



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Titulación: Ingeniería Agroalimentaria y del medio Rural

Mención: Explotaciones Agropecuarias

Título del trabajo:

Caracterización de la composición genética de colonias de abeja negra ibérica (*Apis mellifera* ssp. *iberiensis*) mediante marcadores microsatélites.

English title:

Characterization of the genetic composition of colonies of Iberian black honeybee (*Apis mellifera* ssp. *iberiensis*) by microsatellite markers.

Autor/es

Sandra Martínez Ballano

Director/es

Ester Sales Clemente
Jesús Luis Yániz Pérez de Albéniz

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
2022

Agradecer a mis tutores Ester Sales y Jesús Yániz su tiempo y dedicación, todos los conocimientos aportados y por brindarme esta oportunidad para iniciarme en el mundo de la investigación.

Además de su paciencia y los buenos ratos en la cafetería.

También agradecer a mi familia haberme dado la oportunidad de poder llevar a cabo mis estudios y su apoyo desde el primer momento.

Por último, a mis amigos y compañeros, por ser mi apoyo y ayuda en todo.

Este Trabajo Fin de Grado ha sido financiado por la Agencia Española de Investigación-MICIN (proyecto PID2020-112673RB-100), y por la DGA-FSE (Proyecto A07_17R).

El Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición de defensa es original y todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

Índice

1.- Introducción.....	8
2.- Justificación y objetivos	20
3.- Material y métodos	21
3.1.- Toma de muestras de <i>Apis mellifera iberiensis</i>	21
3.2.- Aislamiento de ADN	21
3.3.- Amplificación de loci microsatélite.....	22
3.4.- Análisis de los marcadores	24
4.- Resultados y discusión.....	25
5.- Conclusiones.....	33
6.- Bibliografía.....	35

Índice de tablas

Tabla 1. Loci microsatélite empleados en estudios de paternidad en <i>Apis mellifera</i>	19
Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación de 9 loci microsatélite descritos en <i>Apis mellifera</i> . Ta, temperatura de anillado.	23
Tabla 3. Rendimiento y calidad de las muestras de ADN (media \pm desviación típica) extraídas de pupas de 24 obreras y de 8 zánganos de 4 colmenas de abeja negra ibérica. Cantidad expresada en ng/ μ L y calidad en ratios A260/A280.	25
Tabla 4. Alelos determinados en 4 reinas de <i>Apis mellifera iberiensis</i> para 4 loci microsatélite (A029, A107, A113 y Ap226).	28
Tabla 5. Número de alelos determinados en colonias de abeja negra ibérica (<i>Apis mellifera iberiensis</i>) para 4 marcadores microsatélite y número estimado de padres por colmena.	28
Tabla 6. Genotipos para 4 marcadores microsatélite (A029, A107, A113 y Ap226) de los zánganos que fecundaron las reinas de 4 colmenas de abeja negra ibérica muestreadas en Aniés (Huesca)...	31

Índice de figuras

Figura 1: Porcentaje de distribución de las colmenas en España por CCAA en 2022. Fuente: MAPA (2022)	9
Figura 2: Distribución geográfica de los 4 principales linajes evolutivos de <i>Apis mellifera</i> . Fuente: (Delaplane, 2018).....	10
Figura 3: Síntomas detectados en colmenas durante las inspecciones realizadas en el Programa de Vigilancia sobre Pérdidas de Colonias de Abejas: A, cría salteada o en mosaico y B, varroa forética. Fuente: MAPA 2021b.	11
Figura 4: Abejas melíferas de tres subespecies, de izquierda a derecha <i>Apis mellifera iberiensis</i> , <i>A. m. ligustica</i> y <i>A. m. carnica</i>	13
Figura 5: Esquema reproducción de las abejas. Fuente: (Chofre, 2019).	15
Figura 6: Inseminación artificial de una abeja reina. Fuente: Volker Steger, https://fineartamerica.com/featured/bee-artificial-insemination-volker-steger.html	18
Figura 7: Muestra en forma de pupa empleada para extracción de ADN (A) y resultado de la homogenización de pupas en distintos estadios de desarrollo (B).	21
Figura 8: Electroforesis de los productos obtenidos mediante las amplificaciones del ADN de 4 abejas obreras (5-O1, 6-O1, 9-O1 y 10-O1) y un zángano (6-Z1) para los loci A024 (izquierda) y A107 (derecha). GR, Gene Ruler 100 bp Ladder; CN, control negativo.	26
Figura 9: Electroferogramas obtenidos mediante el software Geneious R8 de una abeja negra obrera (<i>Apis mellifera iberiensis</i>) de la colmena 5, para el mix A, con los marcadores microsatélite A107 (verde) y Ap226 (azul) (A) y para el mix B, con los marcadores A029 (izquierda) y A113 (derecha) (B).	27
Figura10. Dendrograma <i>Neighbor-Joining</i> que muestra la agrupación de las 96 abejas obreras de la subespecie <i>Apis mellifera iberiensis</i> incluidas en el estudio, en base a la variabilidad alélica detectada en 4 loci microsatélite. Cada individuo está codificado por el número de la colmena (5, 6, 9 o 10) seguido de un número de orden (1-24).	33

Resumen

Debido a sus beneficios como productoras de miel y otros derivados, el hombre ha ido seleccionando las mejores abejas atendiendo a características productivas y de manejo. Esta selección se ha basado tradicionalmente solo en el progenitor femenino, las reinas, lo que retrasa el avance genético. La selección de ambos progenitores está limitada por el sistema reproductivo de *Apis mellifera*, una especie haplo-diploide y con poliandria. El único método que permite la reproducción controlada es la inseminación artificial, pero además de ser costoso, no es tan eficiente como la cubrición natural. Una alternativa es desarrollar sistemas de apareamiento natural controlado, pero hay que disponer de una herramienta que permita comprobar si los zánganos seleccionados son los que se han apareado con la reina. Los marcadores moleculares, en concreto los microsatélites, pueden ser una herramienta útil para ello.

En la Escuela Politécnica Superior de Huesca se está desarrollando un programa de selección de abeja negra ibérica (*Apis mellifera iberiensis*) en colaboración con varios apicultores. Como paso previo a los ensayos de cubrición natural de reinas seleccionadas con zánganos de colonias también seleccionadas, se plantea desarrollar un protocolo para determinar paternidades en colonias de esta subespecie mediante marcadores microsatélite, para lo cual es preciso validar en *A. m. iberiensis* los marcadores descritos en la bibliografía. Para abordar este objetivo, en este estudio muestreamos pupas de cuatro colonias en un colmenar ubicado en Aniés (Huesca). Se colectaron en cada colmena 8 pupas de zánganos (haploides), para determinar el genotipo de la reina, y 24 pupas de obreras (diploides) para determinar los alelos paternos, y de esta forma distinguir las líneas paternas (patrilíneas) de cada colonia. Se ensayó la amplificación de 9 loci microsatélite, pero algunos pares de cebadores no produjeron los fragmentos esperados, por lo que finalmente 4 loci (A029, A107, A113 y Ap226), fueron empleados para el genotipado de las colonias. Los marcadores A107 y A029 fueron los que presentaron mayor diversidad alélica (13 y 10 alelos respectivamente), mientras que para los loci A113 y Ap226 solo se observaron 3 y 4 alelos respectivamente. Esta diversidad alélica permitió discriminar patrilíneas en las 4 colmenas (11, 12, 8 y 10, respectivamente), valores que se corresponden con los obtenidos en otros estudios realizados anteriormente, en los que no se estudió la subespecie *A. m. iberiensis*, y con un número de muestras mucho más elevado. Los análisis permitieron determinar a su vez el genotipo de los zánganos que habían fecundado a las reinas de cada colmena. En conclusión, estos 4 marcadores permitieron caracterizar patrilíneas en colonias de abeja negra ibérica, por lo que se pueden aplicar para el control de paternidad en cruzamientos controlados de esta subespecie.

Palabras clave

Mejora genética, cruzamientos controlados, variabilidad alélica, patrilíneas.

Abstract

Because of their benefits as producers of honey and other honey-derived products, man has been selecting better honeybees on the basis of their productive and management characteristics. This selection has traditionally been based only on the female parent, the queens, which slows down genetic progress. Selection of both parents is limited because of the reproductive system of *Apis mellifera*, an haplo-diploid and polyandrous species. The only method that allows controlled breeding is artificial insemination, but apart from being costly, it is not as efficient as natural mating. An alternative is to develop controlled natural mating systems, but there is a need to have a tool to check whether the selected drones are actually those that mated with the queen. Molecular markers, in particular microsatellites, may be a useful tool for this purpose.

At the Escuela Politécnica Superior of Huesca, a selection program of Iberian black bees (*Apis mellifera iberiensis*) is being developed, in collaboration with several beekeepers. As a previous step to develop natural mating trials of selected queens with drones from selected colonies, a protocol to determine paternity in colonies of this subspecies by microsatellite markers has to be set up. That is, markers described in the literature need to be validated in *A. m. iberiensis*. To address this objective, in this study we sampled pupae from four colonies in an apiary located in Aniés (Huesca). Eight drone pupae (haploid) were collected in each hive to determine the queen genotype, and 24 worker pupae (diploid) to determine the paternal alleles, and thus for distinguishing paternal lines (patrilineages) in each colony. Amplification of 9 microsatellite loci was tested, but some primer pairs did not produce the expected fragments, so finally 4 loci (A029, A107, A113 and Ap226) were used for colony genotyping. Markers A107 and A029 showed higher allelic diversity (13 and 10 alleles respectively), while only 3 and 4 alleles were observed for the A113 and Ap226 loci. This allelic variation allowed discriminating patrilineages in the 4 hives (11, 12, 8 and 10, respectively), values that are in the range of those obtained in previous studies, in which the subspecies *A. m. iberiensis* was not tested, and the number of samples tested was much higher. The analyses also allowed to determine the genotype of the drones that had fertilized the queens in each hive. In conclusion, these 4 markers allowed the characterization of patrilineages in *A. m. iberiensis* colonies, and can therefore be applied for paternity assessment in controlled crosses of this subspecies.

Key words

Genetic improvement, honeybee breeding, controlled mating, allelic variation, patrilineages.

1.- Introducción

Las abejas, según la clasificación de Linneo, son insectos que pertenecen al orden de los Himenópteros, a la superfamilia de los Apoideos, en concreto a la familia de los Ápidos, y aunque se conocen unas veinte mil especies diferentes, las del género *Apis* son las más de mayor impacto en la agricultura, así como en la producción de miel, jalea real, cera, propóleos y polen. Además, son consideradas como el grupo más importante de polinizadores, en especial la abeja melífera (*Apis mellifera* L) que actúa como polinizador agrícola debido a su facilidad de transporte, gran número y su nivel de domesticación (Iwasaki *et al.*, 2021). Se estima que alrededor del 80% de los principales cultivos alimentarios depende de esta abeja para producir sus frutos, mientras que en otros cultivos que no dependen exclusivamente de esa polinización, las abejas aumentan la calidad de los productos y su rendimiento (Klein *et al.*, 2007).

El sector apícola español cuenta en 2022 con 36.475 explotaciones, lo que supone un 3,3% de aumento con respecto al año anterior. El 18% son explotaciones de apicultores profesionales (cuentan con más de 150 colmenas), siendo el nivel más alto de la Unión Europea. Esto supone alrededor del 0,44% de la Producción Final Ganadera y el 0,17% de la producción de la Rama Agraria, con un valor de su producción (miel, cera y polen) estimado en 70,5 millones de euros acumulados en 2021. Aunque la producción respecto al año anterior ha descendido, los precios de los productos son más altos, en particular el de la miel ha subido un 10,3 % comparado con el año anterior.

Si nos referimos al censo de colmenas, en el mes de abril de 2022 el número era de 3.097.647, suponiendo un descenso del 1,4% respecto al año anterior. Por comunidades autónomas, se observan grandes diferencias entre ellas, aunque a grandes rasgos se pueden diferenciar dos zonas. En la zona del norte y noroeste hay un gran número de apicultores pequeños o no profesionales, que en general no practican la trashumancia. Por el contrario, en la zona del centro y sur/sureste de la península encontramos un mayor número de apicultores profesionales que mayoritariamente practican la trashumancia. Más del 50% de las colmenas se encuentran en Extremadura (22%), Andalucía (20%) y Castilla y León (14%) (Figura 1; MAPA, 2022).



Figura 1: Porcentaje de distribución de las colmenas en España por CCAA en 2022. Fuente: MAPA (2022)

Se cree que el género *Apis* es originario de Asia, en concreto de la región de Afganistán, y que con el tiempo se diferenciaron numerosas especies, entre las que destacan *Apis dorsata* F, *A. florea* F, *A. mellifera* L y *A. cerana* F. Las dos primeras son asiáticas y forman nidos abiertos, por lo que solo pueden vivir en regiones cálidas. Las dos últimas son las más utilizadas en apicultura, destacando como se ha mencionado, *A. mellifera*, que se ha extendido por casi todo el mundo, mientras que *A. cerana* se utiliza principalmente en Asia (Sepúlveda, 1986).

Dentro de la especie *A. mellifera* se han descrito a su vez 31 subespecies actualmente reconocidas (Shepard y Meixner, 2003; Meixner *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016) que se han agrupado en cuatro principales linajes evolutivos: A (africana), M (europeo occidental y del norte), C (europeo sudoriental) y O (Oriente Próximo y Medio), atendiendo a diferencias tanto fisiológicas, etológicas, ecológicas y morfométricas como moleculares. Esos cuatro linajes (Figura 2) se dan de forma natural en la cuenca del Mediterráneo (Cánovas *et al.*, 2008). Con estudios de marcadores moleculares más recientes, se han descrito otras dos ramas evolutivas, la Yemenítica de Etiopía (Y) (Meixner *et al.*, 2013) y la Z con poblaciones en Libia (Péntek-Zakar *et al.*, 2015).

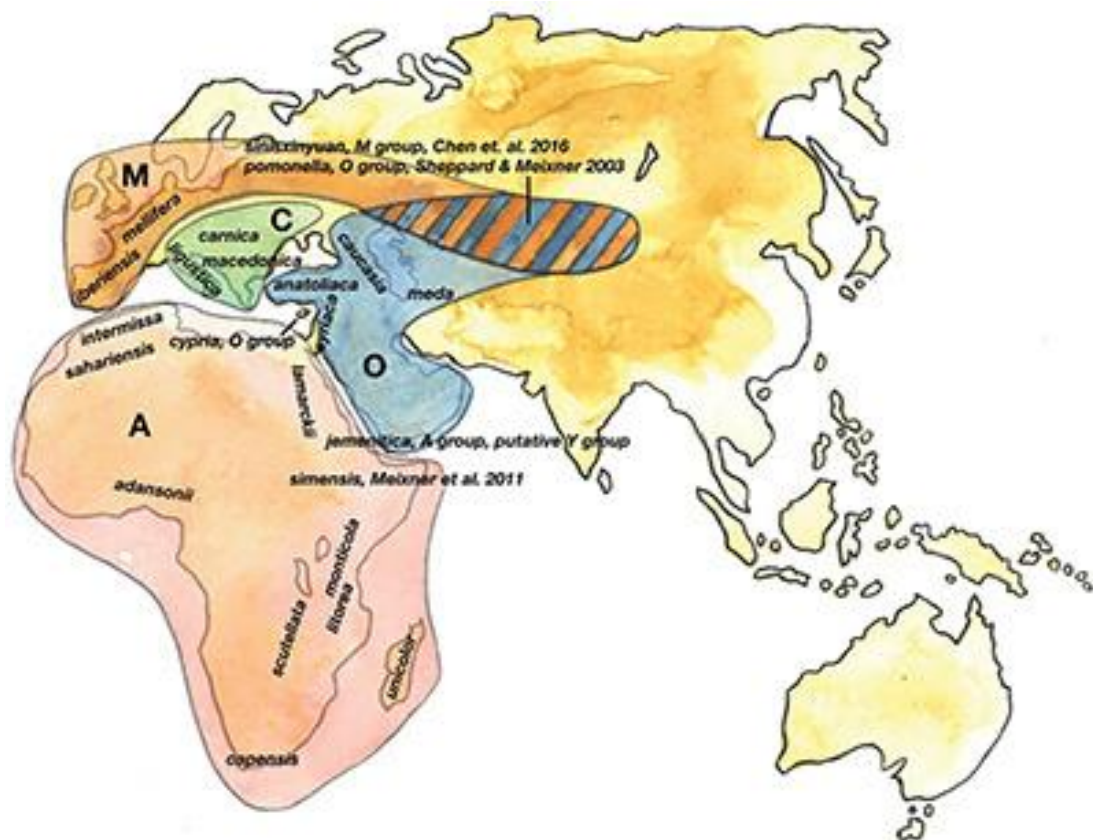


Figura2: Distribución geográfica de los 4 principales linajes evolutivos de *Apis mellifera*. Fuente: (Delaplane, 2018).

A pesar de su importancia tanto económica como ecológica, el número de abejas está disminuyendo en el mundo, especialmente en Norteamérica y Europa. Esto se debe al *Colony Collapse Disorder* (CCD) o síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC), que consiste en la desaparición de grandes poblaciones de abejas en las colmenas sin una clara causalidad. Esto sucede especialmente en invierno, donde la mortalidad media de las colonias en Europa se sitúa en torno al 20% anual, llegando a ser del 50% en algunos países y años concretos (Yániz *et al.*, 2016).

Aunque hay bastante acuerdo en que el SDC no tiene como origen un solo factor, se piensa que la falta de diversidad genética de los linajes puede tener un papel importante (Ellis *et al.* 2010), ya que esto hace a las abejas más susceptibles a enfermedades (virosis, Loque, varroosis...) y pesticidas, siendo estos dos elementos los agentes determinantes en el SDC (Yániz *et al.*, 2016).

La varroosis es la infección causada por el ácaro parásito *Varroa destructor*, que constituye es el principal factor biótico que provoca daños en las poblaciones de abejas melíferas, ya que puede llegar a provocar hasta el 40% de desaparición de colmenas. Los principales síntomas que provoca son debilitamiento y bajada de peso corporal. Además de todos estos problemas, este ácaro es un importante vector de otros virus que afectan a las abejas como, por ejemplo, el virus de las alas

deformadas (DWV) o el virus de la parálisis crónica (CVPV) (Vicente, 2016). Esta última es una de la virosis más importante en abejas adultas, resulta muy contagiosa y presenta cuadros de gravedad variable, que van desde la típica parálisis con abultamiento del abdomen, temblores y dislocación de patas y alas, ataxia y la muerte (Hermoso de Mendoza, 1996). En algunas abejas también se observa alopecia y tendencia al pillaje (síndrome de las “*ladronas negras*”) seguido de temblores, parálisis y la muerte.

Por otro lado, la Loque es una de las enfermedades más serias en las abejas, debido a su alto grado de virulencia y patogenicidad. Esta enfermedad está causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* y afecta a las abejas en estado larval, siendo las adultas portadoras asintomáticas. La muerte ocurre en estado de pupa o prepupa y tras pasar varios días la larva se deseca tomando una coloración negra. Es entonces cuando pasa a la etapa de escama, donde tiene un poder muy infectivo (Sebastián *et al.*, 2004).

Que el invierno sea una de las épocas críticas para la supervivencia de las colonias tiene que ver con las bajas temperaturas, la mayor escasez de alimento en el campo y que la población de abejas se reduce en otoño, lo que se traduce en una reducción de zánganos, limitándose las posibilidades de fecundación (Le Conte *et al.*, 2010). En España, en coordinación con otros países europeos, se lleva a cabo el Programa de Vigilancia sobre las Pérdidas de Colonias de Abejas desde el año 2012 (Figura 3; MAPA, 2021).

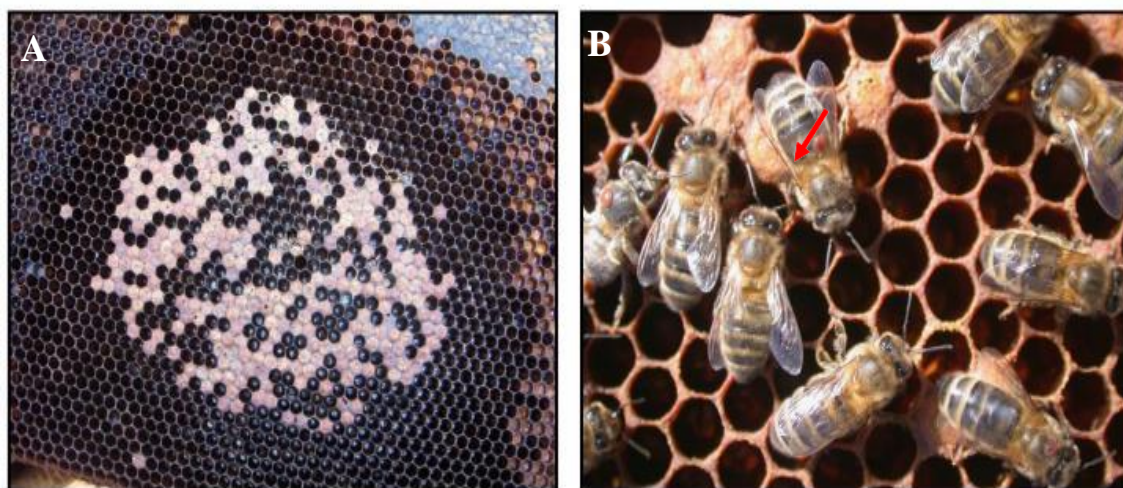


Figura 3: Síntomas detectados en colmenas durante las inspecciones realizadas en el Programa de Vigilancia sobre Pérdidas de Colonias de Abejas: A, cría salteada o en mosaico y B, varroa forética. Fuente: MAPA 2021b.

Este programa consiste en realizar una estimación de las pérdidas de colonias de abejas y estudios de prevalencia de las enfermedades apícolas prioritarias como son la varroosis, nosemosis, loque americana, loque europea, virus de la parálisis aguda, virus de las alas deformadas, virus de la

parálisis crónica y parásitos exóticos (*Aethina tumida* y especies de *Tropilaelaps*). Asimismo, en el marco de ese Programa se realiza un seguimiento y vigilancia de la presencia de residuos de pesticidas en panal de polen y en abejas, y se investigan las sospechas clínicas de intoxicación.

La apicultura moderna, en concreto el manejo de las colmenas que implica, tiene también una gran influencia en la diversidad genética de *Apis mellifera*, ya que para esta actividad se buscan colmenas con un alto rendimiento económico y un comportamiento adecuado de las abejas. Esto está llevando a un cambio en la cría de éstas que finalmente implica una reducción de la variabilidad genética de la especie (Meixner *et al.*, 2013). Los apicultores prefieren las mismas características en las abejas: que sean mansas, trabajadoras y que se adapten bien a vivir en colmenas hechas por el hombre. A estos requisitos se amoldan dos subespecies europeas originarias del sur y este del continente, en detrimento de *Apis mellifera mellifera* L (Figura 4A), la abeja tradicionalmente usada en Europa central. Estas subespecies son *A. m. ligustica* Spinola (Figura 4B) y *A. m. carnica* Pollmann (Figura 4C), que son las predominantes en la apicultura mundial (Yániz *et al.*, 2016).

Esta situación está conduciendo hacia la uniformidad de poblaciones en toda Europa, ya que se están produciendo importaciones masivas, movimiento de colonias y el incremento del comercio de reinas, poniéndose así en peligro las subespecies y ecotipos regionales, lo que supone una reducción en el potencial de las colmenas para adaptarse a cambios ambientales (Meixner *et al.*, 2013). Debido a esto, países como Francia, Noruega, Dinamarca, Suiza, Austria y Eslovenia ya cuentan con programas para la protección de poblaciones de abejas autóctonas (Muñoz *et al.*, 2013).

En España el Ministerio para la Transición Ecológica (MITECO) ha publicado una Estrategia nacional para la conservación de los polinizadores, en la que se establecen una serie de medidas para proteger tanto los polinizadores, como es el caso de las abejas, cómo el hábitat donde viven. Para ello se van a llevar a cabo una serie de objetivos, que se espera que estén vigentes para 2030. Estos son:

- Conservar las especies polinizadoras amenazadas y sus hábitats
- Promover hábitats favorables para los polinizadores.
- Mejorar la gestión de los polinizadores y reducir los riesgos derivados de plagas, patógenos y especies invasoras.
- Reducir el riesgo derivado del uso de productos fitosanitarios para los polinizadores.
- Apoyar la investigación para la mejora del conocimiento.
- Garantizar el acceso a la información y divulgar la importancia de los polinizadores.

Aunque la tendencia en muchos países sea hacia una menor variabilidad genética en las abejas empleadas por los apicultores, la Península Ibérica es una excepción, ya que en ella se ha conservado la subespecie endémica *Apis mellifera iberiensis* Engel (Figura 4D) con escasa contaminación genética. Esta situación, sin embargo, corre el riesgo de cambiar porque en los últimos años sí que se observa un auge en la introducción de abejas mejoradas de las subespecies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* o híbridos derivados de ellas (Yániz *et al.*, 2016).

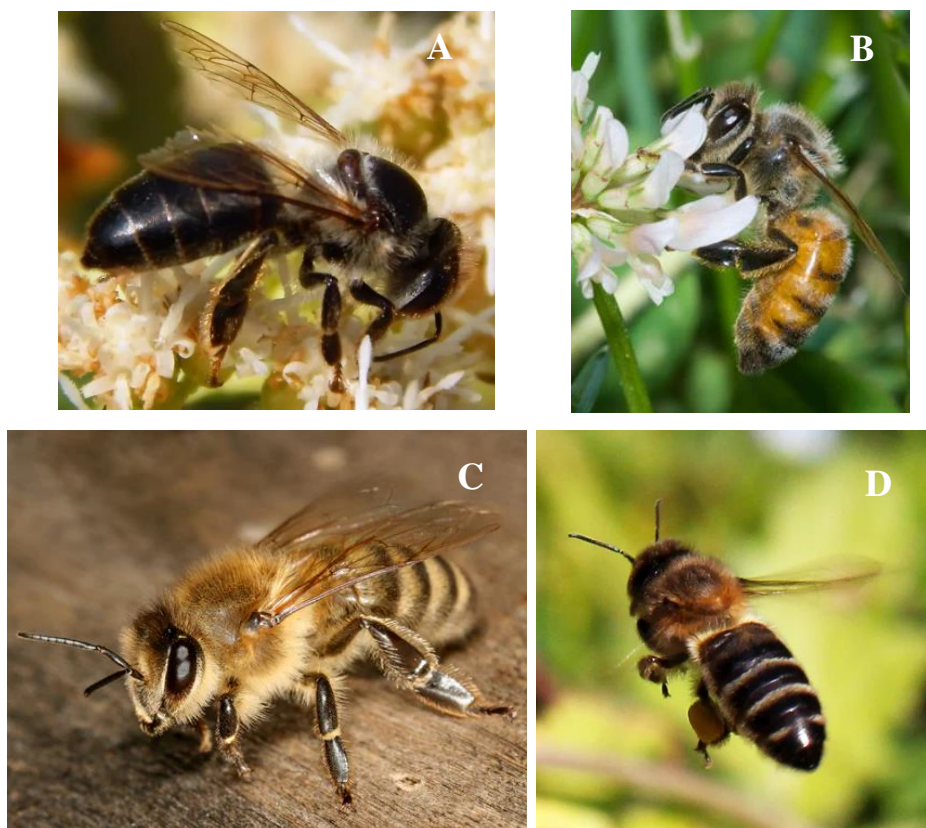


Figura 4: Abejas melíferas de cuatro subespecies, *Apis mellifera mellifera* (A), *A. m. ligustica* (B), *A. m. carnica* (C) y *A. m. iberiensis* (D).

La subespecie *Apis mellifera iberiensis* fue descrita por primera vez en el año 1964 por Goetze (Bravo *et al.*, 1989; de la Rúa, 1999). *Apis mellifera iberiensis* ha sido una de las 31 subespecies de abejas más estudiada en sus patrones de diversidad, ya que se han hecho estudios desde la década de 1970, donde se usaban isoenzimas, feromonas, datos de morfología, de la secuencia del genoma mitocondrial y también marcadores microsatélites nucleares (de la Rúa, 2013). En base a estos resultados se describió que esta subespecie procede de la integración del linaje M y el linaje A (de la Rúa, 2013).

Esta primera hipótesis sobre su origen fue propuesta en 1978 por Ruttner quien, usando un amplio conjunto de caracteres morfológicos, la situó en un eslabón intermedio entre la abeja del norte de África y la abeja centroeuropea (Bravo *et al.*, 1989). En 1982 y 1983 esta hipótesis fue apoyada por Cornuet, quien utilizó como marcador genético la aloenzima malato deshidrogenasa (Mdh) (Bravo *et al.*, 1989).

En estudios posteriores se planteó una segunda hipótesis sobre el origen *A. m. iberiensis*, según la cual esta subespecie era el resultado del contacto secundario entre dos subespecies originadas alopátricamente, *A. m. intermissa* Maa en Marruecos y *A. m. mellifera* en Europa occidental. Estas dos se habrían encontrado en la Península Ibérica donde habrían dado lugar a una nueva especie híbrida (de la Rúa, 1999).

Basándose en los estudios moleculares de la secuencia de diferentes genes del genoma mitocondrial o ADNmt (Garnery *et al.*, 1992) y en los mapas de restricciones de la molécula completa del ADNmt se llegó a la conclusión de que efectivamente *A. m. iberiensis* era una hibridación entre las subespecies *A. m. intermissa* y *A. m. mellifera*, ya que las abejas del norte de la Península Ibérica presentaban haplotipos mitocondriales de las europeas septentrionales y las del sur, de las africanas (de la Rúa, 1999).

Aunque los diferentes estudios basados en el ADNmt presentaban concordancias sobre esta segunda hipótesis, finalmente fue rechazada por los estudios basados en loci microsatélites (de la Rúa, 1999; Miguel *et al.*, 2010). Los microsatélites (*simple sequence repeats*, SSRs) son regiones genómicas muy frecuentes en los eucariotas que comprenden segmentos cortos, de 2-6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem. Se atribuye a estos loci una relación con el empaquetamiento y la condensación del ADN en los cromosomas (Stallings *et al.*, 1991). Los SSRs se distribuyen uniformemente por el genoma y generalmente se encuentran en regiones no codificantes (Goldstein y Schlotterer, 1999). Los marcadores SSR son una valiosa herramienta para estudios genéticos, ya que presentan un alto grado de polimorfismo, y herencia mendeliana codominante, es decir que nos permite diferenciar entre individuos homocigóticos de heterocigóticos, son reproducibles, automatizables, con una fiabilidad del 100%, además de ser fáciles de analizar y medir, reuniendo así todos los requisitos deseables para un buen marcador molecular (Cheng y Crittenden, 1994).

Los marcadores SSR empleados para los estudios filogenéticos en la abeja negra ibérica permitieron desestimar la primera hipótesis sobre el origen de esta subespecie, porque si fuese el resultado de la hibridación entre abejas africanas y europeas, la variabilidad de los microsatélites debería tener una modificación gradual de la frecuencia de los distintos alelos en el eje norte sur (de la Rúa, 1999), mientras que lo que se observó es que todas las abejas que habían sido clasificadas como linaje M tenían perfiles genéticos muy similares, sin estar integrados entre los linajes A y M (Garnery *et al.*, 1998; Miguel *et al.*, 2010).

A partir de estos resultados, los autores proponen una tercera hipótesis, un origen múltiple, según la cual las poblaciones de *A. m. iberiensis* que se parecen a *A. m. intermissa* proceden de la introducción de abejas desde Marruecos a la Península Ibérica (Garnery *et al.*, 1998; de la Rúa, 1999), aunque *A. m. iberiensis* está más próxima a la abeja negra europea, *A. m. mellifera* (Wallberg *et al.*, 2014).

Los estudios realizados con marcadores microsatélites sobre el origen y la diversidad de la abeja negra ibérica concluyeron que Aragón era una de las regiones donde mejor se ha conservado sin hibridar el linaje M de *A. m. iberiensis*. Concretamente en Huesca era donde había menos contaminación, aunque el tamaño muestral de este estudio fue reducido (43 colonias y 6 apiarios). Sin embargo, esta situación ha podido modificarse con el paso de los últimos años, ya que Huesca presenta un riesgo elevado de introducción de abejas foráneas al ser una región receptora de apicultores trashumantes, incluyendo franceses (Yániz *et al.*, 2016).

En cuanto a sus características, la condición más sobresaliente de *A. m. iberiensis* es que presenta una buena actividad pecoreadora durante las horas de luz, incluso con condiciones climatológicas adversas, ya que tienen una estructura compacta del enjambre (Sepúlveda, 1986). Esto les permite mantener la actividad salvo los días de vientos fríos, lo que las convierte en buenas invernadoras. Además, son abejas manejables con un buen uso del ahumador y con baja tendencia al pillaje. En cuanto a las reinas, son buenas ponedoras, robustas y tranquilas. Estas características hacen de *A. m. iberiensis* una buena subespecie para el aprovechamiento por parte del hombre. Sin embargo, como se ha mencionado, las subespecies preferidas por muchos apicultores en el mundo son *A. m. ligustica* y *A. m. carnica*, en las que se ha practicado selección e hibridación para su mejora genética.

El uso apícola ha conllevado la selección de las mejores abejas, aunque a diferencia de otras especies con aprovechamiento ganadero, en ésta la selección se ha centrado casi exclusivamente en la abeja reina, es decir, únicamente en el progenitor femenino. En una colonia de abejas, todos los individuos proceden de la puesta de la abeja reina, que comprende tanto huevos no fecundados (haploides) que darán lugar a los zánganos, como huevos fecundados diploides, que darán lugar a las obreras o a nuevas reinas (Figura 5). La selección de solo uno de los progenitores, el materno, sin controlar los zánganos que copulan con la reina, retrasa el avance genético y por lo tanto la efectividad de la mejora.

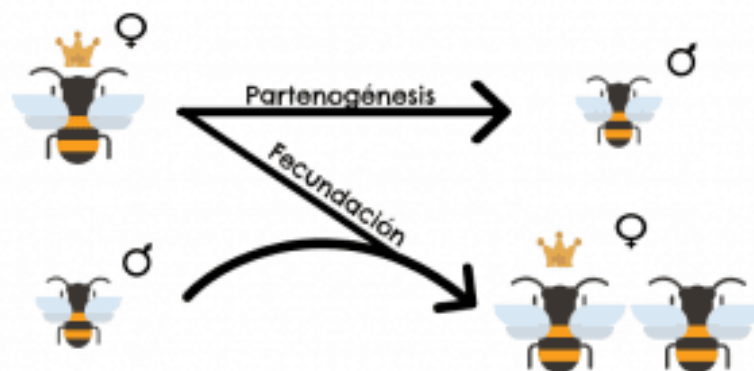


Figura 5: Esquema reproducción de las abejas. Fuente: (Chofre, 2019).

Hay que tener en cuenta que la selección de abejas reinas es una técnica relativamente reciente. Los primeros intentos se dieron a finales del siglo XIX. Fue en 1890 cuando Gilbert M. Doolittle desarrolló un sistema de selección de abejas reinas (Método Doolittle), que actualmente sigue siendo el más utilizado en el mundo (Benedetti y Pieralli, 1990) y permite repoblar de forma regular las colonias, además de aumentar la producción de crías y miel, reducir la enjambrazón y seleccionar larvas con las mejores características genéticas, que serán las hijas de las mejores reinas.

El método Doolittle consiste en coger una larva joven, de menos de un día, de un panal de puesta de obreras y pasarla a una cúpula de tamaño de una celda real, donde será alimentada con jalea real por las obreras. Pasados 11 o 12 días, nacerá la nueva reina y ya podrá ser trasplantada a un nuevo núcleo huérfano (Büchler *et al.*, 2013). Una vez finalizado este paso, solo queda esperar y vigilar la colmena para controlar que la reina es aceptada por las obreras y fecundada naturalmente.

Que la mejora genética de la abeja melífera se haya centrado en la selección de reinas se debe a que la reproducción de *A. mellifera* es extremadamente poliándrica. Esto quiere decir que las hembras se aparean y se multiplican con un número variable de machos, que puede variar desde 5 a más de 20 (Tarpy y Nielsen, 2002), y en cambio, los machos solo se aparean con una única reina. Las reinas se aparean en el transcurso de uno o varios vuelos nupciales, poco después de llegar a la edad adulta, y almacenan el semen en los oviductos laterales hasta llegar a la colmena. Una vez en ella, solo una pequeña porción de los espermatozoides pasa a ser almacenado en la espermateca, mientras que hasta el 95% del semen recibido es expulsado (Koeniger y Koeniger, 1991).

Una vez llegados a este punto, la reina tiene dos opciones de reproducción, como se ha mencionado, porque puede poner huevos no fecundados o puede poner huevos fecundados con el semen que tiene almacenado en la espermateca, dando lugar a embriones diploides, que serán obreras o nuevas reinas, en función de la alimentación que reciban. Este sistema reproductivo fue descubierto en el año 1845, por el párroco Johannes Dzierson, quien publicó un artículo donde planteaba la hipótesis de que los machos derivaban de huevos no fecundados. No fue hasta 1856, cuando esta hipótesis fue confirmada por Carl Th. von Siebold, quien demostró con estudios microscópicos que los óvulos destinados a los machos no contenían espermatozoides. Casi 60 años después, mediante estudios citológicos se confirmó que los zánganos solo contenían un juego de cromosomas, es decir que eran haploides, mientras que las hembras contenían dos juegos (diploides) (Page *et al.*, 2012). Más recientemente, se identificó un gen encargado de determinar el sexo (*Complementary Sex Determiner, csd*), en *A. mellifera*, en función de si el cigoto posee o no dos alelos diferentes para ese locus (Beye *et al.*, 2003; Gempe *et al.*, 2009).

El descubrimiento de Dzierson no pasó desapercibido para Gregor Mendel, quien quiso utilizar el descubrimiento de la haploidía para confirmar su teoría de la herencia con un sistema animal. El problema con el que se topó fue que no tenía control sobre los machos que inseminaban a la reina, ya que éstas se aparean con muchos machos mientras vuelan y a menudo a largas distancias de la colmena (Tarpy *et al.*, 2004). No fue hasta 1927 cuando se llevó a cabo con éxito la primera

inseminación artificial de reinas de *A. mellifera*; desde entonces se ha ido perfeccionando esta técnica gracias a los mejores conocimientos de la anatomía y fisiología, tanto de las abejas reinas como de los zánganos (Prost y Medori, 2007).

Desde 1950, la técnica de inseminación artificial de abejas reinas no ha sufrido casi variaciones. En primer lugar, se realiza la recogida de semen de zánganos seleccionados. Este puede ser recogido el mismo día de la inseminación o el día anterior, manteniéndolo a temperatura ambiente. Cada zángano puede dar aproximadamente 1 µl de esperma y la recolección se realiza mediante manipulación manual de la cabeza, tórax y abdomen del zángano, usando los dedos pulgar e índice. Esta manipulación estimula terminaciones nerviosas que provocan la eversión del aparato genital y la posterior eyaculación del macho (Rinderer, 1986).

Una vez recolectado el semen, se procede a la inseminación de la reina (Figura 6). Para ello, el primer paso es la sedación de ésta mediante la aplicación de CO₂, evitando así movimientos que dificulten su manipulación. Mediante los ganchos dorsal y ventral se accede a la bolsa copuladora donde se encuentra el orificio vaginal. Aproximadamente se administra 8 µl de esperma obtenido de la mezcla de varios zánganos y se marca la reina. Una vez finalizado el proceso se introduce la abeja en la colmena y se coloca un excluidor de reina en la entrada de la colmena para evitar su salida e impedir que se produzcan vuelos de fecundación. Finalmente, hay que realizar un control para verificar que la reina ha sido inseminada correctamente. Esto se comprueba observando la puesta: el nacimiento de obreras confirma que la inseminación ha sido exitosa. De lo contrario, si la puesta es solo de zánganos nos indicaría que el esperma no se ha almacenado correctamente. Si se da este segundo caso, la reina se retirará del núcleo.



Figura 6. Inseminación artificial de una abeja reina. Fuente: Volker Steger, <https://fineartamerica.com/featured/bee-artificial-insemination-volker-steger.html>

Esta técnica hace posible realizar cruces que naturalmente tendrían poca probabilidad de darse y por lo tanto permite avanzar tanto en la cría como en la investigación. Pero, a pesar de que con una buena realización de la técnica de inseminación artificial las reinas pueden tener un rendimiento igual que una que ha sido inseminada naturalmente (Cobey *et al.*, 2013), este procedimiento es muy costoso y en la mayoría de las ocasiones no se obtienen los mismos resultados que con la cubrición natural. La alternativa para poder seleccionar los dos progenitores en un programa de mejora sería desarrollar metodologías de apareamiento natural controlado, como por ejemplo en estaciones de reproducción aisladas, realizando la suelta controlada de zánganos cuando se produce el vuelo nupcial de las abejas reinas, para lo que normalmente se colocan las colmenas que contienen los zánganos seleccionados a cierta distancia de la colmena donde se encuentra la reina, ya que ésta al realizar el primer vuelo se aleja de la colmena para aparearse. Para ello, sin embargo, hay que disponer de una herramienta que nos permita comprobar si los zánganos seleccionados son efectivamente los que se han apareado con la reina. Esta herramienta puede ser los marcadores moleculares, en concreto los microsatélites.

Los marcadores microsatélites, además de en los estudios de diversidad genética, se han empleado para el análisis de la paternidad en abejas (Estoup *et al.*, 1994), permitiendo por ejemplo caracterizar la variación en el tiempo de la composición en líneas paternas de las colonias (Brodschneider *et al.*, 2012) o el estudio de la competencia espermática de zánganos de distinto tamaño (Gençer *et al.*, 2020). En estos estudios se utilizaron un total de 9 marcadores microsatélite (Tabla 1), A29, A76, A107 y A124 (Brodschneider *et al.*, 2012), y A024, A43, A079, A113 y Ap226 (Gençer *et al.*, 2020).

Tabla 1. Loci microsatélite empleados en estudios de paternidad en *Apis mellifera*.

Locus	Cr.	Accesión	Tamaño	Motivo SSR
A029		AJ509245.1	140-150	(GT) ₂₄
A076		AJ509274	210-270	(CT) ₃₂ CATT(CT) ₂ CA(CT) ₃
A107	7	AJ509287	150-190	(GCTC) ₂ (GCT) ₂ (CT) ₂₃
AB124	13	AJ509292	250	(CT) ₈ (CT) ₁₄ (GGCT) ₈
A024	7	AJ509241	100	(CT) ₁₁
A043	3	AJ509256	140	(CT) ₁₂
A079	1	AJ509277	120	(GA) ₁₄
A113	6	AJ509290	220	(TC) ₅ TT(TC) ₈ TT(TC) ₅
Ap226		AJ509455	231	(CT) ₈

Para llevar a cabo el genotipado de las colonias es importante muestrear las abejas en estado de pupa para evitar errores. Se pueden genotipar zánganos para determinar el haplotipo de la reina y de esta forma descartar los alelos maternos entre los obtenidos de las obreras, o estimar los genotipos de los progenitores a partir de únicamente la información alélica de las obreras. Los análisis se pueden realizar mediante distintos programas estadísticos, aunque el más empleado es el *software* Colony, desarrollado por la Sociedad Zoológica de Londres (<https://www.zsl.org/science/software/colony>). Sin embargo, estas metodologías de asignación de paternidades mediante microsatélites no se han aplicado hasta la fecha en colonias de *A. m. iberiensis*.

2. Justificación y objetivos

La abeja negra ibérica (*Apis mellifera iberiensis*) es una subespecie endémica adaptada a los ecosistemas de la Península y aprovechada por sus aptitudes apícolas. Sin embargo, en los últimos años en algunas explotaciones se han introducido otras subespecies foráneas de *Apis mellifera* con unas supuestas mejores características productivas, lo que puede conllevar el desplazamiento de los ecotipos locales y la introgresión de genes que repercutan negativamente en la adaptabilidad de las abejas al medio. Para contrarrestar esta tendencia, y dado que en las explotaciones de la provincia de Huesca se mantiene el uso de la subespecie local, en la Escuela Politécnica Superior se están llevando a cabo proyectos de reproducción y selección de abeja negra ibérica, con el objetivo final de obtener colonias mejoradas que puedan ser competitivas frente a las introducciones procedentes de otros países europeos.

En el marco de un programa de mejora desarrollado en colaboración con apicultores locales, que conforman la Asociación Altoaragonesa para la Selección de la Abeja Negra Ibérica (ASAN) se cuenta con un conjunto de colonias seleccionadas por características de productividad y sanidad, y se pretende abordar en una siguiente fase la realización de cruzamientos controlados entre ellas. Ello requerirá realizar ensayos sobre posibles formas de cubrición natural de reinas con zánganos seleccionados. En este Trabajo Fin de Estudios se pretende poner a punto una metodología de tipificación molecular de abejas de la subespecie *A. m. iberiensis* mediante marcadores microsatélite que permitan discriminar las patrilíneas existentes en una colonia, de forma que se obtenga una herramienta útil con la que verificar la eficacia de los apareamientos controlados.

Por lo tanto, el objetivo de este TFE es diseñar un protocolo de amplificación por PCR de un panel de marcadores microsatélite capaz de discriminar las patrilíneas de una colmena. Para alcanzar este objetivo general se debe de abordar una serie de objetivos parciales:

- 1 – Optimización del protocolo de extracción de ADN a partir de pupas de *A. m. iberiensis*.
- 2 – Validación en *A. m. iberiensis* de los marcadores microsatélite aplicados al estudio de paternidades en abeja melífera descritos en la bibliografía.
- 3 – Selección de los mejores marcadores y amplificación de las muestras de 4 colonias.
- 4 – Análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

3. Material y métodos

3.1- Toma de muestras de *Apis mellifera iberiensis*

Se recogieron pupas de obreras y de zánganos de *A. m. iberiensis* durante los meses de febrero y marzo de 2022, en 4 colmenas (con los códigos de explotación 5, 6, 9 y 10) de un apiario experimental localizado en Aniés (Huesca). Este apiario cuenta con 40 colmenas de *A. m. iberiensis* con genealogía materna conocida. Las muestras se conservaron en tubos de plástico de 50 mL con etanol absoluto, debidamente etiquetados, a -20 °C hasta su utilización.

3.2- Aislamiento de ADN

Para la extracción del ADN de las pupas se siguió el mismo procedimiento tanto para obreras como zánganos, basado en un tampón con CTAB (Evans *et al.*, 2013), aunque con ligeras modificaciones para optimizar el proceso. En total se extrajo ADN de 24 pupas de obreras y de 8 pupas de zánganos de cada colmena. Se escogieron preferentemente las pupas que se encontraban en un estadio de desarrollo menos avanzado (Figura 7A), ya que esto facilitaba el proceso de triturado posterior (Figura 7B).

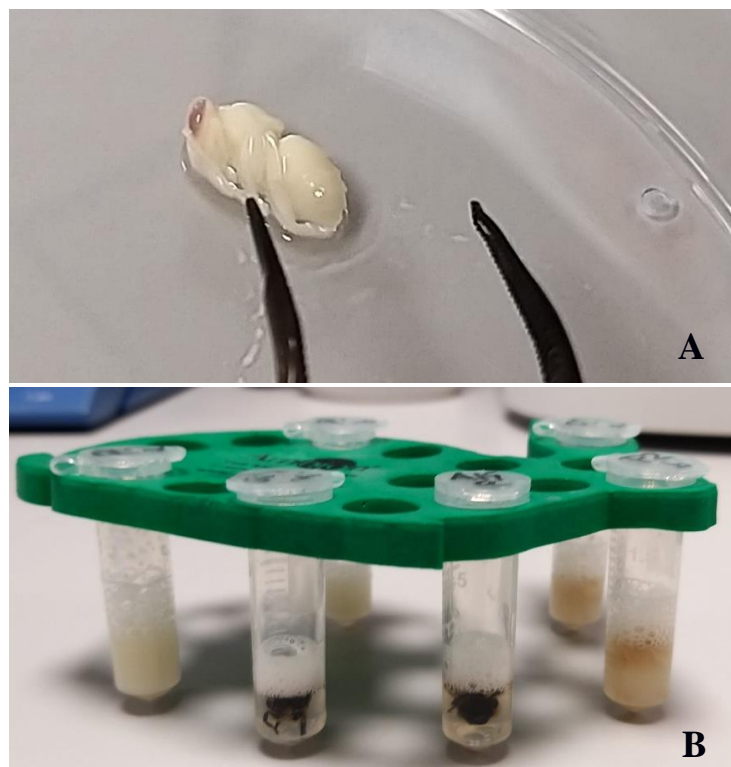


Figura 7. Muestra en forma de pupa empleada para extracción de ADN (A) y resultado de la homogenización de pupas en distintos estadios de desarrollo (B).

Para la extracción de ADN se usaron los tórax, que fueron escindidos de las pupas con pinzas y bisturí, esterilizados a la llama entre cada muestra para evitar contaminaciones. Se introdujo cada tórax en un tubo de 2 mL debidamente rotulado y se colocaron las muestras en la estufa a 37°C durante 20-30 minutos para evaporar el etanol.

A cada muestra de tórax seca se le añadieron 300 µL de tampón CTAB (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB) y 4 bolas de vidrio (2 mm Ø) y se trituró en un molino de bolas (Millmix 20 Domel, Zelezniki, Eslovenia) durante 1 min a 30 Hz. Una vez trituradas, se añadieron a cada muestra 400 µL de tampón CTAB, 3 µL de proteinasa K y 3 µL de ARNasa (Norgen Biotek, Canadá). Las muestras de homogenizaron usando un vórtex durante 5 segundos y se incubaron en un baño termoestable a 60 °C durante 3 horas, agitando los tubos con el vórtex cada media hora. A continuación, se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 10 min (a 10°C) y se transfirió el líquido sobrenadante a un nuevo tubo.

El sobrenadante se extrajo con una disolución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando mediante vuelco y manteniendo después las muestras a 4°C durante 2 min. Transcurrido este tiempo, se rescató la fase superior de las muestras tras centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min (a 10°C). A la fase acuosa extraída se le añadió 1V de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló mediante vuelco, se centrifugó de nuevo (130000 rpm x 5 min, 10°C) y se rescató nuevamente la fase superior acuosa, que fue transferida a un nuevo tubo de 1,5 mL. Se añadieron entonces a cada muestra 30 µL de acetato sódico 3M y 325 µL de isopropanol frío. Se agitaron las muestras en el vórtex durante 10 segundos y se incubaron a -20°C durante al menos 30 minutos. Para separar el ADN se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se descartó el líquido sobrante. Se lavó el pellet de ADN con 500 µL de etanol frío al 75%, se centrifugaron las muestras (13.000 rpm x 3 minutos, 4 °C) descartando el líquido. Tras este paso se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos y se disolvieron en 50 µL de H₂O ultrapura.

Las muestras de ADN así obtenidas se conservaron a -20°C hasta su utilización. La calidad y cantidad de ADN presente en las muestras se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Se prepararon alícuotas de las 128 muestras extraídas a una concentración de 100 ng/µL.

3.3.- Amplificación de loci microsatélite

Se amplificaron un total de 9 loci microsatélite descritos en *Apis mellifera* para la determinación de paternidades. En concreto se ensayaron los marcadores A029, A076, A107, AB124 (Brodschneider *et al.*, 2012) y los marcadores A024, A043, A079, A113, Ap226 (Gençer *et al.*, 2020). Los cebadores empleados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación de 9 loci microsatélite descritos en *Apis mellifera*. Ta, temperatura de anillado.

Locus	Cebador directo	Cebador reverso	Ta (°C)
A029	AAACAGTACATTTGTGACCC	CAACTTCAACTGAAATCCG	55
A076	GCCAATACTCTCGAACAATG	GTCCAATTCACATGTCGACATC	60
A107	CCGTGGGAGGTTTATTGTCG	CCTTCGTAACGGATGACACC	55
AB124	GCAACAGGTCGGGTTAGAG	CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG	55
A024	CACAAGTTCCAACAATGC	CACATTGAGGATGAGCG	55
A043	CACCGAAACAAGATGCAAG	CCGCTCATTAAGATATCCG	55
A079	CGAAGGTTGCGGAGTCCTC	GTCGTCGGACCGATGCG	60
A113	CTCGAATCGTGGCGTCC	CCTGTATTTTGCAACCTCGC	60
Ap226	AACGGTGTTCGCGAAACG	AGCCAACCTCGTGC GG TCA	55

Los 9 pares de cebadores se probaron inicialmente usando muestras de ADN de 4 abejas obreras (una de cada colmena), de un zángano y una muestra control aislada de una obrera adulta en un estudio anterior. Las condiciones de amplificación por PCR para los 9 loci fueron: desnaturalización 95°C x 5 min, seguida de 35 ciclos de 3 pasos a 95°C x 30 s + 55 o 60°C x 30 s + 72°C x 1 min, con una extensión final a 72°C x 7 min. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10 µL, con 0,2 µM de dNTPs 0,2 µM de cada cebador, 0,5 U de KapaTaq Polimerasa (KapaBiosystems, EEUU) y 100 ng de ADN. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EEUU).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de tampón TBE (0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico, 20 mM EDTA) con 3% de agarosa LE (Iberlabo, España), que fueron posteriormente teñidos con bromuro de etidio para la visualización de los fragmentos. Se empleó como referencia un marcador de pesos moleculares (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Una vez seleccionados los cebadores útiles, las amplificaciones de este estudio se realizaron para un total de 128 individuos y 6 loci microsatélite (A024, A029, A079, A107, A113 y Ap226) empleando los cebadores descritos, pero tras marcar los cebadores directos con diferentes fluoróforos (A024F-NED, A029F-FAM, A079F-HEX, A107F-HEX, A113-FAM y Ap226-FAM). Los productos obtenidos se combinaron en función de los tamaños amplificados y los fluoróforos seleccionados, en dos mixes (mix A: A024, A107 y Ap226; mix B: A029, A079 y A113) para simplificar la electroforesis capilar, que se realizó en el Servicio de Genómica de la Universidad de Valencia (SCSIE-UV).

3.4.- Análisis de los marcadores

Los electroferogramas obtenidos para cada mix de 3 loci SSR se analizaron con el *software* Geneious R8 (Geneious® 8.0.3, Biomatters Ltd., Nueva Zelanda, Kearse *et al.*, 2012), para determinar los tamaños de los alelos presentes en cada individuo para cada locus.

Para el análisis de los electroferogramas, se seleccionaron todas las muestras de cada colmena, siendo el primer paso a realizar la alineación de las escalas, y en el caso de ser necesario la adición o eliminación de algún punto para calibrarlas. Una vez alineadas, se fueron seleccionando los marcadores a estudiar, y se compararon una a una las muestras para determinar cuál era con exactitud el tamaño de cada uno de los alelos. Los datos totales obtenidos se dispusieron en una tabla excel donde se buscaron posibles errores cometidos en las mediciones. Los tamaños de los fragmentos obtenidos a partir de las muestras de zánganos se emplearon para deducir los genotipos de las abejas reinas de cada colmena, mientras que los patrones amplificados a partir del ADN de las 24 obreras de cada colonia se dispusieron en 4 matrices, para su análisis mediante el *software* Colony (Zoological Society of London, Reino Unido). El análisis de cada colmena se realizó especificando las características de los datos: madres polígamas y padres monógamos, especie haplodiploide, así como el genotipo de la madre.

Finalmente, se usó el *software* Darwin 6.0 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) para obtener un dendrograma con las distancias genéticas existentes entre las obreras. En primer lugar, el programa se empleó para estimar el coeficiente de disimilitud entre pares de obreras de las 4 colmenas (96 individuos), en base a la falta de coincidencia entre los alelos determinados y, en segundo lugar, se empleó para construir un dendrograma NJ (*Unweighted Neighbor Joining*) que agrupara los individuos en función de la distancia estimada.

4.- Resultados y discusión

Inicialmente, para la extracción del ADN de las pupas de abejas, en concreto de los tórax, se siguió el protocolo de extracción CTAB descrito por Evans *et al.* (2014). Sin embargo, fue preciso realizar algunas modificaciones, ya que este protocolo fue diseñado para la extracción de ADN de abejas adultas, y las muestras obtenidas a partir de pupas no tenían suficiente calidad (ratios de absorción a 260 nm respecto a la absorción a 280 nm del orden de 1,4).

Tras varias pruebas, se pudieron obtener finalmente muestras de suficiente calidad para la amplificación por PCR, con ratios A260/A280 > 2,0 (Tabla 3), cuando se añadió el tampón CTAB en dos partes: primero se añadieron 300 µL de tampón junto con 4 bolas de vidrio, para homogenizar las muestras en el molino de bolas. Tras dicha homogenización se añadieron otros 400 µL de tampón, 3 µL de proteinasa K y 3 µL de ARNasa. De esta forma, se evitaba la formación de espuma y se podía recoger suficiente cantidad de sobrenadante limpio (500 µL) tras la centrifugación. En promedio se obtuvieron rendimientos de 1733 ng/µL (Tabla 3), aunque fue necesario también aumentar el tiempo de incubación en baño maría, de 2 a 3 horas.

Tabla 3. Rendimiento y calidad de las muestras de ADN (media ± desviación típica) extraídas de pupas de 24 obreras y de 8 zánganos de 4 colmenas. Cantidad expresada en ng/µL y calidad en ratios A260/A280.

	Colmena 5		Colmena 6		Colmena 9		Colmena 10	
	Cantidad	Calidad	Cantidad	Calidad	Cantidad	Calidad	Cantidad	Calidad
Obreras	1529 ± 313	2,15±0,03	1837 ± 339	2,08±0,03	1361 ± 488	2,10±0,04	1293 ± 542	2,06±0,2
Zánganos	2160 ± 238	2,06±0,06	2355 ± 192	1,95±0,09	1529 ± 466	2,17±0,06	1806 ± 418	2,13±0,03

Cuando se ensayaron los 9 pares de cebadores descritos en la bibliografía usando 5 muestras de ADN de abejas negras ibéricas, se obtuvieron productos amplificados con los cebadores A024, A029, A079, A107, A113 y Ap226, correspondiéndose con los tamaños esperados descritos en las referencias, (Tabla 1, Figura 8). Para los loci A043 y A076 no se obtuvo ningún producto amplificado, mientras que para el locus AB124 se obtuvieron patrones de amplificación inespecíficos. Por lo tanto, se seleccionaron los primeros 6 loci microsatélite para realizar el estudio en todas las muestras. Que varios de los marcadores no amplificasen en las muestras de *A. m. iberiensis*, puede deberse a que, hasta el momento, todos los estudios realizados con estos marcadores no habían sido realizados en esta subespecie, ya que Brodschneider *et al.* (2012) estudiaron los marcadores en *A. m. carnica*, Gençer *et al.* (2020) para *A. m. caucasica* y Estoup *et al.* (1994) realizaron su estudio con *A. m. mellifera*, por lo que puede haber variación en las secuencias correspondientes a algunos cebadores.

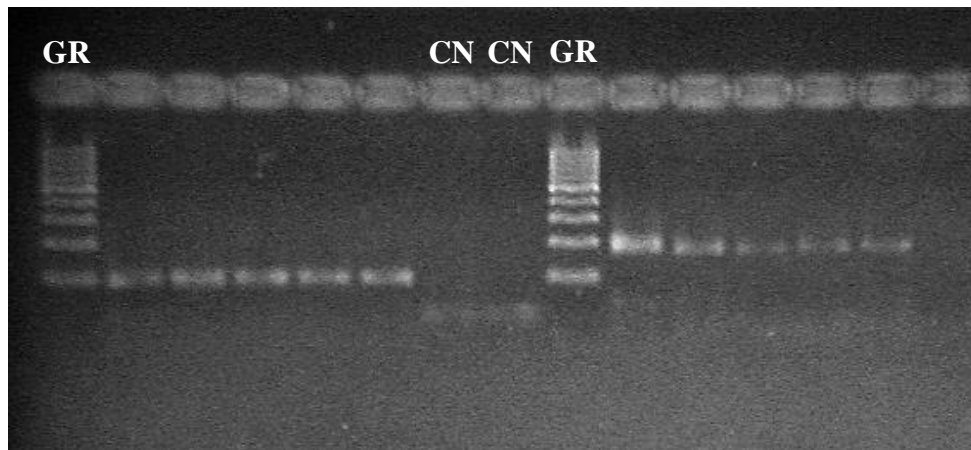


Figura 8. Electroforesis de los productos obtenidos mediante las amplificaciones del ADN de 4 abejas obreras (5-O1, 6-O1, 9-O1 y 10-O1) y un zángano (6-Z1) para los loci A024 (izquierda) y A107 (derecha). GR, Gene Ruler 100 bp Ladder; CN, control negativo.

Una vez seleccionados los marcadores a emplear, se realizaron las amplificaciones de todas las muestras con los cebadores directos marcados con fluoróforos y tras el análisis de los electroferogramas, se observó que los resultados obtenidos en los marcadores A024 y A079, no concordaban con los descritos en la bibliografía. Para el marcador A024 se esperaban unos tamaños de unas 100 pb y en el caso de A079, de 120 pb (Tabla 1), mientras que en las PCR la mayor parte de las muestras mostraban un producto de 92 pb. Tras revisar los electroferogramas se consideraron estos resultados como amplificaciones fallidas y se descartaron ambos marcadores. Finalmente, en el estudio se usaron por tanto los marcadores A029, A107, A113 y Ap226. La Figura 9A corresponde a un electroferograma del mix A, en el que se muestran los alelos obtenidos para los marcadores A107 (verde) y Ap226 (azul), mientras que la Figura 9B muestra los alelos obtenidos para los marcadores A029 (izquierda) y A113 (derecha).

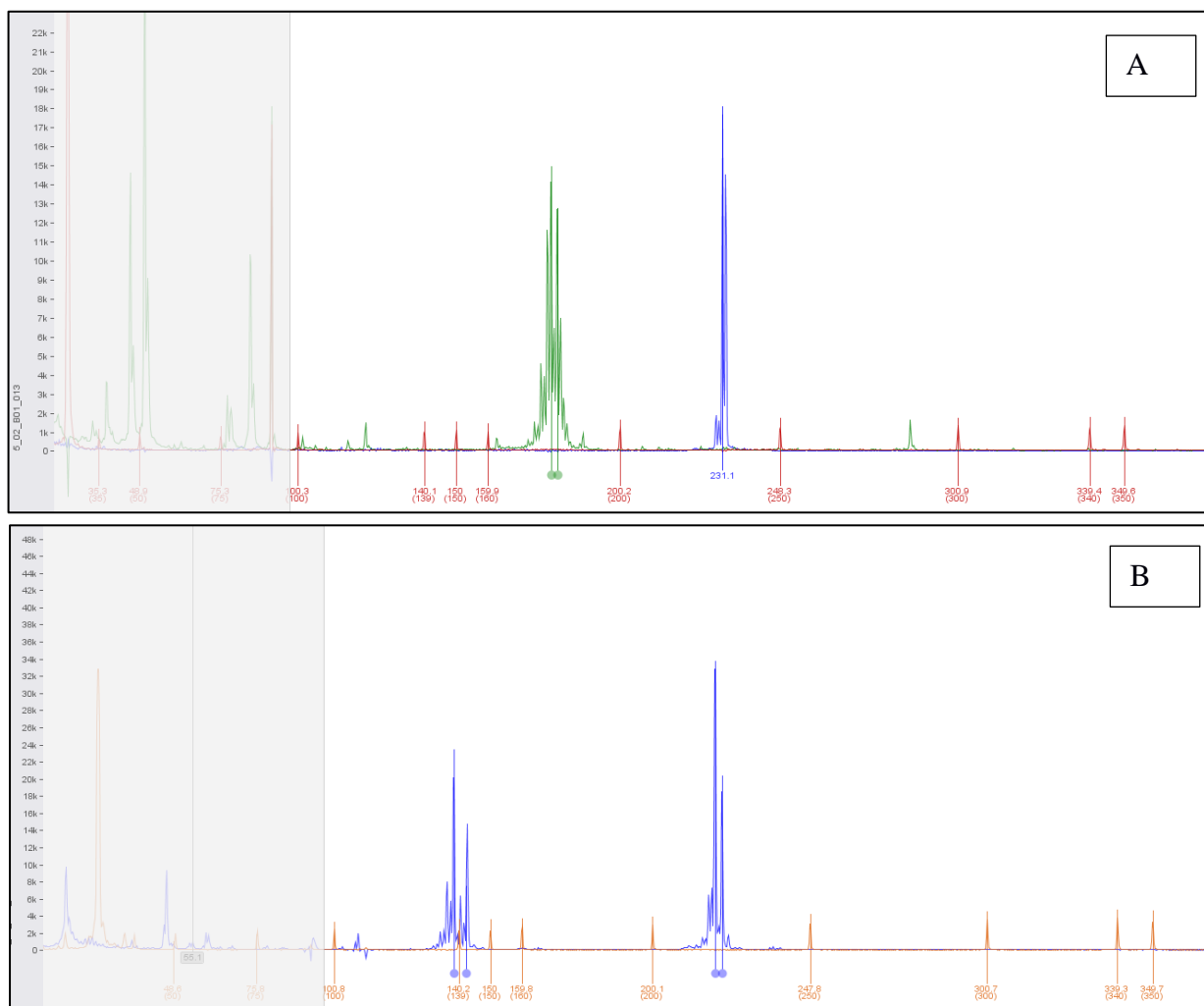


Figura 9: Electroferogramas visualizados mediante el software Geneious R8 resultado de la amplificación del ADN de una abeja negra obrera (*Apis mellifera iberiensis*) de la colmena 5 incluida en el estudio, para el mix A, con los marcadores microsatélite A107 (verde) y Ap226 (azul) (A) y para el mix B, con los marcadores A029 (izquierda) y A113 (derecha) (B).

Gracias a la amplificación de las muestras de ADN de los zánganos de cada colmena fue posible la determinación de los genotipos de las reinas correspondientes, ya que, al tratarse de individuos haploides, con el estudio de un número suficiente de ellos, en este caso 8 por colmena, es posible determinar los dos alelos que han heredado de la madre (Tabla 4).

Tabla 4. Alelos determinados en 4 reinas de *Apis mellifera iberiensis* muestreadas en 4 colmenas de un apiario localizado en Aniés (Huesca) para 4 loci microsatélite (A029, A107, A113 y Ap226).

Reina	A029		A107		A113		Ap226	
5	136	138	179	164	219	221	232	234
6	142	146	169	179	219	223	232	244
9	138	146	171	173	219	223	232	244
10	136	162	169	171	219	221	232	234

Una vez determinados los genotipos de las reinas de cada colmena, el análisis de la matriz de alelos de las 24 obreras muestreadas mediante el software Colony permitió determinar los alelos paternos, y de esta forma diferenciar patrilíneas en cada colonia (Tabla 5). El número de patrilíneas encontradas osciló entre 8 y 12, resultados comparables a los obtenidos por Estoup *et al.*, (1994), ya que en un primer ensayo analizaron un total de 211 obreras de la misma colmena, tomando muestras en tres años consecutivos (1992-1994) obteniendo en total 12 patrilíneas diferentes. Además, se añadió un segundo ensayo, en el cual se muestrearon obreras de cuatro colmenas diferentes, con 287 obreras en total, obteniéndose entre 7 y 20 patrilíneas por colmena. Que se obtuvieran valores cercanos en este trabajo demuestra que el número de muestras usado puede ser suficiente para obtener unos resultados aceptables, aunque no se puede afirmar que estos genotipos sean los únicos presentes en las colmenas, ya que para corroborarlo probablemente sería necesario ampliar el número de muestras analizadas.

Tabla 5. Número de alelos observados para cada marcador microsatélite (A029, A107, A113 y Ap226) y número de padres detectados en 4 colmenas de abeja negra ibérica (*Apis mellifera iberiensis*) pertenecientes a un apiario ubicado en Aniés (Huesca).

Colmena	Número de alelos diferentes				Número de padres
	A029	A107	A113	Ap226	
5	6	6	2	2	11
6	8	7	2	3	12
9	6	5	2	2	8
10	6	6	3	3	10
Total	10	13	4	3	

Los marcadores más polimórficos en el estudio completo fueron A107 (13 alelos) y A029 (10 alelos), mientras que para los marcadores A113 y Ap226 se encontraron 4 y 3 alelos. Estos resultados fueron similares al descrito por Solignac *et al.* (2003) para el marcador Ap226, ya que en poblaciones del linaje M, se obtuvo el mismo número de alelos que en el presente estudio. Es decir, se trata de un marcador no muy polimórfico, al igual que ocurre en nuestro estudio con el marcador A113, para el cual, basándonos en el estudio mencionado, era de esperar más variabilidad, ya que para el linaje M se encontraron 8 alelos diferentes, y en el estudio de Gençer *et al.* (2020) se encontraron 11 alelos. Aunque la variabilidad alélica encontrada para los marcadores A107 y A029 es más elevada, comparada con el estudio de Estoup *et al.* (1994) el número de alelos detectado es menor. En dicho estudio para el marcador A107 se encontraron 22 alelos diferentes, en contraste con los 13 hallados en nuestro estudio, y para A029 encontraron 13, lo que no difiere tanto de los datos obtenidos en nuestro trabajo. A pesar de todo esto, que se hayan encontrado casi el mismo número de alelos que en la bibliografía, nos indica que se trata de una población de abejas donde hay mucha variabilidad, ya que el número de muestras analizadas en este trabajo es mucho menor que en los estudios realizados con otras subespecies de *Apis mellifera*. En el trabajo de Gençer *et al.* (2020) el número de obreras estudiado fue de 908, pertenecientes a 15 colmenas diferentes; Estoup *et al.* (1994) realizaron su estudio con 287 obreras que pertenecían a 4 colmenas diferentes, y Solignac *et al.* (2003) estudiaron tres linajes diferentes con 28 individuos por cada uno. Por otro lado, los individuos analizados en este trabajo proceden de un número menor de colmenas, que además se encuentran en el mismo apiario y forman parte de un programa de mejora genética, por lo que han sido seleccionadas. En concreto, las reinas de las colmenas 6 y 9 provienen de una misma línea de selección de reinas, y estas dos junto con la de la colmena 5 procedían del mismo apicultor. Por lo tanto, la única reina que no procedía de la misma línea de selección era la de la colmena 10. En base a ello, cabría esperar una menor variabilidad en los alelos, ya que las abejas probablemente fuesen genéticamente próximas. Sin embargo, la variación alélica encontrada permitió discriminar patrilíneas en las colmenas, por lo que los 4 marcadores fueron suficientemente informativos para el objetivo del trabajo aunque, como se ha mencionado, no se puede afirmar que el número estimado de patrilíneas se efectivamente el número total existente en la colonia.

En el estudio de Brodschneider *et al.* (2012) se emplearon también 4 marcadores, mientras que en el de Gençer *et al.* (2020) se emplearon 5 marcadores. Por otro lado, en el estudio de (Estoup *et al.*, 1994), a pesar de que en el primer ensayo se usaron 10 marcadores diferentes, los autores refirieron que únicamente con el marcador hiper variable A076 o con el A107 en combinación con el A014, era posible determinar las 12 patrilíneas presentes en el primer muestreo realizado. De todo esto se puede deducir que para este tipo de estudios es importante escoger los marcadores más polimórficos para cada caso, porque esto puede suponer que se pueden diferenciar patrilíneas con menos amplificaciones. Sin embargo, en nuestro trabajo cuando se analizaron los resultados obtenidos únicamente para los dos loci más polimórficos, para la colmena 5 se hallaron 10 patrilíneas, es decir, una menos que con los 4 marcadores y para la colmena 10, se distinguieron 8 en lugar de 10. En los análisis de las colmenas 6 y 9 con solo 2 marcadores, en cambio, se discriminaron los mismos números de patrilíneas que en el análisis con 4 marcadores, 12 y 8 patrilíneas respectivamente. Por

lo tanto, aunque sí que sea importante escoger marcadores muy polimórficos, en algunos casos, como es el de este estudio, es necesario disponer de marcadores suficientes para no perder información en los ensayos.

Finalmente, gracias a que se disponía de información sobre el genotipo de las madres, fue posible determinar cuáles eran los genotipos de los padres de cada colonia (Tabla 6). De esta forma, en futuros trabajos de fecundación controlada sería posible comprobar si los zánganos de una colmena seleccionada como progenitor paterno son efectivamente los que han fecundado a la reina de la colonia seleccionada como progenitor femenino.

Tabla 6. Genotipos para 4 marcadores microsatélite (A029, A107, A113 y Ap226) de zánganos que fecundaron las reinas de 4 colmenas de abeja negra ibérica (*Apis mellifera iberiensis*) muestreadas en Aniés (Huesca).

Padre	Colmena 5				Colmena 6			
	A029	A107	A113	Ap226	A029	A107	A113	Ap226
1	136	187	219	234	140	161	219	244
2	138	181	219	232	148	163	219	232
3	138	163	219	234	154	179	219	232
4	136	179	219	232	136	175	219	232
5	142	163	219	234	138	175	219	232
6	142	164	219	234	138	177	219	232
7	136	167	219	232	144	181	219	232
8	142	163	219	244	146	181	219	244
9	146	187	219	232	142	179	219	232
10	150	187	219	234	146	163	219	232
11	154	187	219	232	138	179	219	244
12					146	179	219	232

Padre	Colmena 9				Colmena 10			
	A029	A107	A113	Ap226	A029	A107	A113	Ap226
1	144	177	219	244	142	175	219	244
2	138	177	219	244	138	165	219	232
3	142	173	219	232	136	175	219	232
4	138	171	219	232	142	167	227	244
5	140	171	219	244	150	177	221	244
6	136	165	219	244	148	165	221	232
7	140	169	219	232	148	175	219	244
8	136	177	219	244	138	165	221	234
9					138	165	219	244
10					140	171	221	244

Los resultados obtenidos mostraron que los padres de las obreras de las distintas colmenas compartían alelos para los 4 loci microsatélite, particularmente para los dos menos polimórficos, A113 y Ap226, lo que impediría discriminar entre abejas pertenecientes a distintas colmenas basándonos solamente en estos genotipos. El caso más evidente es el del marcador Ap226, para el que solo se determinó un alelo en las 72 obreras de las colonias 5, 6 y 9 (Tabla 6).

Para corroborar este hecho, se construyó un dendrograma (método de agrupamiento *Unweighted Neighbor-Joining*) con las distancias genéticas calculadas entre las obreras de las cuatro colmenas (Figura 10). En este dendrograma no se agruparon los genotipos de las 96 obreras de acuerdo a su colonia de origen. Estos resultados se explican por el manejo de las reinas en el programa de mejora, ya que, como se ha mencionado, de una misma reina derivaron las reinas de las colmenas 6 y 9. La colmena 10, por el contrario, se formó con una reina no emparentada con las anteriores, pero debido a que se encuentran en la misma explotación, los zánganos que la fecundaron pudieron proceder de las mismas colonias.

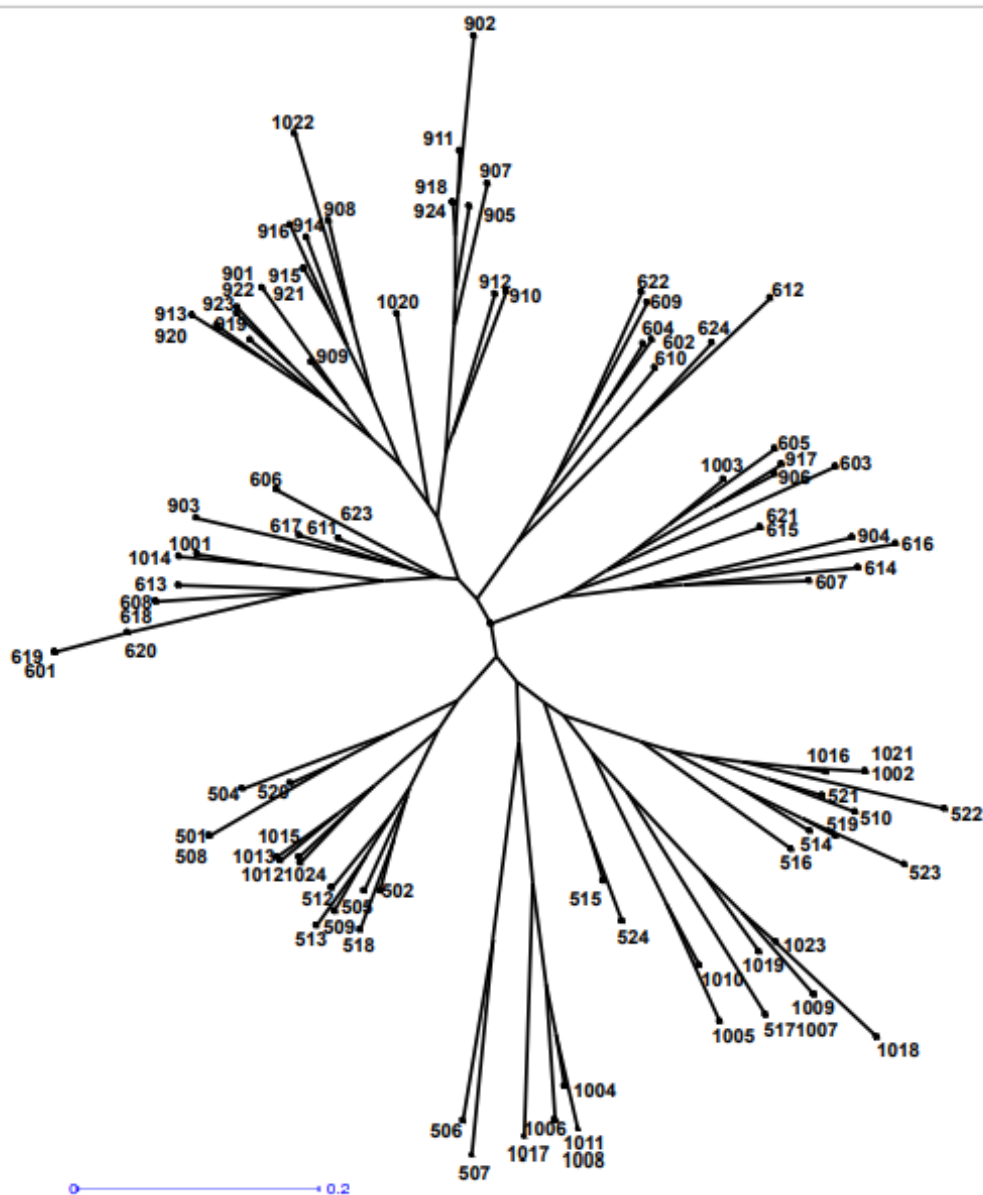


Figura10. Dendrograma *Neighbor-Joining* que muestra la agrupación de 96 abejas obreras de la subespecie *Apis mellifera iberiensis* incluidas en el estudio, en base a la variabilidad alélica detectada en 4 loci microsatélite. Cada individuo está codificado por el número de la colmena (5, 6, 9 o 10) seguido de un número de orden (1-24).

Para una caracterización mejor de las colonias sería por tanto necesario emplear un mayor número de marcadores. Sin embargo, para el objetivo planteado en este trabajo, 4 marcadores han permitido discriminar patrilineas en 4 colmenas de abeja negra ibérica.

5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Para la obtención de muestras de ADN de suficiente calidad a partir de pupas de abejas y zánganos fue preciso modificar el protocolo estandarizado para obtener muestras a partir de abejas adultas. En concreto se empleó mayor cantidad de tampón de extracción y mayor tiempo de incubación.
2. De los 9 marcadores microsatélite ensayados, no se obtuvieron los productos esperados en 3 loci: A043, A076 y AB124, y posteriormente también los marcadores A024 y A079 fueron descartados. Los marcadores útiles para el genotipado de abeja negra ibérica fueron por tanto A029, A107, A113 y Ap226.
3. El genotipado de 8 zánganos de cada colmena permitió caracterizar los alelos maternos de las 4 reinas de las colonias analizadas. El genotipado de 24 obreras, por otro lado, permitió discriminar los alelos paternos. En base a ellos, se reconstruyó el genotipo de zánganos que habían fecundado a cada reina. Para la colmena 5 se encontraron 11 padres diferentes, en la colmena 6 fueron 12, para la colmena 9 se detectaron 8 y finalmente en la colmena 10 se diferenciaron 10 patrilíneas.
4. En el estudio realizado, el número de alelos observado varió para cada marcador microsatélite. Para el marcador A029 se encontraron un total de 10 alelos diferentes, para el A107 un total de 13, en el caso de A113 se detectaron 4 alelos y para Ap226 un total de 3 alelos. Los marcadores más polimórficos fueron por tanto A029 y A107.
5. Aunque en estudios anteriores se pudieron discriminar patrilíneas en colmenas de *Apis mellifera* con un menor número de marcadores, en este trabajo cuando se analizó la composición genética de las colmenas usando solo los alelos de los dos loci más polimórficos se detectaron menos patrilíneas en dos de las cuatro colonias del estudio. Por tanto, es importante disponer de los 4 marcadores para futuros trabajos.
6. La variación alélica observada, sin embargo, no permitió diferenciar las 4 colmenas en un dendrograma *Neighbor-Joining*, ya que las abejas de distintas colonias compartieron muchos de los alelos detectados.

6.- Bibliografía

- Arranz J.J., Coppieters W., Berzi P., Cambisano N., Grisart B., Karim L., Marcq F., Moreau L., Mezer C., Riquet J., Simon P., Vanmanshoven P., Wagenaar D., Georges M. (1998) A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. *Animal Genetics* 29: 107-115.
- Bailey L., Ball B. V. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press; London, UK, segunda edición 193pp.
- Benedetti L., Pieralli L. (1990). *Apicultura*. Barcelona: Omega.
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M.K., Page R.E., Omholt S.W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. 114: 419-429.
- Bravo L., Bustos M., Cobo A., Espinosa E., Flores M., Flores J. M., Gijón H., Giordani G., Josa A., Llorente J., Martín E., Navarro C. J., Padilla F., Pellín P., Puerta F., Romero P., Santidrián S., Serrano I., Usón J., Writter W. (1989). *Cursos de apicultura: Temas teóricos básicos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Brodschneider R, Arnold G, Hrassnigg N, Crailsheim K. (2012). Does patriline composition change over a honey bee queen's lifetime? *Insects*. 3:857-869.
- Büchler R., Andonov S., Bienefeld K., Costa C., Hatjina F., Kezic N., Kryger P., Spivak M., Uzunov A., Wilde J. (2013). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*. 52: 1-30.
- Cánovas F., de la Rúa P., Serrano J., Galián J. (2008). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 46: 24-30.
- Chen C., Liu Z., Pan Q., Chen X., Wang H., Guo H., Liu S., Lu H., Tian S., Li R., Shi W. (2016). Genomic analyses reveal demographic history and temperate adaptation of the newly discovered honey bee subspecies *Apis mellifera sinixinyuan* n. ssp. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1337–1348.
- Cheng H. H., Crittenden L. B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry science*. 73: 539–546.

- Chofre A. (4 diciembre 2019). Reinas, obreras y zánganos. El blog de la genotipia. <https://genotipia.com/genetica-abejas/>
- Cobey S., Tarpy D., Woyke J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*. 52: 1-18.
- Delaplane K. (1 de mayo de 2018). El escurridizo génesis de *Apis mellifera*. *American bee journal*. <https://americanbeejournal.com/the-elusive-genesis-of-apis-mellifera/>
- De la Rúa. (1999). Variabilidad genética, análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de *Apis mellifera* (Linneo 1758) (Hymenoptera: Apidae). Universidad de Murcia. Departamento de Biología Animal.
- De la Rúa P., Acosta J.A., Sánchez O., Muñoz I. (2013). Caracterización molecular de la biodiversidad de la cabaña apícola de la provincia de Albacete. *Sabuco* 9: 175-196.
- Ellis J.D., Evans J. D., Pettis J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*. 49: 134- 136.
- Estoup A., Solignac M., Cornuet J.M. (1994). Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in Honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society*. 258: 17.
- Evans J., Budge G.E., Schwarz R.S., De la Rúa P. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 52: 10-12.
- Garnery L., Cornuet, J.M., Solignac M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*. 1: 145-154.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J., Solignac M. (1998). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*. 30: 49-74.
- Gempe T., Hasselmann M., Schiøtt M., Hause G., Otte M., Beye M. (2009). Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PloS Biology*. 7: e1000222.
- Gençer H.V., Kahya Y. (2020). Sperm competition in honey bees (*Apis mellifera* L.): the role of body size dimorphism in drones. *Apidologie*. 51: 1–17.

- Goldstein B. D., Schlotterer C. (1999). Microsatellites evolution and applications. Oxford University Press, New York. 352pp.
- Hermoso de Mendoza, M. (1996). Bacteriosis y virosis apícolas. *Agroforum*. 9: 27-30.
- Imai K., Matsughige T., Watanabe T., Sugimoto Y., Ihara N. (2007) Mapping of a quantitative trait locus for beef marbling on bovine chromosome 9 in purebred Japanese black cattle. *Animal Biotechnology*. 18: 75-80.
- Jay M Iwasaki., Katja Hogendoorn. (2021). How protection of honey bees can help and hinder bee conservation. *Current Opinion in Insect Science*. 46:112–118.
- Jean-Prost P., Le, C. Y. (2007). Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena (4a. ed.).
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thiere T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28:1647–1649.
- Klein Alexandra María, Vaissiere Bernard E., H, Steffan Dewenter Ingolf, Cunningham Saúl A, Claire Kremený Tschardt Teja. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society*. 274: 303–313.
- Koeniger N., Koeniger G. (1991). An evolutionary approach to mating behavior and drone copulatory organs in Apis. *Apidologie*. 23: 581-590.
- Le Conte Y., Ellis M., Ritter W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*. 41: 353-363.
- MAPA 2021a. PROGRAMA DE VIGILANCIA SOBRE LAS PÉRDIDAS DE COLONIAS DE ABEJAS 2021-2022 <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/otras-enfermedades-abejas/otras-enf-abejas.aspx>
- MAPA 2021b. Toma de muestras: claves para la fiabilidad de los resultados. En: Taller de formación sobre el Programa de Vigilancia. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/otras-enfermedades-abejas/otras-enf-abejas.aspx>
- Martin-Burriel I., Rodellar C., Lenstra J.A., Sanz A., Cons C., Osta R., Reta M., De Arguello S., Zaragoza P. (2007) Genetic Diversity and Relationships of Endangered Spanish Cattle Breeds. *J Hered*.

- Meixner M.D., Leta M.A., Koeniger N., Fuchs S. (2011). The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*-*Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie*. 42: 425–437.
- Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J. D. Ellis; P. Neumann (Eds). *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research*. 52.
- Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L., Estonba A. (2010). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*. 42: 150-161.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 51: 263–273.
- Muñoz I. (2013). Variación genética y conservación de poblaciones de *Apis mellifera* L. Universidad de Murcia. Área de Biología Animal. Departamento de Zoología y Antropología Física.
- Page R. E., Jr, Rueppell O., Amdam, G. V. (2012). Genetics of reproduction and regulation of honeybee (*Apis mellifera* L.) social behavior. *Annual review of genetics*. 46: 97–119.
- Péntek-Zakar E., Andrzej O., Borowik T., Kusza S. (2015). Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecology and Evolution*. 5: 5456-5467.
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006). DARwin software <https://darwin.cirad.fr/>
- Rinderer T.E. (1986). *Bee genetics and breeding*. Academic Press, Inc.
- Sanz A., Uffo O., Miranda I. Martínez S. (2002). Empleo de los microsatélites para determinar paternidad en bovinos cubanos. *Revista Salud Animal*. 24: 166-9.
- Sebastián E., Borracci Lic., Pablo A. Chacana., Alejandra Palacio., Horacio R. Terzolo. (2004). *Loque americana de las abejas. Características y diagnóstico de la enfermedad*. INTA Balcarce.
- Sepúlveda Gil J. (1986). *Apicultura*. Barcelona: Aedos.
- Sheppard W.S, Meixner M.D (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*. 34: 367–375.

- Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2022). El sector apícola en cifras. Principales indicadores económicos. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado. 4: 1-7
- Stallings R. L., Ford A. F., Nelson D., Torney D. C., Hildebrand C. E., Moyzis R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*. 10: 807–815.
- Tapio I., Varv S., Bennewitz J., Maleviciute J., Fimland E., Grislis Z., Meuwissen T.H., Miceikiene I., Olsaker I., Viinalass H., Vilkki J. Kantanen J. (2006) Prioritization for conservation of northern European cattle breeds based on analysis of microsatellite data. *Conservation Biology*. 20, 1768-79.
- Tarpy D.R., Nielsen D.I. (2002). Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 95: 513-528.
- Tarpy D.R., Nielsen R., Nielsen D.I. (2004). A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in Apis. *Insectes Sociaux*. 51:203–4.
- Tautz D. (1989) Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Research*. 17: 63-71.
- Vicente M. (2016). Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Memoria de Tesis doctoral. Madrid, España.
- Wallberg A., Han F., Wellhagen G., Dahle B., Kawata M., Haddad N. (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*. 46: 1081-1090.
- Weber J.L., May P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 44: 388-96.
- Yániz J., Ángel E., Martín P., Sales E., Santolaria P. (2016). Caracterización de la abeja melífera en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada*. 18: 257-271.