0.995
Last point Y	1.247
Line length	0.097

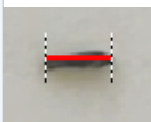


Figura 122. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°27.

Muestra 8

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.502
First point Y	1.545
Last point X	0.86
Last point Y	1.545
Line length	0.357



Figura 123. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.922
First point Y	1.557
Last point X	1.019
Last point Y	1.56
Line length	0.098



Figura 124. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°27.

Muestra 9

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.381
First point Y	1.823
Last point X	0.753
Last point Y	1.826
Line length	0.372




Figura 125. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.972
First point Y	1.82
Last point X	1.072
Last point Y	1.823
Line length	0.1




Figura 126. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°27.

Muestra 10

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.482
First point Y	2.103
Last point X	0.854
Last point Y	2.106
Line length	0.372




Figura 127. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°27.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.957
First point Y	2.074
Last point X	1.052
Last point Y	2.074
Line length	0.095




Figura 128. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°27.

Colmena N°4.

Muestra 1

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.468
First point Y	0.772
Last point X	0.828
Last point Y	0.782
Line length	0.361




Figura 129. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.541
First point Y	0.929
Last point X	0.645
Last point Y	0.929
Line length	0.104




Figura 130. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°4.

Muestra 2

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.407
First point Y	1.082
Last point X	0.762
Last point Y	1.086
Line length	0.354



Figura 131. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.441
First point Y	1.212
Last point X	0.538
Last point Y	1.209
Line length	0.097



Figura 132. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°4.

Muestra 3

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.304
First point Y	1.343
Last point X	0.665
Last point Y	1.339
Line length	0.361



Figura 133. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.381
First point Y	1.476
Last point X	0.464
Last point Y	1.476
Line length	0.084



Figura 134. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°4.

Muestra 4

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.294
First point Y	1.607
Last point X	0.655
Last point Y	1.603
Line length	0.361



Figura 135. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.434
First point Y	1.73
Last point X	0.534
Last point Y	1.73
Line length	0.1



Figura 136. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°4.

Muestra 5

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.347
First point Y	1.874
Last point X	0.698
Last point Y	1.877
Line length	0.351



Figura 137. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.424
First point Y	1.991
Last point X	0.514
Last point Y	1.991
Line length	0.09

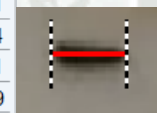


Figura 138. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°4.

Muestra 6

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.905
First point Y	0.701
Last point X	1.263
Last point Y	0.701
Line length	0.357



Figura 139. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.029
First point Y	0.842
Last point X	1.126
Last point Y	0.842
Line length	0.097



Figura 140. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°4.

Muestra 7

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.925
First point Y	0.992
Last point X	1.283
Last point Y	0.992
Line length	0.357




Figura 141. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.065
First point Y	1.116
Last point X	1.166
Last point Y	1.116
Line length	0.1




Figura 142. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena N°4.

Muestra 8

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.922
First point Y	1.226
Last point X	1.269
Last point Y	1.232
Line length	0.347



Figura 143. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.985
First point Y	1.389
Last point X	1.086
Last point Y	1.389
Line length	0.1



Figura 144. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena N°4.

Muestra 9

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.882
First point Y	1.533
Last point X	1.239
Last point Y	1.536
Line length	0.357




Figura 145. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.959
First point Y	1.697
Last point X	1.055
Last point Y	1.7
Line length	0.097



Figura 146. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°4.

Muestra 10

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.929
First point Y	1.86
Last point X	1.286
Last point Y	1.854
Line length	0.357



Figura 147. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°4.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.136
First point Y	1.984
Last point X	1.236
Last point Y	1.984
Line length	0.1



Figura 148. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°4.

Colmena N°8.

Muestra 1

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.937
First point Y	1.04
Last point X	1.287
Last point Y	0.976
Line length	0.356

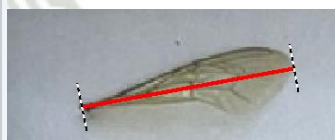


Figura 149. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 1 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.095
First point Y	1.143
Last point X	1.188
Last point Y	1.123
Line length	0.095



Figura 150. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 1 de la colmena N°8.

Muestra 2

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.944
First point Y	1.3
Last point X	1.297
Last point Y	1.252
Line length	0.356

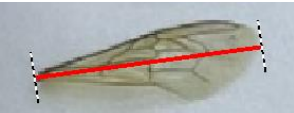


Figura 151. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 2 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.12
First point Y	1.412
Last point X	1.217
Last point Y	1.419
Line length	0.097




Figura 152. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 2 de la colmena N°8.

Muestra 3

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.966
First point Y	1.602
Last point X	1.332
Last point Y	1.583
Line length	0.366



Figura 153. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 3 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.098
First point Y	1.695
Last point X	1.188
Last point Y	1.698
Line length	0.09




Figura 154. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 3 de la colmena N°8.

Muestra 4

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.982
First point Y	1.852
Last point X	1.348
Last point Y	1.833
Line length	0.366




Figura 155. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 4 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.095
First point Y	1.958
Last point X	1.197
Last point Y	1.958
Line length	0.103



Figura 156. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 4 de la colmena N°8.

Muestra 5

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	0.966
First point Y	2.087
Last point X	1.339
Last point Y	2.083
Line length	0.372



Figura 157. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 5 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.095
First point Y	2.221
Last point X	1.194
Last point Y	2.221
Line length	0.1



Figura 158. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 5 de la colmena N°8.

Muestra 6

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.531
First point Y	0.995
Last point X	1.878
Last point Y	0.969
Line length	0.348



Figura 159. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 6 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.637
First point Y	1.13
Last point X	1.733
Last point Y	1.13
Line length	0.096



Figura 160. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 6 de la colmena N°8.

Muestra 7

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.586
First point Y	1.271
Last point X	1.955
Last point Y	1.255
Line length	0.369




Figura 161. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 7 de la colmena Nº8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.692
First point Y	1.409
Last point X	1.785
Last point Y	1.409
Line length	0.093




Figura 162. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 7 de la colmena Nº8.

Muestra 8

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.595
First point Y	1.522
Last point X	1.961
Last point Y	1.522
Line length	0.366




Figura 163. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 8 de la colmena Nº8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.737
First point Y	1.647
Last point X	1.82
Last point Y	1.631
Line length	0.085




Figura 164. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 8 de la colmena Nº8.

Muestra 9

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.656
First point Y	1.769
Last point X	2.032
Last point Y	1.769
Line length	0.376




Figura 165. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 9 de la colmena Nº8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.789
First point Y	1.907
Last point X	1.852
Last point Y	1.907
Line length	0.083



Figura 166. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 9 de la colmena N°8.

Muestra 10

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.618
First point Y	2.064
Last point X	1.981
Last point Y	2.067
Line length	0.363



Figura 167. Longitud total del ala interior derecha de la muestra 10 de la colmena N°8.

Selected Drawing	
Parameter	Value (in)
First point X	1.759
First point Y	2.231
Last point X	1.862
Last point Y	2.231
Line length	0.103



Figura 168. Longitud total del fémur posterior derecho de la muestra 10 de la colmena N°8.

Anexo 5. Secuencias de contig desde el código A1 hasta el código A5.2 realizados con el programa BioEdit.

Contig A1.

TCCTAATTTATTAGGAATTGCTCGTAAAATTGAATATGCAAATAGGAAA
TATCATT CAGGTTTAATATGAGTTGGAGTATTTATTGGATTTGCAATTT
GAAATTGTCTGGATCTCCTAAATGATATGGAAATTGAAAATTAATGAAT
ATAAAGATAAATAAGATGATATAAAATCCTAAAAGATCTTTAATTGAA
AAATATGGATGAAATGAAATTTTATAATTATTAATAATTTGATCCAAGAG
GATTAGATGATCCAGTTAAATGTAAGGCAAATAAATGAAGAATAACTA
TAAATAAAATTAATAATGGTAAAATAAAATGTAAAGAAAAAAATCGAT
TTAATGTAGCATTATTAATTGAAAATCCACCTCAAATTCATAATACAAT
TGTATCACCAATATAAGGAATTGCTGATAAAAGATTAGTAATAACTGTT
GCACCTCAATATGATATTTGTCCTCATGG

Contig A2.

GTTTAATATGAGTTGGAGTATTTATTGGATTTGCAATTTTGA AATTGTCT
GGATCTCCTAAATGATATGGAAATTGAAAATTAATGAATATAAAGATA
AATAAGATGATATAAAATCCTAAAAGATCTTTAATTGAAAATATGGAT
GAAATGAAATTTTATAATTATTAATAATTTGATCCAAGAGGATTAGATGA
TCCAGTTAAATGTAAGGCAAATAAATGAAGAATAACTATAAATAAAT
TAATAATGGTAAAATAAAATGTAAAGAAAAAAATCGATTTAATGTAGC
ATTATTAATTGAAAATCCACCTCAAATTCATAATACAATTGTATCACCA
ATATAAGGAATTGCTGATAAAAGATTAGTAATAACTGTTGCACCTCAAT
ATGATATTTGTCCTCATGG

Contig A3.1.

TTATGTACCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACT
AATCTTTTATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAAT
TTGAGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTT
TACATTTTATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTAT
TTGCCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTAAT
AATTATAAAATTTCAATTCATCCATATTTTCAATTAAGATCTTTTAGG
ATTTTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATA
TCATTTAGGAGATCCAGACAATTTCAAATTTGCAAATCCAATAAATACT
CCAATCATATTAACCTGAATGATATTTCTATTGTCATATTCAATTTT
ACGAGCAATTCCTAATAAATTAGGAGTGTAATA

Contig A3.2.

TTATGTCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACTAA
TCTTTTATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAATTT
GAGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTTTA
CATTTTATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTATTT
GCCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTTAATAA
TTATAAAATTTCATTTTCATCCATATTTTTCAATTAAGATCTTTTAGGAT
TTTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATATC
ATTTAGGAGATCCAGACAATTTCAAATTTGCAAATCCAATAAATACTCC
AACTCATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAATTTTAC
GAGCAATTCCTAATAAATTAGTGTAATA

Contig A4.1.

TTATGTACATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACTA
ATCTTTTATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAATT
TGAGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTTT
ACATTTTATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTATT
TGCCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTTAATA
ATTATAAAATTTCATTTTCATCCATATTTTTCAATTAAGATCTTTTAGGA
TTTTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATAT
CATTTAGGAGATCCAGACAATTTCAAATTTGCAAATCCAATAAATACTC
CAACTCATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAATTTTA
CGAGCAATTCCTAATAAATTAGTGTAATA

Contig A4.2.

TTATGTACCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACT
AATCTTTTATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAAT
TTGAGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTTT
TACATTTTATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTAT
TTGCCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTTAAT
AATTATAAAATTTCATTTTCATCCATATTTTTCAATTAAGATCTTTTAGG
ATTTTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATA
TCATTTAGGAGATCCAGACAATTTCAAATTTGCAAATCCAATAAATACT
CCAACTCATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAATTTT
ACGAGCAATTCCTAATAAATTAGGTGTAATA

Contig A5.1.

TATTACACTAATTTATTAGGAATTGCTCGTAAAATTGAATATGCAAATA
GGAAATATCATT CAGGTTTAATATGAGTTGGAGTATTTATTGGATTTGC
AATTTTGAAATTGTCTGGATCTCCTAAATGATATGGAAATTGAAAATTA
ATGAATATAAAGATAAATAAGATGATATAAAATCCTAAAAGATCTTTA
ATTGAAAAATATGGATGAAATGAAATTTTATAATTATTA AAAATTTGATC
CAAGAGGATTAGATGATCCAGTTAAATGTAAGGCAAATAAATGAAGAA
TAACTATAAATAAAATTAATAATGGTAAAATAAAATGTAAAGAAAAAA
ATCGATTTAATGTAGCATTATTAATTGAAAATCCACCTCAAATTCATAA
TACAATTGTATCACCAATATAAGGAATTGCTGATAAAAAGATTAGTAATA
ACTGTTGCACCTCAATATGATATTTGTC

Contig A5.2.

CCTAATTTATTAGGAATTGCTCGTAAAATTGAATATGCAAATAGGAAAT
ATCATT CAGGTTTAATATGAGTTGGAGTATTTATTGGATTTGCAATTTG
AAATTGTCTGGATCTCCTAAATGATATGGAAATTGAAAATTAATGAATA
TAAAGATAAATAAGATGATATAAAATCCTAAAAGATCTTTAATTGAAA
AATATGGATGAAATGAAATTTTATAATTATTA AAAATTTGATCCAAGAGG
ATTAGATGATCCAGTTAAATGTAAGGCAAATAAATGAAGAATAACTAT
AAATAAAATTAATAATGGTAAAATAAAATGTAAAGAAAAAAAATCGATT
TAATGTAGCATTATTAATTGAAAATCCACCTCAAATTCATAATACAATT
GTATCACCAATATAAGGAATTGCTGATAAAAAGATTAGTAATAACTGTTG
CACCTCAATATGATATTTGTCCTCATGG

Anexo 6. Secuencias de referencia utilizadas en el árbol filogenético de la figura 58.

>*Apis mellifera scutellata*_cytb_referencia_ MG552703.1

TATGTA
CTAATC
ATCTG
TTTAC
ATTTG
ATAATT
GGATTT
TATCAT
CTCCA
TTACG

>*Apis mellifera ligustica*_cytb_referencia_ GU979492.1

TATGTA
CTAATC
ATTTG
TTTAC
ATTTG
ATAATT
GGATTT
TATCAT
CTCCA
TTACG

>*Apis mellifera carnica*_cytb_referencia_ GU979494.1

TATGTA
CTAATC
ATTTG
TTTAC
ATTTG
ATAATT
GGATTT

TATCATTTAGGAGATCCAGATAATTTTAAAATTGCAAATCCAATAAATA
CTCCAACCTCATATTAACCTGAATGATATTTCTTATTTGCATATTCAATT
TTACGAGCAATTCCTAATAAATTAGGAGGTGTAAT

>*Apis mellifera scutellata*_cytb_resultado BLAST

ACTACCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACTAAT
CTTTTATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAATTTG
AGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTTTAC
ATTTTATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTATTTG
CCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTTAATAAT
TATAAAATTTCAATTCATCCATATTTTCAATTAAGATCTTTTAGGATT
TTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATATCA
TTTAGGAGATCCAGACAATTTCAAATTGCAAATCCAATAAATACTCCA
ACTCATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAATTTTACG
AGCAATTCCTAATAAATTAGGA

>*Apis mellifera carnica*_cytb_resultado BLAST

CCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACTAATCTTT
TATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAATTTGAGGT
GGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTTTACATTT
TATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTATTTGCCTT
ACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTTAATAATTATA
AAATTTCAATTCATCCATATTTTCAATTAAGATCTTTTAGGATTTTAT
ATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATATCATTTA
GGAGATCCAGACAATTTCAAATTGCAAATCCAATAAATACTCCAACCTC
ATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAATTTTACGAGCA
ATTCCTAATAAATTAGG

>*Apis mellifera ligustica*_cytb_resultado BLAST

CCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTACTAATCTTT
TATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGAATTTGAGGT
GGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCTTTACATTT
TATTTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTTATTTGCCTT

ACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTTAATAATTATA
AAATTTCAATTCATCCATATTTTTCAATTAAGATCTTTTAGGATTTTAT
ATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCCATATCATTTA
GGAGATCCAGACAATTTCAAATTTGCAAATCCAATAAATACTCCAACTC
ATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAATTTTACGAGCA
ATTCCTAATAAATTAGGA

>*Apis mellifera carpatica*_cytb_resultado BLAST

TATGTACTACCATGAGGACAAATATCATATTGAGGTGCAACAGTTATTA
CTAATCTTTTATCAGCAATTCCTTATATTGGTGATACAATTGTATTATGA
ATTTGAGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTC
TTTACATTTTATTTACCATTATTAATTTTATTTATAGTTATTCTTCATTT
ATTTGCCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCTCTTGGATCAAATTTA
ATAATTATAAAATTTCAATTCATCCATATTTTCAATTAAGATCTTTTA
GGATTTTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTTCAATTTCC
ATATCATTTAGGAGATCCAGACAATTTTAAAATTGCAAATCCAATAAAT
ACTCCAACCTCATATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATATTCAAT
TTTACGAGCAATTCCTAATAAATTAGGAGGTGTAAT