



**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE COLONIAS
COMERCIALES Y SILVESTRES DE *Apis mellifera* EN ARGENTINA**

Marcelo Nicolás Agra

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de

DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS

ÁREA PRODUCCION ANIMAL

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

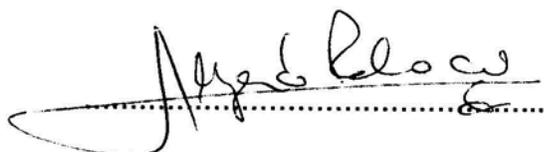
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

**Unidad Integrada Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP-Estación
Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA**

**Balcarce, Argentina
Setiembre, 2018**

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE COLONIAS
COMERCIALES Y SILVESTRES DE *Apis mellifera* EN ARGENTINA**

Marcelo Nicolás Agra



Directora de Tesis. María Alejandra Palacio. Ingeniera Agrónoma, M. Sc, Doctora en Ciencias Agrarias



Co-director de Tesis. Pablo Marcelo Corva. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.

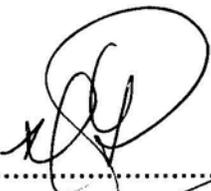
.....

Asesora externa. Silvia Beatriz Lanzavecchia. Licenciada en Ciencias Biológicas, Dra.

**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE COLONIAS
COMERCIALES Y SILVESTRES DE *Apis mellifera* EN ARGENTINA**

Marcelo Nicolás Agra

Aprobada por:


.....
Dra. Cristina Noemi Garderal *p/skyte*
Prof. Liliana IRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMdP


.....
Dra. María Isabel Remis *p/skyte*
Prof. Liliana IRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMdP


.....
Dr. Juan Pablo Torretta. *p/skyte*
Prof. Liliana IRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMdP

DEDICATORIA

A la memoria de mí querido viejo

Y a la de Inger, obvio

A los que amo:

Camila, razón de mi existir

Mamá y Sisse (P)

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Alejandra por la paciencia y la confianza (grande jefa!!!).

A mi co-director, Pablo Corva, por sus siempre valerosas aportaciones y dedicación.

A mi asesora, Silvia Lanzavecchia, por enseñarme mucho de lo que sé, por estar siempre al pie del cañón.

A Sergio (Tiburcio), Analía (my sub-chieff) y Sole, la triada ofensiva de apicultura, siempre dispuestos a dar una mano, un consejo y (lo más importante) ser buena gente. Gracias por todo chicos.

A Sergio Feingold, que desde mis primeras incursiones en la UI-Balcarce abrió generosamente las puertas de su laboratorio y me dio siempre una ayuda (gracias boss).

Acá se viene largo el asunto, a la muchachada del Laboratorio de Agrobiotecnología: Gaby Massa, Nati Norero, Sil Divito, los Tinchos (Carboni y Castellote), al tocayo Monte, Sofi Sucar, Pau Laserna (T. R), Flor Rey, Ceci Decima y a los gerentes de la COPyF Leo Storani y Mati Gonzales. Que se puede decir chicos, nunca me sentí incómodo con ustedes, siempre me ayudaron y preocuparon por mí, ¿¿qué más se puede pedir?? Gracias Totales.

A Ceci Creus, Sil Larraburu, Meli Amenta, Flor Salcedo y Guille Maroniche, del laboratorio de Bioquímica, buenos investigadores y mejores compañeros. Gracias.

A la gente del Laboratorio de Insectos del IGEEAF del INTA-Castelar, por su colaboración y consejos, especialmente a Jorge Cladera, Claudia Conte y Alejandra Scanapieco.

A José Luís, a Juan y a Francisco (Colorao), por su amistad, sus consejos y su apoyo incondicional, gracias compañeros!!!.

A Lucho Velázquez, Ale Bolton (F), Nahuel Peralta (R), Sonyi Luque y Lau Pouzo, incansables compañeros de travesía y buenos momentos.

A Fabi Moreno.

A la Dra Fiorela De Piano.

A la compañera Ceci Aranguren, por los buenos momentos (y mates) compartidos.

A Sol, y a sus bellos retoños, la kumpita Nacha y Fermín.

A Virginia, por la buena onda y la paciencia.

A las secretarías de Agronomía de la EEA-Balcarce, las que ya se jubilaron y soportaron estoicamente mis inoportunas e inexpertas consultas, Cristina Murcia y Adela Simbali, y las que todavía me soportan, Lau Erquiaga y Caro Gorosito, gracias chicas!!!!

A Marita, secretaria de posgrado, que también me aguantó y me sigue aguantando, gracias compañera!!!!

A las técnicas y técnicos de INTA de todo el país que permitieron la recolección de gran parte del material de este trabajo, especialmente a la compañera Clemencia Barberena, a mi amiga María Belén Camacho, a Nati Messina, Juli Merke, Nati Bulacio, Emilio Figini, Willy Huerta y en el recuerdo a Juan Carlos Juarróz.

A Andrea Aignasse, la muestreadora formoseña, pilar de la apicultura de Formosa, ¡¡gracias Andre!!

A los apicultores que generosamente se ocuparon de muestrear sus colonias, se tomaron el trabajo de buscar colonias silvestres y además llenar planillas para remitirmelas, gracias a todos especialmente al amigazo Lisandro Balbuena, a Raúl Daniele y a Juan José Mange.

A toda la gente de INTA-Balcarce que siempre está presente y dispuesta a dar una mano, desde los directivos como Enrique Vivianni-Rossi y Ale, su eficaz secretaria, hasta las chicas de la limpieza que hacen de este un lugar bello para trabajar, sin olvidarme de Grace Chiarinotti, Betty, Laura Malena, el amigazo y compañero Leandro Cambareri, todos, absolutamente todos. Muchas gracias.

Al “Pelado” Berti, que se aguanta ser mi amigo desde hace unas décadas.

Al “Kato” Rodríguez, cuantos años han pasado, eh?? Gracias Kato..

A mis “hermanos”, Martín, “Mamocho” y Mauri, simplemente gracias.

A los “amigüizos” Ricardo y Fabio, grandes amigos y docentes comprometidos con su rol, orgullo de quién escribe.

A mi amigo, el Inyennieri Adriano Sottile; sobreviviente de aquellas épocas, gracias “Manza”...

Al grupete geronte, Freddy, Magú, Pali, Richard, Andrés y Edu, por estar, que no es poco.

A la cofradía genetoide, quién diría que llegaríamos acá, eh?? Gracias PP, Corito, Hugo, Max, Beto, Meca. Siempre me acuerdo de ustedes..

Al Dr. Alejandro Vozzi, el Gringo, por siempre aconsejarme, y a su bella familia.

A mí compadre, Juancito, a mi comadre Nelci y al gurka mayor, a Elián. Gracias por el aguante.

A la Dra. Elina Francisco, la CSI-Junín (vamos Pepa!!)

A mis amigas Caro Moreno y Lili Cabral, a quienes conocí cuando ser universitario era solo una gran aventura y hoy, pese al tiempo y la distancia, siguen estando ahí como el primer día.

A mis ahijadas, Verena y Luna, mis dos pimpollos orgullo del padrino....

A los kumpas que la militancia me dio y que hoy forman parte indisoluble de mi existencia, Gracias Negro, Black, Anahí, Fabián, Didi y su familia, a los Ussai.....

A la muchachada de Unidad Ciudadana (La Cámpora Tandil), fuerza que estamos volviendo!!!!

A mis abuelos, Gerardo, Niels Peder (Wa-wa) y Virtudes, siempre vivos en el recuerdo.

A mis tíos Elvira y Héctor, compañeros de buenas épocas y actuales desventuras que fortalecen la vuelta. Gracias por todo tíos.....

Al Dr. Néstor Kirchner y la Dra. Cristina F. de Kirchner, ex presidentes argentinos para los cuales la ciencia y la tecnología juegan un rol central en el desarrollo de los pueblos libres y actuaron en consecuencia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Taxonomía y origen de <i>Apis mellifera</i>	1
1.2 Biología de <i>Apis mellifera</i>	5
1.3 Introducción de <i>Apis mellifera</i> en América y Argentina.....	6
1.4 Caracterización de la diversidad presente en <i>Apis mellifera</i>	8
1.4.1 Morfometría.....	9
1.4.2 Aloenzimas.....	10
1.4.3 Marcadores moleculares en el ADN	10
1.4.3.1 Haplotipo mitocondrial	10
1.4.3.2 Microsatélites.....	13
1.5 Antecedentes de la caracterización poblacional de <i>A. mellifera</i> en Argentina	16
1.6 Actividad apícola en Argentina	18
1.7 Hipótesis	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos generales.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Muestras.....	26
3.2 Extracción de ADN.....	28
3.3 Análisis de ADN mitocondrial.....	29
3.4 Secuenciación automática de ADN mitocondrial.....	30
3.5 Análisis de ADN nuclear (microsatélites).....	31
3.5.1 Amplificación por PCR.....	31
3.5.2 Análisis de datos.....	32
3.5.3 Estructura poblacional.....	34
3.5.4 Distribución de AA en relación a variables bioclimáticas	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Muestras.....	36
4.2 Extracción de ADN.....	37
4.3 Análisis de ADN mitocondrial.....	37
4.4 Secuenciación automática de ADN mitocondrial.....	42
4.5. Frecuencias haplotípicas obtenidas.....	47
4.6 Análisis de ADN nuclear (microsatélites).....	
4.6.1 Amplificación por PCR.....	47
4.6.2 Análisis de datos.....	47
4.6.3 Estructura poblacional.....	54
4.6.4 Distribución de AA en relación a variables bioclimáticas.....	61
5. DISCUSIÓN.....	64
6. CONCLUSIONES.....	74
7. BIBLIOGRAFÍA.....	76

8. ANEXOS.....	87
8.1. Tablas	87
8.1.1. Tabla XIII: Secuencias de la region intergénica COI-COI	87
8.1.2. Tabla XIV: Frecuencia Alélica y tamaño muestral de las poblaciones analizadas.....	94
8.2. Figuras.....	87
8.2.1. Figura XXVI: Planilla para la toma de muestras de los apiarios.....	87
8.2.2. Figura XXVII: Apiarios cuyas muestras de abejas se han utilizado en esta tesis.....	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Muestras discriminadas por provincia y origen28
Tabla 2.	Características de los cebadores utilizados para amplificar regiones microsatélites de <i>A. mellifera</i>31
Tabla 3.	Localidades muestreadas por provincia36
Tabla 4.	Muestras discriminadas por origen (silvestre o comercial), lugar y haplotipo.....45
Tabla 5.	Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de ocho microsatélites analizados en las poblaciones de <i>A. mellifera</i> estudiadas agrupadas por provincia. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre las poblaciones y el correspondiente a los individuos dentro de las poblaciones.48
Tabla 6.	Parámetros de diversidad genética de <i>A. mellifera</i> de Argentina. Los datos se se muestran por provincia y por marcador microsatelite. Na: número de alelos por locus; HO: heterocigosidad observada; HE: heterocigosidad esperada; Nulos: frecuencia estimada de alelos nulos; *: valores significativamente diferentes de las expectativas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (después de la corrección de Bonferroni); #: Frecuencias significativas de alelos nulos (P<0.05).....49
Tabla 7.	Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de ocho microsatélites analizados en las poblaciones de <i>A. mellifera</i> estudiadas. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre las poblaciones, entre grupos de poblaciones y el correspondiente a los individuos dentro de las poblaciones.....51
Tabla 8.	Valores F_{ST} estimados entre cada par de poblaciones de <i>A. mellifera</i> utilizando información de ocho loci microsatélites51
Tabla 9.	Matriz del número estimado de migrantes Nm.52
Tabla 10.	Valores de F_{IS} obtenidos promediando todos los loci con al menos dos individuos analizados por muestra53
Tabla 11.	Porcentaje de colonias silvestres (CS%), haplotipos africanos y porcentaje de abejas africanizadas (AA%) en los grupos definidos en el DAPC59
Tabla 12.	Parámetros de diversidad genética para los cuatro <i>clusters</i> obtenidos mediante

análisis de DAPC. Se muestra el número de alelos (N_a), número de alelos privados (pN_a), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad esperada no sesgada (uH_e), promedio y error estándar...60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución mundial de las distintas especies del género <i>A. mellifera</i>	1
Figura 2.	Esquema de las tres hipótesis del origen de <i>A. mellifera</i> y su posterior distribución	3
Figura 3.	Distribución de las principales subespecies de <i>A. mellifera</i> en su lugar de origen	3
Figura 4.	Ciclo de vida de las tres castas de <i>A. mellifera</i>	6
Figura 5.	Dispersión de la abeja africanizada en el continente americano.....	8
Figura 6.	Esquema del ADNmt de <i>A. mellifera</i>	11
Figura 7.	Distribución de Africanización en Argentina. Mapas de Argentina con los resultados de los estudios de Kerr <i>et al.</i> , (1982) (A) y Sheppard <i>et al.</i> , (1991) (B).....	17
Figura 8.	Zona Apícolas de Argentina.: Mapa de regiones fitogeográficas y apícolas de Argentina.....	19
Figura 9.	Localización de sitios de muestreo de colonias de <i>A. mellifera</i> en Argentina, Detalle del área de muestreo que indica la ubicación de los apiarios y colonias silvestres muestreados (puntos rojos) en las 10 provincias. 1 indica el límite de saturación de AA, 2 límite de zona colonización permanente de AA, 3 límite de colonización temporaria de AA (según Sheppard <i>et al.</i> , 1991). 32° de latitud Sur, límite de Africanización (según Kerr <i>et al.</i> , 1982).....	26
Figura 10.	Fotografía de un gel de agarosa mostrando el ADN total extraído de muestras de <i>A. mellifera</i> provenientes de Entre Ríos.	37
Figura 11.	Fotografía de un gel de agarosa mostrando: Calles 1 a 3) Fragmento Cit B amplificado por PCR sin digerir; Calle 4) 25 bp DNA Step Ladder (Promega); Calles 5 a 10) Patrones de restricción del fragmento de	

- amplificación de la región Cit B con la enzima Bgl II, muestras provenientes de las poblaciones de Ribeirão Preto (Brasil), Jujuy Buenos Aires, Tucumán, Mendoza y Santa Fe (en ese orden).....38
- Figura 12. Fotografía de un gel de agarosa al 4% mostrando: calles 1 a 6) Patrones de restricción de fragmentos amplificados de la región intergénica COI-COII con la enzima Hinf I obtenidos de poblaciones de Brasil, Jujuy, Buenos Aires, Tucumán, Mendoza y Santa Fe; Calles 7 a 9) fragmentos amplificados de la región intergénica COI-COII sin digerir; Calle 10) 25 bp DNA Step Ladder (Promega). Calle 1)-haplotipo A4, calle 2 haplotipo A1, calles 3 y 6 haplotipo C2J y calles 4 y 5 haplotipo C1.39
- Figura 13. Fotografía de un gel de agarosa al 4% mostrando: calles 1 a 6) Patrones de restricción de fragmentos amplificados de la región intergénica COI-COII con la enzima Hinf I obtenidos de poblaciones de Brasil, Jujuy, Buenos Aires, Tucumán, Mendoza y Santa Fe; Calles 7 a 9) fragmentos amplificados de la región intergénica COI-COII sin digerir; Calle 10) 25 bp DNA Step Ladder (Promega). Calle 1 haplotipo A4, calle 2 haplotipo A1, calles 3 y 6 haplotipo C2J y calles 4 y 5 haplotipo C1.....40
- Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 4% mostrando: Calle 1) Patrón de restricción de la región intergénica COI-COII con la enzima Hinf I de una muestra de Buenos Aires; calles 2, 3 y 4) Patrón de restricción de muestras de La Pampa; Calle 5) DNA 50 pb step ladder (Promega). Calle 6) DNA step ladder 100pb (Promega). Calles 1 y 2 haplotipo C1, calles 3 y 4 haplotipo M4..... 41
- Figura 15. Esquema de los haplotipos detectados. El haplotipo C2J difiere con el haplotipo C1 con cambios en la composición de 4 nucleótidos42
- Figura 16. Frecuencia de haplotipos detectados en las 10 provincias analizadas.....44
- Figura 17. Esquema de las relaciones evolutivas entre haplotipos, y su frecuencia en cada una de las provincias estudiadas.....46
- Figura 18. Árboles de agrupamiento en función de distancias genéticas: A. método UPGMA. B.método "Neighbour-Joining".....54
- Figura 19. Determinación del número más probable de *clusters* o grupos genéticos ($K = 2$) que explicarían la variación encontrada en ocho

- microsatélites en *A. mellifera* en Argentina.....55
- Figura 20. Gráfico que muestra la composición genética de *A. mellifera*, analizadas en el presente trabajo. Cada individuo está representado por una barra vertical dividida en segmentos de colores con la longitud de cada segmento que representa la proporción del genoma del individuo de $K = 2$ a $K = 4$. Los individuos se agruparon por origen (colonias comerciales y silvestres) y su correspondiente haplotipo mitocondrial. La flecha blanca indica un grupo de muestras de BA (Buenos Aires) que permanecieron altamente homogéneas a través de los análisis con diferentes valores de K56
- Figura 21. Numero de BIC (*Bayesian Inference Criterion*, Criterio de Inferencia Bayesiana) versus número de clústers existentes en *A. mellifera*.....57
- Figura 22. Diagrama de dispersión de individuos sobre los dos componentes principales del Análisis de DAPC basado en el BIC. Los individuos se representan como puntos y el clúster como elipses. Los valores propios del análisis se muestran en el recuadro.....58
- Figura 23. Número de muestras por provincia incluidas en cada clúster después de aplicar el criterio BIC para el análisis de componentes principales (DAPC)..61
- Figura 24. A) Probabilidad de ocurrencia de haplotipos africanos en función de la latitud, estimada mediante regresión logística. S: Colonias silvestres. C: colonias comerciales. B) Regresión lineal del grado de africanización vs latitud, basado en el análisis de marcadores nucleares.....62
- Figura 25. A a E: Probabilidad de ocurrencia de haplotipos africanos estimados por regresión logística. Gráficos F a J: Regresión lineal del grado de africanización en diferentes variables relacionadas con el clima.63

RESUMEN

La abeja doméstica o abeja melífera, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) , es un insecto social perteneciente al orden Hymenoptera, familia Apidae. Esta especie está estrechamente relacionada con la actividad humana a través de la apicultura para la obtención de productos de la colmena (miel, propóleo, cera y jalea real), como también la importante tarea de polinización de cultivos agrícolas y de especies silvestres. Las primeras introducciones de *A.mellifera* al continente americano se realizaron desde Europa; específicamente en nuestro país, las primeras colonias establecidas provinieron de Francia e ingresaron en 1830. El ingreso de distintas subespecies de *A. mellifera* (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. carnica* y, principalmente, *A. m. ligustica*) continuó a lo largo del siglo XX. En el año 1957 ocurrió la dispersión accidental de colonias silvestres de la subespecie africana *A. m. scutellata*, en Brasil, dando origen a un proceso de hibridación con linajes europeos previamente establecidos, denominado Africanización. Este suceso ha ocasionado un perjuicio a la apicultura por las características negativas de las abejas africanizadas. Asimismo, la Africanización contribuyó a complejizar la estructura genética de las colonias comerciales y silvestres en América. En nuestro país, la distribución de estas poblaciones se concentraba en el norte del territorio aunque posteriormente, debido a las actividades comerciales y movimiento de colonias (trashumancia) realizados por apicultores, esa distribución se vio modificada. El presente trabajo de tesis doctoral tuvo como objetivo general proporcionar una descripción actualizada de la diversidad y estructura genética de colonias comerciales y colonias silvestres de *A.mellifera*. Se realizó un muestreo de 396 colonias de abejas localizadas en la principal región apícola de Argentina, incluyendo las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes, Chaco, Tucumán, Santiago del Estero y Formosa. La diversidad genética se analizó utilizando dos marcadores del ADN mitocondrial (región intergénica Citocromo Oxidasa I-Citocromo Oxidasa II y Citocromo B) y del ADN nuclear (8 microsatélites). Se detectaron tres haplotipos de linaje europeo (M4, C1, C2J) y tres de origen africano (A1, A4, A30). Los haplotipos europeos se encontraron principalmente en apiarios comerciales, mientras que los haplotipos de origen africano se detectaron en alta frecuencia en colonias silvestres. Asimismo, se observó una distribución preponderante de haplotipos africanizados en el norte del territorio. Respecto

a los marcadores nucleares, los resultados mostraron un alto grado de hibridación entre las poblaciones de origen europeo y africano. Los análisis de correlación mostraron una asociación significativa entre la distribución de Africanización y la latitud.. Los estudios realizados en esta tesis permitieron identificar el origen y caracterizar la variabilidad genética presente en las colonias comerciales y silvestres de *A.mellifera* de la principal zona apícola de Argentina. Los marcadores utilizados brindaron información fundamental respecto a la distribución de la diversidad genética y permitieron complementar y actualizar la información existente, con un análisis detallado de los principales factores que explican la compleja estructura genética de las abejas en nuestro país.

Palabras claves: Abeja europea, Abeja africanizada, haplotipos mitocondriales, microsatélites, estructura poblacional, hibridación.

ABSTRACT

The domestic bee or honey bee, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), is a social insect belonging to the order Hymenoptera, family Apidae. This species is closely related to human activity through beekeeping to obtain products from the hive (honey, propolis, wax and royal jelly), as well as the important task of pollination of agricultural crops and wild species. The first introductions of *A. mellifera* to the American continent were made from Europe; specifically in our country, the first colonies came from France and entered in 1830. The income of different subspecies of *A. mellifera* (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. carnica* and, mainly, *A. m. ligustica*) continued throughout the 20th century. In 1957, the accidental dispersion of wild colonies of the African subspecies *A. m. scutellata*, in Brazil, giving rise to a process of hybridization with previously established European lineages, called Africanization. This event has caused damage to beekeeping due to the negative characteristics of Africanized bees. Likewise, Africanization contributed to make the genetic structure of commercial and wild colonies in America more complex. In our country, the distribution of these populations was concentrated in the north of the territory but later, due to the commercial activities and movement of colonies (transhumance) carried out by beekeepers, this distribution was modified. The main objective of this PhD thesis was to provide an updated description of the diversity and genetic structure of commercial colonies and wild colonies of *A. mellifera*. A sampling of 396 colonies of bees located in the main apicultural region of Argentina was carried out, including the provinces of Buenos Aires, La Pampa, Cordoba, Santa Fe, Entre Rios, Corrientes, Chaco, Tucumán, Santiago del Estero and Formosa. The genetic diversity was analyzed using two markers of mitochondrial DNA (intergenic region Cytochrome Oxidase I-Cytochrome Oxidase II and Cytochrome B) and nuclear DNA (8 microsatellites). Three haplotypes of European lineage (M4, C1, C2J) and three of African origin (A1, A4, A30) were detected. European haplotypes were found mainly in commercial apiaries, while haplotypes of African origin were detected in high frequency in wild colonies. Likewise, a preponderant distribution of Africanized haplotypes was observed in the northern part of the territory. Regarding nuclear markers, the results showed a high degree of hybridization between European and African populations. The correlation analyzes showed a significant association between the distribution of Africanization and latitude. The studies carried out in this thesis allowed

to identify the origin and to characterize the genetic variability present in the commercial and wild colonies of *A. mellifera* of the main apicultural area of Argentina. The markers used provided information regarding the distribution of genetic diversity and allowed complementing and updating existing information, with a detailed analysis of the main factors that explain the complex genetic structure of bees in our country.

Key words: European honeybees, Africanized honeybees, mitochondrial haplotypes, microsatellites, population structure, hibridation.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADNmt: ADN mitocondrial

ADN: Acido Desoxirribonucleico

ACZ: Área de Congregación de Zánganos

COI-COII: Citocromo Oxidasa I- Citocromo Oxidasa II

MINAGRO: Ministerio de Agroindustria

PBI: Producto Bruto Interno

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

RENAPA: Registro Nacional Apícola

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Animal

SNPs: Single Nucleotide Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeat

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Taxonomía y origen de *Apis mellifera*

Las abejas melíferas se encuentran dentro del Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Hymenoptera, Familia Apidae y género *Apis*. Además de *A. mellifera*, el género *Apis* está conformado por otras 8 especies: *A. dorsata* o abeja gigante, *A. cerana* o abeja oriental, *A. florea* o abeja enana, *A. nigrocincta*, *A. koschevnikovi*, *A. andreniformis*, *A. nuluensis* y *A. laboriosa* (Garnery et al., 1991; Koeniger y Koeniger, 2000; Franck et al., 2000; Le Conte y Navajas, 2008). Además de *A. mellifera* la otra especie explotada comercialmente es *A. cerana*, principalmente en China (Tan et al., 2005), aunque aún en Asia está siendo reemplazada por *A. mellifera* en condiciones de apicultura comercial. La distribución de las otras especies del género *Apis* está restringida a su lugar de origen (Figura 1A y B), ocupando las distintas áreas boscosas del Extremo Oriente y no son explotadas comercialmente. Debido a su importancia económica como productora de miel y principalmente por su actividad como polinizadora de cultivos, *A. mellifera* es el insecto social utilizado con fines comerciales con mayor distribución en el mundo. (Figura 1B)

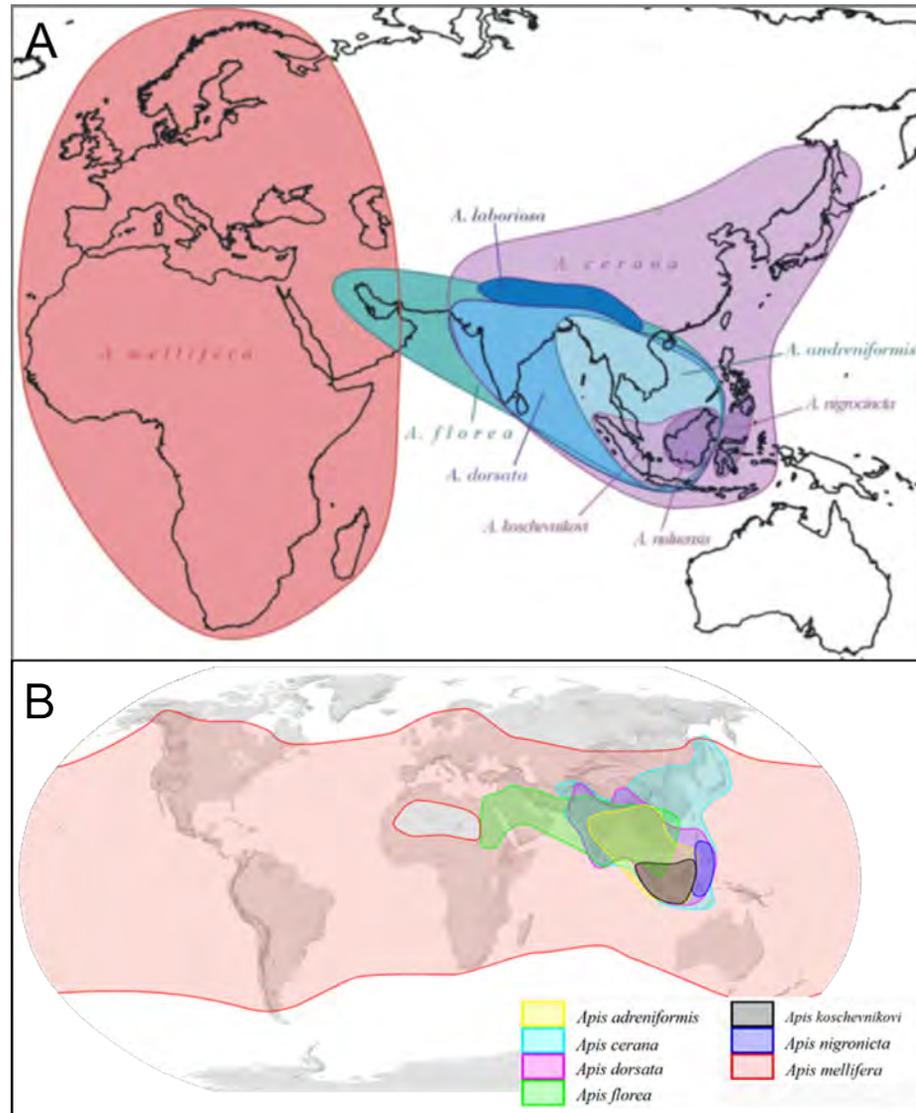


Figura 1. A. Distribución mundial de las distintas especies del género *Apis* en su lugar de origen (Le Conte y Navajas 2008, según Franck et al., 2000). B. Distribución de *A. mellifera* en el mundo.

Apis mellifera es un insecto social benéfico, considerado el principal polinizador de cultivos comerciales y especies vegetales silvestres (Buchmann y Nabhan, 1996; Klein et al., 2007, Brown y Paxton, 2009), como asimismo el principal productor de miel. Se considera actualmente que existen 4 linajes (A, C, M y O), en los cuales las más de 26 subespecies de *A. mellifera*, aunque el origen geográfico de la misma es todavía un tema controversial y ha propiciado el surgimiento de diferentes hipótesis. Se han planteado tres posibles escenarios para explicar el origen evolutivo de *A. mellifera*. El primero, descripto

por Ruttner et al (1978), sugiere que esta especie tiene su centro de origen en el Medio Oriente o en el noreste de África, desde donde colonizó Europa a través de dos rutas: una directa a través del este de Europa y otra occidental, a través del norte de África y la Península Ibérica. Esta hipótesis se basa en el análisis morfológico que sugiere la continuidad entre los linajes A (África) y M (oeste y norte de Europa) (Figura 2A). Una segunda hipótesis, basada principalmente en el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) (Cornuet y Garnery, 1991; Garnery et al., 1992) también propone un origen en Oriente Medio, pero no incluye la colonización de Europa a través de una ruta occidental. Esta hipótesis se basa en árboles filogenéticos que agrupan a los brazos evolutivos A y C (este de Europa), este último en lugar del brazo evolutivo M, y argumenta en contra de la migración a través del estrecho de Gibraltar (Figura 2B). La tercera hipótesis plantea un origen africano y fue propuesta por Wilson (1971), basada en el comportamiento de las abejas de formar el denominado “cluster de invierno” para mantener la homeostasis de la colonia, necesaria en los climas templados. Se basa en que actualmente *A. mellifera* no se distribuye en los trópicos de Asia, por lo que plantea que un origen africano es el más plausible. Un estudio genético realizado por Whitfield et al. (2006) con 1136 SNPs (polimorfismos de nucleótido simple), analizando 341 individuos de 14 subespecies geográficas de *A. mellifera* y tres grupos externos (*A. cerana*, *A. florea* y *A. dorsata*) argumenta a favor de esta última hipótesis (Figura 2C).

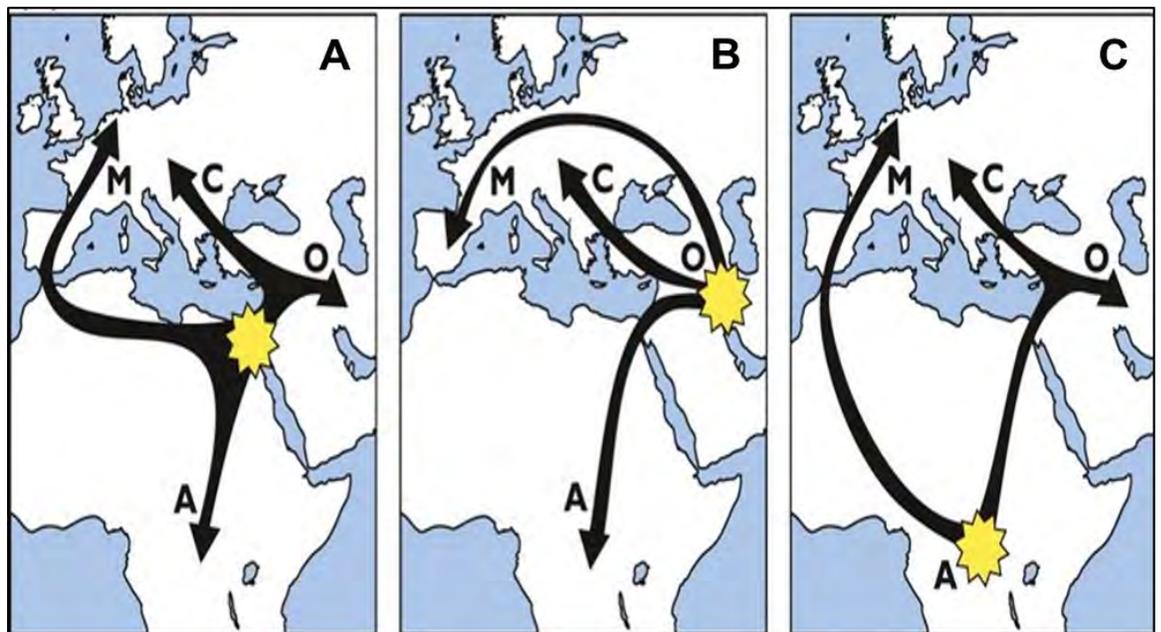


Figura 2. Esquema de las tres hipótesis del origen de *Apis mellifera* y su posterior distribución A) Centro de origen en Medio Oriente y colonización Europa a través de dos rutas, B) Origen en Medio Oriente y colonización de Europa por ruta occidental, C) Origen Africano. (Han et al., 2012.)

La divergencia entre los linajes M y C y la existencia de un linaje O (Oriente medio) filogenéticamente relacionado a C, continúa generando controversias sobre el origen geográfico de esta especie (Wallberg et al., 2014).

Sin embargo, existe consenso en el patrón de dispersión de las abejas por Europa y Asia. En África y en el sur de la península ibérica se dispersó el brazo A, en el norte de la península ibérica y en el oeste y norte de Europa (incluyendo las islas británicas) se desplazó el brazo M. El brazo C se extendió desde la península italiana y Europa del este hacia el Oriente Medio. El linaje O, se dispersó en una restringida zona del Noreste de África y cercano oriente, en Egipto y Líbano (Franck et al., 2001; Whitfield et al., 2006; Wallberg et al., 2014).

Se han descrito más de 26 subespecies de *A. mellifera*, tanto a nivel morfológico como molecular, adaptadas a distintas condiciones climáticas y ecológicas. Del total de subespecies reconocidas, las más representativas de cada linaje son: *A. m. mellifera* (Linnaeus, 1758) y *A. m. iberiensis* (Engel, 1999) , 2 subespecies representativas del brazo M, *A. m. ligustica* (Spinola, 1806) y *A. m. carnica* (Pollman, 1879) del brazo C y las subespecies *A. m. scutellata* (Lepetelier, 1836) y *A. m. adansonii* (Latreille, 1804) representan el brazo A (Ruttner et al., 1978; Clarke et al., 2001). Por último, *A. m. syriaca* (Skorikov, 1829) y *A. m. anatoliaca* (Maa, 1953) son dos subespecies del brazo O (Figura 3).



Figura 3. Distribución de las principales subespecies de *A. mellifera* en su lugar de origen. Tomado de Le Conte y Navajas 2008, según Ruttner, 1988.

Las abejas del brazo evolutivo A se caracterizan por su reducido tamaño, alto comportamiento defensivo y alta tasa de enjambrazón y abandono de colmena, sobre todo las subespecies del sur de África, *A. m. scutellata* y *A. m. capensis*. Las abejas europeas, tanto del brazo evolutivo M como del C, tienen un tamaño mayor a las del brazo A, poseen bajo comportamiento defensivo y una reducida tasa de abandono de colmena. Estas abejas están adaptadas a climas templados a fríos. La subespecie *A. m. ligustica* (brazo evolutivo C), o abeja italiana, hoy en día es la más difundida en la apicultura comercial, principalmente por su productividad y mansedumbre, llegando a desplazar a

otras subespecies de su ambiente natural, como sucede con *A. m. mellifera* (brazo evolutivo M) en los países escandinavos (Jensen et al., 2005).

1.2 Biología de *Apis mellifera*

Apis mellifera es un insecto social holometábolo, es decir que en su desarrollo atraviesa por una metamorfosis completa. El ciclo de vida se caracteriza por la presencia de los estadios de huevo, larva, pupa y adulto (Figura 4). En la colonia se distinguen 3 castas: la reina, las abejas obreras y los zánganos. Cada colonia está formada por una reina, varios miles de obreras y, dependiendo de la estación del año, hasta cientos de zánganos. Al ser una especie haplodiploide, la reina y las obreras se generan a partir de huevos fecundados ($2n$) y los zánganos, a partir de huevos sin fecundar (n). Las diferencias fenotípicas entre la reina y las obreras se deben fundamentalmente a la alimentación diferencial que reciben en el estadio de larva. La reina es fecundada en vuelo por una cantidad de zánganos que varía entre 7 y 17. Los apareamientos ocurren a varios metros de altura y a una distancia variable del apiario de origen, en zonas denominadas “Área de congregación de Zánganos” ACZ (Baudry et al., 1998). Estas zonas son efímeras y congregan zánganos provenientes de diferentes colmenas de la zona aledaña (aproximadamente 2 km).

La casta de las obreras es la encargada del mantenimiento y defensa de la colonia. Desde el momento de su nacimiento, las obreras realizan tareas internas en la colonia (abejas nodrizas) como la limpieza de celdas, cuidado y alimentación de la cría, construcción de panales, remoción de crías muertas y posteriormente, tareas externas como la defensa de la colonia y la recolección de alimento (abejas pecoreadoras). Después de nacer, la obrera completa su desarrollo en los siguientes 8-10 días y viven aproximadamente 6 semanas durante los períodos de máxima actividad (fines de primavera, verano y principios de otoño). Las abejas nacidas a fines del otoño en zonas de clima templado y templado frío realizan pocas actividades durante el invierno y pasan la mayor parte del tiempo dentro de la colmena; pueden vivir varios meses hasta la llegada de la primavera. Su tamaño es menor al de la reina y zánganos. Los zánganos solo tienen función reproductiva, son alimentados por las obreras durante toda su vida y

son eliminados de la colonia en momentos de escasez de alimento. Los zánganos tienen un cuerpo grueso y pesado, de mayor tamaño y su abdomen es más corto y redondeado que el de la reina (Winston, 1982).

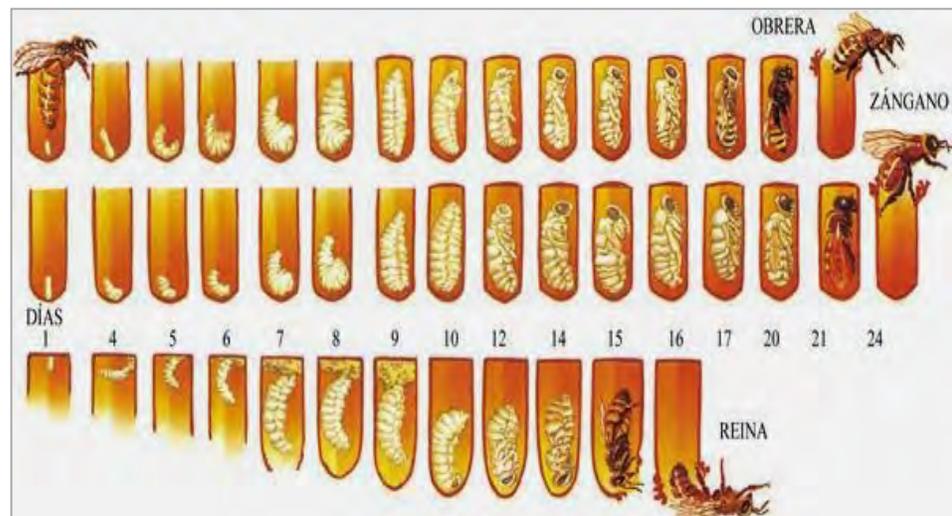


Figura 4. Ciclo de vida de las tres castas de *Apis mellifera*. (Winston, 1991)

1.3 Introducción de *Apis mellifera* en América y en Argentina

La abeja melífera habría sido introducida al continente americano (más precisamente, en la isla de Santo Domingo) durante los siglos XIV-XV durante la colonización española (de Jaime Lorén, 2003). Sin embargo, otras fuentes aseguran que fueron los Padres Dominicos los responsables de su introducción en el continente americano en el año 1536. Las abejas introducidas pertenecían al brazo M (*A. m. mellifera*). Posteriormente, se registraron introducciones de la subespecie *A. m. ligustica* (brazo C) pero se desconoce la fecha exacta (Bierzychudek, 1979).

Los registros hacen mención de *A. mellifera* en Sudamérica hacia 1830, cuando arribaron a Colonia del Sacramento (Uruguay) las primeras cuatro colmenas de *A. m. mellifera* (brazo M) provenientes de Francia (Bierzzychudek, 1979). Simultáneamente la subespecie *A. m. carnica* fue introducida en Río Grande do Sul (Brasil) por colonos alemanes (brazo C) y posteriormente, en este mismo lugar, en el año 1839 el padre Antonio Carneiro introdujo colonias desde Porto (Portugal) las cuales pertenecían a la subespecie *A. m. iberiensis* (brazo M).

En Argentina se produjeron sucesivas introducciones desde diferentes países y hacia distintas provincias. Así, en 1855 se introdujeron abejas de la subespecie *A. m. ligustica* en la provincia de Mendoza desde Chile; en 1857 se enviaron a Gualeguaychú (Entre Ríos) 4 colmenas de *A. m. mellifera* provenientes de Montevideo (Uruguay), con lo que se dio inicio a la multiplicación de material en esa zona (Bierzzychudek, 1979).

La introducción de nuevos materiales vivos (reinas fecundadas y celdas reales) continuó durante el siglo XX, principalmente de *A. m. ligustica* o abeja italiana, preferida por su mansedumbre y productividad (Palacio y Bedascarrasbure, 1998), como así también *A. m. carnica* y *A. m. caucasica* (Salizzi, 2014). En Brasil se efectuó la introducción de *A. m. scutellata* (brazo A) en el año 1956, con la finalidad de originar híbridos con abejas de origen europeo que presentaran una mejor adaptación al clima tropical-subtropical de ese país (Kerr y Barbieri, 1970). Accidentalmente estas colonias abandonaron sus colmenas y comenzó un proceso masivo de hibridación conocido como "africanización" que continúa en la actualidad (Figura 5). Las abejas africanizadas, producto de esta hibridación, se caracterizan por tener un alto comportamiento defensivo y una alta tasa de enjambrazón y abandono de colmena, características poco deseables en la apicultura comercial (Taylor, 1977; Kerr et al., 1982; Spivak et al., 1993; Lobo Segura, 2000; Clarke et al., 2002). Las abejas africanizadas fueron detectadas por primera vez en nuestro país en 1965, en la provincia de Misiones (De Santis y Cornejo, 1968).

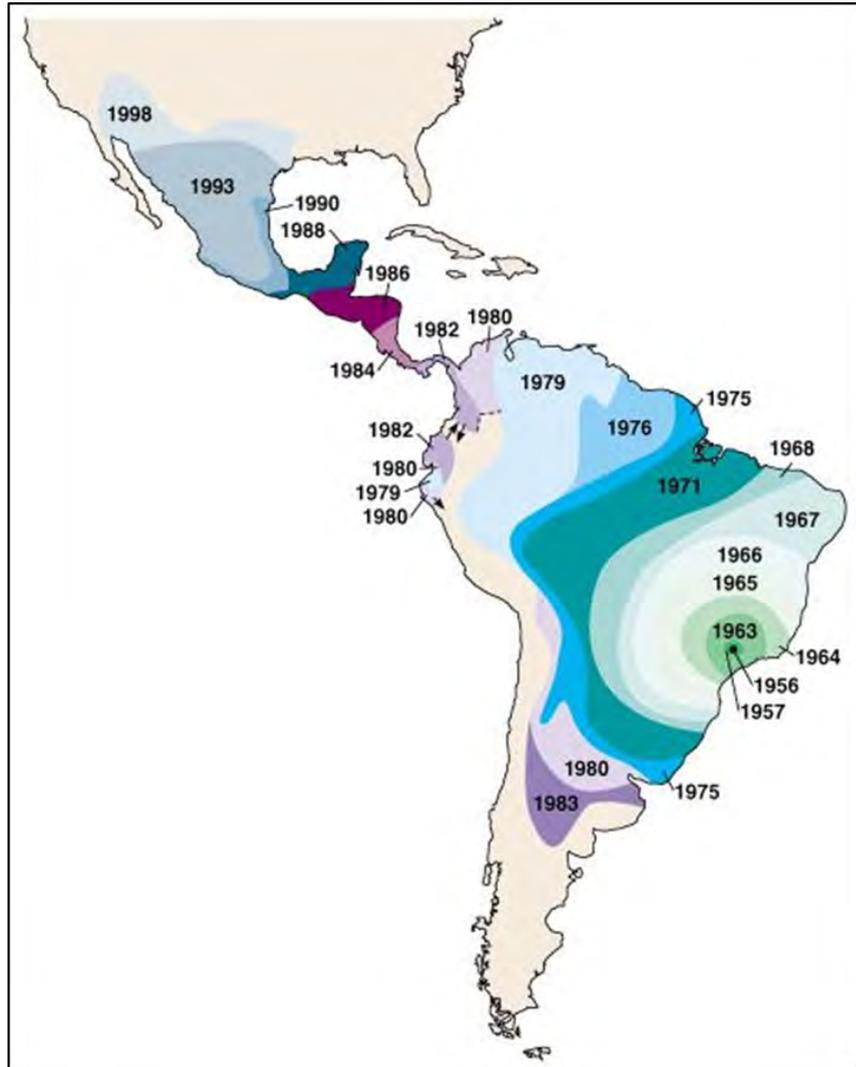


Figura 5. Dispersión de la abeja africanizada en el continente americano. (Caron, 1999, p.221).

1.4 Caracterización de la diversidad presente en *Apis mellifera*

Se han desarrollado diversas técnicas para la caracterización de *A. mellifera*. La primera en utilizarse fue la morfometría mediante la medición de distintas partes del cuerpo de la abeja obrera (Ruttner 1978, Meixner et al., 2013). Con el advenimiento de las técnicas moleculares se comenzó a analizar la variabilidad existente en las alozimas (Mestriner y Contel, 1972). Posteriormente, con el desarrollo de técnicas moleculares

como la PCR ("*Polymerase Chain Reaction*") se inició el estudio de la variabilidad en el ADN mitocondrial y nuclear de *A. mellifera* (Smith, 1991; Estoup et al., 1993).

1.4.1 Morfometría

La morfometría, basada en la medición de determinadas partes del cuerpo del insecto (alas, cabeza y longitud total) permitió realizar los primeros estudios de caracterización de las distintas subespecies de abejas (Ruttner et al, 1978). Sin embargo, estas características morfométricas muestran cambios graduales y sus intervalos se superponen (Meixner et al., 2010, 2013), siendo necesario utilizar varios caracteres al mismo tiempo y aplicar métodos estadísticos para poder discriminar entre grupos. Caracteres como tamaño corporal, pilosidad, nervaduras alares y patrones de coloración se han utilizado en los análisis morfométricos, a partir de los primeros estudios realizados por Alpatov (1929). Un conjunto de 36 caracteres seleccionados por su poder discriminativo, denominado "morfometría clásica", fue descrito por Ruttner (1988). En la actualidad se utilizan un número variable de medidas morfométricas que no superan las 10, en función de su poder discriminante (Meixner et al., 2013, Mladenovic et al., 2011). En Argentina la morfometría se ha empleado para caracterizar abejas provenientes de distintas regiones del país (Andere et al., 2000; Andere et al., 2008; García et al., 2008), aplicada conjuntamente con evaluación de caracteres comportamentales (comportamiento defensivo). Las medidas utilizadas para estos estudios fueron longitud de la probóscide; longitud, ancho y ángulos de nervios en el ala delantera derecha; longitud y ancho y ángulos de las venas del ala posterior derecha; longitud de tibia, fémur y metatarso, y ancho de metatarso, las cuales han sido de gran utilidad para determinar diferentes ecotipos y africanización en diferentes poblaciones de *A. mellifera* (Andere et al., 2008). La morfometría geométrica se basa en las coordenadas de los puntos de referencia ubicados en las intersecciones de las venas del ala (Bookstein, 1991; Smith et al., 1997). Los avances fundamentales de la morfometría geométrica sobre los enfoques tradicionales incluyen (i) la manera en que se puede medir la diferencia de formas (utilizando la distancia de Procrustes), (ii) la elucidación de las propiedades del espacio de forma multidimensional definido por este coeficiente de distancia, (iii) el desarrollo de métodos estadísticos específicos para el estudio de la forma, y (iv) el desarrollo de nuevas

técnicas para las representaciones gráficas de los resultados (Bookstein, 1991; Rohlf, 2000; Mendes et al., 2007).

1.4.2. Alozimas

El análisis de alozimas fue el primer tipo de marcador molecular que se utilizó en la investigación de *A. mellifera* (Mestriner, 1969; Mestriner y Contel, 1972). La mayoría de estos análisis se realizaron en las décadas de 1980 y 1990, contribuyendo a la comprensión del flujo génico, la estructura poblacional y la hibridación (Sheppard y McPheron, 1986; Del Lama et al., 1990; Meixner et al., 1994).

Uno de los loci de enzimas más polimórficos y utilizados en los estudios de la variabilidad poblacional de *A. mellifera* ha sido el locus Mdh1 (malato deshidrogenasa), ya que permitió estudiar en un principio el grado de africanización en poblaciones americanas (Lobo et al., 1989; Del Lama et al., 1990) y también diferenciar linajes europeos (Cornuet, 1982; Cornuet et al., 1986). Sin embargo, la variación de los distintos alelos de Mdh 1 se podría interpretar como una adaptación fisiológica a los diferentes climas sin reflejar necesariamente el flujo génico (Nielsen et al., 1994, Cornuet et al., 1995), por lo que el uso de Mdh 1 y las alozimas en general ha decrecido tras la aparición de otras técnicas moleculares basadas en diferencias a nivel del ADN.

1.4.3. Marcadores moleculares en el ADN

1.4.3.1 Haplotipo mitocondrial

El genoma mitocondrial es una molécula circular de ADN de aproximadamente 16.000 pares de bases en el caso de *A. mellifera* (Figura 6). Posee herencia materna, genes de copia única, ausencia de recombinación y una alta tasa de evolución (Avise et al., 1984; Simon et al., 1994). Estas características, sumadas a la gran cantidad de mitocondrias por célula y al número de copias del genoma por mitocondria (varía entre 1000 y 10000 copias), facilitan su estudio desde el punto de vista metodológico y

experimental (Birky, 1995). En particular para *A. mellifera*, la variabilidad genética presente en las regiones no codificantes del ADN mitocondrial (ADNmt) ha permitido detectar diferencias a nivel de subespecies (Smith et al., 1991; Arias et al., 2006).

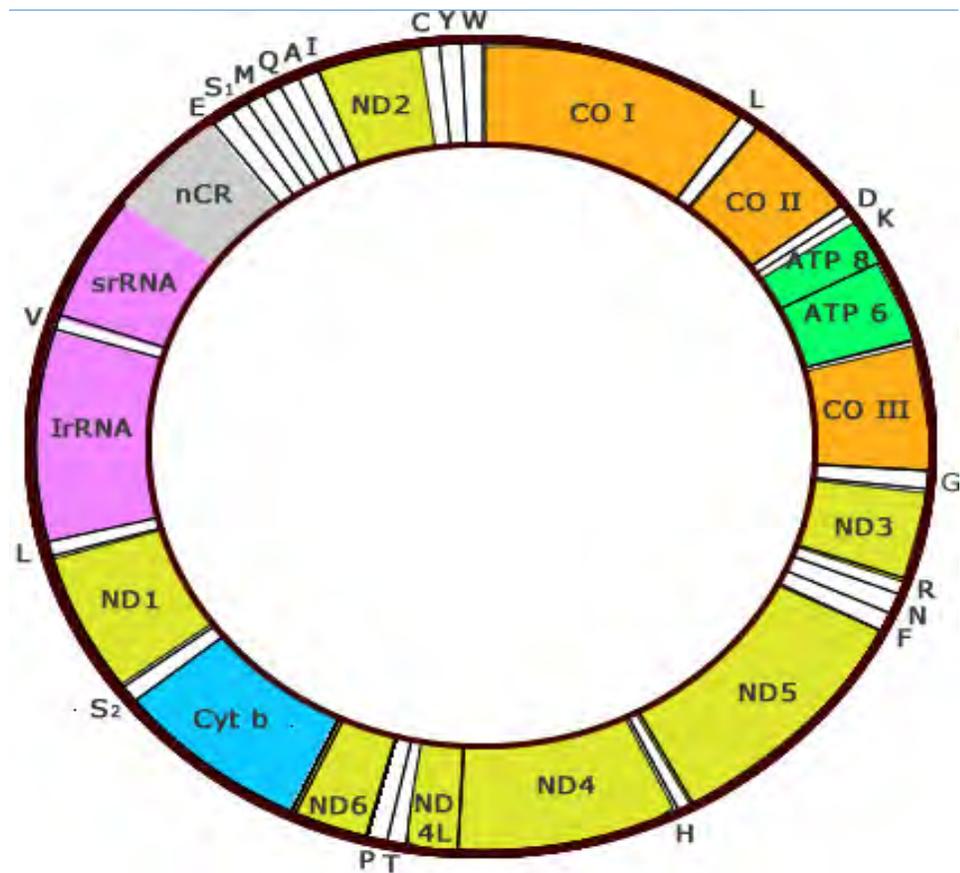


Figura 6. Esquema del ADNmt de *Apis mellifera*. Adaptado de Crozier y Crozier, 1993.

Los principales marcadores moleculares utilizados para el análisis de variaciones en el ADNmt en abejas son: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) y la secuenciación directa. Las variaciones mediante RFLP se revelan mediante la digestión

de todo el genoma mitocondrial con endonucleasas de restricción. Los primeros trabajos realizados con distintas subespecies de *A. mellifera* en su lugar de origen (Smith et al., 1991; Garnery et al., 1992; Arias et al., 2006) o donde fueron introducidas (Smith y Brown, 1988; Hall y Muralidharan, 1989; Smith et al., 1989) mostraron el poder discriminativo de esta técnica y confirmaron la presencia de los tres linajes (A, C y M) previamente descritos por Ruttner (1978, 1988) mediante el uso de la morfometría. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular modernas, el método de RFLP se ha sustituido por la técnica de PCR-RFLP, principalmente porque para implementar el primero, se necesita una considerable cantidad de ADNmt no degradado y además requiere mayor tiempo de procesamiento. En ambos métodos, los haplotipos se determinan mediante el empleo de enzimas de restricción. Sin embargo, a diferencia de la técnica de RFLP, que analiza todo el genoma mitocondrial, la variación que detecta la técnica PCR-RFLP se revela dentro de una región específica amplificada por PCR.

En los primeros trabajos realizados con esta técnica se utilizaron varias regiones específicas de ADN, tanto para determinar africanización en poblaciones de *A. mellifera* en América (Hall y Smith, 1991; Clarke et al., 2002; Pinto et al., 2003; Pinto et al., 2004) o subespecies en poblaciones de *A. mellifera* de Europa del Este (Smith et al., 1997; Bouga et al., 2005; Kozmus et al., 2007; Ivanova et al., 2010; Stevanovic et al., 2010). Uno de los primeros marcadores desarrollados fue el gen Citocromo B (Cit B) amplificado con primers que flanquean un amplicón de 485 pares de bases (pb) de longitud, junto con el uso de la enzima de restricción *Bgl* II. La enzima realiza un corte específico generando dos bandas (una de 291 pb y otra de 194 pb) en las abejas de origen europeo y no realiza ningún corte en las abejas de origen africano (Crozier et al., 1991). Este marcador determina si la muestra analizada es de origen europeo o africano, pero no discrimina las distintas subespecies y haplotipos a la que pertenecen las abejas analizadas. Este marcador se ha utilizado para determinar el grado de africanización en América (Pinto et al., 2003).

Uno de los marcadores más utilizados es la región intergénica entre los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo Oxidasa II (COI-COII); presenta al menos siete variantes en su longitud que pueden ser explicadas por la combinación de tres secuencias relacionadas: la secuencia Po con una longitud de 67 pares de bases (67 pb), la

secuencia P (54 pb) y la secuencia Q (192-196 pb). Esta última se encuentra presente en todas las subespecies y se divide en tres regiones según su similitud con las regiones adyacentes del ADNmt: Q₁ es similar al extremo 3' del gen COI, Q₂ es similar al gen del ARNt^{leu} y Q₃, a la secuencia P (Cornuet et al., 1991). Las diferentes combinaciones de estas secuencias generan las siguientes variantes: PoQ, PoQQ y PoQQQ que son características del brazo evolutivo A; las secuencias PQ, PQQ y PQQQ representativas del brazo evolutivo M y solo Q correspondiente al brazo evolutivo C (Garnery et al., 1993). Estas secuencias acumulan gran cantidad de mutaciones, deleciones e inserciones que generan polimorfismos evidenciados en forma rápida y sencilla por medio de enzimas de restricción; entre ellas, la más utilizada es *Dra* I, pero también *Hinf* I y *Eco*R1 sirven para la determinación de diferentes haplotipos. La combinación de tamaño y sitios de restricción generados en el análisis de la región intergénica COI-COII con el uso de la enzima *Dra* I ha permitido describir más de 100 haplotipos (Franck et al., 2001; De la Rúa et al., 2005; Collet et al., 2006; Shaibi et al., 2009; Alburaki et al., 2011; Rortais et al., 2011; Pinto et al., 2012).

1.4.3.2 Microsatélites

En el ADN nuclear de la mayoría de los eucariotas pueden localizarse regiones denominadas microsatélites o SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Los microsatélites son una serie de marcadores que implican un número variable (hasta 100) de repeticiones en tándem de 1-5 pb. Los diferentes alelos se caracterizan por la exacta longitud en pares de bases de un fragmento de ADN obtenido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada entre dos motivos de secuencia fija (cebadores o primers) que flanquean la región de la repetición en tándem. Debido a su tasa de mutación generalmente alta (entre 10⁻⁵ y 10⁻² mutaciones por generación), estos marcadores pueden tener un gran número de alelos, por lo que son adecuados para el mapeo del genoma o análisis de paternidad. También como marcadores codominantes, son muy útiles para la genética de poblaciones (Estoup et al., 1993). En *A. mellifera*, se ha demostrado que los microsatélites son abundantes (Estoup et al., 1993) y se caracteriza por una amplio rango de diversidad génica (Levinson y Gutman, 1987; Estoup et al., 1994; Estoup et al., 1995; Clarke et al., 2002; The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Kraus et al., 2007).

Se han propuesto dos modelos para explicar la evolución de las familias de microsatélites:

1. El modelo de infinitos alelos (“Infinite Allele Model” o I.A.M) que fuera descrito por Kimura y Crow (1964), según el cual cada mutación ocurrida al nivel de la composición de nucleótidos de un alelo, da lugar a un nuevo alelo hasta ese momento no presente en la población. Cada nuevo mutante tiene la misma probabilidad de aparecer independientemente de cómo sea el alelo original, de esta forma el número de alelos que pueden encontrarse en un locus dado es elevado.

2. El modelo de la mutación paso a paso (“Stepwise Mutation Model” o S.M.M) descrito por Ohta y Kimura, 1973), que asume que los alelos tienen una tendencia a mutar mediante la ganancia o pérdida de una unidad de repetición en pasos discretos.

Ambos modelos asumen que la generación de nuevos alelos es compensada por la pérdida de alelos por deriva génica, bajo la asunción de neutralidad y equilibrio, es decir, la mutación y la deriva son las únicas fuerzas que determinan la distribución de la frecuencia de alelos de un locus dado. En ese caso los números mínimo y máximo de alelos esperados para un gen se pueden predecir por ambos.

Los primeros trabajos que describieron el desarrollo y uso de estos marcadores en *A. mellifera* fueron realizados por Estoup et al (1993). Posteriormente, los mismos marcadores se utilizaron para analizar diferencias genéticas entre distintas subespecies procedentes de distintos orígenes geográficos (Estoup et al., 1995). Más recientemente, Solignac et al. (2003) desarrollaron un nuevo set de 552 microsatélites para *A. mellifera* y mostraron las posibles amplificaciones cruzadas logradas con especies emparentadas. Estos marcadores fueron utilizados con éxito en estudios de diferenciación de subespecies de *A. mellifera*, análisis de dispersión e introgresión (Franck et al., 2001; De la Rúa et al., 2004; Muñoz, Dall’Olio et al., 2014; Muñoz, Pinto et al , 2014).

Un estudio detallado de *A. mellifera* de Europa occidental utilizó 11 loci para diferenciar las abejas del brazo evolutivo M del brazo evolutivo C en poblaciones de origen griego y demostrar la alta introgresión en poblaciones francesas (Garnery et al., 1998b). Los análisis estadísticos utilizados fueron los valores F_{ST} y los árboles filogenéticos, agrupando las muestras por similitud genética. Estas herramientas

moleculares y de análisis de datos han resultado de utilidad para desarrollar estrategias de conservación de poblaciones, ecotipos y subespecies europeas de *A. mellifera*.

El uso conjunto de diferentes marcadores moleculares ha permitido profundizar los conocimientos sobre aspectos genéticos y dispersión de las poblaciones de abejas. Franck et al. (1998) analizaron el origen de *A. mellifera* de Europa occidental mediante el empleo de microsatélites y haplotipos mitocondriales. El análisis mediante el uso de microsatélites demostró que las abejas ibéricas eran genéticamente homogéneas formando un *cluster*, pese a presentar 2 haplotipos distintos (Smith et al., 1991; Garnery et al., 1992; Garnery et al., 1995; De la Rúa et al., 1999), con una influencia limitada del norte de África. Se utilizaron métodos similares para determinar la variación en las abejas procedentes de Oriente Medio, que llevaron a la hipótesis de un cuarto linaje (*opus cit*) basado en datos moleculares (Franck et al., 2000). Un estudio del proceso de africanización relacionado con el tiempo en la península de Yucatán demostró la utilidad de los microsatélites para la detección de híbridos entre abejas de origen europeo y africano, es decir abejas “africanizadas” (Clarke et al., 2002).

Un método alternativo al análisis de los estadísticos *F* y los árboles filogenéticos es la prueba de asignación, que se puede aplicar con algunas variaciones (Manel et al., 2005). La asignación determinística compara el genotipo de cada individuo en relación a agrupaciones definidas en función de la ubicación del muestreo u otras categorías posibles. Las asignaciones Bayesianas se utilizan sin tener conocimiento previo del número de poblaciones. Así, el número de grupos es variable sin tener en cuenta el origen siendo el programa Structure (Pritchard et al., 2000) el más utilizado, el cual determina el número más probable de clusters (*k*) que conforman una población total infiriendo agrupamientos de individuos. El método Bayesiano es sensible y puede asignar a las poblaciones en varios niveles, como subespecies estrechamente relacionadas y brazos evolutivos. Un ejemplo de aplicación de este método en las abejas melíferas es un estudio de los diversos niveles de introgresión de *A. m. ligustica* en poblaciones de *A. m. mellifera* en los países escandinavos (Jensen et al., 2005).

Recientemente se han desarrollado marcadores genómicos como los marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Un SNP es un cambio de una única base nucleotídica en una posición dada de una secuencia de ADN y son en general bialélicos. Respecto a su aplicación en *A. mellifera*, se utilizaron en estudios evolutivos que han contribuido a tener una comprensión integral del origen y dispersión de las subespecies, como también en análisis de introgresión y africanización (Whitfield et al., 2006; Zayed y Whitfield, 2008). Asimismo han sido utilizados para realizar estudios de asociación entre caracteres comportamentales y genéticos (Spötter et al., 2012). En la actualidad existen nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento que permiten la obtención de gran cantidad de datos de alta calidad, lo cual facilita la generación de información e intercambio de datos entre laboratorios y el desarrollo de bases públicas de datos (Niedringhaus et al., 2011; Pareek et al., 2011; Haddad et al., 2015).

1.5 Antecedentes de caracterización poblacional de *Apis mellifera* en Argentina.

A fin de determinar la existencia de abejas “africanizadas”, las primeras evaluaciones en Argentina fueron realizadas por De Santis y Cornejo (1968) a partir del comportamiento defensivo, también considerado como “agresividad”. Posteriormente, se aplicaron técnicas morfométricas para discriminar abejas europeas de africanizadas (Kerr et al., 1982) (Figura 7A). En 1991, Sheppard et al. (1991) realizaron los primeros trabajos de caracterización molecular con el análisis del ADN mitocondrial total de abejas mediante la técnica de RFLP. Los autores analizaron muestras de abejas de la zona noreste de nuestro país, con epicentro en la provincia de Tucumán, realizando transectas en dirección sur y oeste para confirmar la presencia de africanización. Los autores registraron una zona de saturación donde sólo detectaron abejas africanizadas, una zona de colonización permanente o zona de transición, caracterizada por una compleja hibridación entre abejas de origen europeo y africano y una zona de colonización temporaria donde las abejas africanizadas solo se encontraban en los meses de primavera y verano (Figura 7B).

Años después, Sheppard et al. (1999) profundizaron los estudios genéticos de las poblaciones de abejas de Argentina empleando la técnica de PCR-RFLP y análisis de la región intergénica COI-COII del ADN mitocondrial. Mediante estos análisis, los autores describieron la presencia de un 25% de las abejas con haplotipo A que no pertenecían a la subespecie *A. m. scutellata*, sugiriendo que existe una sobreestimación del grado de africanización y que la subespecie *A. m. iberiensis* (provenientes del sur de la península ibérica dónde porta el haplotipo A) y la subespecie *A. m. intermisa* (provenientes del norte de África) se encuentran en el país.

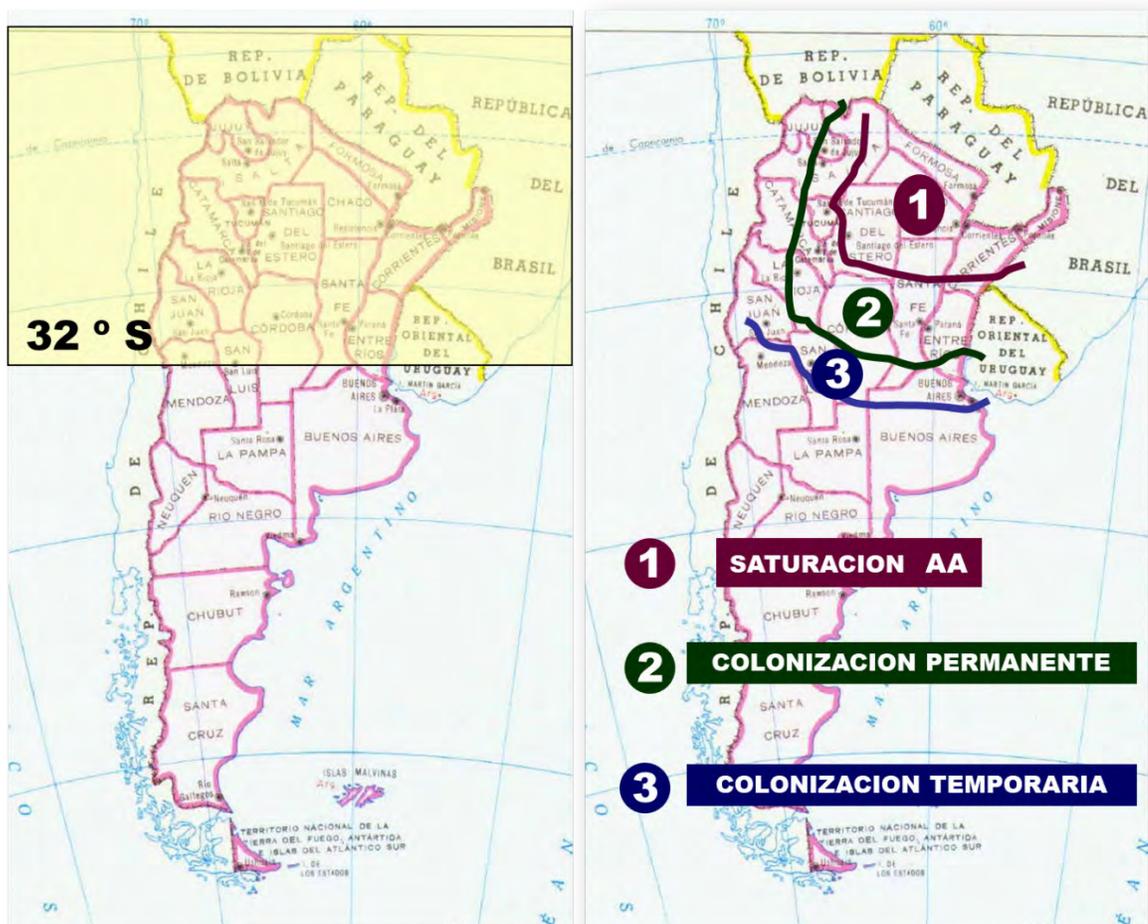


Figura 7. Distribución de Africanización en Argentina. Mapas de Argentina con los resultados de los estudios de Kerr et al., (1982) (A) y Sheppard et al., (1991) (B).

Abrahamovich et al. (2007) realizaron un muestreo exhaustivo (300 colonias) en la provincia de Buenos Aires y determinaron los haplotipos mediante el uso de la técnica PCR-RFLP analizando la región COI-COII con la enzima de restricción *Dra* I. Estos autores reportaron que el 92% de las colonias muestreadas pertenecían al linaje C (principalmente el haplotipo C1 descrito para *A. m. ligustica*), 2,68% al linaje M (identificando los haplotipos M2, M3 y M6, lo que indicaría la presencia de las subespecies *A. m. mellifera* y *A. m. iberiensis*, esta última provenientes del norte de la península ibérica). Por último, un 5,02 % correspondía al linaje A, determinándose 4 haplotipos, A1 y A4 que son típicos de *A. m. scutellata* (especialmente A4) en la zona norte de Buenos Aires y los haplotipos A8 y A11, indicando la presencia de *A. m. iberiensis* (del sur de la península ibérica) y subespecies del norte africano.

1.6 Actividad apícola en Argentina

Argentina es uno de los principales productores y exportadores de miel del mundo. Actualmente ocupa el tercer lugar en exportación detrás China y Turquía (Garzón y Young, 2016). La miel producida en Argentina es considerada de alta calidad a nivel mundial (SENASA, 2014). El Ministerio de Agroindustria (actual Secretaría) de nuestro país ha implementado políticas de fortalecimiento del sector apícola que han permitido incrementar las ventas externas de miel a granel en el período enero-noviembre del 2016, alcanzando un aumento del 74,49%, respecto de igual periodo del año anterior. El 95% de la producción de miel se exporta; los principales destinos están liderados por Estados Unidos, con la comercialización de 32.000 toneladas en los 11 meses de 2016, seguido por Alemania, Bélgica, Francia y Australia. Asimismo, son considerables las exportaciones de material vivo apícola (abejas reinas y paquetes de abejas) principalmente dirigidos a Francia, España y Líbano (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca [MAGyP] 2016), de maquinarias, insumos para la apicultura y de otros productos de la colmena como cera, propóleos y polen.

Se considera la existencia de 5 zonas apícolas en Argentina (INTA-SAGPyA, 2006), que se diferencian por sus características climáticas y ecológicas y el tipo de explotación apícola que se realiza en esas zonas, desde explotaciones consideradas de gran envergadura hasta pequeños productores artesanales (Figura 8).

Si bien aporta solo un 0,2 % del PBI de Argentina, la apicultura brinda a la economía y a la sociedad mucho más que miel. Es una importante alternativa para las economías regionales y la agricultura familiar, que además de permitir el desarrollo económico a nivel de pequeños emprendedores, favorece los modelos asociativos que reconstruyen el tejido social de las comunidades resultando en ese sentido una excelente herramienta de desarrollo.

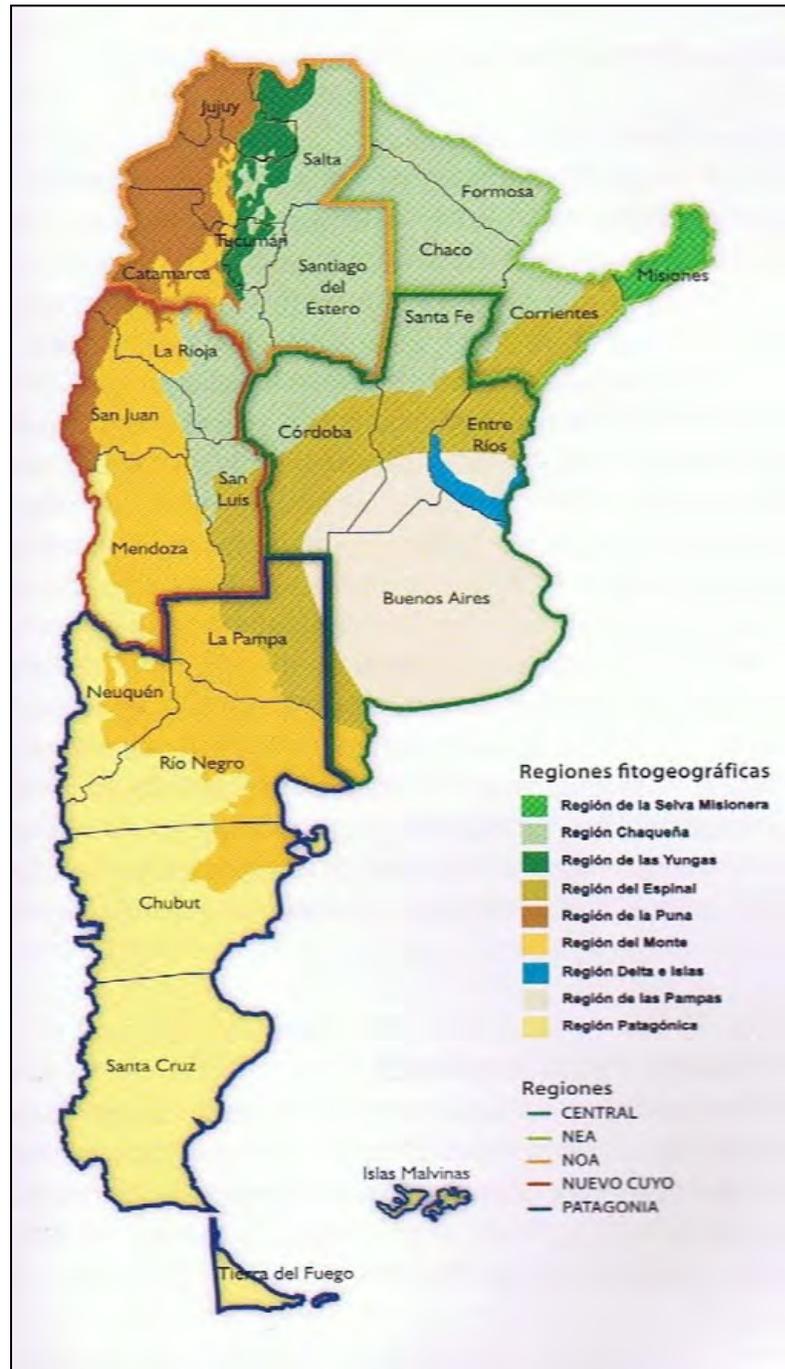


Figura 8. Regiones Apícolas de Argentina: Mapa de regiones fitogeográficas y apícolas de Argentina.

El escaso requerimiento de capital y tierra, fácil acceso a la tecnología de producción, uso de mano de obra intensiva, amplia distribución territorial, excelentes oportunidades de mercado, tanto para miel como para otros productos primarios y con valor agregado, son características propias de la actividad apícola que han sido importantes en el desarrollo de diferentes territorios. Esto es muy importante en una actividad que se encuentra caracterizada casi exclusivamente por pequeños apicultores, considerando que el 97% maneja menos de 500 colmenas (Palacio, 2017). Otro aporte fundamental está dado por los servicios ambientales que brindan, como la polinización de especies nativas e implantadas. Un tercio de los alimentos que se producen en el mundo dependen directa o indirectamente de la polinización por abejas. Según McGregor (1976), por cada dólar que ingresa por los productos de la colmena, la abeja produce 10 veces ese valor en servicio ambiental. Esto es debido a que su efecto polinizador permite aumentar la producción y mejorar la calidad de los frutos y semillas.

A fines de 2017 el Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA) informaba un total de 8745 apicultores con 2206762 colmenas (MAGyP, 2018). Si bien el RENAPA está en proceso de actualización en este momento, se estima que la cantidad de colmenas y fundamentalmente la cantidad de apicultores ha disminuido en los últimos años, entre otras causas por efecto de intensificación de la agricultura y la alta variabilidad de precios internacionales. También se ha registrado un desplazamiento de la apicultura hacia zonas extra pampeanas (Salizzi, 2014). Históricamente, la provincia de Buenos Aires ha tenido la mayor cantidad de colonias, registrando aproximadamente un 35% del total de colmenas del país, seguida por las provincias de Entre Ríos (25%), Santa Fe (11%), Córdoba (9%) y La Pampa (6%). Estas 5 provincias representan aproximadamente el 86% de las colmenas existentes en el país. En la actualidad la provincia de Buenos Aires dispone de 2342 apicultores y un total de 771659 colmenas, lo que representa una reducción respecto de registros previos (RENAPA, 2015; MAGyP, 2017). Entre Ríos presenta un total de 556908 colmenas y 2009 apicultores. Santa Cruz es la provincia con menor cantidad de apicultores (solo 3 registrados en el año 2017) y un total de 53 colmenas, que están concentradas en su mayoría en la zona de Los Antiguos (Noroeste de la provincia). Santa Cruz, Chubut y Neuquén son provincias con escaso desarrollo apícola. Además de la diferencia de climas entre las regiones, también varía el tipo de

abeja y manejo que realiza el apicultor. Al norte de nuestro país el clima es más cálido, por lo que algunos apicultores de zonas meridionales como la provincia de Buenos Aires trasladan sus colmenas (práctica conocida como trashumancia) hacia esa región en agosto-septiembre para la multiplicación (aumento del número de colonias en forma controlada).

En la cadena apícola participan distintos actores entre los que se destacan: productores apícolas, productores y proveedores de insumos, acopiadores y exportadores e industriales. Organismos estatales, como el Ministerio de Agroindustria (MinAgro) y Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) brindan el marco regulador de la actividad, dentro del cual se destaca un conjunto de normas que ordenan la producción y garantizan la trazabilidad de la miel Argentina. En aspectos vinculados con la investigación y transferencia tecnológica, capacitación y fomento del comercio, actúan diversos organismos como el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), MinAgro, SENASA, Fundación Export-AR, Consejo Federal de Inversiones (CFI) (Ferrari, 2012) y Universidades Nacionales.

Específicamente en el INTA, a partir del año 1995 se inició el Proyecto Integrado de Desarrollo Apícola (PROAPI) que se transformó, a partir de 2010, en el Programa Nacional de Apicultura en el que participan otras instituciones; tiene como objetivo consolidar a la apicultura como una herramienta de desarrollo sustentable. Su aporte en investigación, desarrollo tecnológico y extensión ha aportado a la profesionalización del sector en los últimos 25 años (Bedascarrasbure, 2011). El ajuste del sendero tecnológico para la producción de miel sin el uso de antibióticos con gestión de la calidad y trazabilidad desde el apiario le permitió a Argentina liderar el mercado mundial de miel de calidad. El sendero tecnológico propuesto enfatiza la importancia del recambio periódico de reinas, considerando el apiario como unidad de manejo con el objetivo de mejorar la producción y buen desempeño de las reinas durante el período productivo.

El uso de antibióticos en apicultura era una práctica de manejo frecuente para el control de enfermedades bacterianas de la cría, especialmente a partir de 1989 con la

aparición de la enfermedad Loque americana (producida por *Paenibacillus larvae*). En la aplicación del sendero que involucra diferentes pautas de manejo del apiario, ha sido fundamental el uso de reinas tolerantes a las enfermedades de la cría sobre la base de la selección por alto comportamiento higiénico (Palacio et al., 2010). Este comportamiento es la capacidad de las abejas de detectar, desopercular y remover la cría muerta o enfermas de las celdas y es un mecanismo de defensa a enfermedades bacterianas y fúngicas (Rothenbuhler, 1964; Gramacho y Spivak, 2003; Oldroyd y Thompson, 2007; Palacio et al., 2010). El uso de abejas seleccionadas con alto comportamiento higiénico ha disminuido la incidencia de Loque americana a valores inferiores al 5% del total de las colmenas (Rodríguez et al., 2015). Esta característica, juntamente con otros criterios de selección (masedumbre, capacidad de postura y tolerancia a varroosis), han sido incorporados en un Programa de Mejoramiento Genético (MeGA) (Palacio et al., 2001; Bedascarrasbure 2011) que obtiene materiales genéticos adaptados a diferentes ambientes y multiplicados por 17 criaderos de reinas en diferentes provincias del país (Figini et al., 2016). Este Programa se ha basado en la evaluación y selección de ecotipos locales que se han generado a partir de la introducción de diferentes subespecies y su adaptación a la gran variedad de climas existentes en el país, lo cual ha resultado en una diversidad genética de riqueza invaluable para el trabajo de selección (Palacio y Bedascarrasbure, 1998; Palacio et al., 2004).

Los materiales genéticos obtenidos en el Programa son preservados en un sistema de población cerrada mediante el uso de la técnica de inseminación instrumental (Palacio et al., 2001), que permite proveer a los criadores de reinas de madres seleccionadas

El conocimiento de la variabilidad genética disponible resultará un insumo fundamental para Programa de Mejoramiento Genético (MEGA).

1.7. Hipótesis

Se plantean las siguientes hipótesis:

La utilización conjunta de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares permite analizar la estructura poblacional de la abeja en Argentina, en particular en relación al estatus de la Africanización. La situación de la Africanización en Argentina ha cambiado desde las últimas evaluaciones realizadas, debido a la actividad apícola comercial.

En nuestro país existe una estructura poblacional característica que no se explica solamente por la distribución geográfica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

La caracterización genética de las poblaciones de *A. mellifera* de Argentina es relevante desde un punto de vista de investigación básica y aplicada. Permite conocer el estado actual de la distribución de las poblaciones de diferentes orígenes o linajes para realizar inferencias evolutivas o de filogeografía y simultáneamente, brinda información a los apicultores para conseguir una trazabilidad de sus materiales y así acceder a los mercados locales o internacionales. En este sentido, el MEGA se dedica a la selección y conservación de stocks de abejas con características deseables para la comercialización de productos de la colmena disponibles para los apicultores. En este marco, este trabajo de tesis propone aportar al MEGA conocimientos fundamentales y herramientas de análisis de la diversidad genética en colonias silvestres y comerciales de *Apis mellifera* en Argentina. Estos conocimientos permitirán disponer de nuevos criterios para la selección y conservación de los recursos genéticos autóctonos adaptados a las diferentes eco-regiones de nuestro país. Los recursos genéticos mejorados proveerán de valor agregado a la actividad apícola, permitiendo mantener el posicionamiento de nuestro país en los mercados internacionales.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A través de un muestreo de cobertura nacional de apiarios comerciales y colonias silvestres de *A. mellifera*, considerando las principales regiones apícolas y sus condiciones eco-ambientales, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los recursos genéticos silvestres y comerciales de *A. mellifera* en Argentina, mediante el empleo conjunto de marcadores mitocondriales y nucleares.
2. Definir el estatus actual de la Africanización en territorio argentino.

3. Evaluar la estructura genética de la población de abejas, independientemente de la Africanización.
4. Identificar el germoplasma más utilizado en la producción comercial y las tendencias en selección.
5. Detectar las fuentes más variables de germoplasma con miras a su aprovechamiento en un programa de mejoramiento genético.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Se obtuvieron muestras de abejas obreras de colmenas comerciales instaladas en apiarios y de colonias silvestres de las provincias de: La Pampa (LP), Buenos Aires (BA), Entre Ríos (ER), Santa Fe (SF), Córdoba (CB), Tucumán (TU), Santiago del Estero (SE), Chaco (CH), Corrientes (CO) y Formosa (FS). La cobertura del muestreo representa el área que concentra más del 80% de la producción de miel del país (Ferrari et al., 2011) (Figura 9); se incluyó el área con presencia de abeja africanizada (AA) según estimaciones previas (Whitfield et al., 2006; Abrahamovich et al., 2007).

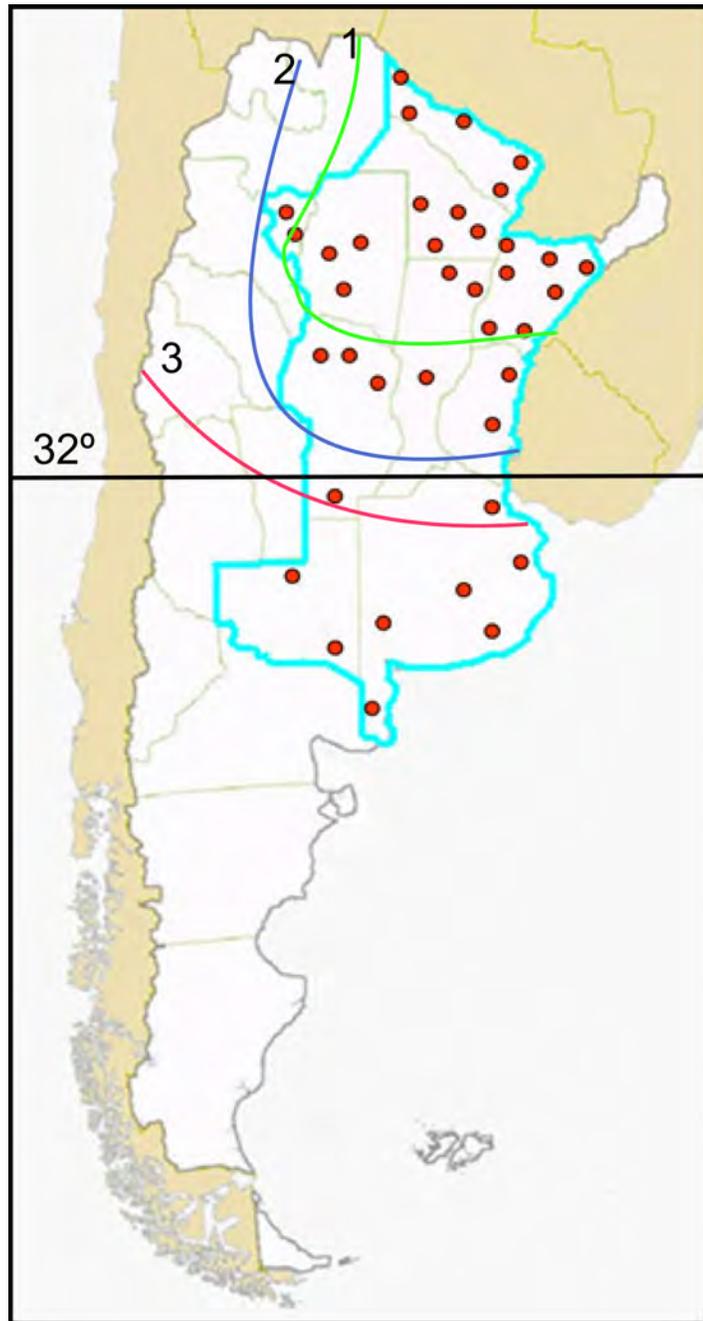


Figura 9. Localización de sitios de muestreo de colonias de *A. mellifera* en Argentina,. Detalle del área de muestreo que indica la ubicación de los apiarios y colonias silvestres muestreados (puntos rojos) en las 10 provincias. 1 indica el límite de saturación de AA, 2 límite de zona colonización permanente de AA, 3 límite de colonización temporaria de AA (según Sheppard et al, 1991). 32° de latitud Sur, límite de Africanización (según Kerr et al, 1982).

Se colectaron muestras correspondientes a 10 apiarios y 10 colonias silvestres en promedio por provincia con la colaboración de técnicos de INTA y apicultores. En cada apiario se muestrearon tres colmenas aleatoriamente. Las muestras de colonias silvestres se obtuvieron de huecos de árboles u otras cavidades naturales o de enjambres que habían sido capturados e instalados en colmenas tipo Langstroth sin recambiar la reina, con excepción de BA y FS donde las muestras correspondieron solo a colonias comerciales o silvestres respectivamente. De cada colonia comercial y silvestre se muestrearon entre 10 y 30 abejas obreras nodrizas del centro de la colmena, para asegurar su origen. Las abejas se conservaron en alcohol etílico 96% para luego ser remitidas a la Unidad Integrada Balcarce (UIB) (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata-Estación Experimental Agropecuaria, INTA) para su posterior análisis.

Las muestras de apiarios fueron remitidas junto con una ficha con datos que consideraba el origen de las reinas, la localización del apiario e información sobre el estado de la colmena y del manejo que recibe por parte del apicultor (Anexo I). En el caso de muestras de colonias silvestres se registró el lugar geográfico, el estado general de la colonia y el comportamiento defensivo. Adicionalmente se obtuvieron muestras de AA de seis colonias de Ribeirão Preto (Brasil), que fueron utilizadas como controles positivos

En la Tabla 1 se detalla la cantidad de muestras colectadas por provincia, discriminadas por origen (comerciales o silvestres).

Tabla 1. Muestreo de apiarios de la principal zona apícola. Se discriminan por provincia y origen (comerciales o silvestres)

<i>Provincia</i>	Totales	Comerciales	Silvestres
<i>Buenos Aires (BA)</i>	63	63	0
<i>La Pampa (LP)</i>	39	31	8
<i>Córdoba (CB)</i>	32	22	10
<i>Santa Fe (SF)</i>	31	24	7
<i>Entre Ríos (ER)</i>	32	24	8
<i>Corrientes (CO)</i>	39	20	19
<i>Chaco (CH)</i>	54	40	14
<i>Formosa (FS)</i>	31	0	31
<i>Santiago del Estero (SE)</i>	43	35	8
<i>Tucumán (TU)</i>	32	24	6
<i>Totales</i>	396		

3.2. Extracción de ADN.

El ADN total (ADNmt y ADN nuclear) se aisló mediante la técnica de alta concentración salina descrita por Baruffi et al. (1995), a partir del tórax de un individuo por colmena, previamente disecado y colocado en tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml junto a 400 µl de buffer de extracción. Los tórax se trituraron y luego se incubaron a 60-65 °C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó acetato de potasio 8M y se incubaron las muestras a 30 minutos a 4°C; luego se centrifugaron 15 minutos a 14-15000 RPM a 4°C. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se precipitó el ADN con etanol absoluto; se centrifugó nuevamente 15 min a 14-15000 RPM a temperatura ambiente. El pellet de cada tubo se lavó primero con etanol 70% y luego con etanol al 100% y se secó en block de calor a 50 °C. Se resuspendió el ADN en agua bidestilada. Se adicionó ARNasa y se incubó 30 min a 37°C. Se evaluó la calidad y cantidad de ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con marcador de tamaño molecular.

3.3. Análisis del ADN mitocondrial

Se analizaron los polimorfismos de dos regiones del genoma mitocondrial de *A. mellifera*: la región intergénica correspondiente a los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo Oxidasa II (COI-COII) y un segmento de la región codificante del gen Citocromo B (Cit B).

La región codificante del gen Citocromo B (Cit B), que presenta un tamaño de 485 pb, se analizó utilizando los primers: forward (5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3') y reverse (5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3'), previamente descritos para *A. mellifera* por Crozier et al. (1991). La amplificación por PCR se realizó siguiendo los parámetros según el protocolo descrito por Pinto et al. (2003): desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 15 seg, 50°C por 15 seg y 68°C por 25 seg, con una extensión final de 10 min a 72°C. Se tomaron 5 µl de producto de PCR y se corrieron en gel de agarosa al 1% p/v, teñido con GelRed (Biotium, CA, USA) y fotografiado bajo luz U.V.

Los productos de PCR de la región Cit B se digirieron con la enzima *Bgl* II (Promega) que posee como sitio de reconocimiento y corte la secuencia de ADN A[^]GATCT. Se incubaron 10 µl de producto de PCR de Cit B con 1U de enzima de restricción a 37°C durante 3 hs. Los patrones de bandas se separaron en electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con GelRed y fotografiado bajo luz U.V.

La región COI-COII se amplificó con los primers MT hsf (5'-TCTATACCACGACGTTATTC-3') y MT 2 (5'-GATCAATATCATTGATGACC-3') descritos por Crozier y Crozier (1993) y Lobo Segura (2000). La mezcla de reacción se realizó en 25 µL de volumen final, conteniendo: 1 µM de cada cebador, 0.5 mM de dNTP (Boehringer Mannheim), 1.5 mM de MgCl₂ (InbioHighway), 1X de tampón de reacción (InbioHighway), 1U de Taq polimerasa (InbioHighway) y 5 µl de ADN total como templado. El ciclo de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C y una extensión final de dos minutos a 72°C. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research). Se verificó el resultado de las reacciones

corriendo 5 µl de producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en buffer TBE 0.5X, teñido con GelRed y fotografiado bajo luz U.V.

Para la determinación haplotípica se utilizó la técnica PCR-RFLP. Primeramente se escogió la enzima de restricción *DraI* (Promega) para digerir el fragmento de PCR obtenido de la región COI-COII; esta enzima tiene su sitio de reconocimiento y corte en la secuencia TTT[^]AAA. Las reacciones de digestión se realizaron utilizando 10 µl del producto de PCR con 1U de la enzima de restricción *DraI* incubados a 37°C durante 3 hs. utilizando el buffer y las condiciones indicadas por el proveedor. Posteriormente, los patrones de restricción se evidenciaron mediante del ADN digerido en electroforesis en gel de agarosa 4% p/v en TBE 0.5X. teñido con GelRed y fotografiado bajo luz UV.

Con la intención de aumentar el poder discriminativo de la técnica de PCR-RFLP de la región COI-COII utilizando *DraI*, y siguiendo los antecedentes de Sheppard et al. (1996), se utilizó la digestión del mismo fragmento de amplificación COI-COII con la enzima *Hinf I*, cuya secuencia de reconocimiento y corte está compuesta por G[^]ANTC. La reacción de digestión consistió en 10 µl del producto de PCR de la región COI-COII con 1U de la enzima de restricción *Hinf I* (Promega) incubados a 37°C durante 3 hs utilizando el tampón y las condiciones indicadas por el proveedor. Los fragmentos de restricción fueron separados y visualizados en gel de agarosa al 4% p/v, teñido con GelRed y fotografiado bajo luz U.V.

3.4. Secuenciación automática de regiones del ADN mitocondrial de *Apis mellifera*

Con el fin de confirmar la identidad de los marcadores mitocondriales analizados, los productos de PCR de la región intergénica COI-COII obtenidos de colonias de San Rafael (Mendoza), Rafaela (SF), Federación (ER), Castelar (BA), Río Colorado (LP) y Ribeirão Preto (Brasil) fueron purificados y secuenciados utilizando un secuenciador automático Abi 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem) (SIGYSA, INTA Castelar). Las secuencias fueron procesadas utilizando el programa Staden Package (Staden, 1996) y alineadas con los programas Bioedit (Hall, 1999) y Clustal X 1.81 (Thompson et al, 1997). Las secuencias consenso de cada haplotipo fueron comparadas con los bancos

de datos genéticos, utilizando el programa Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) versión 2.2.10 del US National Institute of Health (Altschul et al, 1990).

De manera similar, dos productos de PCR de la región Cit B amplificados a partir de muestras de ADN de origen africanizado y europeos fueron procesados y secuenciados. Por último, se utilizó el programa PopArt (Leigh y Bryant, 2015) para combinar las frecuencias haplotípicas y se resumieron resumir las relaciones filogenéticas entre los haplotipos.

3.5. Análisis de ADN nuclear (microsatélites)

3.5.1. Amplificación por PCR

A partir de la bibliografía (Estoup et al, 1995; 2001; Solignac et al, 2003) se seleccionaron 8 marcadores microsatélites polimórficos para estimar la variabilidad genética poblacional, mencionados en la Tabla 2. Se determinó el tamaño de los alelos amplificados mediante secuenciador automático capilar, usando cebadores forward marcados en su extremo 5' con los fluorocromos FAM y HEX.

Tabla 2. Características de los cebadores utilizados para amplificar regiones microsatélites de *A. mellifera*. Nombre de los cebadores, motivos de repetición, temperaturas de hibridación (Th) en grados centígrados (°C), secuencias nucleotídicas de los iniciadores (F: forward, R: reverse) y fluorocromos utilizados en su marcación.

Locus	Motivo de repetición	Th	Secuencia de los cebadores	Fluorocromo
Ap043	(TA) ₆ GATA(GA) ₁₀	60	F5'-GGCGTGACAGCTTATTCC R5'-CGAAGGTGGTTTCAGGCC	FAM
Ap068	(CT) ₁₂ (TA) ₈	50	F5'-TGTCTGCCCTCCTCTCTGTT R5'-CACATCGAGCGAGAAGGC	FAM
Ap085	(GA) ₆ (GA) ₁₁	50	F5'-GATCAAACACACAAACGAAAGC R5'-ACCGGAAGCCTAATCAAGG	HEX
Ap226	(CT) ₈	50	F5'-AACGGTGTTCGCGAAACG R5'-AGCCAACCTCGTGCGGTCA	FAM
Ap256	(GA) ₁₂ AT(GA) ₃	50	F5'-CCAAGTCGCTTCATCATCGT R5'-CCTAAGGTCTACACCCCGT	HEX

Ac011	(CT) ₁₉	50	<i>F5'</i> -CTTACGCCAATCTCTCCACG <i>R5'</i> -CGGTTAATTTTCGTTTCTCGC	HEX
Ag005a	(A) ₈ G(A) ₈ G(A) ₅	55	<i>F5'</i> -TGTTCCGGCAAGCTGAAG <i>R5'</i> -GTGCTCCGCAACAACGTG	HEX
A113	(TC) ₅ TT(TC) ₈ TT(TC) ₅	60	<i>F5'</i> -CTCGAATCGTGGCGTCC <i>R5'</i> -CCTGTATTTTGCAACCTCGC	FAM

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research), y las mezclas (volumen final de 25 µl) contuvieron: 1 µM de cada cebador, 0.5 mM de nucleótidos (Boehringer Mannheim), 1.5 mM de MgCl₂ (InbioHighway), 1X Reaction Buffer (InbioHighway), 1 U de Taq polimerasa (InbioHighway) y 5 µl de ADN total como molde. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15 seg, 50°C por 15 seg y 68°C por 15 seg, con una extensión final de 10 min a 72°C. Se confirmó la amplificación corriendo 5 µl de producto de PCR en electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed y fotografiado bajo luz U.V.

3.5.2. Análisis de datos

El genotipado se realizó mediante co-electroforesis de productos de PCR de cuatro marcadores microsatélites distintos por muestra: en cada pocillo de una placa de secuenciación se colocaron 2 µL del mix de productos de PCR, a los que se agregaron 7,5 µl de TEMED y 0,5 µl de marcador de peso molecular TAMRA 500, y se desnaturalizaron durante 3 a 95°C. Posteriormente, las placas se sometieron a electroforesis capilar en un secuenciador automático MegaBace 3100 (General Electric), para separar los alelos de cada marcador en cada muestra. Se estandarizaron los tamaños alélicos y se evaluó la presencia de alelos nulos con el programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al, 2004).

La variabilidad presente en las poblaciones de abejas de Argentina, por provincia y tipo de colonia, se estimó mediante diferentes índices de diversidad genética utilizando la información aportada por los microsatélites (Franck et al, 2000; De la Rúa et al, 2002). Se

estimaron la heterocigosidad esperada (H_e), y observada (H_o) y el número de alelos en cada locus (N_a) utilizando el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al, 2005). Se evaluaron desvíos de las proporciones genotípicas esperadas bajo Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) y posible Desequilibrio de Ligamiento entre loci aplicando el procedimiento de corrección para comparaciones múltiples de Bonferroni, utilizando el programa GENEPOP 3.4 (Rousset, 2008).

Se investigó la diferenciación genética entre las colonias de diferentes provincias mediante los índices F de Wright (Wright, 1969) según Weir y Cockerham (1984), y utilizando también el test de exactitud de Fisher, calculado con el programa GENEPOP 3.4 (Rousset, 2008). Se evaluó el déficit de heterocigotos de los microsatélites a diferentes niveles: 1) F_{IS} : dentro de las poblaciones, 2) F_{ST} : entre las poblaciones. Los valores de F_{ST} se tomaron de a pares para medir la distancia genética entre poblaciones mediante una matriz de distancia, utilizando el programa Arlequin 3.5 (ver punto 4.2.3). El F_{st} representa una estimación de la variancia en las frecuencias alélicas entre subpoblaciones en relación a la población total. Definido como coeficiente de correlación (Wright 1951), si se calcula entre pares de subpoblaciones (demos), puede indicar (si es significativo y alto) que la variancia dentro de las subpoblaciones es menor en relación a la total, y que están más diferenciadas entre ellas.

Asimismo, se compararon las poblaciones de a pares mediante el cálculo de matrices de distancia en base de alelos compartidos, la divergencia debida a mutación y deriva en conjunto, o a deriva solamente. Se agruparon las poblaciones en árboles filogenéticos basados en esas distancias, construidos mediante el uso del software *R* (Jombart y Collins, 2015) y el programa Populations 1.2.31 (Langella, 1999). Se utilizó el método de Neighbour-Joining, en el cual inicialmente se produce un árbol en forma de estrella, al cual se adicionan como nodo único el agrupamiento entre las poblaciones más cercanas, y mediante el método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), en el que primero se unen las dos poblaciones o grupos más similares y se promedian sus valores en la matriz para la siguiente iteración. Por último, la distribución de la variación total se cuantificó mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al, 2005).

3.5.3. Estructura poblacional

La estructura poblacional se estimó mediante el enfoque Bayesiano en el programa Structure v.3.2.1 (Pritchard et al, 2000). Los análisis se basaron en el modelo de “admixture” o mezcla de las frecuencias alélicas correlacionadas, con un número de *clusters* (K) comprendido entre dos y dieciocho. Diez corridas de 10.000 iteraciones fueron realizadas por cada K. El número de K más probable fue determinado por el método ΔK (Evanno et al, 2005) disponible en el sitio web de Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012). La estructura de la población también se estimó mediante el Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) utilizando el paquete “adegenet” del programa R (Jombart y Collins, 2015). El número más probable de *clusters* se evaluó mediante el método de sucesivos K-means (find.*clusters*), que abarca un número de K de 1 a 10, siendo el valor más probable de K el que corresponde al Bayesian Information Criterion, Criterio de Información Bayesiano (BIC) más bajo.

3.5.4 Distribución de AA en relación a variables bioclimáticas

Se realizaron análisis de regresión para modelar la distribución de las abejas africanizadas en el área bajo estudio en relación con las siguientes variables bioclimáticas: latitud, temperatura máxima diaria en el mes de enero y en el mes de julio, temperatura mínima diaria de enero y julio, y número de horas de frío de julio (horas con una temperatura por debajo de 4°C). La información climática se obtuvo de las estaciones agrometeorológicas más cercanas a los sitios de muestreo utilizando el sistema SIGA versión 1.0.5 (SIGA, 2018) desarrollado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Los mitotipos (variable respuesta) se codificaron como africano (1) o europeo (0) y se ajustó un modelo de regresión logística, que incluyó alternativamente cada una de las variables consideradas. En todos los casos, el origen de la muestra (colonias comerciales o colonias silvestres) también se incluyó en los modelos como un efecto fijo.

Asimismo, se realizó una regresión lineal, utilizando como variable dependiente las probabilidades de asignación de población (frecuencia de africanización en las muestras analizadas) generadas con el programa Structure ver. 3.2.1 (Pritchard et al, 2000) y las mismas variables independientes explicativas mencionadas anteriormente. Para definir la variable dependiente, supusimos que las colonias silvestres con haplotipo A4 del norte del país tenían una contribución comparativamente mayor del material genético africano detectado en este trabajo. Por lo tanto, considerando $K = 4$, para cada muestra elegimos la probabilidad de asignación correspondiente a la población que comparativamente hizo la mayor contribución al grupo referido y, al mismo tiempo, la contribución más baja que correspondió a las muestras de la provincia de Buenos Aires. Las pruebas de paralelismo y coincidencia se incluyeron en los análisis de regresión lineal para evaluar la contribución del origen de las muestras a la distribución de abejas africanizadas en Argentina. Todos los análisis de regresión se realizaron con el paquete de software SAS (SAS® University Edition).

4. RESULTADOS

4.1 Muestras

La época de muestreo coincidió con el fin de temporada de cosecha de miel (fines de verano, principios de otoño). Las muestras fueron obtenidas de 125 apiarios y 105 colonias silvestres en 40 localidades (ciudades, pueblos y parajes) (Tabla 3). Se obtuvieron doce muestras de colonias silvestres de huecos de árboles, dos en los Esteros del Iberá (CO) y 8 en Río Colorado (LP) o entre piedras (Cerro Uritorco, CB). El resto de las colonias de las colonias silvestres habían sido capturadas por apicultores y ubicadas en colmenas tipo Langstroth.

Tabla 3. Localidades muestreadas por provincia

Provincia	Localidades
Entre Ríos (ER)	Colonia Yerúa, El Alambrado, Federación, Concordia
Formosa (FS)	San Marín, Sumayén, El Colorado, Colonia La Sirena, Villa 213
Tucumán (TU)	Famaillá, Leales
Santiago del Estero (SE)	Pozo Hondo, Quimilí, Zanjón Grande
Córdoba (CB)	Cerro Uritorco, Huidobro, Cruz del Eje, Jesús María
Corrientes (CO)	Iberá, Monte Caseros, Bella Vista, Virasoro, Paso de la Patria, Riachuelo, Mercedes
Chaco (CH)	Villa Ángela, J. J. Castelli, Gral San Martín, Paraje El Algarrobal
Santa Fe (SF)	Rafaela, Felicia, Saladero Cabál
Buenos Aires (BA)	Hilario Ascasubi, Balcarce, Tandil, 25 de Mayo, Suipacha, Castelar
La Pampa (LP)	Anguil, Río Colorado

4.2. Extracción de ADN

Si bien la aplicación de protocolo de alta concentración salina afecta la recuperación de ADN, el uso del tórax (por la presencia de músculos) permite obtener suficiente cantidad de ADN para los análisis. Se registró degradación de ADN en pocas muestras que durante el transporte se abrieron accidentalmente, produciendo la evaporación del alcohol (Figura 10).

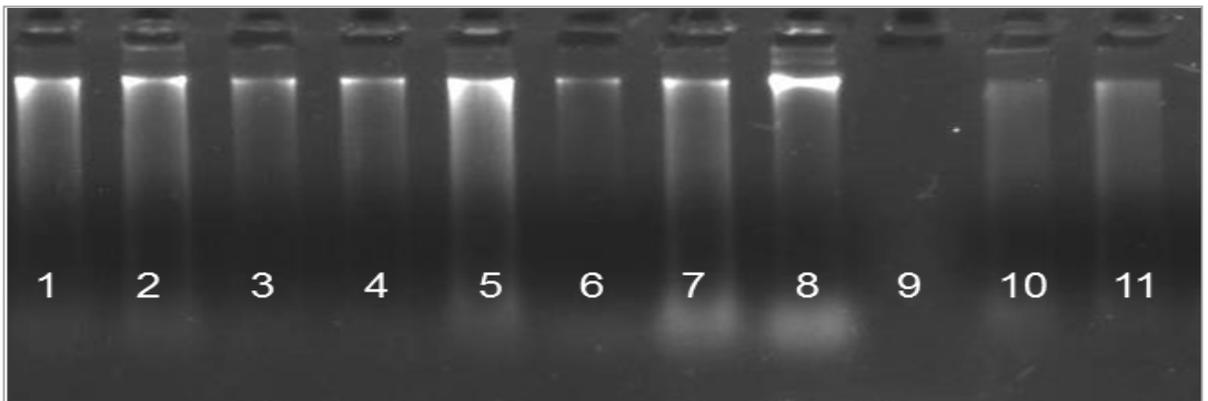


Figura 10: Fotografía de un gel de agarosa mostrando el ADN total extraído de muestras de *A. mellifera* provenientes de Entre Ríos. El chorreado evidente en todas las muestras indica ADN degradado. Nótese la ausencia de ADN en la muestra sembrada la calle 9 sin ADN, y las muestras sembradas en las calles 10 y 11, con ADN muy degradado.

De un total de 396 muestras analizadas para ADN mitocondrial (ver sección 4.3.) 238 pudieron analizarse para ADN nuclear. La baja calidad de ADN en 158 muestras no permitió amplificar la mayoría de los loci de microsatélites (ver sección 4.5.1.).

4.3. Análisis del ADN mitocondrial.

Se amplificó la región Cit B en las primeras 28 muestras, y se determinó el origen de éstas como africana o europea, sin discriminar en haplotipos. Se obtuvo un fragmento de 487 pb, donde se generaron dos bandas (una de 291 pb y la otra de 194 pb) luego del corte de la enzima *Bgl* II en las muestras de abejas de origen europeo (brazos evolutivos C y M). No se produjo ningún corte en las muestras de las abejas de origen africano

(brazo evolutivo A), lo cual permitió discriminar las muestras de Ribeirão Preto (Brasil) y de Jujuy de las de Buenos Aires, Tucumán, Mendoza y Santa Fe (Figura 11).

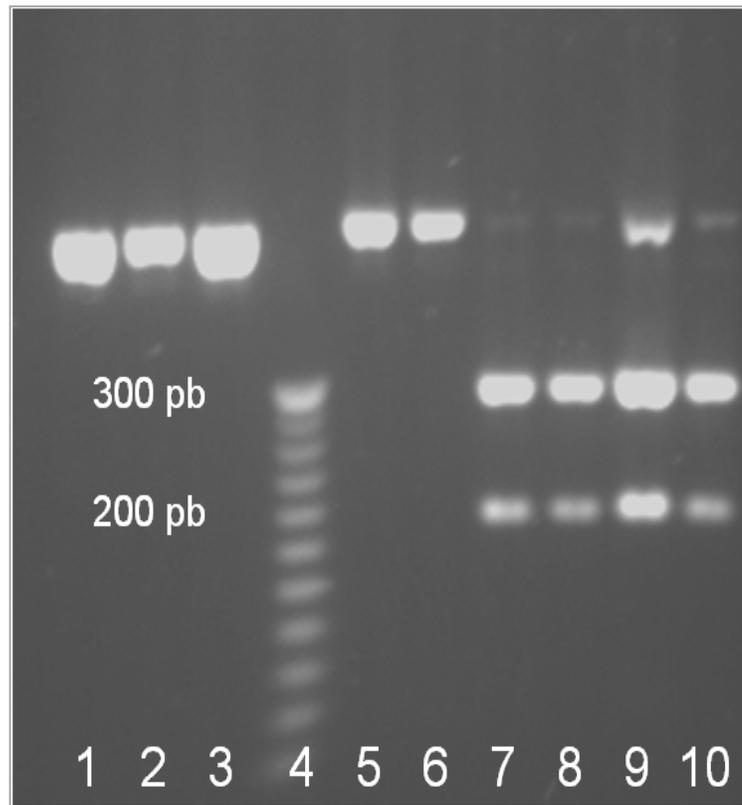


Figura 11. Fotografía de un gel de agarosa mostrando: Calles 1 a 3) Fragmento Cit B amplificado por PCR sin digerir; Calle 4) 25 bp DNA Step Ladder (Promega); Calles 5 a 10) Patrones de restricción del fragmento de amplificación de la región Cit B con la enzima *Bgl* II, en muestras provenientes de las poblaciones de Ribeirão Preto (Brasil), Jujuy, Buenos Aires, Tucumán, Mendoza y Santa Fe (en ese orden).

Utilizando el marcador COI-COII se analizaron 396 muestras de ADN y se logró amplificar un fragmento de longitud variable, entre 900 y 1300 pb. La posterior digestión con enzimas de restricción permitió distinguir patrones diferenciales (haplotipos mitocondriales) que se compararon con los ya descritos en la literatura. En un principio se realizó el análisis de esta región del ADN mitocondrial para 50 muestras de ADN de abejas de diferentes localidades de Argentina, obtenidas según lo descrito en la sección 3.3. utilizando la enzima *Dra* I.

Se detectaron los haplotipos A1, A4 y C1 mediante la digestión de los productos de PCR de la región COI-COII con la enzima *Dra*I (Figura 12).

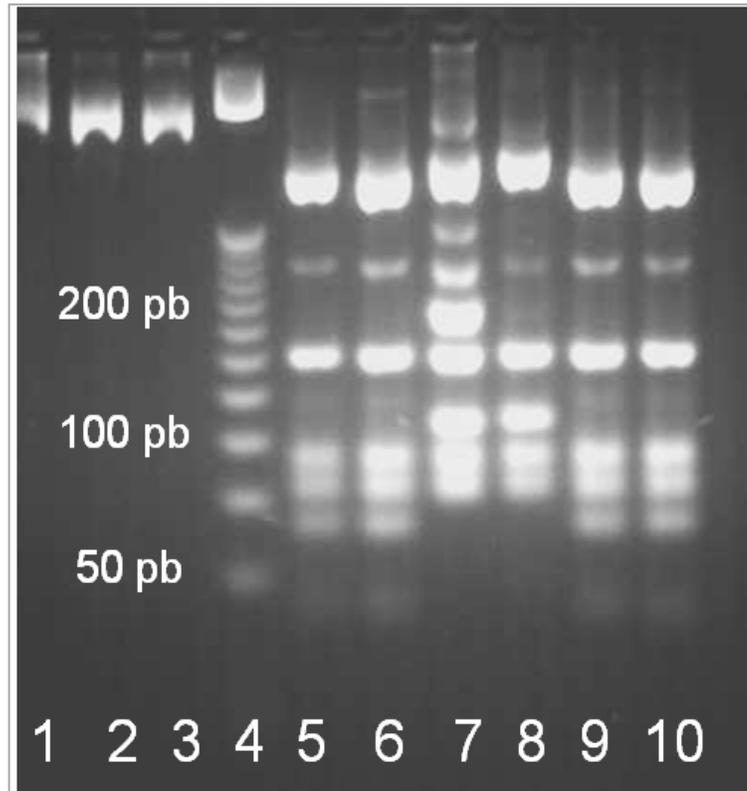


Figura 12. Fotografía de un gel de agarosa mostrando: Calles 1 a 3) Fragmento COI-COII amplificado por PCR sin digerir; Calle 4) 25 bp DNA Step Ladder (Promega); Calles 5 a 10) Patrones de restricción del fragmento de amplificación de la región COI-COII con la enzima *Dra* I, muestras provenientes de las poblaciones de Buenos Aires, Tucumán, Brasil, Jujuy, Mendoza y Santa Fe (en ese orden). Calles 5, 6, 9 y 10 haplotipo C1, calle 7 haplotipo A4 y calle 8 haplotipo A1.

Esta metodología tuvo bajo poder discriminativo, por lo cual se decidió utilizar la enzima *Hinf*I para continuar los análisis. Con la enzima *Hinf* I fue posible sub-clasificar las muestras anteriormente descritas como C1, que produjeron dos patrones de digestión diferentes (Figura 13), discriminando muestras de Buenos Aires de las procedentes de Tucumán (Calles 3 y 4, Figura 13).

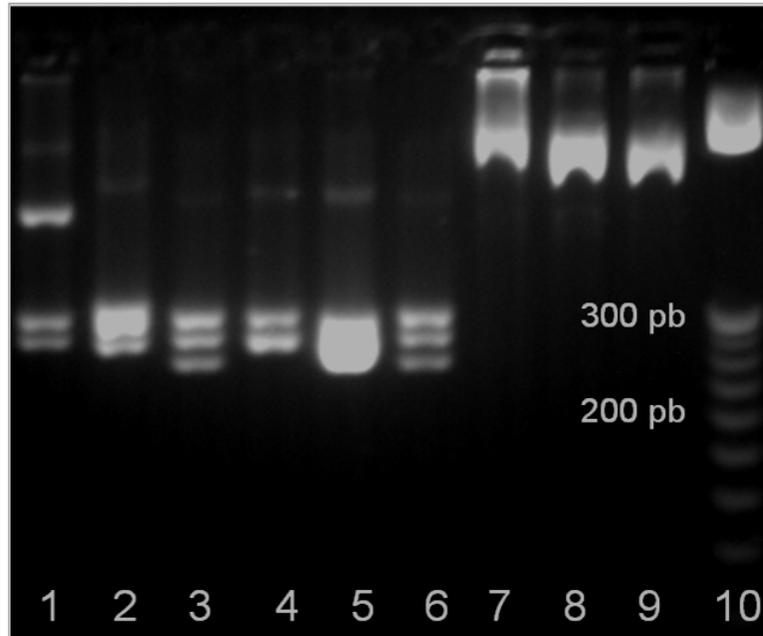


Figura 13. Fotografía de un gel de agarosa al 4% mostrando: calles 1 a 6) Patrones de restricción de fragmentos amplificados de la región intergénica COI-COII con la enzima *Hinf* I obtenidos de poblaciones de Brasil, Jujuy, Buenos Aires, Tucumán, Mendoza y Santa Fe; Calles 7 a 9) fragmentos amplificados de la región intergénica COI-COII sin digerir; Calle 10) 25 bp DNA Step Ladder (Promega). Calle 1 haplotipo A4, calle 2 haplotipo A1, calles 3 y 6 haplotipo C2J y calles 4 y 5 haplotipo C1.

Con el objetivo de determinar el haplotipo del nuevo perfil de bandas observado, las muestras fueron purificadas y enviadas a secuenciar (ver sección 4.4.). De esta manera, fue posible identificar dos subtipos antes descriptos como un único haplotipo: C1 que caracteriza a la subespecie *A. m. ligustica* (Franck et al., 2001; Pinto et al., 2012) (Figura 13, calles 5 y 6) y el haplotipo C2J, una variante del haplotipo C2, característico de la subespecie *A. m. cárnica* (Nedić et al., 2009) que no había sido descripto hasta el momento en Argentina. Asimismo, el uso de *Hinf* I permitió detectar al haplotipo M4, perteneciente al brazo evolutivo M y que caracteriza a la subespecie *A. m. mellifera* (Franck et al., 2001) (Figura 14). En relación al brazo evolutivo A se detectaron tres haplotipos: A1, A4 y A30.

Las abejas obtenidas en apiarios de Ribeirão Preto (Brasil), que fueron colectadas y utilizadas para definir el patrón para abeja africanizada, mostró un perfil de bandas

compatible con el haplotipo A4 utilizando ambas enzimas (figura 12, línea 7 para *Dra* I y figura 13, línea 1 para *Hinf* I). El haplotipo A1 se observa en los perfiles de banda de las líneas 8 (Figura 12) y 2 (Figura 13).

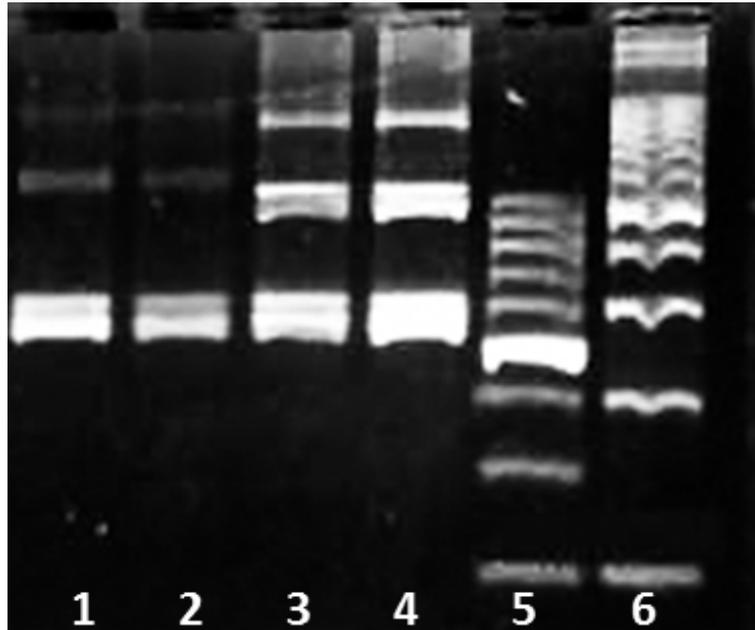


Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 4% mostrando: Calle 1) Patrón de restricción de la región intergénica COI-COII con la enzima *Hinf* I de una muestra de Buenos Aires; calles 2, 3 y 4) Patrón de restricción de muestras de La Pampa; Calle 5) DNA 50 pb step ladder (Promega). Calle 6) DNA step ladder 100pb (Promega). Calles 1 y 2 haplotipo C1, calles 3 y 4 haplotipo M4.

El tercer haplotipo africano detectado es el A30, similar al perfil de bandas del haplotipo A4 con una pequeña deleción en la región P (Figura 15).

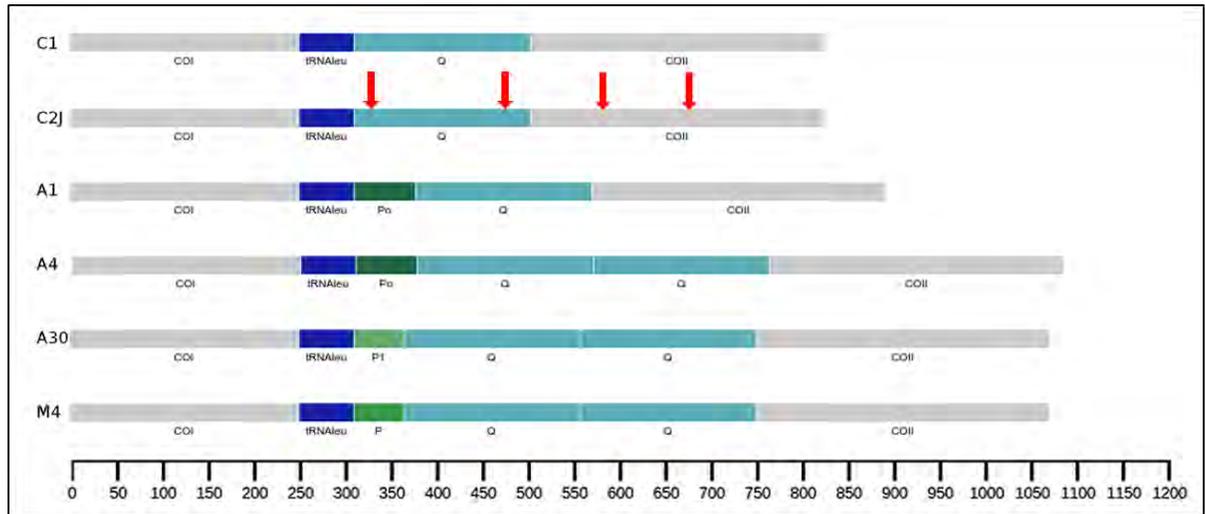


Figura 15. Esquema de los haplotipos detectados. El haplotipo C2J difiere con el haplotipo C1 en 4 nucleótidos (flechas rojas).

4.4. Secuenciación automática de regiones del ADN mitocondrial de *Apis mellifera*

Muestras representativas de cada perfil de bandas detectado fueron secuenciadas y comparadas con las depositadas en GenBank para confirmar que correspondían a los haplotipos asignados. Muestras de las provincias de Mendoza y Tucumán y dos muestras de La Pampa (GB JQ582433-35 y JQ582440) mostraron total similitud con la secuencia de AN EF033655.1 (Collet et al., 2006) que corresponde a los haplotipos C1 descritos por Cornuet (1991). Las muestras de Buenos Aires y Santa Fe (GB JQ582431-2) mostraron 4 cambios nucleotídicos en comparación con los haplotipos C1. Se encontró una delección situada en la región Q_1 , una transversión $A \leftrightarrow T$ en la región Q_3 y dos transiciones $C \leftrightarrow T$ situado en la región de codificación del gen COII. Sólo una de estas sustituciones de nucleótidos fue reconocida por las enzimas de restricción que permiten diferenciar entre haplotipo C1 y la variante de haplotipo C2J (*Hinf* I y *TfII*) (Conte et al., 2008; Nedic et al., 2009). La muestra de Entre Ríos 2 (GB JQ582438) mostró 100% de similitud cuando se comparó con el haplotipo africanizado A30 (AN EF033654.1 Collet et al., 2006). Una muestra de La Pampa (FJ478006) mostró 100% de similitud cuando se comparó con el haplotipo M4 (AN EF033656.1) (Collet et al., 2006) (Tabla XIII, Anexo).

4.5. Frecuencias haplotípicas obtenidas

El haplotipo más frecuente presente en todas las provincias fue el C1 (*A. m. ligustica*), el cual solo posee una región Q (Figura 15). Los haplotipos C2J (*A. m. carnica*), A4 (*A. m. scutellata*) y A1 (*A. m. intermissa* y otras) fueron encontrados casi en la misma proporción (Figura 17) y con una amplia distribución. Los haplotipos A1 y A4 no fueron detectados en las provincias de Buenos Aires y La Pampa y el haplotipo C2J no se encontró ni en Formosa ni en La Pampa (Figura 17 y Tabla 4). Al igual que el haplotipo C1, C2J solo posee una región Q (Figura 15), el haplotipo A1 posee una región Q y una región llamada P_0 (P_0Q), en tanto que el haplotipo A4 posee la región P_0 y dos regiones Q (P_0QQ). El tercer haplotipo africano detectado, el haplotipo A30, también posee 2 regiones Q y la región P_0 posee una delección de 17 pares de bases por lo que se la denomina P_1 (P_1QQ). El haplotipo A30 solo se detectó en dos colonias, una en la provincia de Corrientes y la otra en la provincia de Entre Ríos. Por último, el haplotipo M4 (característico de la subespecie *A. m. mellifera*) posee una región llamada P que es similar a P_0 pero con una delección de 15 bases y posee dos regiones Q (PQQ) (Figura 15).

En la provincia de Formosa se registró la mayor frecuencia de colonias africanizadas. Se observó la presencia de abejas de origen europeo en una frecuencia de 0,1. En las provincias de Corrientes y Chaco se observó una frecuencia de haplotipos de origen africanos de 0,52 y 0,60 respectivamente. En Corrientes y Entre Ríos, se detectaron 5 haplotipos de los 6 registrados (A1, A4, A30, C1 y C2J) siendo las provincias con mayor variabilidad haplotípica. Las provincias con menor frecuencia de haplotipos A fueron Entre Ríos (0,35), Córdoba (0,32), Tucumán (0,29), Santa Fe (0,2) y por último Santiago del Estero, con una frecuencia de 0,12. No se detectaron haplotipos de origen africano en las provincias de Buenos Aires y La Pampa (Figura 16 y tabla 4).

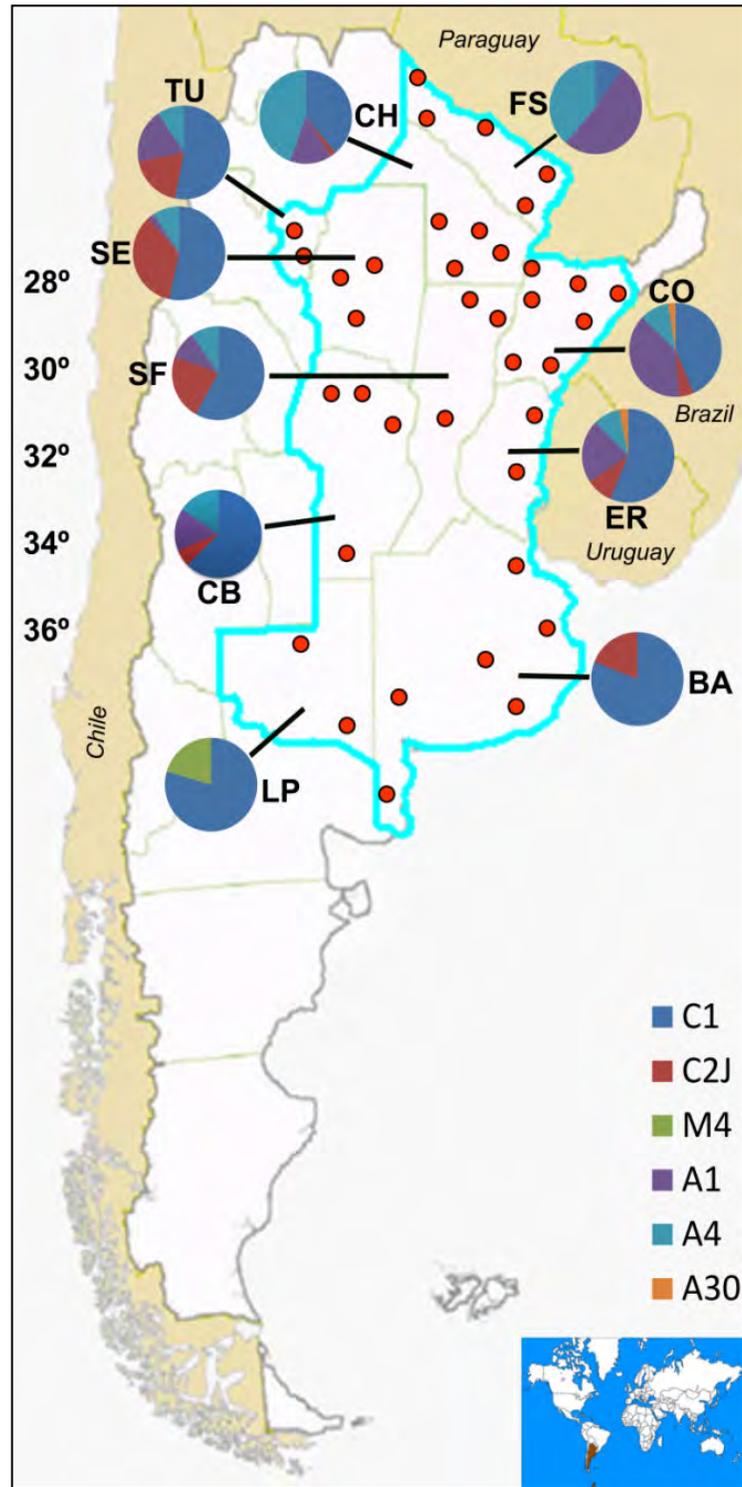


Figura 16. Frecuencia de haplotipos detectados en las 10 provincias analizadas.

En las colonias silvestres (105 muestras de todas las provincias excepto Buenos Aires), el haplotipo A1 fue el más frecuente (37 colonias), 29 correspondieron a los haplotipos A4 y C1, dos colonias mostraron el haplotipo C2J y 8 colonias provenientes de la zona norte del Río Colorado, en la frontera entre las provincias de La Pampa y Río Negro, mostraron el haplotipo M4 (Tabla 4).

Tabla 4: Muestras discriminadas por origen (silvestre o comercial), provincia y haplotipo.

Provincia	N	C1		C2J		M4		A1		A4		A30	N° haplot
		S ¹	C ¹	S	C	S	C	S	C	S	C	C	
BA	63	-	51	-	12	-	-	-	-	-	-	-	2
LP	39	-	31	-	0	8	-	-	-	-	-	-	2
CB	32	2	18	-	2	-	-	5	-	3	2	-	4
SF	31	4	14	-	7	-	-	-	3	3	-	-	4
ER	32	6	12	-	3	-	-	2	5	-	3	1	5
CO	39	7	10	-	2	-	-	11	4	1	3	1	5
CH	54	6	15	-	1	-	-	2	6	6	18	-	4
FS	31	3	-	-	0	-	-	16	-	12	-	-	3
SE	43	1	22	2	13	-	-	1	-	4	-	-	4
TU	32	-	15	-	6	-	-	3	3	2	3	-	4
N Total	396	29	188	2	46	8	-	40	21	29	29	2	
			217		48		8		61		58	2	

Las muestras de la provincia de Buenos Aires, todas de apiarios comerciales, pertenecieron al brazo evolutivo C (C1 y C2J). Los haplotipos C fueron los más abundantes, detectándose el haplotipo C1 en todas las provincias y el C2J en 8 (excepto Formosa y La Pampa) (Tabla 4; Figura 16). Las relaciones evolutivas entre todos los haplotipos detectados en las muestras analizadas se esquematizan en la Figura 17.

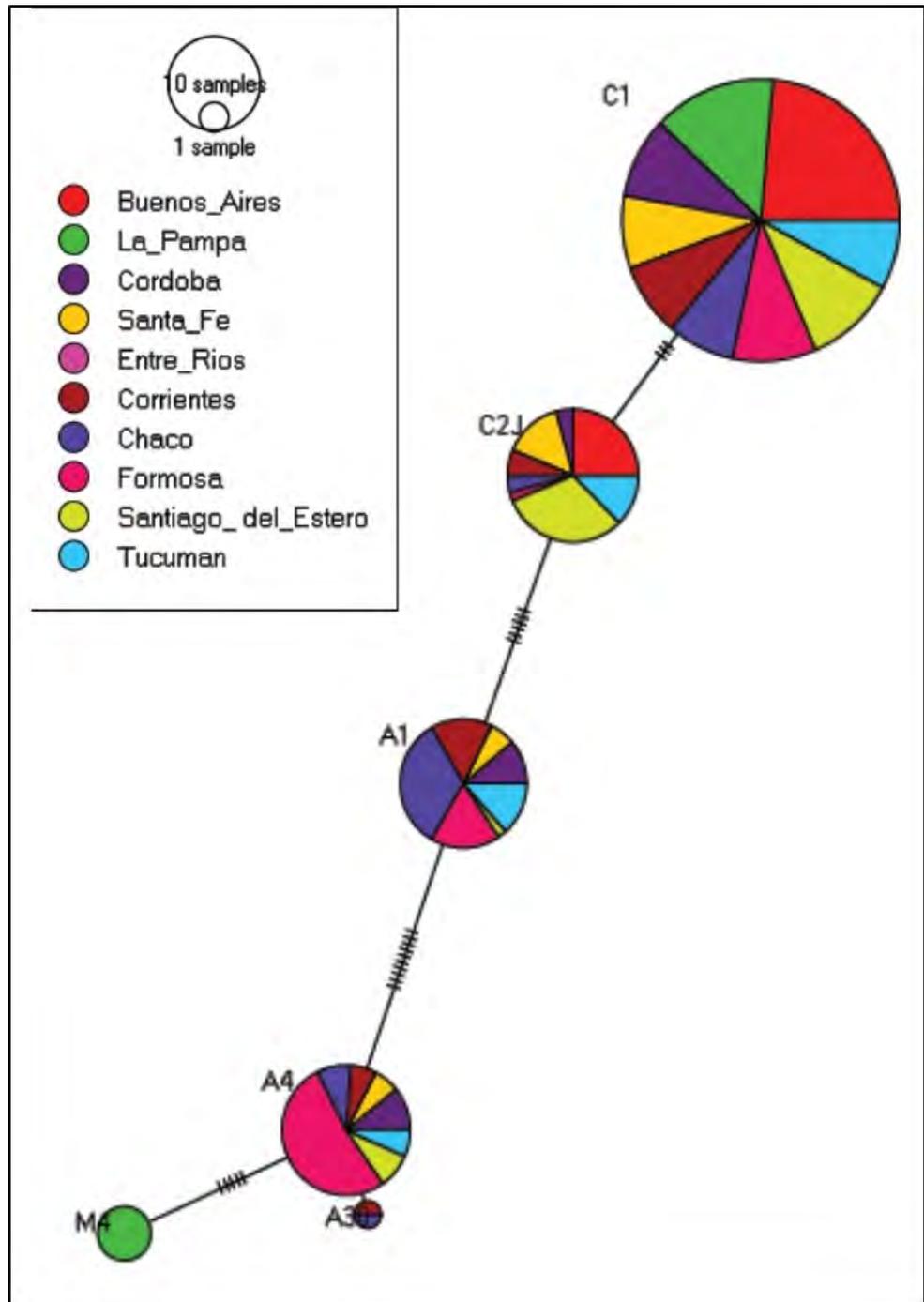


Figura 17. Esquema de las relaciones evolutivas entre haplotipos y su frecuencia en cada una de las provincias estudiadas.

4.6. Análisis de ADN nuclear (microsatélites)

4.6.1. Amplificación por PCR.

Debido a problemas en la amplificación por PCR de algunos loci microsatélites, fundamentalmente ocasionado por la baja calidad del ADN extraído en algunas muestras, solo se utilizaron 238 para este análisis, que resultaron representativas de las poblaciones.

4.6.2. Análisis de datos

Se detectaron entre 60 a 100 alelos en total. Las muestras de la provincia de Chaco mostraron mayor número de alelos con un valor medio de 12,5; las provenientes de Santa Fe mostraron menor valor para este parámetro, registrando valores medios de 8,25 alelos por locus. El número total de alelos por locus varió de un máximo de 16 alelos en el locus Ap043 en la provincia de Entre Ríos a un mínimo de 5 alelos en el locus Ag005a en la Provincia de Santa Fe, siendo el valor medio de todos los loci de 10,238 +/- 0,239 (Tabla 6). El mayor número de alelos y valores esperados de heterocigosidad se observaron en Santiago del Estero, Chaco y Corrientes, mientras que los valores más bajos se encontraron en Buenos Aires y La Pampa junto con Entre Ríos (Tabla 6). No se detectó Desequilibrio de Ligamiento entre los loci analizados. Se registró la presencia de alelos nulos en las muestras de Buenos Aires (Ap226), Formosa (Ap068, Ap256 y A113), Córdoba (Ap256, A113), Corrientes (Ap256), Chaco (Ap043, Ap256 y Ag005a), Santa Fe (Ap043), Entre Ríos (Ac011, Ap043 y Ap256) y Tucumán (A113) lo que podría explicar algunas de las deficiencias de heterocigotos observada. No se detectaron alelos nulos en las poblaciones de Tucumán y Santiago del Estero (Tabla 6). Para conocer mejor la estructura poblacional de las abejas melíferas en Argentina, los primeros análisis se realizaron utilizando la provincia como referencia para la agrupación de muestras. El análisis de AMOVA mostró que la mayor parte de la variabilidad genética se encuentra entre individuos de cada provincia (96,43%) y solo el 3,57% de variación se da entre individuos de cada una de las provincias de donde se obtuvieron las muestras ($F_{ST} = 0.03573$; $p < 0.01$), indicando que esta estrategia de agrupamiento proporcionó poca información para justificar la variación genética (Tabla 5). La mayoría de los valores F_{ST} estimados entre pares de provincias fueron bajos (rango 0,014 a 0,129) siendo los valores

F_{ST} más altos los que se encuentran entre Buenos Aires y Formosa, Tucumán, Corrientes y Chaco (Tabla 8).

Tabla 5: Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de ocho microsatélites analizados en las poblaciones de *A. mellifera* estudiadas agrupadas por provincia. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre las poblaciones y el correspondiente a los individuos dentro de las poblaciones.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	9	59,835	0,08983 Va^*	3,57
Dentro de poblaciones	466	1129,766	2,42439 Vb^*	96,43
Total	475	1189,601	2,51422	

* $p < 0,05$

* $F_{ST} p < 0.05$

El AMOVA realizado agrupando a las poblaciones en cuatro grupos, 1) Entre Ríos y Córdoba, 2) Santiago del Estero, Corrientes y Chaco, 3) Formosa y Tucumán y 4) Buenos Aires, Santa Fe y La Pampa arrojó valores significativos a nivel de población y de grupo (Tabla 7). Todas las poblaciones, excepto Tucumán y Santiago del Estero, se encontraron en EHW. La H_o más elevada se encontró en las poblaciones de la provincia de Formosa. La agrupación estuvo basada a nivel individual, de población y de grupo para poder realizar un mejor análisis en la comparación de la variabilidad entre poblaciones y entre grupos de poblaciones, dando valores significativos en ambos.

Tabla 6: Parámetros de diversidad genética de *A. mellifera* de Argentina. Los datos se se muestran por provincia y por marcador microsatelite. Na: número de alelos por locus; HO: heterocigosidad observada; HE: heterocigosidad esperada; Nulos: frecuencia estimada de alelos nulos; *: valores significativamente diferentes de las expectativas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (después de la corrección de Bonferroni); #: Frecuencias significativas de alelos nulos ($P < 0.05$)

Locus	Rango alelico	ER		TU		FS		SE		CB		CO		CH		SF		BA		LP	
		Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho	Na	Ho
		He		He		He		He		He		He		He		He		He		He	
		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos		Nulos	
Ap043	117-171	16	0,71429	12	0,92857	9	0,81818	9	0,83333	13	0,76923	11	0,84	12	0,74286	12	0,71429	8	0,70833	10	0,76471
			0,86542*		0,90476		0,85518		0,8587		0,88084		0,85633		0,88903*		0,91534*		0,6844		0,90553
			0,0885#		-0,0312		0,0106		-0,0063		0,058		-0,0005		0,0824#		0,1054#		-0,0277		0,0695
Ap068	130-180	9	0,79412	9	1,00	8	0,59091	8	0,73333	10	1,000	10	0,69565	10	0,73529	8	0,66667	9	0,73333	8	0,83333
			0,86435		0,88923		0,81078*		0,77701		0,87273		0,85314		0,83845		0,83448		0,76158		0,85079
			0,035		-0,0781		0,1456#		0,012		-0,0769		0,0908		0,0582		0,095		0,0105		-0,0037
Ap085	176-214	15	0,88571	9	0,85714	12	0,86364	11	0,87714	11	0,96296	13	0,88	15	0,91429	7	0,93333	9	0,9	10	0,88235
			0,88199		0,8836		0,87949		0,86772		0,89518		0,88		0,91014		0,82529		0,7791		0,81996

			-0,0093		-0,003		-0,0024		-0,012		-0,0458		-0,0101		-0,0095		-0,0783		-0,0804		-0,0515
Ap226	227-259	9	0,81818	7	0,92857	9	0,84211	10	1.000	9	1.000	10	0,86957	13	0,91176	8	0,66667	9	0,5	11	0,76471
			0,80746		0,83598		0,84637		0,88736		0,84067		0,85507		0,89113		0,74713		0,76299*		0,90553
			-0,0142		-0,0706		-0,0108		-0,0766		-0,0958		-0,0194		-0,0188		0,04		0,1996#		0,0695
Ap256	150-190	12	0,71429	11	0,85714	12	0,68182	13	0,8	12	0,59259	15	0,625	15	0,72222	10	0,93333	13	0,8	10	0,83333
			0,85921*		0,91005		0,88584*		0,91494		0,89797*		0,91312*		0,89163*		0,88506		0,80565		0,87143
			0,085#		0,0118		0,1188#		0,0501		0,1959#		0,1771#		0,098#		-0,0435		-0,0049		0,0083
Ag005a	81-108	9	0,76471	7	0,57143	10	0,72727	9	0,86667	8	0,76923	8	0,64	11	0,72222	5	0,8	9	0,66667	11	0,76471
			0,85075		0,80688		0,80021		0,87356		0,76923		0,80163		0,88537*		0,73103		0,6791		0,8984
			0,0459		0,1531		0,0363		-0,013		-0,0097		0,1021		0,0946#		-0,0619		0,0008		0,0655
Ac011	83-145	13	0,68571	9	0,85714	12	0,68182	10	0,73333	10	0,92857	12	0,875	12	0,8	8	0,9	8	0,68966	9	0,77778
			0,8617*		0,84921		0,82875		0,86897		0,85844		0,9078		0,84969		0,84211		0,71385		0,87778
			0,1066#		-0,0228		0,0859		0,0678		-0,0482		0,0079		0,0229		-0,0588		0,0085		0,0464
A113	200-238	11	0,68571	8	0,75	8	0,5	9	0,93333	10	0,55556	11	0,91667	12	0,86111	8	0,6	11	0,82143	10	0,55556
			0,81035		0,8587		0,79704*		0,85057		0,73445*		0,87234		0,87402		0,8023		0,75779		0,88095*
			0,0762		0,0464		0,2181#		-0,0633		0,1295#		-0,0353		0,0004		0,1276		-0,0493		0,2131#

Tabla 7: Resultados del Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de ocho microsatélites analizados en las poblaciones de *A. mellifera* estudiadas. Se incluyen los porcentajes de variación observados entre las poblaciones, entre grupos de poblaciones y el correspondiente a los individuos dentro de las poblaciones.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación
Entre Grupos	3	42,088	0,05327 Va*	1,60
Entre poblaciones dentro de grupos	6	44,097	0,09195 Vb*	2,76
Dentro de poblaciones	466	1482,614	3,18157 Vc*	95,63
Total	475	1568,798	3,32680	

*p<0,05

El valor más alto de los estadísticos F de Wright fue encontrado entre Buenos Aires y Formosa ($F_{ST} = 0,1296$) y el menor entre Chaco y Santiago del Estero ($F_{ST} = 0,0112$) (Tabla 8).

Tabla 8: Valores F_{ST} estimados entre cada par de poblaciones de *A. mellifera* utilizando información de ocho loci microsatélites.

	ER	TU	FS	SE	CB	CO	CH	SF	BA
TU	0.0302*								
FS	0.0369*	0.0372*							
SE	0.0223*	0.0331*	0.0333*						
CB	0.0048	0.0396*	0.0456*	0.0329*					
CO	0.0161*	0.0215*	0.0162*	0.0109	0.0226*				
CH	0.0231*	0.0251*	0.0358*	0.0112*	0.0194*	0.0057			
SF	0.0218*	0.0453*	0.0640*	0.0002	0.0253*	0.0311*	0.0264*		
BA	0.0469*	0.1111*	0.1296*	0.0666*	0.0493*	0.0847*	0.0704*	0.0354*	
LP	0.0174*	0.0467*	0.0505*	0.0200*	0.0167*	0.0277*	0.0144*	0.0160	0.0512*

El número de migrantes entre las poblaciones más cercanas entre sí fue relativamente alto, sobre todo entre Chaco y Santiago del Estero ($Nm = 36,00543$) y el menor se dio entre Buenos Aires y Formosa ($Nm = 1,58114$). En la tabla 9 se detalla la matriz entre pares de poblaciones el valor M ($M = 2Nm$).

Tabla 9: Matriz del número estimado de migrantes Nm

	ER	TU	FS	SE	CB	CO	CH	SF	BA
TU	10.0418								
FS	11.3535	13.14353							
SG	25.0051	12.08605	16.3912						
CD	21.1763	8.26833	9.5267	13.1030					
CO	17.0987	18.35241	31.1136	41.1833	15.1506				
CH	22.0228	13.68016	13.9631	72.0108	18.8448	43.7077			
SF	14.9639	8.13414	7.2512	28.0055	19.5860	11.7583	14.9272		
BA	9.2861	3.46102	3.1622	6.6517	7.2404	4.7628	6.6220	7.2549	
LP	26.8989	9.59164	11.2157	42.0395	22.9633	18.7961	47.7095	17.8743	8.6401

Este valor de F_{IS} fue positivo en todas las poblaciones, indicando que no existe exceso de heterocigotas. Las poblaciones de Entre Ríos, Formosa y La Pampa mostraron los valores más elevados (0,1110; 0,1554 y 0,1227 respectivamente), indicando que en ellas hay un déficit significativo de heterocigotas. En el resto de las poblaciones el valor se aproximó a 0 indicando que las mismas se encuentran en equilibrio de H-W (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de F_{IS} obtenidos promediando todos los loci de los individuos analizados por muestra.

Muestra	1-Qintra	1-Qinter	F_{IS}
Entre Ríos	0.7572	0.8518	0.1110*
Tucumán	0.8440	0.8682	0.0278
Formosa	0.7110	0.8408	0.1544*
Santiago del Estero	0.8448	0.8631	0.0211
Córdoba	0.8241	0.8445	0.0242
Corrientes	0.7927	0.8688	0.0876
Chaco	0.8007	0.8800	0.0901
Santa Fe	0.7719	0.8229	0.0620
Buenos Aires	0.7293	0.7447	0.0207
La Pampa	0.7714	0.8793	0.1227*

* $p < 0,05$

Las relaciones filogenéticas entre las poblaciones estudiadas, calculadas mediante las medidas de distancia genéticas D_S y D_M (Nei, 1987) y DAS (Chakraborty y Jin., 1993) resultaron idénticas. Los agrupamientos poblacionales (Figura 18) tuvieron un soporte relativamente bajo (bootstrap resultante no mayor a 60), pero ello puede deberse a que la mayor variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones. El árbol tipo UPGMA muestra agrupamiento entre las poblaciones de las provincias de Buenos Aires y La Pampa, en las que no se detectó africanización, y las poblaciones con menor grado de africanización (Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos), y, por otro lado, las poblaciones de las provincias con mayor grado de africanización (Formosa, Chaco y Corrientes), excepto Santiago del Estero (Figura 18 A). El árbol obtenido con el método "Neighbour-Joining" (Figura 18 B) también muestra mayor distancia genética entre las poblaciones de Buenos Aires y Tucumán. Estos resultados coinciden con los del método UPGMA y con los resultados de AMOVA

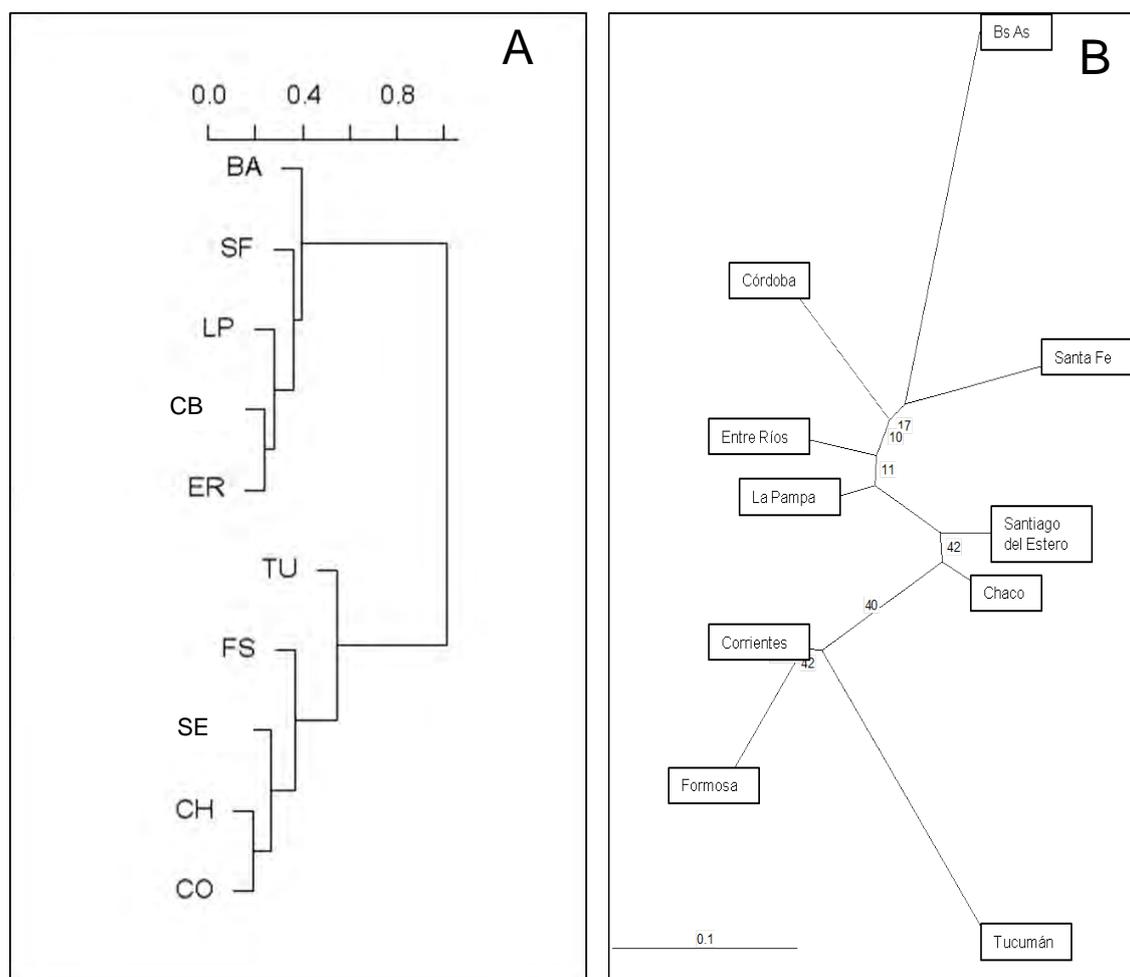


Figura 18. Árboles de agrupamiento en función de distancias genéticas: A. método UPGMA. B. método "Neighbour-Joining".

4.5.3 Estructura poblacional

Utilizando la totalidad de los genotipos obtenidos en las 10 poblaciones (N=238) se encontró que el número de *clusters* (K) que explicaría la totalidad de la variación encontrada en *A. mellifera* de Argentina sería $K = 2$, lo que sugiere dos orígenes genéticos diferentes (Figura 19).

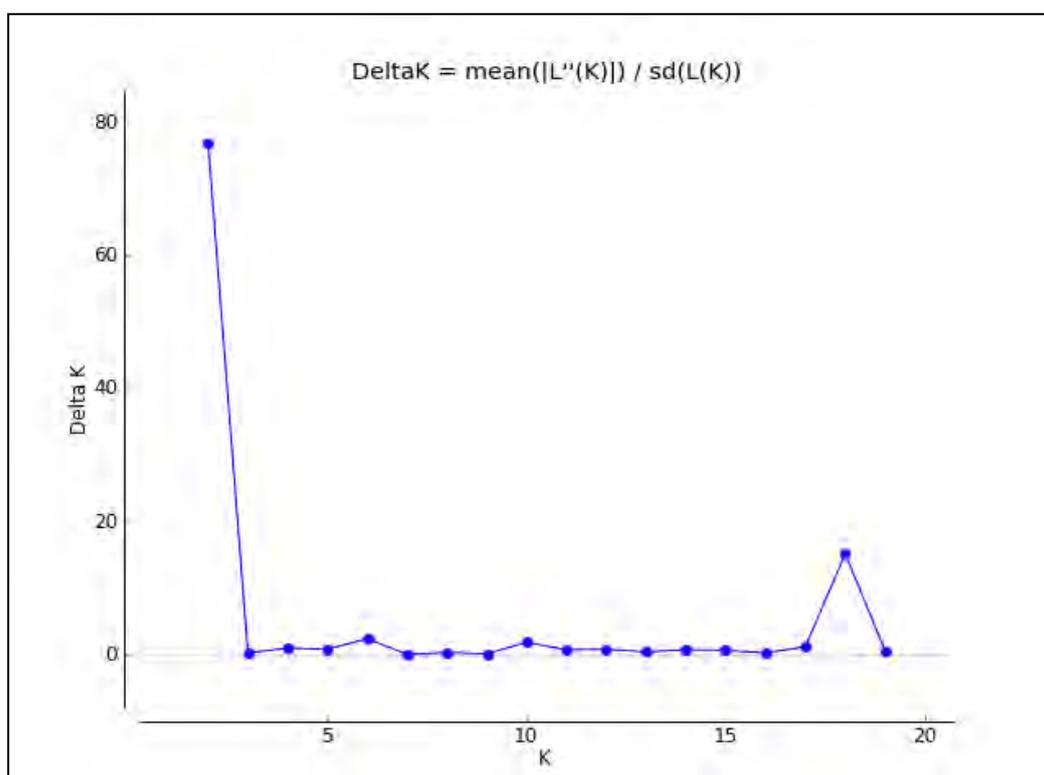


Figura 19. Determinación del número más probable de *clusters* o grupos genéticos ($K = 2$) que explicarían la variación encontrada en ocho microsatélites en *A. mellifera* en Argentina

Sin embargo, cuando se observaron las asignaciones poblacionales correspondientes a $K = 3$ y 4 , se vio que existiría una subestructura en la población (Figura 20). Estos análisis mostraron que, todas las muestras de Buenos Aires se agrupan en un mismo grupo genético. Con $K = 3$ se obtuvo un grupo con una contribución proporcionalmente mayor en las colonias silvestres. En el análisis con $K = 4$ se observó que las abejas de la provincia de La Pampa tienen una composición genética diferente de las otras.

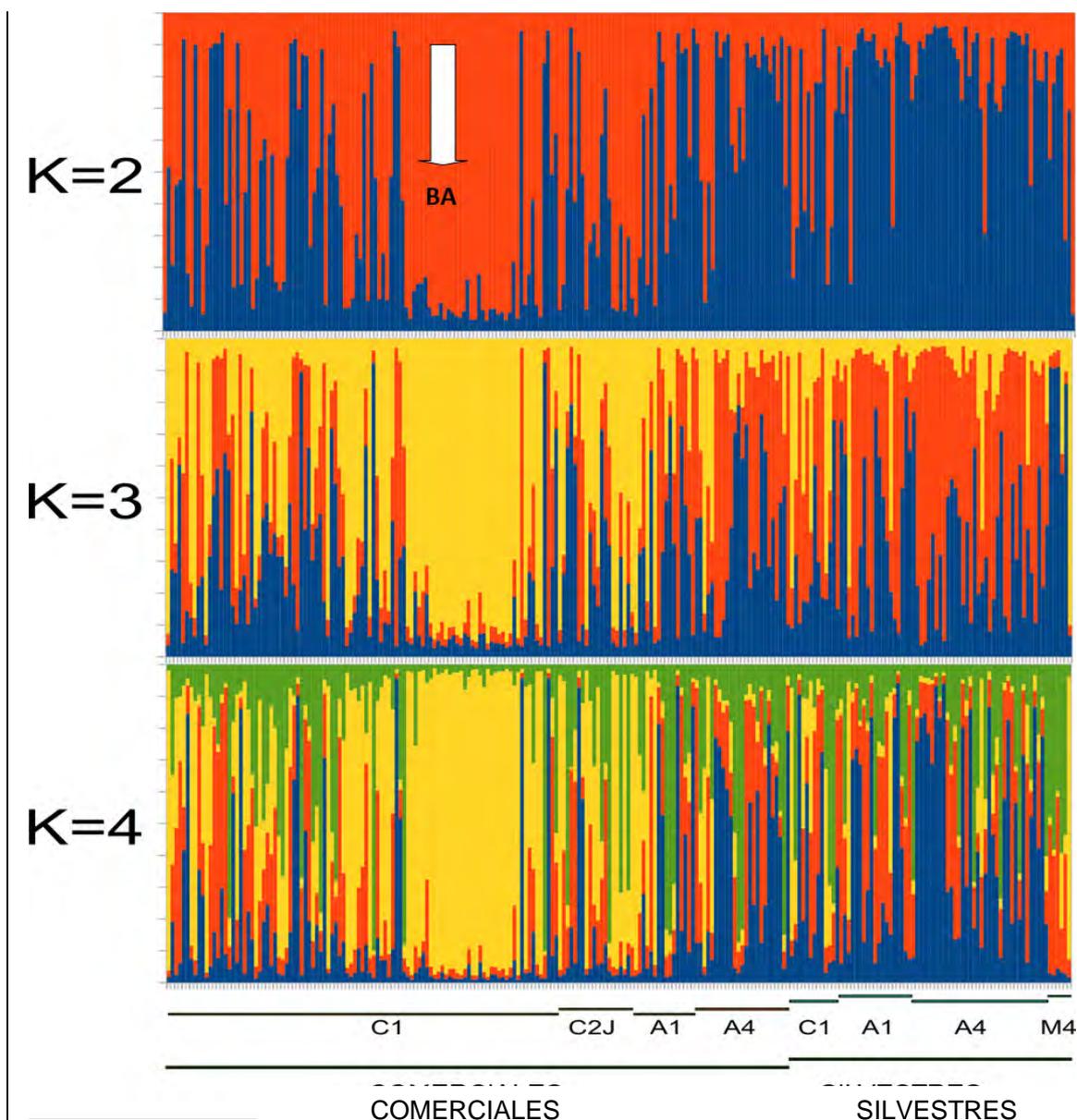


Figura 20: Gráfico que muestra la composición genética de *A. mellifera*, analizadas en el presente trabajo. Cada individuo está representado por una barra vertical dividida en segmentos de colores con la longitud de cada segmento que representa la proporción del genoma del individuo de $K = 2$ a $K = 4$. Los individuos se agruparon por origen (colonias comerciales y silvestres) y su correspondiente haplotipo mitocondrial. La flecha blanca indica un grupo de muestras de BA (Buenos Aires) que permanecieron altamente homogéneas a través de los análisis con diferentes valores de K .

El análisis de DAPC (Análisis Discriminante de Componentes Principales), confirmó una estructura compleja de la población. El valor más bajo de BIC correspondió a $K = 4$ (Figura 21), el que se utilizó para completar los análisis discriminantes (Figura 22), y hubo poca variación entre los resultados del Criterio de Información Bayesiano (BIC) del DAPC para $K = 3$ y $K = 4$.

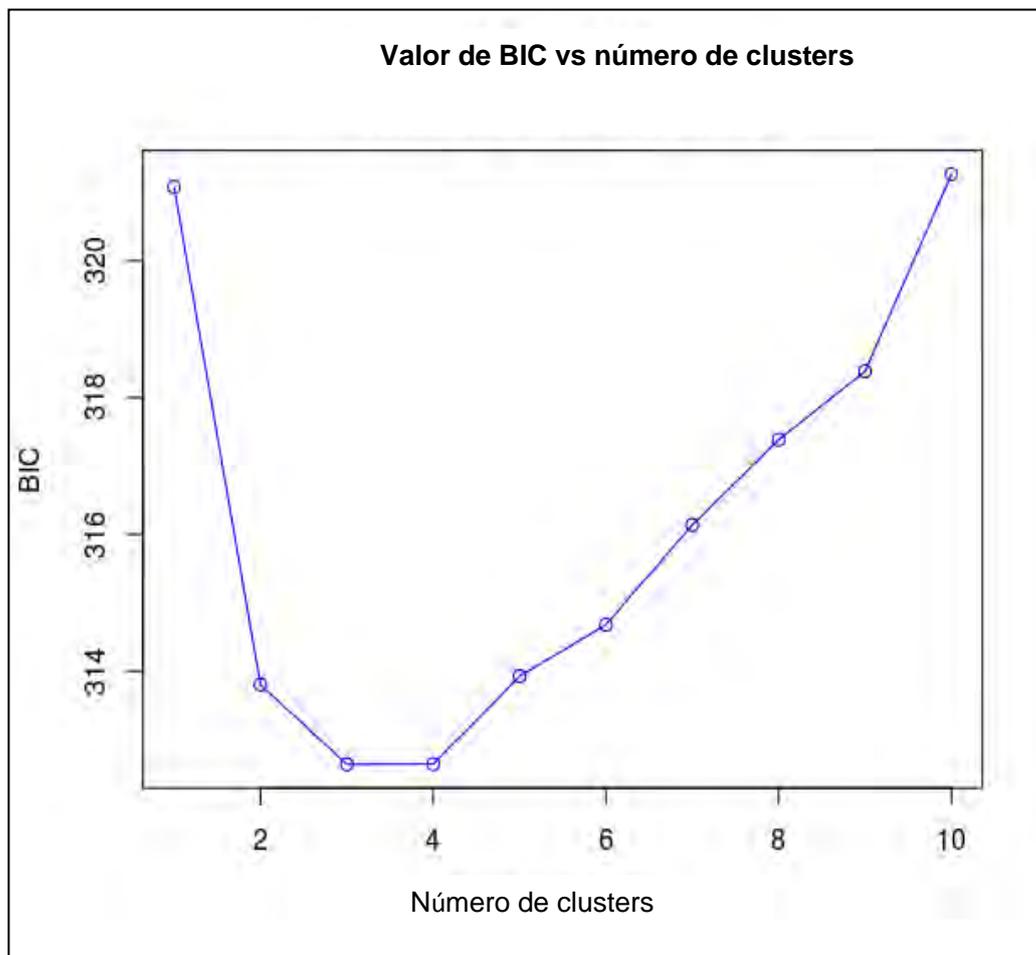


Figura 21. Numero de BIC (Bayesian Inferred Criterion, *Criterio de Inferencia Bayesiana*) versus número de *clusters* existentes en *A. mellifera*.

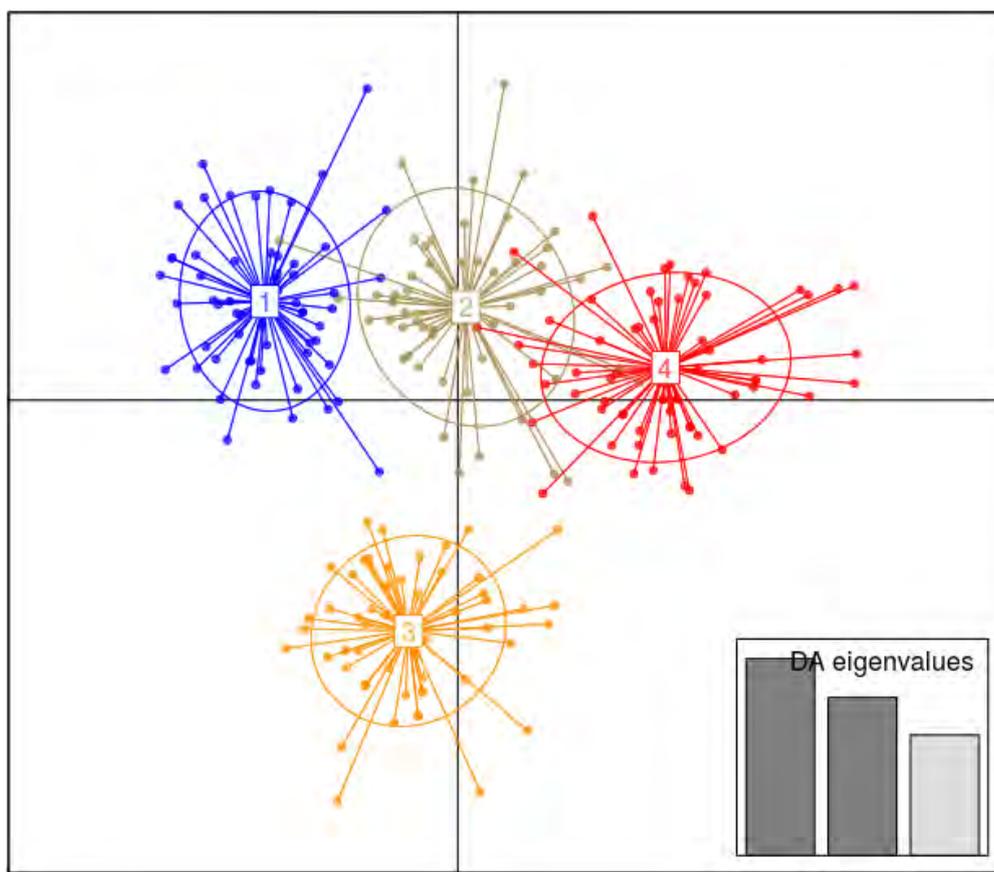


Figura 22. Diagrama de dispersión de individuos sobre los dos componentes principales del Análisis de DAPC basado en el BIC. Los individuos se representan como puntos y el *cluster* como elipses. Los valores propios del análisis se muestran en el recuadro.

La primera función discriminante explicó la mayor parte de la variabilidad genética (39,2%) y se asoció con el grado de africanización. El análisis DAPC identificó 4 grupos, conformados por 60, 54, 57 y 67 muestras (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de colonias silvestres (CS%), haplotipos africanos y porcentaje de abejas africanizadas (% AA) en los grupos definidos en el DAPC.

Cluster ¹	N	CS %	Haplotipos Africanos		AA %	
			A1 %	A4 %	Comercial	CS
3	57	52.6	12.3	28.0	19.3	40.3
1	60	40.0	15.0	21.7	23.3	35.0
2	54	27.7	5.5	9.2	20.4	14.8
4	67	4.5	0.0	1.5	4.5	1.5

¹Los *clusters* están ordenados de acuerdo con el porcentaje de colonias silvestres incluidas en cada uno de ellos.

Todos los *clusters* estuvieron compuestos por muestras de orígenes distintos: por ejemplo, en los grupos 2 y 3 hubo muestras de las 10 provincias: el grupo 1 incluyó muestras de todas las provincias, con excepción de Buenos Aires, mientras que el grupo 4 no incluyó ninguna muestra de Formosa o Tucumán y la mayoría de los individuos correspondieron a colonias de Buenos Aires. La mayoría de las muestras correspondientes a colonias silvestres de Formosa se incluyeron en los grupos 1 o 3, pero ninguno de ellos se asignó al grupo 4. De cinco muestras de colonias silvestres de La Pampa, cuatro se ubicaron en el grupo 2 y una en el grupo 3. Además los valores de variabilidad genética de cada grupo fueron altos y similares (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros de diversidad genética para los cuatro *clusters* obtenidos mediante análisis de DAPC. Se muestra el número de alelos (Na), número de alelos

privados exclusivos (pNa), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y heterocigosidad esperada no sesgada (uHe), promedio y error estándar.

<i>Cluster</i>	<i>N</i>	Na	pNa	Ho	He	uHe
1	60	15,12	1,00	0,70	0,86	0,86
		1,43	0,42	0,10	0,02	0,02
2	54	14,87	1,37	0,71	0,81	0,82
		1,66	0,46	0,10	0,06	0,06
3	57	15,50	2,00	0,71	0,85	0,86
		1,28	0,60	0,10	0,01	0,01
4	67	13,87	1,12	0,65	0,80	0,79
		1,42	0,23	0,10	0,03	0,03

La distribución de los *clusters* con respecto a la primera función discriminante coincidió con el porcentaje de colonias silvestres en cada uno de ellos y también con el porcentaje de haplotipos africanos, particularmente el haplotipo A4. Sólo el 6% de los haplotipos entre las muestras del grupo 4 fueron africanos (colonias silvestres y comerciales), mientras que el 40% de las muestras en el grupo 1 eran de colonias salvajes, con un 36,7% de haplotipos africanos, con mayor porcentaje de A4 (59,1%) (Tabla 11).

La contribución de las diferentes provincias en los cuatro *clusters* inferidos se presenta en la Figura 23

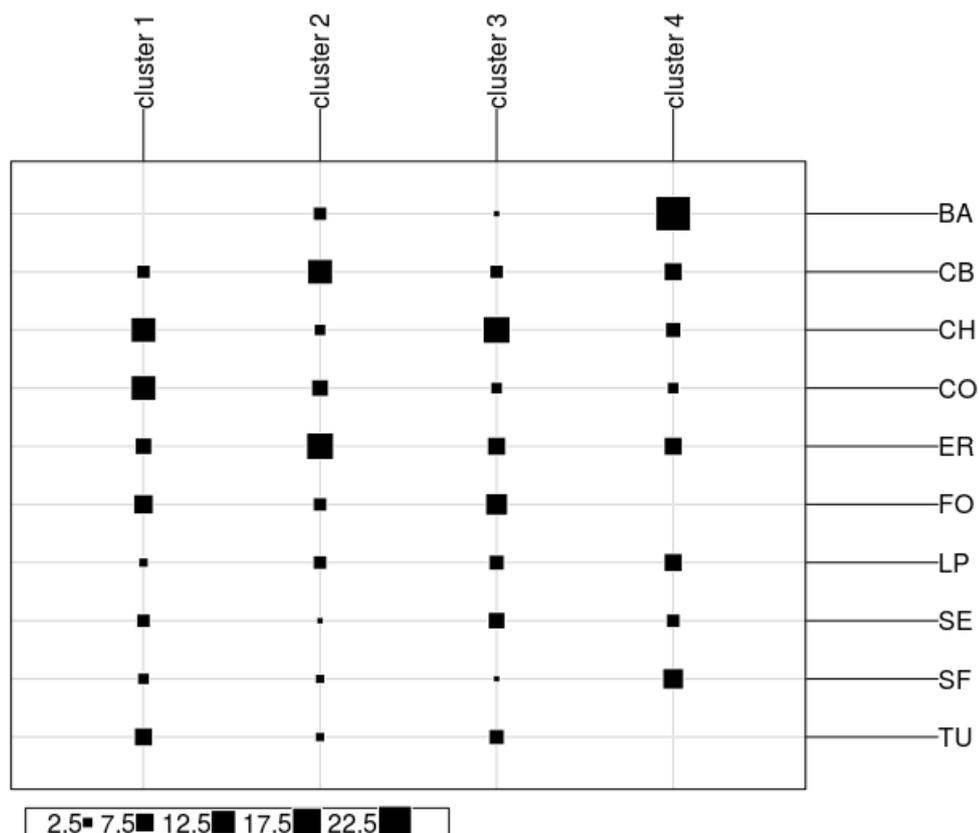


Figura 23. Número de muestras por provincia incluidas en cada *cluster* después de aplicar el criterio BIC para el análisis de componentes principales (DAPC).

4.5.4 Distribución de *A. mellifera* asociada a variables bioclimáticas

Los resultados de los análisis de regresión logística, que vincularon las probabilidades de mitotipo (africano o europeo) con varias variables bioclimáticas, mostraron que el origen de la muestra (colonias comerciales y silvestres) tuvo un efecto significativo ($p < 0.01$; Figuras 24 A y 25). El análisis que incluyó la latitud tuvo la mayor bondad de ajuste (Figura 24 A). Se detectó una clina latitudinal significativa y la probabilidad de encontrar un haplotipo africano en una muestra disminuyó de Norte a Sur. Entre las diferentes variables climáticas, el modelo que incluyó la temperatura máxima diaria de enero tuvo la menor bondad de ajuste.

Los resultados de los análisis de regresión lineal fueron consistentes con los basados en la información de los haplotipos (Figuras 24 B y 25). Todas las variables tuvieron efectos significativos ($p < 0.01$) sobre el grado putativo de africanización (estimado mediante el análisis Bayesiano del programa Structure), excepto la

temperatura máxima diaria de enero ($p > 0.09$). El modelo que incluyó a la latitud proporcionó la mejor bondad de ajuste (Figura 24 B). La prueba de coincidencia fue significativa para todas las variables ($p < 0.05$ o inferior), mientras que la prueba de paralelismo no fue significativa en ningún caso.

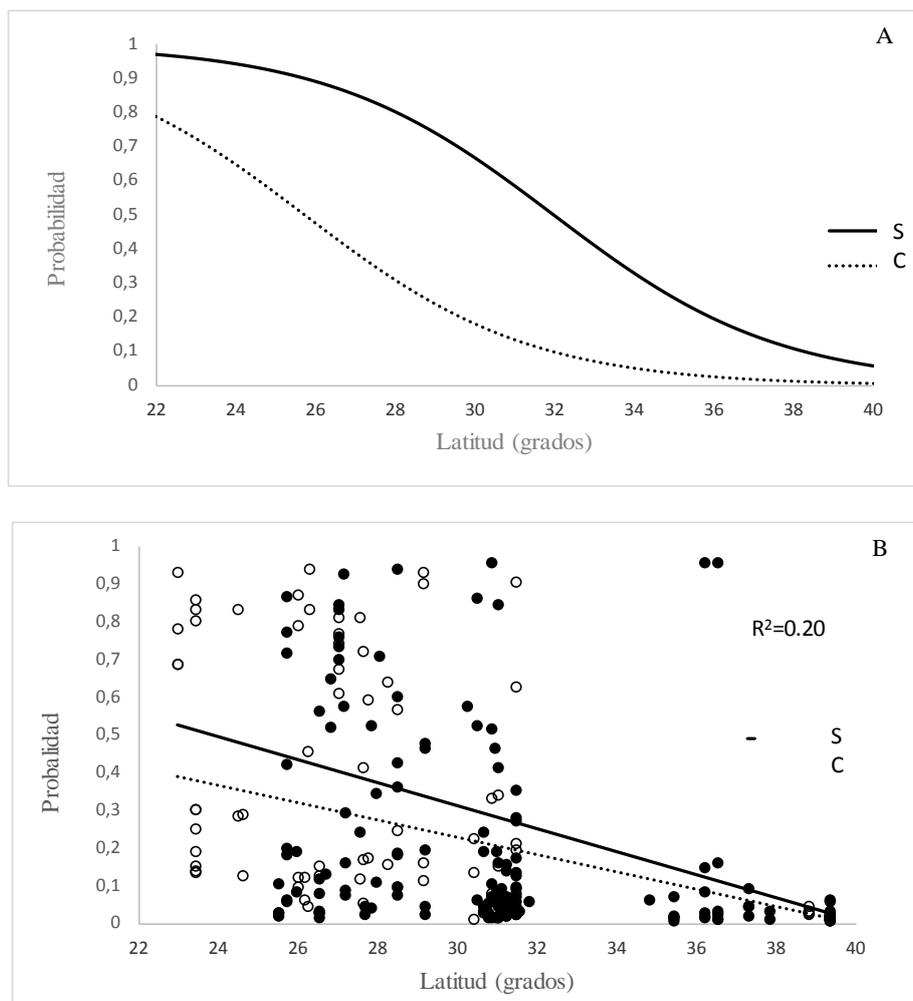


Figura 24: A) Probabilidad de ocurrencia de haplotipos africanos en función de la latitud, estimada mediante regresión logística. S: Colonias silvestres. C: colonias comerciales. B) Regresión lineal del grado de africanización vs latitud, basado en el análisis de marcadores nucleares. Las probabilidades de asignación corresponden a la población que realizó la mayor contribución genética a las colonias salvajes de la provincia de Formosa y se asumió que era de origen africano (ver Figura 18 y Tabla 4). Las probabilidades de asignación correspondientes a las colonias silvestres y comerciales se representan con círculos blancos y negros, respectivamente.

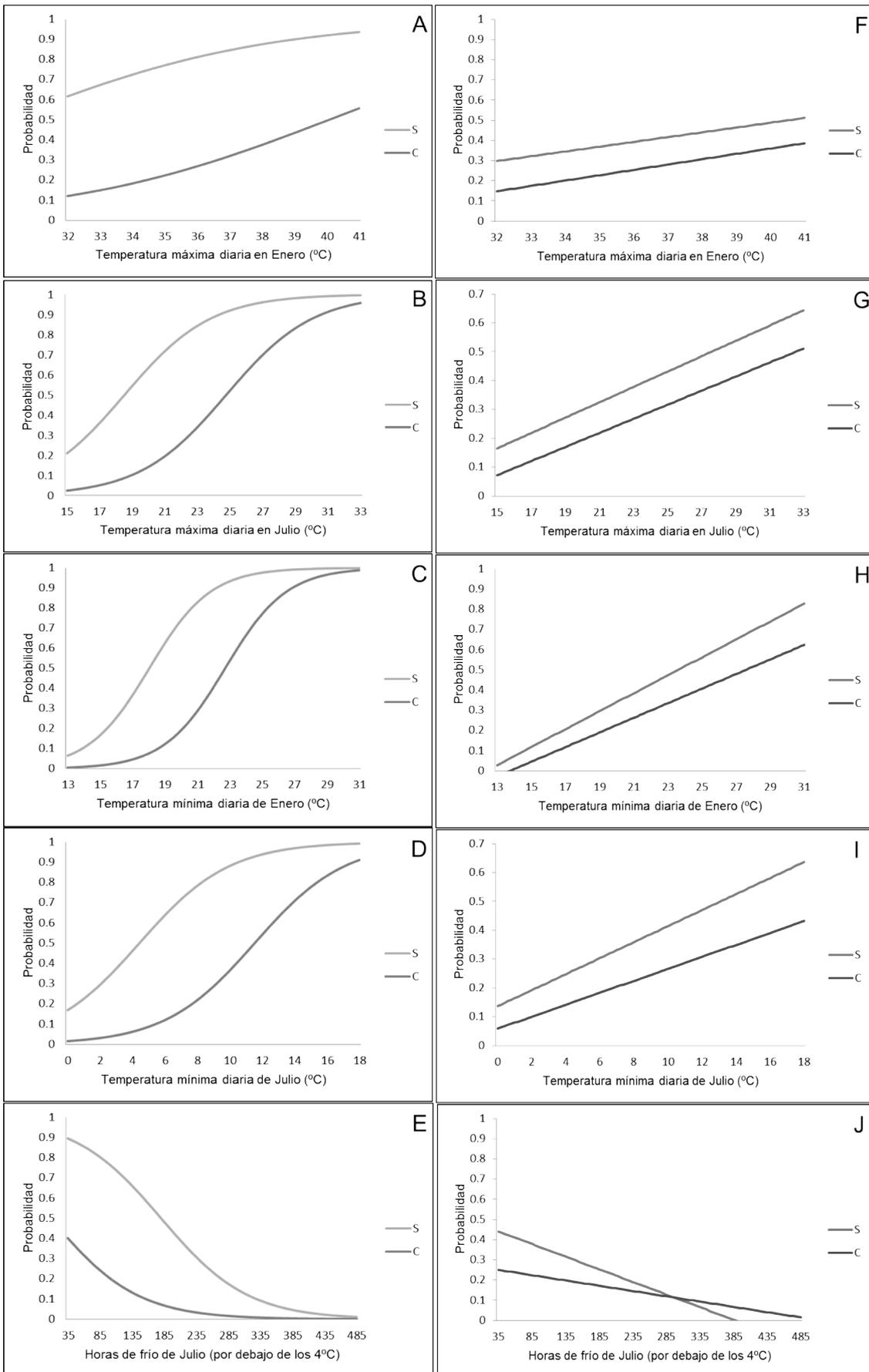


Figura 25: A a E: Probabilidad de ocurrencia de haplotipos africanos estimados por regresión logística. Gráficos F a J: Regresión lineal del grado de africanización en diferentes variables relacionadas con el clima. Las probabilidades de asignación se basan en el análisis de los marcadores nucleares y corresponden a la población que realizó la mayor contribución genética a las colonias silvestres de la provincia de Formosa (ver Figura 17 y Tabla 4). S: colonias silvestres. C: colonias comerciales.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis representa una de las evaluaciones más completas de la variabilidad genética y en particular de la situación de la africanización de *A. mellifera* realizado en el área norte y centro de Argentina, teniendo en cuenta el área geográfica abarcada y el número de muestras analizadas de colonias silvestres y comerciales. Estos resultados, que han sido publicados, constituyen la información más actualizada sobre la caracterización de la variabilidad genética en Argentina (Agra et al., 2018).

La mayoría de estas muestras fueron remitidas por apicultores comerciales de las distintas provincias involucradas, muchos de ellos integrantes de grupos técnicos bajo la asesoría de profesionales del INTA y de otras instituciones gubernamentales provinciales. Este proceso generó un estrecho vínculo con los apicultores y técnicos, quienes recibieron informes conteniendo los resultados de los análisis moleculares. Una de las dificultades en esta forma de trabajo estuvo relacionada con el transporte de las muestras, que en algunos casos se abrieron accidentalmente con el consecuente deterioro del ADN.

Al analizar el ADNmt, se detectaron un total de 6 haplotipos, dos pertenecientes al brazo evolutivo C (haplotipos C1 y C2J), uno perteneciente al brazo evolutivo M (haplotipo M4) y tres pertenecientes al brazo evolutivo A (A1, A4 y A30). Trabajos realizados con anterioridad en el país con marcadores moleculares para analizar la distribución de *A. mellifera* en zonas específicas, como Sheppard et al. (1991) en el norte del país y Abrahamovich et al. (2007) en la provincia de Buenos Aires, encontraron una distribución similar de los haplotipos que se determinaron en este trabajo, demostrando que los recursos genéticos de origen europeo se establecieron ampliamente en las regiones templadas del país y los haplotipos de origen africano se detectaron en áreas subtropicales. Abrahamovich et al. (2007) informaron la existencia del haplotipo C1 en más del 92% de las colonias muestreadas en la provincia de Buenos Aires, el cual es característico de la subespecie *A. m. ligustica*. En el presente trabajo el haplotipo C1 se detectó en 55% de las muestras analizadas y estuvo presente en las 10 provincias muestreadas, con una alta frecuencia en colonias comerciales de las regiones templadas. Esta amplia

distribución se justifica por la reconocida docilidad, productividad y prolificidad de esta subespecie que motivó sucesivas introducciones desde Italia en una primera etapa y desde los Estados Unidos posteriormente, sobre todo en la última década del siglo XX. Por la misma razón, *A. m. ligustica* también está reemplazando a otras subespecies locales en Francia y los países escandinavos (Jensen et al, 2005; Bouga et al., 2011).

En la provincia de Buenos Aires la totalidad de las muestras analizadas fueron haplotipos del brazo evolutivo C (C1 y C2J); más del 80% de las muestras pertenecieron al haplotipo C1. Esta provincia representa en volumen casi el 40% de la producción de miel del país y concentra la mayor cantidad de apicultores, muchos de los cuales realizan trashumancia desplazando sus colmenas a otras regiones primicia o para polinización de cultivos (principalmente hacia el valle de Río Negro y hacia el norte del país).

Las provincias con mayor proporción de colonias comerciales con haplotipo C1, luego de Buenos Aires, son La Pampa, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. Estas cuatro provincias en conjunto representan el 40% de la producción apícola del país, confirmando que los apicultores comerciales escogen abejas de la subespecie *A. m. ligustica* por sus características deseables para la apicultura comercial (RENAPA, 2018). Las provincias de Chaco y Corrientes tienen un menor porcentaje de colonias con haplotipo C1 (38 y 43% respectivamente), aunque en ambas se detectó un elevado porcentaje de colonias silvestres con este haplotipo (junto con la provincia de Entre Ríos). La enjambrazón de colmenas comerciales de apicultores de la región y trashumantes, que trasladan sus colmenas para multiplicar en forma temprana, podría explicar la alta prevalencia de haplotipo C1 en colonias silvestres. El análisis de microsatélites mostró una alta introgresión de genes africanos en las colonias silvestres, justificado por la mayor aptitud reproductiva de los zánganos de este origen respecto a los europeos (Schneider et al, 2004).

En nuestro estudio hemos detectado el haplotipo C2J, también perteneciente al brazo evolutivo C, en un porcentaje total de 12,12% (48 muestras en total), registrándose en todas las provincias salvo en Formosa y La Pampa. Este haplotipo fue reportado en Europa (Nedić *et al*, 2009) y es una variante del haplotipo C2 que caracteriza a *A. m. carnica*. Esta subespecie tiene su distribución natural desde los Alpes suizos hacia el este incluyendo Hungría, Eslovenia, Croacia, Serbia, Montenegro y otros países que formaron parte de la ex-Yugoslavia. No es posible determinar a

ciencia cierta cómo es que este haplotipo llegó a Argentina (no existen datos bibliográficos que determinen su existencia en otros países de América), pero se registró una amplia distribución. Solo se detectó una colonia silvestre con este haplotipo en la provincia de Santiago del Estero.

Magnus et al. (2011; 2014), mediante secuenciación de la región intergénica COI-COII, detectó una alta frecuencia de haplotipos del brazo evolutivo C en apiarios comerciales y en colonias silvestres en EE.UU. El haplotipo C1 en particular fue muy frecuente solo en colonias comerciales, ya que en colonias silvestres se detectaron otros haplotipos de este brazo evolutivo (C2, C11, C12, C27 y C31).

Otros autores determinaron los haplotipos en abejas africanizadas de colonias comerciales y silvestres en México (Clarke et al., 2001; Kraus et al., 2007), Puerto Rico (Rivera-Marchand et al., 2012; Galindo-Cardona et al., 2013), Brasil (Collet et al., 2006), Perú (Quezada-Euan et al., 2003) y Uruguay (Branchiccela et al., 2014). En el caso de este trabajo, se describió la presencia de tres haplotipos mitocondriales del brazo evolutivo A. Dentro de este grupo, los haplotipos más frecuentes fueron A4 y A1. El haplotipo A4 es característico de las abejas de Sudáfrica que pertenecen a la subespecie *A. m. scutellata* (Schneider et al., 2004; Collet et al., 2006) y como tal, está típicamente asociado con el proceso de africanización que comenzó en Brasil en el año 1957. No existe documentación de otras introducciones de abejas africanas en el país desde ese evento y por lo tanto, es la fuente más probable de introducción de este haplotipo en Argentina.

Si bien el haplotipo A4 es el que caracteriza a la subespecie *A. m. scutellata*, en el proceso de africanización en América el haplotipo A1 se considera también "africanizado", pudiéndose deber a un "efecto fundador" donde algunos de los enjambres que se escaparon en 1957 portaran este haplotipo (Collet et al., 2006). No es concluyente la explicación de las posibles rutas de introducción del haplotipo A1. Podría corresponder a la subespecie *A. m. intermissa* desde el norte de África a través de España (Canovas et al., 2007) o a la subespecie *A. m. iberiensis* desde el sur de la Península Ibérica (De la Rúa et al., 2004; Whitfield et al., 2006). De hecho, Sheppard et al. (1999) afirmaron que el grado de africanización en las colonias de abejas argentinas estaba sobreestimado, ya que un 25% de los haplotipos de origen africano detectados no tienen su origen en *A. m. scutellata*.

En México y el sur de los Estados Unidos, se notificó A1 con mayor frecuencia que el haplotipo A4 (Kraus et al., 2007). A su vez, en Uruguay y Brasil se detectaron haplotipos A4 y A1 con una abundancia relativa de 34% y 26% respectivamente, pero el haplotipo A1 mostró una clina de Norte a Sur, similar al patrón de distribución descrito en África (Collet et al., 2006).

La mayor frecuencia de haplotipo A1 en Argentina en relación a Uruguay y Brasil a la misma latitud respalda la hipótesis propuesta por Sheppard et al. (1999) sobre otras posibles fuentes de abejas de origen africano en Argentina, como por ejemplo a través de inmigrantes españoles. También su hipótesis es respaldada por la presencia de haplotipo A30 únicamente en colonias comerciales en las provincias de Corrientes y Entre Ríos (una sola colonia por provincia) que podría estar asociada con la introducción de abejas desde la Península Ibérica, donde este haplotipo ha sido detectado previamente (Garnery et al., 1995; Franck et al., 2001; Collet et al., 2006).

En relación al brazo evolutivo M, Abrahamovich et al. (2007) informaron una frecuencia de 2,68 % de haplotipos M2, M3 y M6 en la provincia de Buenos Aires. En este trabajo fue detectado solo el haplotipo M4 en colonias silvestres en la provincia de La Pampa. La presencia de este haplotipo podría estar justificada por la introducción documentada de colonias de la subespecie *A. m. mellifera* provenientes de Alemania entre finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Bierzzychudek, 1979); su baja frecuencia y distribución en el país estaría relacionada a la superioridad de la abeja italiana como productora de miel (Jensen et al, 2005).

La distribución de los haplotipos de ADN mitocondrial en Argentina obtenida en el presente trabajo permite la evaluación del estado actual de "Africanización". Este proceso en América ha sido descrito como "una de las invasiones biológicas más espectaculares hasta ahora documentado" (Schneider et al., 2004; Pinto et al., 2005). De acuerdo con esa afirmación, las primeras evaluaciones locales de africanización utilizando herramientas moleculares informaron la presencia de un área saturada con AA por arriba de los 28° de latitud Sur (Sheppard et al., 1991). Por el contrario, en este trabajo se evidencia la presencia de colonias (tanto comerciales como silvestres) con haplotipos europeos en las provincias del norte (por encima de esta latitud). Aunque se demostró que no hay áreas saturadas, como fue propuesto originalmente por

Sheppard et al. (1991), hay una fuerte presencia de AA en el norte del país, particularmente en colonias silvestres. Por otro lado, se confirma que la región que se encuentra por debajo de los 35° de latitud Sur está libre de AA, de acuerdo con los resultados previos de Abrahamovich et al. (2007).

El proceso de Africanización ha sido bien estudiado desde el punto de vista genético y comportamental. En lo que respecta a este último tema, Scheneider et al. (2004) describen cuatro características básicas que determinarían las ventajas de las colonias africanizadas sobre las colonias de origen europeo:

- (i) la tasa de crecimiento más rápido de las colonias africanas,
- (ii) la usurpación de jerarquía, en la que los enjambres africanos invaden las colonias de origen europeo y reemplazan a las reinas y las obreras,
- (iii) los zánganos africanos que tienen una mayor libido,
- (iv) la ventaja selectiva de las abejas africanizadas sobre las abejas europeas tanto por su mayor capacidad de colonizar y por su capacidad superior para sobrevivir en ambientes tropicales y subtropicales,

Estas ventajas de la genética africana realizan una contribución significativa a la mezcla poblacional (*admixture*) en colonias comerciales. A pesar del desplazamiento de las colonias de origen europeo por parte de colonias africanizadas descrito en América en regiones tropicales y subtropicales, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con la idea de que la apicultura en Argentina se realiza principalmente con AE.

Con el apoyo de instituciones oficiales como el INTA ("Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria") y otras entidades gubernamentales y privadas, la apicultura se ha convertido en una actividad profesionalizada en Argentina. Las buenas prácticas apícolas incluyen el reemplazo de la reina cada dos años enfatizando la importancia de contar con genética seleccionada adaptada a ambientes específicos. El Programa de Mejoramiento Genético (MeGA) del PROAPI se centra principalmente en la selección por tolerancia a enfermedades, producción y mansedumbre (Palacio et al., 2000; Palacio et al., 2010); esta última es una característica también seleccionada por la mayoría de los criadores de abejas reinas. La incorporación del bajo comportamiento defensivo o mansedumbre en los criterios de selección favorece las

líneas europeas y en especial a la subespecie *A. m. ligustica* (Jensen et al, 2005) por lo que en parte podría explicar la alta frecuencia de colonias detectadas con el haplotipo C1.

Los marcadores moleculares aplicados han evidenciado información valiosa para comprender la compleja estructura genética presente en las colonias de abejas melíferas comerciales y silvestres. Los resultados obtenidos resaltan la importancia de las estrategias de manejo implementadas por los apicultores en Argentina, consistentes con el uso de reservas de abejas seleccionadas para la producción de miel y la existencia de recursos genéticos silvestres que deben ser tomados en cuenta por los programas de mejoramiento de abejas y por los criadores comerciales de abejas reinas que se hayan distribuidos por la zona núcleo apícola del país.

El desarrollo de marcadores nucleares ha simplificado significativamente el estudio de la complejidad genética encontrada en poblaciones híbridas de abejas melíferas, no solo por su alto grado de polimorfismo sino también por la posibilidad de controlar la contribución genética de ambos progenitores. Se han realizado amplios estudios aplicando este tipo de marcadores para analizar la estructura de poblaciones de abejas de su centro de origen e híbridos derivados (Garnery et al., 1998b, Franck et al., 2000, Franck et al., 2001; Clarke et al., 2002; Kraus et al., 2007).

En este trabajo, los marcadores de mtDNA permitieron mostrar la existencia de un importante reservorio de germoplasma africano en colonias silvestres. El análisis de los marcadores microsatélites permitió profundizar el análisis del proceso de hibridación que se produjo en Argentina. Los ocho loci estudiados han mostrado diferente nivel de polimorfismo en cuanto al número de alelos presentes en estas poblaciones.

En el análisis de AMOVA, al agrupar a las muestras por su lugar de origen geográfico (provincias), la mayor proporción de la variabilidad se detectó dentro de las poblaciones (96%). Los resultados obtenidos mediante los análisis de distancia genéticas confirmó que el origen por provincias no permite discriminar la variabilidad en las poblaciones.

La introgresión de los genes africanos fue evidente en las poblaciones comerciales y en las colonias silvestres, que se presentaron como patrones mixtos en

el análisis del programa Structure, determinando que el número de K es igual a 2. Esto permitiría inferir que los dos componentes podrían coincidir con lo determinado por el análisis haplotípico, siendo los dos componentes origen africano y europeo, ambos presentes en la mayoría de las provincias, excepto Formosa y Buenos Aires. Las asignaciones poblacionales correspondientes a $K = 3$ y 4 permitieron distinguir subestructuras poblacionales, diferenciando por ejemplo a las colonias M4 identificadas en las muestras de La Pampa; las muestras provenientes de Buenos Aires se presentaron homogéneas con los diferentes valores de K, con menores niveles de introgresión.

Esta estructura de población compleja también fue evidente por medio del análisis de los componentes principales DAPC, donde una contribución mixta de individuos de diferentes poblaciones de abejas estuvo presente en los cuatro grupos que se identificaron. Se evidenció que los dos principales componentes para discriminar a los 4 *clusters* fueron el porcentaje de colonias silvestres y el porcentaje de africanización (detectado previamente con marcadores ADNmt) en cada uno de ellos.

Los 4 grupos mostraron alta heterogeneidad, con muestras de las 10 provincias en 2 de ellos, 9 provincias en el 3º y 8 provincias en el 4º, explicando parcialmente la existencia de un alto nivel de flujo génico. Por otra parte la menor cantidad de colonias africanizadas y silvestres en el grupo 4 y la mayor proporción de colmenas de Buenos Aires en este grupo indican que las colonias con mayor grado de africanización tienen una distribución más septentrional que las europeas.

Tomados en conjunto, los resultados de Structure y Adegnet indicarían una mezcla genética generalizada, con una contribución significativa del material genético africano a las abejas de todas las provincias excepto Buenos Aires y La Pampa, y especialmente a las de las colonias silvestres. A su vez, el germoplasma europeo aparecería de forma más heterogénea de lo que cabría esperar en base a la comparación de haplotipos mitocondriales solos, dada la prevalencia del haplotipo C1.

Las condiciones climáticas pueden afectar la distribución de las abejas melíferas. Carneiro Vital et al. (2012) modeló la distribución potencial de las abejas africanizadas en los Estados Unidos sobre la base de nueve variables ambientales

relacionadas con el clima, que definieron la distribución original de siete subespecies de *A. mellifera* en África. Concluyeron que la distribución actual de AA en América refleja las características específicas de nicho de la subespecie de la que se originaron, particularmente en el caso de *A. m. scutellata*. En concordancia con los resultados de esta Tesis sus modelos predicen que un área que incluye la mayor parte de la provincia de Buenos Aires no estaría actualmente ocupada por AA.

En base a los resultados de Kerr et al. (1982), Taylor y Spivak (1984) propusieron un límite para la colonización permanente de AA a 32° de latitud Sur. Un límite adicional de colonización temporal aproximadamente a 35° de latitud Sur fue definido por estos autores, considerando la capacidad de las AA para sobrevivir en la temporada de crecimiento pero no el invierno. Carneiro Vital et al. (2012) plantearon la hipótesis de que el área adecuada pero no desocupada definida por sus modelos podría solaparse con el área de colonización temporal de Taylor y Spivak (1984), pero no se puede descartar la existencia de factores limitantes para la colonización aparte del clima.

En el presente estudio, no se encontraron haplotipos africanos más allá de 32° de latitud Sur. Se debe tener en cuenta que cualquier límite ecológico de AA se verá confundido por el efecto de la selección contra este grupo genético en una región que concentra más del 50% de la apicultura en el país. Los efectos combinados de las condiciones climáticas desfavorables y las prácticas de apicultura cada vez más profesionalizadas han contribuido a la preponderancia actual de AE en esta zona templada.

Los resultados de los análisis de regresión (Figura 4) explican parcialmente la distribución actual de las abejas, ya que el grado de africanización y la variabilidad genética con marcadores nucleares se asocian a variables bioclimáticas, principalmente a clinas latitudinales, como se describió anteriormente por otros autores de esta especie (Taylor y Spivak, 1984; Sheppard et al., 1991; Whitfield et al., 2006).

Nuestros resultados son consistentes con los de Abrahamovich et al. (2007) quien analizaron los haplotipos de 300 colonias en la provincia de Buenos Aires y el 3.35% del total que presentó haplotipo A1 o A4 estuvieron restringidos al área por encima de 35° de latitud Sur. Southwick et al. (1990) predijeron que las AA estarían

limitadas por la isoclima de 120 días consecutivos que no excedan los 10°C en invierno. En la provincia de Buenos Aires, la latitud de 35° Sur aproximadamente concuerda con la isoterma media anual de 16 °C y la isoterma media de 9 °C durante el mes de julio (invierno en el hemisferio sur), que podría establecer un límite para la propagación de las AA. Curiosamente, Kono y & Kohn (2015) establecieron un límite putativo a 35,5° de latitud Norte para las AA en la costa oeste de EE.UU. (California) correspondiente a la isoterma media de 10 °C en invierno. Teniendo en cuenta los cambios climáticos actuales y el proceso de calentamiento global, se deberían realizar más estudios que incluyan un mayor número de apiarios y colonias silvestres establecidas en regiones templadas para monitorear la distribución de AA en Argentina y su posible influencia en la apicultura.

Diferentes factores además del proceso de africanización pueden justificar la compleja estructura genética actual de las abejas melíferas en Argentina. El flujo de genes entre las poblaciones de abejas se ve facilitado por la ausencia de barreras naturales significativas, no solo dentro del país sino también con los países limítrofes. Entre Ríos y Corrientes fueron las provincias con la mayor diversidad de haplotipos; si tenemos en cuenta que la provincia de Corrientes tiene fronteras comunes con Brasil y Paraguay, mientras que Entre Ríos comparte fronteras con Uruguay, donde los asentamientos urbanos cercanos y los apicultores rurales podrían intercambiar material genético, un proceso no registrado que potencialmente contribuye a la variabilidad detectada de las poblaciones de abejas en Argentina.

Otro factor importante que contribuye a la introducción de genes en las abejas de Argentina es la trashumancia. Cada año, los apicultores de regiones templadas (principalmente de la provincia de Buenos Aires) trasladan colonias desde el sur (clima templado) hacia el norte (clima subtropical) del territorio en busca de mejores condiciones para la multiplicación de colonias y para tener ventajas en las etapas iniciales de la temporada de producción de miel. Además, la trashumancia también es una actividad habitual relacionada con las necesidades de la polinización de cultivos.

En resumen, los resultados de este trabajo indican que a pesar de las sucesivas introducciones planificadas y no planificadas de los más variados materiales genéticos, actualmente las colonias comerciales presentan una alta frecuencia de abejas con el haplotipo C1, característico de *A. m. ligustica*, subespecie muy apreciada

por los apicultores y criadores de reina y ampliamente reconocida por su docilidad, productividad y prolificidad. Sin embargo, hay una fuerte presencia de AA en el norte del país, principalmente en colonias silvestres, siendo una fuente permanente de germoplasma africanizado. No se ha colectado suficiente evidencia contra la suposición de que el límite sur del área donde están presentes las AA no ha cambiado desde las primeras estimaciones realizadas hace aproximadamente 37 años.

En perspectiva y para poder seguir analizando el status de africanización en Argentina, se pueden contemplar a futuro el uso de nuevos marcadores, tanto de SNPs a nivel nuclear como también la secuenciación de la región intergénica COI-COII de las muestras. Esto último debido a que esta región tiene un alto nivel de mutaciones que genera nuevos haplotipos, los cuales no pueden detectarse mediante técnicas convencionales como la PCR-RFLP. También se podría intensificar el muestreo de abejas pecoreadoras en primavera (inicio de temporada) y verano (plena actividad) a lo largo de una transecta fija, en dirección norte-sur entre los 30 y 35° de latitud sur. Esto permitiría determinar el límite de africanización como así también su fluctuación temporal a lo largo del año.

La información proporcionada en este trabajo puede ser de una inestimable ayuda para fortalecer la estrategia de los programas de mejoramiento de abejas y de cabañas apícolas, a fin de mantener la alta calidad de los recursos genéticos de abejas adaptados a cada región ecoclimática para una apicultura sustentable. Por último, la evaluación de la estructura genética de las abejas argentinas debe mantenerse actualizada no solo para conocer la variabilidad genética disponible y su aplicación en programas de mejoramiento, sino también para contar con información del estatus de africanización en el país, en un contexto de cambio climático que permita realizar ajustes en el manejo apícola.

6. CONCLUSIONES

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue determinar el presente estatus de la africanización en el país, ya que se partía del concepto establecido muchos años atrás de que el norte era una región saturada con abejas africanizadas. Los resultados demostraron que esta no es la situación actual, debido principalmente a la actividad apícola comercial y no a cambios ecológicos o a la dinámica poblacional de la abeja africanizada.

Independientemente de la actividad comercial, la distribución del germoplasma africano está limitada por factores ecológicos, principalmente la temperatura. Aun cuando se ha refutado el estatus de saturación, se confirma una fuerte presencia del germoplasma africano en el norte de Argentina, revelada a través de la toma de muestras en colonias silvestres. Se demostró que, a través de los años, se mantiene un límite de africanización definido por la isoterma anual de 16°C; en el área de muestreo, este límite coincide aproximadamente con la latitud 33°S.

Aun cuando se detectó una importante variabilidad a nivel de haplotipos mitocondriales, se destaca la presencia de los haplotipos A4 y el A1, característicos de la subespecie *A. m. scutellata* registrados en el norte del país. En contraposición, en el sur de la región considerada, que corresponde a su vez al área de apicultura más tecnificada, hay una clara predominancia del haplotipo C1, característico de la subespecie *A. m. ligustica*.

La integración de marcadores nucleares y mitocondriales en el análisis fue una herramienta muy poderosa para la caracterización poblacional de abejas, ya que permitió revelar procesos complejos de introgresión genética. Los resultados experimentales previos se habían limitado a la caracterización a nivel mitocondrial, por lo que mostraban un panorama mucho más simple que el demostrado en esta Tesis.

Este trabajo llevó muchos años de diseño, muestreo y análisis. En la actualidad es posible acceder a otras herramientas moleculares, incluyendo la secuenciación integral de genomas, que justificarían repetir en el futuro este análisis con el mismo set de muestras. Por ejemplo, sería de gran interés refinar la caracterización de los diferentes pools genéticos detectados a nivel poblacional, no solamente la

contribución del germoplasma africano y el llamado "italiano", que predominan respectivamente en el norte y el sur de la región de muestreo. Asimismo, a posteriori se confirmó que debe intensificarse el muestreo en la considerada región de transición, para precisar la distribución de germoplasma africanizado. Un nuevo muestreo debería considerar en detalle el factor estacional, para discriminar áreas de colonización permanente.

Otro objetivo relevante de este trabajo, fue la caracterización de la variabilidad poblacional a los fines de identificar germoplasma útil en planes de selección en marcha, por ejemplo aquellos orientados a mejorar la sanidad. Los resultados obtenidos muestran que no hay nichos aislados definidos por la distribución geográfica, al menos en la región considerada por su contribución a la actividad apícola nacional. Los presentes resultados pueden ser de gran utilidad en la búsqueda de germoplasma útil a esos planes de mejoramiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAMOVICH, A.H.; ATELA, O.E.; DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J. 2007. Assessment of the mitochondrial origin of honey bees from Argentina. *Journal of Apicultural Research* 6(3): 191-194.
- AGRA, M.; CONTE, C.A.; CORVA,P.M.; CLADERA, J.L.; LANZAVECCHIA, S.B.; PALACIO, M.A. 2018. Molecular characterization of *Apis mellifera* colonies from Argentina: genotypic admixture associated with ecoclimatic regions and apicultural activities. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 166 (9): 724–738 DOI: 10.1111/eea.12719.
- ALBURAKI, M.; MOULIN, S.; LEGOUT, H.; ALBURAKI, A.; GARNERY, L. 2011. Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie* 42:628–641. DOI: 10.1007/s13592-014-0331-0.
- ALPATOV, W. 1929. Growth and variation of larvae of *Drosophila Melanogaster*. *The Journal Zoology* 52 (3) : 407-338. DOI: 10.1002/jez.1400520303
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. 215(3):403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- ANDERE, C.; PALACIO, M.A.; RODRIGUEZ, E.; DOMINGUEZ, M.T.; FIGINI, E.; BEDASCARRASBURE, E. 2000. Evaluation of honey bee defensive behavior in Argentina - A field method. *American Bee Journal*. 140 (12): 975-978.
- ANDERE, C.; GARCÍA, C.; MARINELLIA, C.; CEPEDA,R.; RODRIGUEZ, M.B.; PALACIO, M.A. 2008. Selection of morphometric variables of honeybees *Apis mellifera* to be used in ecotypes characterization in Argentina. *Ecological Modelling* 214 (1): 53-58.
- ARIAS, M.C.; TINGEK, S.; KELITU, A.; SHEPPARD, W.S. 1996. *Apis nulensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, 1996 and its genetic relationship with sympatric species inferred from DNA sequences. *Apidologie*, 27(5), 415-422.
- AVISE, J.C.; SAUNDERS, N.C. 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*. 108 (1): 237-255.
- BARUFFI, L.; DAMIÁN, G.; GUGLIELMINO, C.; MALACRIDA, A.; GASPERI, G. 1995. Polymorphism within and between population of *Ceratitis capitata*. Comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*. 74 (4): 425-437.

- BAUDRY, E.; SOLIGNAC, M.; GARNERY, L.; GRIES, M.; CORNUET, J. M.; KOENIGER, N. 1998. Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proc Biol Sci.* 265(1409): 2009–2014.
- BEDASCARRASBURE, E. 2011. Consolidando la Apicultura como herramienta de desarrollo. Ediciones INTA, Buenos Aires, pp. 25-39.
- BIERZYCHUDEK, A. 1979. Historia de la Apicultura Argentina. Héctor J. Mattone: Buenos Aires, Argentina, pp. 115-147.
- BIRKY, W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (25): 11331-11338
- BOOKSTEIN, F. 1997. Morphometric Tool for Landmark Data. *Biometrics.* 54 (1) DOI: 10.2307/2534038.
- BOUGA, M.; HATJINA, J. 2005. Genetic variability in greek honey bee (*a. Mellifera* L.) Populations using geometric morphometrics analysis. *Proceedings of the balkan scientific conference of biology in plovdiv (Bulgaria) from 19th till 21st of may 2005*, pp. 598–602
- BOUGA, M.; ALAUX, C.; BIENKOWSKA, M.; BÜCHLER, R.; CARRECK, N. L.; CAUIA, E.; CHLEBO, R.; DAHLE, B.; DALL'OLIO, R.; DE LA RÚA, P.; GREGORC, A.; IVANOVA, E.; KENCE, A.; KENCE, M.; KEZIC, N.; KIPRIJANOVSKA, H.; KOZMUS, P.; KRYGER, P.; LE CONTE, Y.; LODESANI, M.; MURILHAS, A. M.; SICEANU, A.; SOLAND, G.; UZUNOV, A.; WILDE, J. 2011. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *J. Api. Res.* 50(1): 51-84.
- BROWN, M.; PAXTON, R. J. 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie.* 40 (3): 410-416.
- BUCHMANN, E.; NABHAM, G. 1996. The pollination crisis. *The Sciences.* 36(4): 22-27
- CARON, D. M. 1999. *Honey Bee Biology and Beekeeping*. Wicwas Press: Cheshire. . 355p.
- CÁNOVAS, F.; DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. 2007. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J Zool. Syst. Evol. Res.* 46(1): 24-30.
- CLARKE, K. E.; OLDROYD, B.; JAVIER, J.; QUEZADA-EUÁN, G.; RINDERER, T. 2001. Origin of honey bees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 10(6): 1347-1355.

- CLARKE, K.E.; RINDERER, T.E.; FRANCK, P.; QUEZADA-EUÁN, J.G.; OLROYD, B. P. 2002. The Africanization of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a Study of a Massive Hybridization event Across Time. *Evolution*. 56 (7): 1462-1474.
- COLLET, T.; FERREIRA, K.M.; ARIAS, M.C.; SOARES, A. E. E.; DEL LAMA, M. A. 2006. Genetic structure of Africanized honey bee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. *Heredity*. 97(5): 329-335.
- Consejo Federal de Inversiones. 2011. La apicultura argentina y sus regiones: una visión panorámica, CFI: Buenos Aires, Argentina. <http://biblioteca.cfi.org.ar/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/apicultura-argentina.pdf>
- CORNUET, J. M. 1982. Representation graphique de populations multinormales par des ellipses de confiance. *Apidologie* 13: 15-20.
- CORNUET, J. M.; DAOUDI, A.; CHEVALET, C. 1986 Genetic pollution and number of matings in a black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) population. *Theor. Appl. Genet.* 73(2), 223-227.
- CORNUET, J. M.; OLDROYD, B. P.; CROZIER, R. H. 1995. Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honey bees. *J.Apic.Res.* 34(1), 45-47.
- CORNUET, J.M.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*. 128(2): 393-403.
- CROZIER, Y. C.; KOULIANOS, S.; CROZIER, R. H. 1991. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. *Experientia* 47 (9): 968-969.
- CROZIER, R.H. 1993. The mitochondrial genome of the honey bee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*. 133(1): 97-117.
- DEL LAMA, M. A.; LOBO, J. A.; SOARES, A. E.; DEL LAMA, S. N. 1990. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honeybee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*, 21(4): 271-280.
- DE JAIME LORÉN, J. M. 2003. Sobre la primicia hispana en cuanto a los envíos de abejas europeas a América. *Llull: Revista de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas*. 26 (56): 595-612
- DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; GALIAN, J. 1998. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honey bees (*Apis mellifera* L.) *Mol. Ecol.* 7(11): 1543-1547.

- DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J.; SERRANO, J. 1999. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de abejas de la miel (*Apis mellifera* L.) de la Región de Murcia. Invest. Agr: Prod. San. Anim., 14: 41-49.
- DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J.; SERRANO, J.; MORITZ, R.F.A. 2001. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. Mol. Ecol. 10(7): 1733-1742.
- DE LA RÚA, P.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, R.; PEDERSEN, B.V.; GALIÁN, J.; SERRANO, J. 2004. Molecular diversity of Honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. Arch. Zootec. 53(202): 195-203.
- DE LA RÚA, P.; FUCHS, S.; SERRANO, J. 2005. Biogeography of european honey bees. In: Lodesani, M.; Costa, C. (eds.). Beekeeping and conserving biodiversity of honeybees: sustainable bee breeding, theoretical and practical guide. Northern Bee Books, Hebden Bridge, pp15-52.
- DE LA RÚA, P.; JAFFÉ, R.; DALL'OLIO, R.; MUÑOZ, I.; SERRANO, J. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European Honey bees. Apidologie. 40(3): 263-284.
- DE SANTIS, L.; CORNEJO, L. G. 1968. La abeja africana *Apis mellifera adansonii* en América del Sur. Rev. Fac. Agron. La Plata.17: 35-44.
- EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. 2011. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet. Resour. 4(2): 359-361.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M.; CORNUET, J. M. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Nucleic Acids Res. 21(6), 1427-1431.
- ESTOUP, A.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUETT, J. M. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) Populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. Genetics 140(2): 679-695.
- EVANNO, G.; REGNAUT S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14(8): 2611-2620.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin. Ver 3.0. An integrated software package for population genetic data analysis. Evol. Bioinform. Online 1: 47-50.

- FERRARI, C. A.; PÉREZ, M. F.; CURRAO, H. F.; BESSONE, J. F. 2011. La apicultura Argentina y sus regiones: una visión panorámica. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires. pp 98-112.
- FRANCK P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52(4): 1119-1134.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honey bees from the Near East. *Apidologie* 31(2): 167-180.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; LOISEAU, A.; OLROID, B.P.; HEPBURN, H.P.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. 2001. Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86(4): 420-430.
- GARCIA, C.; ANDERE, C.I.; MESINA, N.; RODRIGUEZ, E.M.; PALACIO, M,A. 2008. Análisis morfológico de colonias de Entre Ríos-Argentina, según apiario y origen genético 2º Congreso Argentino de Apicultura. Mar del Plata. .
- GARNERY, L.; VAUTRIN, D.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. 1991. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, 22(1), 87–92.
- GARNERY, L.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1(3), 145–154.
- GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CELEBRANO, G.; CORNUET, J.M. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera*. *Experientia* 49(11): 1016-1021.
- GARNERY, L.; MOSSHINE, E.H.; OLDROYD, B.P.; CORNUET, J.M. 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Mol. Ecol.* 4(4): 465-471.
- GARNERY, L.; FRANCK, P.; BRAUDRY, E.; VAUTRIC, D.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. 1998. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II. Microsatellite loci. *Evolution* 30 (Suppl. 1) 49-74
- GRAMACHO, K.; SPIVAK, M. 2003 Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol* 54 (5) pp. 472-479

- HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. A.; CLOBERT, J.; DAVIES, K. F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R. D., COOK, W.M. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci. Adv.*, 1(2), e1500052.
- HALL, H. G.; SMITH, D. R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88(10), 4548–4552.
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HARRISON, J.F.; FEWELL, J.H.; ANDERSON, K.E.; LOPER, G.M. 2006. Environmental physiology of the invasion of the Americas by Africanized honey bees. *Soc. Integ. Comp. Biol.* 46(6): 1110-1122.
- JENSEN, A.B.; PALMER, K.A.; BOOMSMA, J.; PEDERSEN, B.V. 2005. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honey bee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Mol. Ecol.* 14(1): 93-106.
- JOMBART, T.; COLLINS, C. 2015. A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0.0. MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling. London, pp. 9-22.
- KERR, W.E. 1967. The history of the introduction of African bees to Brazil. *S. Afr. Bee J.* 39 (2): 3-5.
- KERR, W. E.; BARBIERI, M. R.; BUENO, D. 1970. Reproduction in African and Italian bees and their hybrids. 1º Congresso Brasileiro de Apicultura. DEMA, SC, and ACA. Brazil. pp. 130-135.
- KERR, W.E.; DEL RÍO, S.L.; BARRIONUEVO, M. 1982. The southern limits of the distribution of the Africanized honey bee in South America. *Am. Bee. J.* 122: 196-198.
- KERR, W. E.; BRANDEBURGO, M. M.; GONCALVES, L. S. 1982. Effects of Brazilian climatic conditions upon the aggressiveness of Africanized colonies of honeybees. In: Jaisson P. (ed.). *Social Insects in the Tropics*. Presse de l'Universite Paris Nord, pp. 256–280.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49 (4): 725-738
- KLEIN, A.M.; VAISSIERE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. 2007. Importance of

- pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 274(1608), 303–313
- KOENIGER, N.; KOENIGER, G. 2000. Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. Apidologie, 31(2), 313-339.
- KOZMUS, P.; STEVANOVIC, J.; STANIMIROVI, Z.; STOJI, V.; KULI, Z.; MEGLI, V. 2007. Analysis of mitochondrial DNA in honey bees (*Apis mellifera*) from Serbia. Acta Vet. 57. (5-6): 465-476.
- LANGELLA, O. 1999. Populations 1.2.31: a population genetic software. CNRS UPR9034 <https://bioinformatics.org/populations/>
- LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties, 27(2), 499-510.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol. Evol, 6(9):1110-1116.
- LOBO SEGURA, J. A. 2000. Highly Polymorphic DNA markers in an Africanized Honey Bee population in Costa Rica. Genet. Mol. Biol. 23 (2): 317-322.
- MCGREGOR, S. E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Research Service, USDA: Washington. pp 77-85.
- MEIXNER, M. D.; PINTO, M. A.; BOUGA, M.; KRYGER, P.; IVANOVA, E.; FUCHS, S. 2013. In Standard methods for characterizing subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. J. Api. Res. 52 (4): 1-27
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2016. Informes de coyuntura [Archivos PDF] En: MAGyP. Mercado Externo. Apicultura <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/publicaciones.php>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2017. Informes de coyuntura [Archivos PDF] En: MAGyP. Mercado Externo. Apicultura <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/publicaciones.php>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2018. Informes de coyuntura [Archivos PDF] En: MAGyP. Mercado Externo. Apicultura <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/publicaciones.php>

- MORITZ, R.F.A.; CORNUET, J. M.; KRYGER, P.; GARNERY, L.; HEPBURN, H. R. 1994. Mitochondrial DNA variability in South African honey bees (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 25(2): 169-178.
- MUÑOZ, I.; DALL'OLIO, R.; LODESANI, M.; DE LA RÚA, P. 2014. Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: are the conservation islands really effective? *Insect. Conser. Diver.* 7(6): 563-571.
- MUÑOZ, I.; PINTO, M.A.; DE LA RÚA, P. 2014. Effects of queen importation on the genetic diversity of island honey bee populations (*Apis mellifera* Linneaus 1758). *J. Api. R.* 53(2): 296-302.
- MUÑOZ, I.; HENRIQUES, D.; JOHNSTON, J.S.; JULIO CHÁVEZ-GALARZA, J.; KRYGER, P.; PINTO, M.A. 2015. Reduced SNP Panels for Genetic Identification and Introgression Analysis in the Dark Honey Bee (*Apis mellifera mellifera*) *PLoS ONE* 10(4): e0124365.
- NEDIĆ, N.; STANISAVLJEVIĆ, L.; MLADENOVIĆ, M.; STANISAVLJEVIĆ, E 2009. Molecular characterization of the honey bee *Apis mellifera carnica* in Serbia *Arch. Biol. Sci.* 61 (4): 587-598.
- OLEKSA, A.; WILDE, J.; TOFILSKI, A.; CHYBICKI, I.J. 2013. Partial reproductive isolation between European subspecies of honey bees. *Apidologie* 44(5): 611-619.
- OHTA, T.; KIMURA, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 22: 201-204.
- PALACIO, A.; BEDASCARRASBURE, E. 1998. Orígenes de las abejas. *Revista Super campo.* 4(45): 23-24
- PALACIO, M.A.; IGINI, E.; RODRIGUEZ, E.; RUFFINENGO, S.; DASCARRASBURE, E.; DEL HOYO, M. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* selected for its hygienic behaviour. *Apidologie* 31(4): 471-478.
- PALACIO, M.A.; FIGINI, E.; ANDERE, C.; DEL HOYO, M.; RUFFINENGO, S.; TERUGGI, G.; RODRÍGUEZ, G.; BEDASCARRASBURE, E. 2001. Improving Honey Bee Stocks in Argentina. 37^o International Apicultural Congress. 28 October - 1 November 2001 . Durban, Sudáfrica. pp 59.
- PALACIO, M.A.; FIGINI, E.; ANDERE, C.; BASUALDO, M.; BEDASCARRASBURE, E.L. 2004. Razas De abejas. *Campo y abejas* 7 (3): 49-50.

- PALACIO, M.A.; RODRIGUEZ, E.; GONCALVES, L.; BEDASCARRASBURE, E.; SPIVAK, M. 2010. Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 41(6): 602-612.
- PINTO, M.A.; JOHNSTON, J.S.; RUBINK, W.L.; COULSON, R.N.; PATTON, J.C.; SHEPPARD, W.S. 2003. Identification of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mitochondria DNA: Validation of a Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 96(5): 679-684.
- PINTO, M. A.; MUÑOZ, I.; CHÁVEZ-GALARZA, J.; DE LA RÚA, P. 2012. The Atlantic side of the Iberian Peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity. *Apidologie*, 43(6), 663-673.
- PINTO, M.A.; HENRIQUES, D.; NETO, M.; GUEDES, H.; MUÑOZ, I.; AZEVEDO, J.C.; DE LA RÚA, P. 2013. Maternal diversity patterns of Ibero-Atlantic populations reveal further complexity of Iberian honey bees. *Apidologie* 44(4): 430-439.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.
- PRITCHARD, D. J. 2016. Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *J. Apic. Res.* 55 (1):38-48, DOI: 10.1080/00218839.2016.1196016
- REBORATTI, C. 2010. Un mar de soja: la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Revista de Geografía Norte Grande.* 45: 63-76.
- RODRIGUEZ, G.A.; FIGINI, E.E.; PALACIO, M.A.; BARRETO, J.A. (20 de octubre de 2015). Loque americana, ¿de nuevo al ataque?. INTA. E.E.A. Hilario Ascasubi, E.E.A. Balcarce, E.E.A. Rafaela. Artículo de Divulgación. <https://inta.gob.ar/documentos/loque-americana-%C2%BFde-nuevo-al-ataque-0>
- RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; ALBURAKI, M.; LEGOUT, H.; GARNERY, L. 2011. Review of the *Dral* COI-COII test for the conservation of the black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) *Conser. Genet. Resour.* 3(2): 383-391.
- ROSENKRANZ, P. 1999. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie* 30 (2-3): 159-172.
- ROTHENBUHLER, W. C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F 1 and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist*, 4(2), 111-123.
- ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.*8(1): 103-106.

- RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. Material and methods. *Apidologie*, 9(4), 363-381.
- SALIZZI, E. 2014. Reestructuración económica y transformaciones en el agro pampeano: la expansión del cultivo de la soja y sus efectos sobre la apicultura bonaerense en los inicios del siglo XXI. *Estudios Socioterritoriales*, 16(1):14-47.
- SCHNEIDER, S.S.; DE GRANDI-HOFFMAN, G.; SMITH, D. R. 2004. The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49(1): 351-376.
- SHEPPARD, W.S.; RINDERER, T.; MAZZOLI, J.; STELZER, J.; SHIMANUKI, H. 1991. Gene flow between African- and European-derived honey bee populations in Argentina. *Nature*. 349(6312): 782-784.
- SHEPPARD, W.S.; RINDERER, T.E.; MEIXNER, M.D.; YOO, H.R.; STELZER, J.A.; SCHIFF, N.M.; KAMEL, S.M.; KRELL, R. 1996. *HinF1* variation in mitochondrial DNA of Old World honey bee races. *J. Hered.* 87(1): 35-40.
- SHEPPARD, W.S.; RINDERER, T.E.; GARNERY, L.; SHIMANUKI, H. 1999. Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. *Genet. Mol. Biol.* 22(1): 73-75.
- SMITH, D.R.; PALOPOLI, M.F.; TAYLOR, B.R.; GARNERY, L.; CORNUET, J.-M.; SOLIGNAC M.; BROWN, W.M. 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *J. Hered.* 82(2): 96-100.
- SMITH, D. R.; SLAYMAKER, A.; PALMER, M.; KAFTANOĞLU, O. 1997. Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, 28(5), 269-274.
- STADEN, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Mol. Biotechnol.* 5(3): 233-241.
- STEVANOVIC, J.; STANIMIROVIC, Z.; RADAKOVIC, M.; KOVACEVIC, S.R. 2010. Biogeographic Study of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on Mitochondrial DNA analyses. *Russ. J. Genet.* 46 (5): 603-609.
- SOLIGNAC, M. ; VAUTRIN, D.; LOISEAU, A.; MOUGEL, F.; BAUDRY, E.; ESTOUP, A.; GARNERY, L.; HABERL, M.; CORNUET, J. M. 2003. Five hundred and fifty

- microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes* 3(2): 307-311.
- SPIVAK, M.; FLETCHER, D. J. C.; BREED, M. D. 1991. The "African" Honey Bee. Westview Press. Boulder, CO. pp 87-118.
- TAYLOR, O.R. 1977. The past and possible future spread of Africanized honey bees in the Americas. *Bee World* 58(1): 19-30.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 443:931–949.
- THOMPSON, G.J.; YOCKEY, H.; LIM, J.; OLDROYD, B.P. 2007. Experimental manipulation of ovary activation and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers: testing hypotheses of reproductive regulation. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 307(10): 600-610.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. 1997. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 25(24): 4876-4882.
- TRAVESET, A.; SANTAMARÍA, L. 2004. Alteración de mutualismos planta-animal debido a la introducción de especies exóticas en ecosistemas insulares. En: Fernandez-Palacios Martínez, J.; Morici, C. *Ecología Insular. Ecología insular / island ecology*. Asociación Española de Ecología Terrestre, Cabildo Insular de La Palma, pp. 251-276..
- WALLBERG, A.; HAN, F.; WELLHAGEN, G.; DAHLE, B.; KAWATA, M.; HADDAD, N.; SIMÕES, Z.L.P. ; ALLSOPP, M. H.; KANDEMIR, I.; DE LA RÚA, P.; PIRK, C. W.; WEBSTER, M. T. 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics* 46 (10): 1081-1088
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.
- WHITFIELD, C.W.; BEHURA, S.K.; BERLOCHER, S.H.; CLARK, A.G.; JOHNSTON, J. S.; SHEPPARD, W.S.; SMITH, D.R.; SUAREZ, A.V.; WEAVER, D.; TSUTSUI, N.D. 2006. Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science* 314(5799): 642-645.
- WINSTON, M. L. 1991. The biology of the honey bee. Harvard University Press. Cambridge, MA, pp. 26-51.

8. ANEXOS

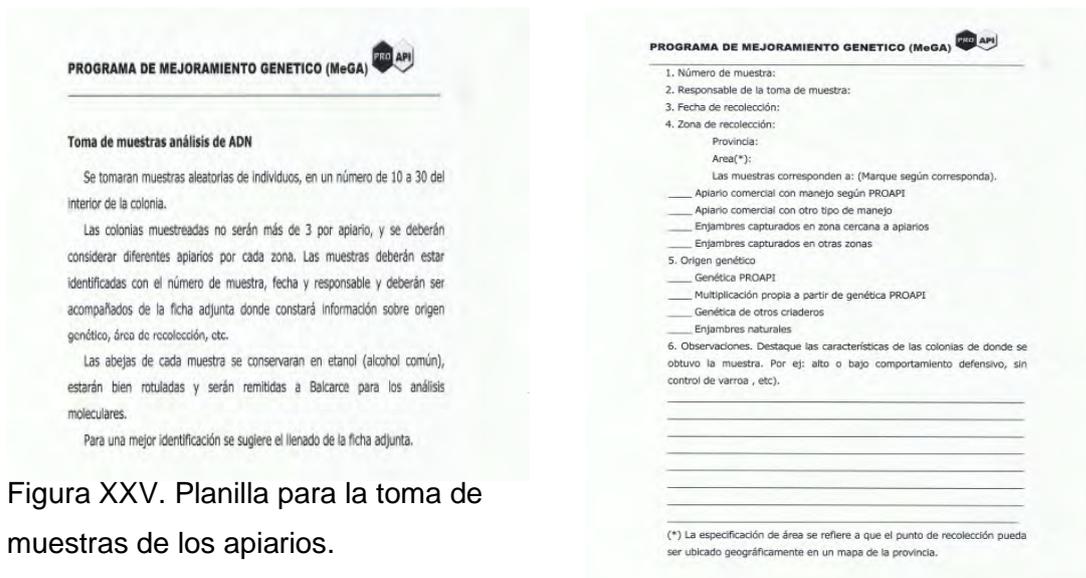
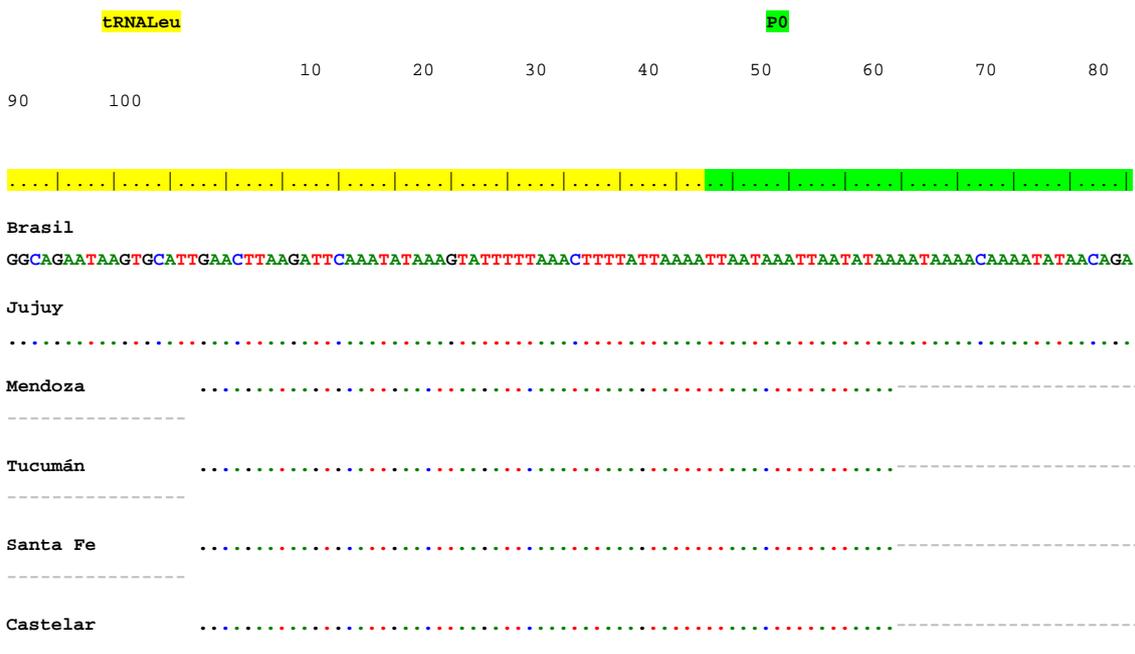


Figura XXV. Planilla para la toma de muestras de los apiarios.

Tabla XIII. Secuencias de la region intergénica COI-COII



Federación 1

.....A.

Federación 2

.....

Colonia Yerua

.....

EF033649.1-A1

.....A.

EF033654.1-A30

.....A.

EF033655.1-C1

.....

EF033650.1-A4

.....

Q1

Q2

190 200 110 120 130 140 150 160 170 180

.....

Brasil

ATATATTTATTAAAAATTAAATTTATTAAAAATTC-CACCTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATAAATAACAATTTAATAAAAAATAATAATTTATTTT

Jujuy

.....

Mendoza

.....

Tucumán

.....

Santa Fe

.....

Castelar

.....

Federación 1

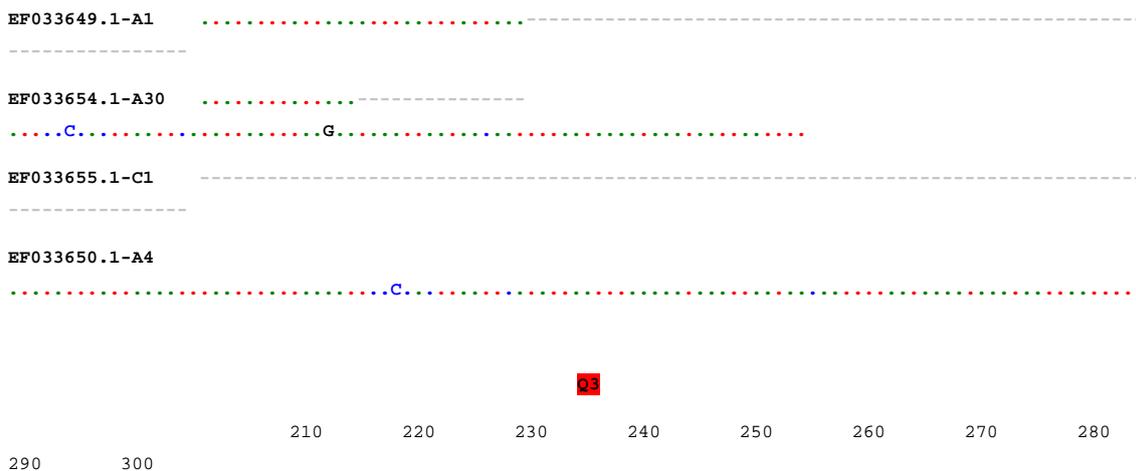
.....C.....G.....

Federación 2

.....

Colonia Yerua

.....



Brasil

ATTTTATAATTGAATTTTAAATCAATCTTAAAGATTTAATCTTTTATTAAAATTAATAAATTAATATAAAATAAAACAAAATATAACAGAATATATT





Brasil

ATTAAATTTAATTTATTTAAATTCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTAACAATTT - AATAAAATAAATAATTAATTTATTTTA

Jujuy

.....

Mendoza

T.....T.....

Tucumán

T.....T.....

Santa Fe

.....T.....

Castelar

.....T.....

Federación 1

.....G.....

Federación 2

T.....T.....

Colonia Yerua

.....

EF033649.1-A1

.....

EF033654.1-A30

.....G.....

EF033655.1-C1

T.....T.....

EF033650.1-A4

.....

Q3

410 420 430 440 450 460 470 480

490 500



Brasil

TATGAAATTTTAAATTCATCTTAAGATTTAATCTTTTATTAAAAATAAATTAATATAAAATAAACAAAATAACAGAATATATTTATTAATA

Jujuy

.....

Mendoza

.....A.....

Tucumán

.....A.....

Santa Fe

.....A.....T.....

Castelar

.....A.....T.....

Federación 1

.....

Federación 2

.....A.....

Colonia Yerua

.....

EF033649.1-A1

.....

EF033654.1-A30

.....

EF033655.1-C1

.....A.....

EF033650.1-A4

.....

COII

590 600 510 520 530 540 550 560 570 580

.....

Brasil

TTTAATTTATTAATAATTCCACATGATTCATATTTATATTTCAAGAATCAAATTCATATTTATGCTGATAATTTAATTTCAATTCATAATATAGTTATAAT

Jujuy

.....

Mendoza

.....T.....

Tucumán

.....T.....

Santa Fe

.....

Castelar

.....

Federación 1

.....

Federación 2

.....T.....

Colonia Yerua

.....

EF033649.1-A1

.....
 EF033654.1-A30

 EF033655.1-C1
T.....
 EF033650.1-A4

610 620 630 640 650 660 670 680

690 700

.....

Brasil
 AATCATTATTATAAATTCACACTTAACCTGATATATTATTTAGATTATTATAAAATAAATTTCAAATTTATTTTATTAAAAATCATAAATTGAA

Jujuy

.....

Mendoza

...T.....C.....C.....

Tucumán

...T.....C.....C.....

Santa Fe

...T.....C.....

Castelar

...T.....C.....

Federación 1

.....

Federación 2 ...T.....-

Colonia Yerua

.....

EF033649.1-A1

.....

EF033654.1-A30

.....

EF033655.1-C1

...T.....C.....C.....

EF033650.1-A4

.....

710 720 730 740 750 760 770 780

790 800

.....

Brasil

ATTATTGAACAGTTATTCACATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTCCATCATTAATAAATTTTATATTTAATTGANGAAATTGT-----

JujuyAAATCCTTTTTTTT
MendozaA.....AAATCCTTTTTTTT
TucumánA.....AAATCCTTTTTTTT
Santa FeA.....AAATCCTTTTTTTT
CastelarA.....AAATCCTTTTTTTT
Federación 1--
Federación 2	
Colonia YeruaAAATCCTTTTTTTT
EF033649.1-A1AAATCCTTTTTTTT
EF033654.1-A30AAATCCTTTTTTTT
EF033655.1-C1A.....AAATCCTTTTTTTT
EF033650.1-A4AAATCCTTTTTTTT
	810 820 830

Brasil	-----
Jujuy	CAATTA-----
Mendoza	CNATTAAATCAT-----
Tucumán	CAATTAAATC-----
Santa Fe	CA-TTAAATCAT-----
Castelar	CNATTAAAT----
Federación 1	
Federación 2	
Colonia Yerua	CAATTAAAT
EF033649.1-A1	CAATTAAATCAATTGGTCATCAATGATATTGG
EF033654.1-A30	CAATTAAATCAATTGGTCATCAATGATATTGG
EF033655.1-C1	CAATTAAATCAATTGGTCATCAATGATATTGG
EF033650.1-A4	CAATTAAATCAATTGGTCATCAATGATATTGG

Tabla XIV. Frecuencia Alélica y tamaño muestral de las poblaciones analizadas.

Locus	Allele/n	ER	Tuc	Fsa	SdE	Cba	Ctes	Chaco	SFe	BsAs	LP
AP068	N	34	13	22	15	28	23	34	15	30	18
	130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000
	142	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000
	146	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	148	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
	150	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
	152	0.044	0.038	0.136	0.000	0.018	0.087	0.074	0.033	0.083	0.028
	154	0.103	0.154	0.159	0.200	0.107	0.152	0.059	0.067	0.033	0.000
	156	0.250	0.192	0.045	0.400	0.232	0.283	0.309	0.333	0.433	0.167
	158	0.074	0.077	0.045	0.000	0.054	0.043	0.059	0.067	0.183	0.167
	160	0.118	0.192	0.364	0.200	0.143	0.196	0.206	0.067	0.000	0.139
	162	0.074	0.000	0.023	0.033	0.161	0.087	0.118	0.100	0.100	0.278
	164	0.147	0.154	0.136	0.067	0.143	0.043	0.059	0.200	0.100	0.083
	166	0.162	0.038	0.091	0.033	0.071	0.065	0.074	0.133	0.000	0.111
	168	0.000	0.115	0.000	0.033	0.036	0.000	0.029	0.000	0.017	0.028
	170	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	180	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
Ap085	N	35	14	22	14	27	25	35	15	30	17
	176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000
	178	0.014	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.014	0.000	0.000	0.029
	180	0.014	0.036	0.045	0.000	0.000	0.040	0.057	0.000	0.000	0.000
	182	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
	184	0.000	0.107	0.023	0.107	0.019	0.020	0.014	0.000	0.000	0.000
	186	0.029	0.071	0.091	0.071	0.056	0.100	0.071	0.100	0.033	0.029
	188	0.029	0.143	0.000	0.036	0.148	0.000	0.100	0.000	0.000	0.029
	190	0.200	0.214	0.227	0.107	0.111	0.160	0.071	0.000	0.117	0.029
	192	0.157	0.214	0.023	0.036	0.130	0.240	0.171	0.200	0.050	0.029
	194	0.071	0.071	0.205	0.036	0.130	0.060	0.143	0.067	0.017	0.118
	196	0.143	0.107	0.091	0.286	0.093	0.160	0.057	0.167	0.117	0.324
	198	0.014	0.000	0.023	0.036	0.074	0.020	0.029	0.067	0.017	0.059
	200	0.171	0.000	0.114	0.214	0.185	0.100	0.143	0.333	0.383	0.265
	202	0.086	0.000	0.000	0.036	0.000	0.020	0.043	0.067	0.233	0.088
	204	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000
	206	0.014	0.000	0.114	0.036	0.000	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000
	208	0.000	0.000	0.023	0.000	0.037	0.020	0.029	0.000	0.000	0.000
	210	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	212	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000
	214	0.029	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ap226	N	33	14	19	15	27	23	34	15	28	17
	227	0.030	0.000	0.026	0.067	0.000	0.000	0.015	0.000	0.018	0.000
	229	0.379	0.000	0.079	0.233	0.037	0.043	0.162	0.067	0.214	0.176
	231	0.121	0.214	0.211	0.100	0.000	0.283	0.147	0.067	0.071	0.176
	233	0.030	0.143	0.132	0.033	0.000	0.065	0.015	0.000	0.071	0.029
	235	0.000	0.036	0.026	0.000	0.056	0.000	0.015	0.000	0.071	0.118
	237	0.076	0.000	0.000	0.200	0.185	0.130	0.074	0.033	0.429	0.147

	239	0.121	0.036	0.000	0.033	0.278	0.043	0.074	0.467	0.054	0.059
	241	0.061	0.000	0.026	0.067	0.093	0.000	0.191	0.067	0.036	0.059
	243	0.045	0.179	0.105	0.067	0.056	0.109	0.118	0.067	0.036	0.059
	245	0.136	0.286	0.289	0.133	0.019	0.196	0.088	0.200	0.000	0.059
	247	0.000	0.107	0.105	0.067	0.204	0.087	0.059	0.033	0.000	0.088
	249	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.022	0.029	0.000	0.000	0.029
	251	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000
	259	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
Ac011	N	35	14	22	15	28	24	35	10	29	18
	83	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	105	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	107	0.014	0.000	0.023	0.067	0.054	0.083	0.086	0.000	0.000	0.000
	109	0.000	0.107	0.000	0.000	0.036	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
	111	0.043	0.071	0.045	0.000	0.018	0.042	0.029	0.050	0.000	0.056
	113	0.043	0.036	0.023	0.033	0.000	0.021	0.043	0.050	0.017	0.028
	115	0.057	0.286	0.159	0.067	0.143	0.125	0.186	0.100	0.017	0.139
	117	0.229	0.071	0.045	0.233	0.250	0.167	0.186	0.350	0.466	0.250
	119	0.243	0.250	0.318	0.267	0.179	0.167	0.271	0.200	0.241	0.111
	121	0.129	0.000	0.227	0.067	0.143	0.083	0.014	0.000	0.103	0.083
	123	0.057	0.036	0.023	0.067	0.018	0.000	0.071	0.000	0.017	0.167
	125	0.014	0.036	0.000	0.067	0.036	0.063	0.014	0.100	0.034	0.083
	127	0.043	0.000	0.068	0.000	0.125	0.083	0.057	0.100	0.103	0.083
	129	0.100	0.107	0.023	0.100	0.000	0.104	0.029	0.050	0.000	0.000
	131	0.014	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000
	139	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
Ap043	N	35	14	22	12	26	25	35	14	24	17
	117	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	119	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	121	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	123	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	125	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	127	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	129	0.071	0.036	0.068	0.000	0.019	0.080	0.100	0.036	0.042	0.059
	131	0.057	0.036	0.091	0.333	0.019	0.140	0.171	0.036	0.042	0.176
	133	0.229	0.071	0.159	0.125	0.096	0.040	0.100	0.071	0.083	0.118
	135	0.200	0.036	0.205	0.125	0.212	0.300	0.171	0.179	0.083	0.147
	137	0.029	0.000	0.250	0.125	0.192	0.040	0.086	0.179	0.000	0.147
	139	0.000	0.107	0.136	0.042	0.038	0.140	0.029	0.000	0.000	0.088
	141	0.014	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.014	0.000	0.042	0.059
	143	0.200	0.000	0.000	0.083	0.038	0.000	0.171	0.107	0.542	0.118
	145	0.029	0.000	0.045	0.083	0.173	0.120	0.057	0.143	0.125	0.000
	147	0.029	0.000	0.000	0.000	0.077	0.000	0.000	0.071	0.042	0.029
	149	0.000	0.000	0.000	0.000	0.058	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	155	0.014	0.000	0.000	0.000	0.038	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000
	157	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000
	159	0.014	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059

	161	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.036	0.000	0.000
	163	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000
	165	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	167	0.029	0.143	0.023	0.042	0.000	0.080	0.043	0.071	0.000	0.000
	169	0.043	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.043	0.036	0.000	0.000
	171	0.014	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
Ap256	N	35	14	22	15	27	24	36	15	30	18
	150	0.000	0.143	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	152	0.000	0.000	0.000	0.000	0.093	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	154	0.000	0.107	0.023	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	156	0.057	0.000	0.091	0.067	0.111	0.063	0.083	0.000	0.000	0.028
	158	0.143	0.107	0.159	0.233	0.111	0.083	0.153	0.200	0.067	0.194
	160	0.186	0.179	0.091	0.067	0.093	0.104	0.139	0.100	0.233	0.111
	162	0.271	0.143	0.205	0.067	0.222	0.146	0.125	0.067	0.033	0.222
	164	0.086	0.036	0.023	0.000	0.056	0.021	0.056	0.000	0.033	0.056
	166	0.057	0.000	0.000	0.133	0.000	0.000	0.069	0.133	0.367	0.167
	168	0.000	0.143	0.000	0.033	0.037	0.021	0.014	0.233	0.067	0.028
	170	0.014	0.036	0.182	0.100	0.130	0.146	0.208	0.000	0.067	0.139
	172	0.000	0.036	0.023	0.000	0.037	0.000	0.014	0.000	0.033	0.028
	174	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.028	0.033	0.017	0.028
	176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.014	0.067	0.000	0.000
	178	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
	180	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.033	0.000
	182	0.014	0.000	0.000	0.033	0.000	0.021	0.000	0.033	0.017	0.000
	184	0.086	0.036	0.023	0.033	0.037	0.021	0.014	0.000	0.000	0.000
	186	0.000	0.036	0.114	0.100	0.019	0.167	0.028	0.000	0.000	0.000
	188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.017	0.000
	190	0.000	0.000	0.045	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	192	0.043	0.000	0.023	0.033	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
	194	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.083	0.042	0.100	0.017	0.000
Ag005a	N	34	14	22	15	26	25	36	15	30	17
	81	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
	82	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	83	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	85	0.059	0.000	0.045	0.233	0.038	0.100	0.153	0.100	0.000	0.118
	86	0.235	0.000	0.023	0.167	0.385	0.100	0.153	0.433	0.533	0.206
	87	0.000	0.286	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	90	0.059	0.000	0.000	0.033	0.019	0.000	0.083	0.000	0.000	0.059
	91	0.162	0.286	0.182	0.167	0.115	0.280	0.181	0.200	0.133	0.059
	92	0.029	0.000	0.023	0.067	0.000	0.040	0.083	0.033	0.033	0.029
	93	0.132	0.036	0.364	0.100	0.135	0.320	0.153	0.000	0.033	0.059
	94	0.074	0.000	0.045	0.000	0.000	0.040	0.028	0.000	0.000	0.000
	95	0.029	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	96	0.000	0.000	0.023	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	97	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.020	0.042	0.000	0.017	0.059
	98	0.000	0.000	0.068	0.000	0.038	0.000	0.014	0.000	0.067	0.029
	99	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000	0.017	0.059
	100	0.221	0.214	0.205	0.167	0.250	0.100	0.083	0.233	0.150	0.176

	102	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.147
A113	N	35	12	22	15	27	24	36	15	28	18
	200	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	202	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000
	204	0.057	0.042	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
	208	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
	210	0.029	0.000	0.023	0.000	0.000	0.021	0.014	0.000	0.000	0.000
	212	0.071	0.000	0.136	0.033	0.019	0.104	0.014	0.067	0.000	0.083
	214	0.071	0.208	0.091	0.067	0.056	0.104	0.097	0.133	0.232	0.111
	216	0.071	0.208	0.364	0.333	0.074	0.188	0.139	0.400	0.018	0.139
	218	0.000	0.042	0.000	0.133	0.074	0.021	0.125	0.000	0.000	0.028
	220	0.400	0.250	0.227	0.133	0.481	0.229	0.125	0.133	0.429	0.222
	222	0.071	0.125	0.023	0.033	0.167	0.167	0.250	0.033	0.071	0.194
	224	0.043	0.042	0.068	0.067	0.037	0.063	0.042	0.000	0.036	0.111
	226	0.086	0.000	0.068	0.100	0.056	0.042	0.056	0.133	0.036	0.028
	228	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.042	0.097	0.000	0.018	0.056
	230	0.086	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.014	0.000	0.036	0.028
	234	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000
	238	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.067	0.089	0.000



Figura XXVI. A-Apiario comercial en Cruz del Eje (provincia de Córdoba).B-Apiario (ensayo Red de Tolerancia a Varroa) en la EEA INTA-Rafaela (provincia de Santa Fe). C-Apiario comercial en El Potrillo (provincia de Formosa).D- Apiario (Banco de Germoplasma) en la Unidad Integrada Balcarce en cultivo de girasol. Las cuatro figuras precedentes son de apiarios cuyas muestras de abejas se han utilizado en esta tesis.