

Africanización de colonias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae), presente en el ADN mitocondrial

Africanization of colonies of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae), present in the mitochondrial DNA

Silva-Contreras Amador¹ , Martínez-González Juan^{2*} , Cienfuegos-Rivas Eugenia² , López-Zavala Rigoberto¹ , Tapia-González José³ , Parra-Bracamonte Gaspar⁴ 

¹Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata". Tamaulipas, México. ²Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ingeniería y Ciencias. Centro Universitario Adolfo López Mateos. Tamaulipas, México. ³Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur. Jalisco, México. ⁴Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas, México. *Autor de Correspondencia: Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ingeniería y Ciencias. Centro Universitario Adolfo López Mateos. Cd. Victoria, Tamaulipas, México, CP. 87149. asilvac10b@gmail.com, jmartinez@docentes.uat.edu.mx, ecienfue@docentes.uat.edu.mx, rigoberto62@hotmail.com, joset@cusur.udg.mx, gparra@ipn.mx.

RESUMEN

La apicultura es una actividad asociada a productores de bajos ingresos cuyos productos están destinados a la exportación. El presente estudio se realizó para evaluar el grado de africanización de los apiarios comerciales a través de la presencia de genes africanos en el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). Se colectaron abejas de apiarios comerciales, que se mantuvieron en alcohol etanol hasta la extracción del ADN. El ADN obtenido se congeló a -20° C hasta su utilización. Para la PCR-RFLP se utilizaron 50 µg de producto de PCR que fue digerido e incubado por 16 horas y los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 1% en solución TBE 1X. La tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio. Se visualizó un patrón de dos fragmentos (194 y 291 pb) correspondiente al mitotipo Europeo (E) y un fragmento único sin digerir de 485 pb que corresponde al mitotipo africano. El porcentaje de africanización de las poblaciones fue de 69.9% con base en el análisis polimórfico de ADN mitocondrial, confirmando la dominancia de genes africanizados. Las poblaciones no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, porque existe déficit de heterocigotos.

Palabras Clave: Africanización, PCR, Norte de México.

ABSTRACT

Mexican beekeeping is an activity associated with producers of low income whose products are intended for export. The present study was conducted to assess the degree of africanization of the commercial apiaries through the presence of African genes in deoxyribonucleic acid (DNA) mitochondrial of honeybees (*Apis mellifera* L.). We collected bees from commercial apiaries that were kept in alcohol ethanol until the DNA extraction. The Retrieved DNA was frozen at - 20° C until use. 50 µg that was digested PCR product were used for the PCR-RFLP and incubated for 16 hours and the products of digestion were separated by electrophoresis in an agarose 1% solution TBE 1X gel. The staining of the gels was performed with ethidium bromide. A pattern of two fragments (194 and 291 pb) was visualized corresponding to the mitotipo

European (E) and a fragment only undigested 485 PB which corresponds to the African mitotipo. The population of Hardy-Weinberg are not in balance, there is deficit of heterozygotes.

Keywords: Africanization, PCR, Norther Mexico.

INTRODUCCIÓN

El estado de Tamaulipas posee muchos recursos multiflora que podrían ser utilizados para el desarrollo de la apicultura, particularmente en la Sierra Madre Oriental (Villegas *et al.*, 2003); además, en el centro del estado existe una importante área citrícola (SDR, 2017).

Sin embargo, la africanización de los núcleos ha propiciado la disminución de la producción de miel; asimismo, las enfermedades, parasitosis, la falta de capacitación de los productores y los fenómenos climáticos también han disminuido el potencial productivo de las abejas (Guzmán-Novoa *et al.*, 2004; Medina-Flores *et al.*, 2015; Urbina-Romero *et al.*, 2019). De igual modo, la introducción de nuevas plagas como el escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*), reportado en el país recientemente por la SAGARPA (2007).

La llegada de las abejas africanizadas en 1987, trajo consigo cambios significativos en la manera de hacer apicultura en el país; estos híbridos heredaron características indeseables de sus progenitores africanos (*Apis mellifera scutellata*), como el comportamiento defensivo, la tendencia a enjambrar y la migración (Medina-Flores *et al.*, 2015; Urbina-Romero *et al.*, 2019). Las consecuencias directas de este comportamiento defensivo fue el abandono de la actividad de productores, reducción del número de colmenas, incremento en los costos de producción por la adquisición de equipos de protección y el intercambio periódico de reinas fecundadas (SAGARPA, 2016).

Sin embargo, las abejas africanizadas poseen características deseables para la actividad apícola, entre ellas la adaptación a los climas tropicales que se traduce en el crecimiento rápido de sus poblaciones y resistencia a ciertas enfermedades y parasitosis (Vázquez-Castro *et al.*, 2006; Medina-Flores *et al.*, 2015).

Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ésta asociada al polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), los cuales son una herramienta versátil, rápida y de bajo costo para detectar polimorfismos de un nucleótido simple (SNPs) de genes asociados a características de producción; así como para evaluar la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones (Sifuentes *et al.*, 2006). Se ha comprobado que el polimorfismo en el ADN nuclear (ADNn) y ADN mitocondrial (ADNm) son marcadores moleculares muy útiles en el estudio de genética de poblaciones (Clarke *et al.*, 2001).

Asimismo, el polimorfismo del ADN se utilizó para discriminar grupos de abejas pertenecientes a las subespecies africanas y europeas (Esquivel-Rojas *et al.*, 2015). Por su parte, Medina-Flores *et al.* (2015) encontraron en un estudio realizado en Zacatecas, México, que las diferencias en las frecuencias de los morfotipos africanos y europeos fueron significativas, tanto intrarregión como entre las tres regiones.

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar las poblaciones de abejas de *Apis mellifera* de apiarios comerciales en el estado de Tamaulipas, usando técnicas de análisis moleculares para identificar la variabilidad del ADN y la presencia de genes europeos y africanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron 103 muestras provenientes de apiarios comerciales del estado de Tamaulipas; los productores reemplazan sus reinas aproximadamente cada dos años (SAGARPA, 2016), con abejas reinas certificadas (no africanizadas); algunos recurren a la alimentación artificial de las abejas durante las épocas de frío y de sequía, con productos como jarabe de fructuosa y torta de soya.

Las muestras (abejas), se mantuvieron en alcohol etanol absoluto al 95% a temperatura ambiente hasta la extracción del ADN. La extracción de ADN completo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, de acuerdo al protocolo propuesto por Crozier y Crozier (1993). Para la extracción del ADN se congelaron cuatro abejas con Nitrógeno líquido (N₂), se maceraron en mortero estéril y las muestras se digirieron a 55° C por 16 hrs en 295 µL de solución Master-Mix (Proteinasa K, RNase A Solution, EDTA 0.5 M, pH 8.0; Nuclei Lysis Solution). Para purificar el ADN se agregó al tubo Eppendorf® de 1.5 mL con la muestra, 250 µL de Wizard® SV Lysis Buffer, se centrifugaron a 13000 Xg por un minuto; se transfirió al tubo colector con minicolumna con filtro, se agregaron 650 µL de Wizard® SV Wash Solution (cuatro veces), centrifugando a 13000 Xg por un minuto. Posteriormente se desechó el tubo de minicolumna y se colocó el filtro con el ADN en un tubo nuevo Eppendorf® de 1.5 ml, se añadieron 250 µL de H₂O estéril desionizada libre de nucleasas incubándose por dos minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 13000 Xg por dos minutos y el ADN obtenido se congeló a -20° C hasta su utilización.

La PCR fue desarrollada conforme al protocolo descrito por Esquivel-Rojas *et al.* (2015), pero con 100 ng de ADN, 50 nm de cada iniciador y 25 µL de Mastermix®, que incluye 1 U de *Taq* polimerasa y 10 µL de H₂O estéril libre de nucleasas.

La región de 485 pb del gen Citocromo b, se amplificó empleando los iniciadores *Cytb-b* F: TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC y *Cytb-R* ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT. La mezcla fue desnaturalizada a 94° C por un minuto, seguida por 30 ciclos, 94° C por un minuto, 60° C por un minuto y 72° C, 30 segundos; finalmente a 72° C por 7 min, empleando un Termociclador Nyx Technik®. Para la PCR-RFLP se utilizaron 50 µg de producto de PCR que fue digerido con 1.5 U de *Bg/II* en un volumen final de 25 µL. Se incubó por 16 hrs y los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 1% en solución TBE 1X; se utilizó un marcador estándar de 50 pb. La tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio y la captura de las imágenes se realizó con el fotodocumentador DigiDoc-IT System® y el software Launch Doc-ITLS Acquisition®. Se visualizó un patrón de dos fragmentos (194 y 291 pb) correspondiente al mitotipo europeo (E) y un fragmento único sin digerir de 485 pb que corresponde al mitotipo africano (Crozier y Crozier, 1993).

Para la detección del sitio polimórfico *L2S1int*, se diseñaron los iniciadores F: GGCGTCCAGGTAACCGTCTCC y R: CGGTTGGAGGCGAACGGAAA para obtener un fragmento de 830 pb. Las condiciones de PCR son las recomendadas por Suazo y Hall (2002), utilizando la enzima de restricción *AvaI* para identificar el alelo africano. Dado que los análisis en este fragmento no fueron concluyentes para identificar las características moleculares esperadas, los resultados no se incluyen en el presente manuscrito.

Para el análisis estadístico y determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg, el déficit de heterocigotos y el índice de contenido polimórfico del *locus* utilizado para la caracterización de las poblaciones, se emplearon los softwares Cervus v3.03® y GENEPOP v4.0.10®.

RESULTADOS

El método molecular empleado en el presente trabajo estuvo basado en la PCR-RFLP de ADNn y ADNm; por un lado, se amplificó el fragmento nuclear de subalelo *L2S1int* de 830 pb empleando la enzima de restricción *AvaI*. Asimismo, se amplificó el fragmento mitocondrial de 485 pb del gen mitocondrial del citocromo b utilizando la enzima *Bg/II*; ya que estos dos *loci* contienen los cambios en las secuencias que permiten la discriminación de la subespecie africana *Apis mellifera scutellata* y las subespecies no africanas.

En la figura 1 se muestran los geles de agarosa con los productos de la PCR del ADNm, sometidos a electroforesis y teñidos con bromuro de etidio (EtBr). Se observó el

fragmento amplificado del gen del citocromo b con un tamaño de banda de 485 pb (A) y el segmento amplificado del subalelo *L2S1int* un fragmento de 830 pb (B).

En el presente trabajo se observó que el polimorfismo del gen mitocondrial del Citocromo b detectado con la enzima *Bgl*II, discrimina el haplotipo mitocondrial de *A. m. scutellata*; ancestro de las abejas africanizadas, del haplotipo de *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. cárnica* y *A. m. caucasica* (figura 2).

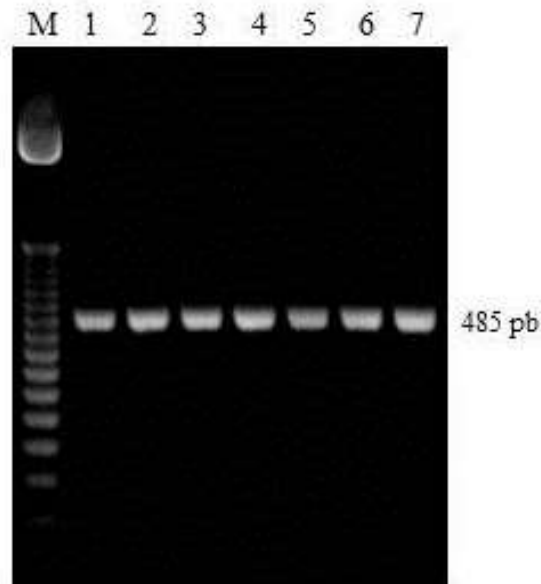


Figura 1. Electroforesis del gel de Agarosa 1.7% con el fragmento amplificado de 485 pb del gen del citocromo b. Carriles: 1, marcador molecular de 50 pb y Carriles 2-8, segmento del gen del citocromo b amplificado (A).

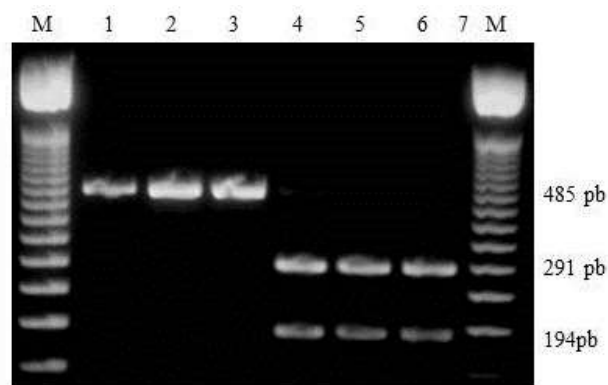


Figura 2. Patrones de RFLP del segmento del gen del citocromo b/ *Bgl*II. Electroforesis del gel de Agarosa 1.7%. Fragmento de 485 pb característico de abejas africanizadas (carriles 2-4). Segmentos de 194 Fragmento 291 pb característico de abejas no africanizadas (carriles 5-7).

El análisis electroforético de los geles de agarosa 1.7% con el ADN_m de las muestras, mostró fragmentos de bandas de ADN_m de genotipos africano y europeo (figura 3). Los fragmentos que mantuvieron el tamaño de 485 pb son característicos de las abejas africanas, (debido a que carecen del sitio de corte para la enzima *Bg/II* en el gen del citocromo b); mientras que en los individuos que tuvieron el sitio de restricción se produjeron fragmentos de 194 y 291 pb, correspondientes a abejas no africanas.

Se observó que las poblaciones tienen un grado de africanización superior al 55% (cuadro 1), a excepción de Jaumave.

Por otro lado, las frecuencias genotípicas y alélicas en las poblaciones de abejas de las regiones de Tamaulipas se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 1. Número y frecuencias (porcentaje) de la distribución de los patrones de ADN_m europeo y africano en las poblaciones de abejas de Tamaulipas

Localidad	N	Europeo (E)	Africano (A)	E-A
Victoria	15	5(33.3)	9(60.0)	1(6.7)
Altamira	24	2(8.3)	22(91.7)	
Llera	23	5(21.7)	18(78.3)	
Güemez	24	8(33.3)	14(58.3)	2(8.3)
Padilla	12	5(41.7)	7(58.3)	
Jaumave	5	2(40.0)	2(40.0)	1(20.0)
Total	103	27(26.2)	72(69.9)	4(3.9)

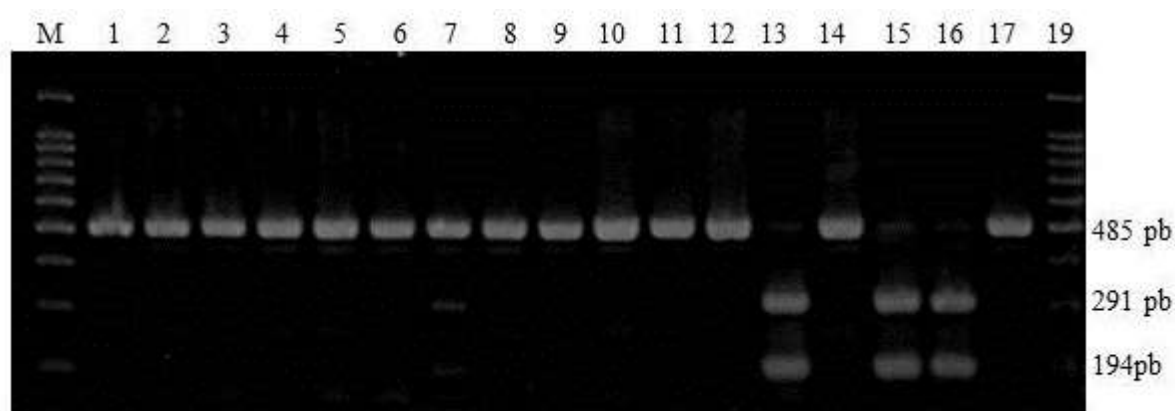


Figura 3. Patrones de RFLP del segmento del gen del citocromo b obtenidos con la endonucleasa *Bg/II*. Electroforesis del gel de Agarosa 1.7%. Segmentos de 485 pb característico de abejas africanizadas (carriles 2-13, 15 y 18). Segmentos de 194 y 291 pb característico de abejas europeas (carriles 14, 16, 17).

Los análisis realizados para las frecuencias genéticas de las poblaciones indicaron que no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, probablemente debido a que existe déficit de heterocigotos.

DISCUSIÓN

El método molecular empleado permitió la discriminación de la subespecie africana *Apis mellifera scutellata* y las subespecies no africanas (Zamora *et al.*, 2008; Esquivel-Rojas *et al.*, 2015). El polimorfismo del gen mitocondrial del citocromo b detectado con la enzima *Bgl*II, discrimina el haplotipo mitocondrial de *A. m. scutellata*; ancestro de las abejas africanizadas, del haplotipo de *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. cárnica* y *A. m. caucasica* (Pinto *et al.*, 2003; Genchi-García *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas en las poblaciones de abejas de Tamaulipas

Población	N	Frecuencias Genotípicas		
		Europeo (E)	Africana (A)	E/A
Victoria	15	0.333	0.600	0.067
Altamira	24	0.083	0.917	
Llera	23	0.217	0.780	
Güémez	24	0.333	0.583	0.083
Padilla	12	0.417	0.583	
Jaumave	5	0.400	0.400	0.100

E/A= europeo/africano

El análisis electroforético de los geles de agarosa 1.7% con el ADNm de las muestras, mostró fragmentos de bandas de ADNm de genotipos africano y europeo. Los fragmentos que mantuvieron el tamaño de 485 pb son característicos de las abejas africanas, (debido a que carecen del sitio de corte para la enzima *Bgl*II en el gen del citocromo b); mientras que en los individuos que tuvieron el sitio de restricción, se produjeron fragmentos de 194 y 291 pb, correspondientes a abejas no africanas.

El patrón observado en este trabajo coincide con el patrón para discriminar haplotipos africanos de no africanos en áreas africanizadas (Pinto *et al.*, 2003; Tibatá *et al.*, 2018). Se observó que las poblaciones tienen un grado de africanización; resultados similares fueron reportados por Esquivel-Rojas *et al.* (2015), Medina-Flores *et al.* (2015), Quezada-Euán (2007) y Zamora *et al.* (2008), al realizar la evaluación del polimorfismo de las poblaciones africanizadas en México.

Los resultados obtenidos con las modificaciones al protocolo de purificación de ADNm, permitieron conocer la estructura genética de las abejas melíferas en el centro de Tamaulipas. La caracterización de las poblaciones mostró que 69.9% de las colonias evaluadas tuvieron en su ADNm, el sitio de restricción para el haplotipo africano; como

se señala en la literatura (Quezada-Euán, 2007; Zamora *et al.*, 2008; Esquivel-Rojas *et al.*, 2015; Medina-Flores *et al.*, 2015). Mientras que el 26.2% de los apiarios muestreados tuvieron en su ADNm el haplotipo, que los caracteriza como de origen materno europeo. Un 4% de las muestras presentaron haplotipo mixto europeo-africano; esto pudo deberse a que los zánganos son silvestres y presentan una alta proporción de genes africanos. Sin embargo, los apicultores de Tamaulipas tienen como estrategias introducir reinas cada año o año y medio, pero certificadas ante la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), de no ser portadoras del gen africano (SAGARPA, 2016).

En los sitios muestreados el haplotipo africano representó un alto porcentaje de las colonias, confirmando la reducción de alelos tipo europeo en las poblaciones apícolas de México, Colombia y Brasil (Quezada-Euán, 2007); y la dominancia de genes nucleares y mitocondriales africanos en el genoma de las colonias domésticas, a partir de la llegada de la abeja africanizada a México.

Las poblaciones de Altamira están compuestas casi en su totalidad de abejas con mitotipo de origen africano, probablemente porque los productores no realizan el cambio anual con reinas de origen europeo. Estos resultados sugieren que las prácticas apícolas, como el cambio anual de reinas no ha sido suficiente para revertir la frecuencia de genes africanos en las poblaciones locales. Además, las condiciones climáticas tropicales de la región, han facilitado el desplazamiento de los genes europeos.

Se observó que las poblaciones tienen un alto grado de africanización, a excepción de Jaumave; lo que indica que aún es necesario seguir introduciendo reinas certificadas europeas (SAGARPA, 2016).

Quezada-Euán (2007) reportó para Chiapas y Tabasco 95.0% de africanización; Uribe *et al.* (2003) y Zamora *et al.* (2008) reportaron 13.7, 48.0, 50.0 y 21.0%, de haplotipos derivados de abejas africanas en Sonora, Baja California Sur y Baja California Norte, respectivamente. De igual modo, Quezada-Euán (2007) reportó que la proporción de africanización en Michoacán y Jalisco fue 56.0 y 40.0%, respectivamente. Mientras que en Yucatán, se incrementó de 61.0 a 73.0%— Alaniz-Gutiérrez *et al.* (2016) observaron que los morfotipos africanos en Ensenada y Mexicali, Baja California se encuentran por arriba del 85.0%.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que las poblaciones de *Apis mellifera* L. de Tamaulipas, están constituidas por genes característicos *A. mellifera scutellata* y en menor proporción por genes de las subespecies europeas como *A. mellifera ligustica*. Los resultados del análisis de los marcadores moleculares mostraron que las poblaciones de Tamaulipas son heterogéneas con introgresión de genes africanos en las poblaciones europeas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los apicultores de la zona centro de Tamaulipas. Al Laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UAT. Al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (CoSNET) por el financiamiento parcial para el desarrollo del proyecto.

LITERATURA CITADA

ALANIZ-GUTIÉRREZ L, Torres-Salado N, Ail-Catzim CE, Velazco-López JL. 2016. Frecuencia de morfotipos africanizados y europeos de *Apis mellifera* en Ensenada y Mexicali, Baja California. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 3(9):421-426. ISSN: 2007-9028.

CASTAÑEDA-VENEGAS JÁ. 2011. Producción de miel de abejas de flor de azahar. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México, D.F.

CLARKE KE, Oldroyd BP, Quezada EJJG, Rinderer TE. 2001. Origin of honeybees (*Apis mellifera* L) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*. 10:1347-1355. DOI:10.1046/j.1365-294X.2001.01274.x

CROZIER RH, Crozier Y. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*. 133(1):97-177. ISSN: 1943-2631.

ESQUIVEL-ROJAS S, Macías-Macías JO, Tapia-González JM, Contreras-Escareño F, León-Mantecón MJ, Silva-Contreras A. 2015. Selección de abejas (*Apis mellifera* L) con baja defensividad y su relación con el ambiente en Jalisco, México. *Abanico Veterinario*. 5(1):44-50. ISSN: 2007-428X.

GENCHI-GARCÍA ML, Reynaldi FJ, Bravi CM. 2018. An update of Africanization in honey bee (*Apis mellifera*) populations in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Apicultural Research*. 57(5):611-614. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494887>

GUZMÁN-NOVOA E, Hunt GJ, Uribe-Rubio JL, Prieto-Merlos D. 2004. Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behaviour at the individual and colony levels: the relationship guarding, pursuing and stinging. *Apidologie*. 35(1):15-24. ISSN: 0044-8435, DOI: 10.1051/apido:2003061

MEDINA-FLORES CA, Guzmán-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Aguilera-Soto J, López-Carlos MA. 2015. Africanización de colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en tres regiones climáticas del norte de México. *Veterinaria México OA*. 2(4):1-9. ISSN: ISSN 2448-6760.

PINTO MA, Spencer JJ, Rubink WL, Coulson RN, Patton JC, Sheppard WS. 2003. Identification of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) mitochondrial DNA: Validation of a Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *Annals of the Entomological Society of America*. 96:679-684. ISSN: 0013-8746.

QUEZADA-EUÁN JJG. 2007. A retrospective history of the expansion of Africanized honeybees in Mexico. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 46(4):295-300. ISSN: 0021-8839. doi.org/10.1080/00218839.2007.11101412

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2007. Situación actual del pequeño escarabajo de la colmena en México y sus perspectivas. 17ª. Reunión Anual de la CONASA. [online]. Disponible: http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs_17a_reunion/comite07/Igor_Romero_Sosa.pdf [citado 12 de diciembre de 2016].

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Reglas de Operación de los Programas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación para el ejercicio fiscal 2016. [online]. Disponible: <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44530/Reglas-Operacion-2016-sagarpa.pdf> [citado 12 de diciembre de 2016].

SDR (Secretaría de Desarrollo Rural). 2017. Tamaulipas segundo lugar a nivel nacional en producción de cítricos. [online]. Disponible: <https://www.tamaulipas.gob.mx/desarrollorural/2017/04/tamaulipas-segundo-lugar-a-nivel-nacional-en-produccion-de-citricos/> [citado 13 de septiembre de 2019].

SIFUENTES RAM, Puentes-Montiel HG, Moreno-Medina VR, De La Rosa-Reyna XF. 2006. Assesment of the myostatin Q204X allele using an allelic discrimination assay. *Journal of Genetic and Molecular Biology*. 29(3):496-497. ISSN: 1415-4757, doi.org/10.1590/S1415-47572006000300017

SUAZO A, Hall HG. 2002. Nuclear DNA PCR-RFLPs that distinguish African and European honeybee groups of subspecies. II: Conversion of long PCR markers to standard PCR. *Biochemical Genetics*. 40(7/8):241-261. ISSN: 0006-2928.

TIBATÁ VM, Arias E, Corona M, Ariza-Botero F, Figueroa-Ramírez J y Junca H. 2018. Determination of the Africanized mitotypes in populations of honey bees (*Apis mellifera* L.) of Colombia. *Journal of Apicultural Research*. 57(2):219-227. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1409065>

URBINA-ROMERO RA, Utrera-Quintana F, Castillo-González F, Livera-Muñoz M, Benítez-Riquelme I, Villa-Mancera AE, Hernández-Hernández JE, Silva-Rojas HV. 2019. Valoración del origen africanizado en la integración de una población experimental de *Apis mellifera* L. *Revista fitotecnica mexicana*. 42(2):111-118. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000200111&lng=es&tlng=pt

URIBE RJL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa BA, Zozaya J. 2003. Efecto de la africanización sobre la producción de miel y comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en el Altiplano Mexicano. *Veterinaria México*. 34(1):47-59. ISSN: 0301-5092.

VÁSQUEZ-CASTRO JA, Narrea-Cango M, Bracho-Pérez JC. 2006. Efecto del ácido oxálico, ácido fórmico y coumaphos sobre *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colonias de abejas. *Revista Peruana de Entomología*. 45:149-152. ISSN: 2222-2529.

VILLEGAS DG, Bolaños MA, Miranda SJ, García AJ, Galván GO. 2016. Flora nectarífera y polinífera en el Estado de Tamaulipas. SAGARPA. [online]. Disponible: http://www.agrotamaulipas.gob.mx/informacion_sector/forestal/Flora%20Tamaulipas.pdf [citado 12 de diciembre de 2016].

ZAMORA O, Domínguez R, Alaniz-Gutiérrez L, Quezada-Euán JG. 2008. Frequency of European and African-derived morphotypes and haplotypes in colonies of honey bees (*A. mellifera*) from NW México. *Apidologie*. 39:388-396. ISSN: 0044-8435, DOI: 10.1051/apido:2008016