



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE *Apis mellifera*
PROVENIENTES DE COLMENAS LOCALIZADAS EN LAS PROVINCIAS DE
PICHINCHA, IMBABURA Y CARCHI – ECUADOR.**

AUTORA: ACOSTA VÁSQUEZ JONATHAN ALEXANDER

DIRECTOR: RON ROMÁN JORGE, PhD.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE *Apis mellifera* PROVENIENTES DE COLMENAS LOCALIZADAS EN LAS PROVINCIAS DE PICHINCHA, IMBABURA Y CARCHI – ECUADOR.**” fue realizado por el señor **ACOSTA VÁSQUEZ, JONATHAN ALEXANDER** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 4 de Diciembre del 2018

Una firma manuscrita en tinta azul que dice 'Jorge Ron Román'.

Jorge Ron Román, Ph.D.

DIRECTOR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **JONATHAN ALEXANDER ACOSTA VÁSQUEZ**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE *Apis mellifera* PROVENIENTES DE COLMENAS LOCALIZADAS EN LAS PROVINCIAS DE PICHINCHA, IMBABURA Y CARCHI – ECUADOR”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 4 de Diciembre del 2018

A blue ink signature of Jonathan Alexander Acosta Vásquez, consisting of several loops and a long horizontal stroke.

.....
Jonathan Alexander Acosta Vásquez

CI: 1725014201



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

*Yo, **JONATHAN ALEXANDER ACOSTA VÁSQUEZ** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE Apis mellifera PROVENIENTES DE COLMENAS LOCALIZADAS EN LAS PROVINCIAS DE PICHINCHA, IMBABURA Y CARCHI – ECUADOR**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad*

Sangolquí, 4 de Diciembre del 2018

.....
Jonathan Alexander Acosta Vásquez

CI: 1725014201

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, hermanos y hermana, amigos y todos aquellos que han hecho de mi vida algo especial.

Jonathan

AGRADECIMIENTO

Al final de este recorrido, quisiera agradecer primero a mis padres Mandina y Marco por todo el apoyo, el amor y comprensión; además de agradecer todos los consejos recibidos de su parte, las mismas que me ayudaron a ser mejor persona. Agradezco también a mis hermanos Leslie, Marco y Luis; y a mi sobrina Joley, por la paciencia y por estar presentes en todo momento.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE y al Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana por financiar este trabajo de titulación. A todos aquellos docentes e investigadores que forman parte del Laboratorio de Biotecnología Animal, por permitirme realizar mi trabajo de investigación en el mismo.

A mi director de tesis, Dr. Jorge Ron Román, por sus consejos, paciencia y por su dirección de este proyecto. Le agradezco su confianza de todo corazón.

A las doctoras María Augusta Chávez y Sarah Martín, y la Ing. Cristina Cholota por el apoyo, paciencia y los conocimientos aportados al proyecto. A mis compañeras del laboratorio, Dayana y Michelle, por acompañarme durante la realización del presente trabajo y por la ayuda prestada. De la misma forma, agradezco al Dr. Jonathan Liria por la ayuda prestada en la parte de morfometría; y al Ing. Luis Fuentes por su labor en la recolección de las muestras.

Al doctor Carlos Arroyo y a la Ing. Karli Vizuite, así como a todo el personal del Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales por la ayuda prestada durante el análisis morfométrico.

A todos los laboratorios que han colaborado en el préstamo de insumos y equipos para el desarrollo del proyecto. Al Doctor Francisco Flores por su ayuda en la parte de biología molecular.

A Johanna Paz, Paola Ruíz, Gabriel Benavides, Marco Viteri, Darwin Castro, Jorge García, Pablo Paredes y Nathaly López por el apoyo y por los buenos momentos. En especial, agradezco a Morayma Muñoz, Gaby Gordillo, Sandy Ceracapa y Sebastián Rosero, quienes además, tuvieron paciencia conmigo a lo largo de este trayecto.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN	i
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Justificación e importancia del problema a resolver.....	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
1.5 Hipótesis.	4
2 MARCO TEORICO.....	5
2.1 <i>Apis mellifera</i>	5
2.1.1 Castas	5
2.1.1.1 Reina.....	6
2.1.1.2 Abeja Obrera.....	7
2.1.1.3 Abeja Zángano.....	8
2.1.2 Taxonomía.....	9
2.1.3 Morfología.....	9
2.1.3.1 Cabeza	9
2.1.3.1.1 Ojos	10
2.1.3.1.2 Antenas.	11
2.1.3.1.3 Aparato Bucal.	11
2.1.3.1.4 Glándulas.	12
2.1.3.2 Tórax.....	12
2.1.3.2.1 Alas.	13
2.1.3.2.2 Patas	13

2.1.3.3	Abdomen	14
2.1.4	Flora melífera y apicultura.....	14
2.1.5	Ciclo de Vida de la abeja.....	15
2.1.6	Distribución de <i>Apis mellifera</i> en Latinoamérica.....	16
2.2	Haplotipos.....	16
2.2.1	Haplotipos en abejas.....	16
2.3	Caracterización de <i>Apis mellifera</i>	17
2.3.1.1	Morfometría geométrica.....	18
2.3.1.1.1	Análisis de las componentes principales (PCA)	19
2.3.1.1.2	Análisis de variables canónicas (CVA).	19
2.3.1.1.3	Análisis cluster.....	19
2.3.1.2	Caracterización basada en ADN mitocondrial.	19
3	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	Participantes.....	21
3.1.1	Periodo de la investigación	21
3.2	Procedimientos	21
3.2.1	Primera fase: Análisis morfométrico de <i>Apis mellifera</i>	21
3.2.1.1	Procesamiento de las muestras.	21
3.2.1.2	Toma de fotografías.....	22
3.2.1.3	Análisis morfométrico.	22
3.2.1.3.1	Determinación de “landmarks”.....	22
3.2.1.3.2	Análisis morfométrico.	23
3.2.2	Segunda fase: Análisis molecular.....	23
3.2.2.1	Extracción de ADN.....	23
3.2.2.2	Optimización de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	24
3.2.2.2.1	Temperatura de hibridación	25
3.2.2.2.3	Concentración de MgCl ₂	26
3.2.2.2.3	Número de ciclos.	26
3.2.2.2.4	Concentración de ADN.....	26
3.2.3	Tercera fase: Análisis de las secuencias para determinar haplotipos.....	26
3.2.3.1	Ensamblaje de secuencias.....	26

3.2.3.2	Análisis filogenético.....	27
3.2.3.3	Frecuencia estadística.....	27
3.2.3.4	Análisis morfométrico tomando en cuenta haplotipos.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Primera fase: Análisis morfométrico de <i>Apis mellifera</i>	28
4.1.1	Análisis de las componentes principales (PCA).....	29
4.1.2	Análisis de Variables Canónicas (CVA).....	30
4.1.3	Rejilla de deformación de CVA.....	31
4.1.4	Análisis Cluster.....	32
4.2	Segunda fase: Análisis molecular.....	33
4.2.1	Optimización de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	33
4.2.1.1	Temperatura de hibridación.....	33
4.2.1.2	Concentración de MgCl ₂	34
4.2.1.3	Número de ciclos.....	34
4.2.1.4	Concentración de ADN.....	35
4.3	Tercera fase: Análisis de las secuencias para determinar haplotipos.....	36
4.3.1	Análisis morfométrico tomando en cuenta haplotipos.....	42
5	DISCUSIÓN.....	44
5.1	Primera fase: Análisis Morfométrico de <i>Apis mellifera</i>	44
5.2	Segunda fase Optimización de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	45
5.3	Tercera fase: Análisis de las secuencias para determinar haplotipos.....	47
6	CONCLUSIONES.....	50
7	RECOMENDACIONES.....	50
8	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Castas de abejas (<i>Apis mellifera</i>)	5
Figura 2: Abeja Reina	6
Figura 3: Abeja obrera	7
Figura 4: Zángano	8
Figura 5: Cabeza de <i>Apis mellifera</i>	10
Figura 6: Antenas de <i>Apis mellifera</i>	11
Figura 7: Estructura del aparato bucal	12
Figura 8: Tórax de <i>Apis mellifera</i>	13
Figura 9: Alas de <i>Apis mellifera</i>	13
Figura 10: Abdomen de <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 11: <i>Ciclo de vida de Apis mellifera</i>	15
Figura 12: "Landmarks" utilizados para el análisis morfométrico.....	22
Figura 13: "Landmarks" utilizados para el análisis morfométrico.	28
Figura 14: Análisis de procrustes en base a 16 "Landmarks".....	28
Figura 15: Análisis de componentes principales (PCA) a nivel de provincia.	29
Figura 16: Análisis de componentes principales (PCA) a nivel de cantón.....	29
Figura 17: Análisis de Variables Canónicas (CVA) por Provincias.....	30
Figura 18: Análisis de Variables Canónicas (CVA) por Cantones.....	30
Figura 19: Rejilla de deformación de CVA a nivel de provincia.....	31
Figura 20: Rejilla de deformación de CVA a nivel de cantón.....	31
Figura 21: Diagrama de agrupamiento UPGMA (Análisis Cluster) por provincia (a) y por cantones (b).	32
Figura 22: Optimización utilizando un gradiente de temperatura.....	34
Figura 23: Optimización utilizando tres concentraciones de MgCl ₂	34
Figura 24: Optimización utilizando 35 y 40 ciclos.....	35
Figura 25: Optimización utilizando diferentes concentraciones.....	35
Figura 26: Resultados obtenidos en PCR aplicada en muestras de ADN extraídas manualmente.	36
Figura 27: Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las muestras obtenidas en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha.	39
Figura 28: Análisis de Variables Canónicas (CVA) en base a los haplotipos encontrados en las tres provincias.....	42
Figura 29: Análisis de componentes principales (PCA) en base a los haplotipos encontrados en las tres provincias.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Funciones de la abeja obrera, de acuerdo a su edad (Suasnávar et al., 2018).</i>	7
Tabla 2: <i>Ciclo biológico de Apis mellifera (Suasnávar et al., 2018).</i>	15
Tabla 3: <i>Cantidad de reactivos usados inicialmente en PCR para Apis mellifera.</i>	24
Tabla 4: <i>Primers de la secuencia tRNA^{Leu}-COII que se utilizaron en el presente proyecto (Garnery et al., 1991).</i>	25
Tabla 5: <i>Programa comúnmente empleado en la amplificación de mtADN en Apis mellifera (A. L. Szalanski et al., 2016).</i>	25
Tabla 6: <i>P-value para prueba de permutación para las distancias de Mahalanobis entre Provincias.</i>	33
Tabla 7: <i>P-value para prueba de permutación para las distancias de Mahalanobis entre cantones.</i>	33
Tabla 8: <i>Haplotipos encontrados por Apiario.</i>	37
Tabla 9: <i>Prueba Chi-Cuadrado entre las variables Provincia y Linaje.</i>	40
Tabla 10: <i>Distribución de haplotipos de acuerdo a localización geográfica.</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PCA: Análisis de las componentes principales.

CVA: Análisis de Variables Canónicas.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

RESUMEN

Apis mellifera es un himenóptero apócrito que pertenece a la familia *Apidae*. Su introducción al Ecuador se presume fue por parte de conquistadores españoles. La *Apis mellifera* contribuyen con el 25% de la polinización lo cual muestra su importancia en la naturaleza. En el Ecuador la industria apícola no se encuentra muy desarrollada, representando apenas el 0,1% de la economía nacional, llegando a exportar en pequeña cantidad. El conocer el tipo de *Apis mellifera* podría contribuir en el desarrollo de la apicultura en las tres provincias en las que se enfocó el estudio. El trabajo se desarrolló en tres fases. En la primera se realizó la caracterización morfométrica, al observar y fotografiar alas obtenidas de 179 apiarios, donde se determinó que no existen diferencias estadísticas en las muestras obtenidas. En la segunda fase se optimizó la técnica molecular PCR con el objetivo de amplificar el gen de la región tRNA^{leu}-COII del ADN mitocondrial; estos fragmentos fueron enviados a secuenciación. En la tercera fase se analizó los resultados de la secuenciación para de esta forma determinar los haplotipos; en base a esto se comprobó la presencia de los linajes A correspondiente al linaje Africano y C correspondiente al linaje de Europa del Este. Los resultados de la tercera fase mostraron además que en la actualidad existe una tendencia a la Africanización en *Apis mellifera*, un fenómeno descrito en varios países de la región; dentro de esta fase se determinó la presencia de 11 haplotipos, de los cuales 8 eran africanos y 3 de Europa del Este.

Palabras clave:

- **HAPLOTIPOS**
- ***APIS MELLIFERA***
- **PCR**
- **SIERRA ECUADOR**

ABSTRACT

Apis mellifera is a hymenoptera belonging to the Apidae family. Its entry into this country is presumed by Spanish conquerors. *Apis mellifera* contribute 25% of the pollination, which shows its importance in nature. In Ecuador, the apiculture industry is not much developed, representing only 0.1% of the national economy, exporting in a small amount. Knowing the type of *Apis mellifera* could contribute to the development of beekeeping in the three provinces where the study was focused. The work was developed in three phases. In the first one, the morphometric characterization was made, observing and photographing wings obtained from 179 apiaries, where it was determined that there are no statistical differences in the samples obtained; even so it was found that there is a tendency to differentiate as the distance increases. In the second phase, the PCR molecular technique was standardized with the aim of amplifying the gene of the tRNA^{Leu}-COII region of the mitochondrial DNA; these fragments were sent to sequencing. In the third phase, the results of the sequencing were analyzed in order to determine the haplotypes; based on this, the presence of lineages A corresponding to the African lineage and C corresponding to the lineage of Eastern Europe was confirmed. The results of the third phase also showed that there is currently a trend towards Africanization in *Apis mellifera*, a phenomenon described in several countries of the region; in this phase the presence of 11 haplotypes was determined, of which 8 were African and 3 from Eastern Europe.

Keywords:

- **HAPLOTYPES**
- ***APIS MELLIFERA***
- **PCR**
- **HIGHLAND ECUADOR.**

CAPITULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Las abejas son considerados organismos importantes, no solo por su utilidad industrial sino también por su labor en la naturaleza (Vásconez, 2017). Es por estas razones que varios de los estudios alrededor de este organismo tienen como objetivo el conservar su variabilidad genética (Yogesh & Khan, 2014).

Apis mellifera también es conocida por su capacidad de adaptación a varios tipos de condiciones ambientales (Suasnávar, de León, & Guzmán, 2018), siendo las zonas cálidas las más predilectas (Bradbear, 2018). Aun así, es susceptible a diversos tipos de enfermedades y a la contaminación ambiental (Bradbear, 2018); aunque su resistencia a las mismas, se ha demostrado, varían de colonia a colonia, es decir, han sido herencia de abejas reinas (FAO, 2018).

En nuestro país, no existen estudios genéticos que determinen el tipo de abejas utilizadas; pero podrían ser de origen italiano. Aunque en los últimos años, se han importado líneas de origen desconocido traídas de Estados Unidos (Vásconez, 2017).

Varios estudios han demostrado que las características en *Apis mellifera* varían de acuerdo a su localización, lo cual a la vez se encuentra ligado a su haplotipo (A. L. Szalanski, Tripodi, Trammel, & Downey, 2016). Incluso se ha demostrado que el haplotipo se encuentra relacionado a la adaptación a diferentes climas (Webster, Hasselmann, Wallberg, & Scho, 2017) y a la resistencia a enfermedades (Tibatá et al., 2017).

El determinar el tipo de haplotipos presentes en nuestro país, significará un gran avance en la industria apícola, ya que permitirá conocer la distribución de las mismas en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha; y servirá como punto de partida a futuros estudios, cuyos objetivos estén enfocados a la determinación de las características de estas abejas.

1.2 Antecedentes

Hoy en día, no se conoce como se introdujeron las primeras *Apis mellifera* en nuestro país pero se intuye que fueron traídas por conquistadores españoles, los mismos que las trajeron de Italia (Vásconez, 2017). La industria apícola no se encuentra muy desarrollada en nuestro país, por lo que la producción de miel se da en apiarios artesanales (Andrade, 2009).

La mayor probabilidad de crecimiento de apiarios se da en la Costa y en el Oriente (Vásconez, 2017); a pesar de esto, la mayor cantidad de apiarios se encuentran en los Andes Ecuatorianos (Andrade, 2009). En el país se maneja en su gran mayoría la abeja africanizada, la misma que ingresó al país en los años 70 (Vivas Espinosa, 2015). Antes del ingreso de estas especies, en el país se cultivaban Meliponas, que es el nombre que reciben las “abejas sin aguijón”; las cuales eran de gran importancia para los primeros mestizos e indígenas, quienes también solían llamarlas “Trigonas o Mezotrigonas” (Mina & Sanchez, 2013).

Las abejas contribuyen con el 25% de la polinización, razón por la cual son importantes para la agricultura, además de ser importantes para el ambiente (Mina & Sanchez, 2013). La principal floración para las abejas en nuestro país es el *Eucaliptus globulus*; sin embargo, existen una gran cantidad de floraciones como *Medicago sativa* o *Persea americana* que actúan como fuente de polen (Vivas Espinosa, 2015). Cada tipo de floración producen mieles de distinto sabor, color y aroma debido a que la composición depende de la fuente del néctar, origen botánico, el clima y las condiciones ambientales (Insuasty-Santacruz, Martínez-Benavides, & Jurado-Gámez, 2016).

A pesar de toda la diversidad, el país no ha logrado repuntar su producción, llegando a representar apenas el 0.1 % de la economía nacional; además de exportar en pequeña cantidad, de la cual el 40 % proviene de la apicultura trashumante entre la costa y la sierra (Agila, 2015).

1.3 Justificación e importancia del problema a resolver

La falta de interés en la apicultura ha provocado que esta constituya apenas el 0,1% de la economía nacional; es por esto que en los últimos años, la producción de miel de abeja se considera insuficiente para cubrir la demanda del mercado nacional actual (Agila, 2015).

La producción de miel de abejas se ve afectada por el tipo de ambiente a la que estas se enfrentan, siendo la temporada lluviosa la que peores resultados obtiene (Mina & Sanchez, 2013). Este problema se ve agravado por la manera individual en que trabajan los apicultores, razón por la cual han optado por formar asociaciones (MAGAP, 2018). Otro de los problemas radica en la falta de conocimiento acerca de la especie de abeja con la que se está trabajando, y por ende, de los sistemas de producción que presentan cada una de ellas (Agila, 2015).

El estudio sobre las especies de *Apis mellifera* presentes en el país, ayudará a conocer el tipo de daño que estas producen en especies nativas, debido a que la mayoría de especies productoras han sido introducidas (Andrade, 2009). Por último, la importancia de *Apis mellifera* en la naturaleza, ha llevado a diversas instituciones a resaltar la importancia de la conservación de la variabilidad genética de esta especie (Strange, Garnery, & Sheppard, 2008).

Los resultados de esta investigación, proveerán información a los productores apícolas, acerca del tipo de *Apis mellifera* más conveniente de acuerdo a las condiciones geográficas en las que se encuentre el apiario (A. L. Szalanski et al., 2016); además de abrir paso a futuras investigaciones que tengan como objetivo el analizar la diferencia entre especies en cuanto a su productividad y resistencia a enfermedades (Webster et al., 2017).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Caracterizar morfológica y molecularmente a *Apis mellifera*, provenientes de colmenas localizadas en las provincias de Pichincha, Imbabura y Carchi.

1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente a *Apis mellifera* presentes en colmenas de las provincias de Pichincha, Imbabura y Carchi.
- Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para la identificación de *Apis mellifera*.
- Clonar y secuenciar muestras de *Apis mellifera* y analizar su filogenia mediante herramientas bioinformáticas.

1.5 Hipótesis.

Según el análisis morfológico:

H₁: El análisis morfológico permite diferenciar las poblaciones de *Apis mellifera* presentes en las provincias en las cuales se enfoca el estudio.

H₀: El análisis morfológico no permite diferenciar las poblaciones de *Apis mellifera* presentes en las provincias en las cuales se enfoca el estudio.

Según la prueba molecular PCR:

H₁: La Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) permite diferenciar las poblaciones de *Apis mellifera* presentes en las provincias en las cuales se enfoca el estudio.

H₀: La Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) no permite diferenciar las poblaciones de *Apis mellifera* presentes en las provincias en las cuales se enfoca el estudio.

Según la secuenciación.

H₁: El análisis de los productos de PCR secuenciados permite diferenciar los haplotipos presentes en las provincias en las cuales se enfoca el estudio.

H₀: El análisis de los productos de PCR secuenciados no permite diferenciar los haplotipos presentes en las provincias en las cuales se enfoca el estudio.

CAPITULO II

2 MARCO TEORICO

2.1 *Apis mellifera*

Apis mellifera es un himenóptero apócrito que pertenece a la familia *Apidae*. Al encontrarse presente en los cinco continentes, es uno de los organismos con mayor distribución en el mundo (Agila, 2015). Las abejas actúan en colectividad, agrupándose en colmenas, las mismas que forman apiarios. La colmena actúa como un superorganismo, debido a la interacción entre los individuos que la conforman, los mismos que actúan en sinergia (Vásconez, 2017).

2.1.1 Castas

Se conocen 3 tipos de castas: abeja obrera, abeja reina y el zángano. Cada una con una función en específico y trabajo diferenciado (Agila, 2015).

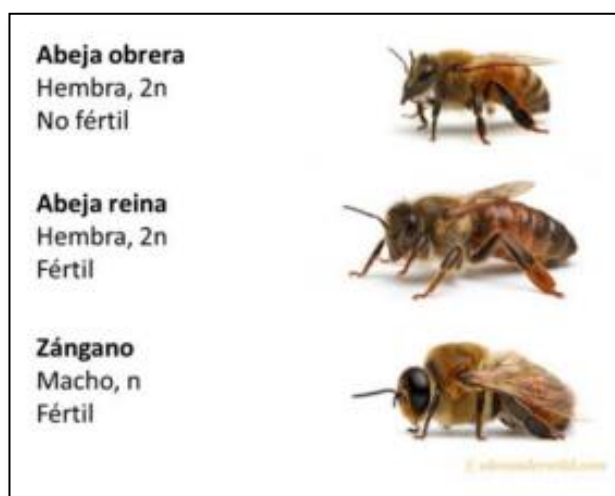


Figura 1: Castas de abejas (*Apis mellifera*)

Fuente: (Rubiano, 2016).

Estas tres castas se diferencian morfológicamente, siendo la obrera la más pequeña. Los zánganos poseen un abdomen y ojos grandes mientras que las reinas poseen un abdomen alargado debido a su desarrollado aparato reproductor (Rubiano, 2016).

2.1.1.1 Reina

Es la única abeja fértil de la colonia, además de ser la base en la cual se sustenta la misma, al mantener la cohesión emitiendo feromonas (Pérez- Ziegele, 2007). Su periodo de desarrollo es de 16 días, alcanzando su madurez sexual a los cinco días (Rubiano, 2016). Su nacimiento se da en celdillas denominadas “realeras”, además de ser alimentadas con jalea real producida por abejas obreras nodrizas (Magaña, Lanz, Pacheco, Velázquez, & Navarro, 2017). De esta alimentación depende la capacidad de puesta la cual varía entre 1500 a 3000 huevos al día (Vásconez, 2017). La fecundación de los huevos depende de las necesidades de la colmena y está controlada por la espermoteca de la reina (Rubiano, 2016).

La reina es capaz de producir una resina, que es la unión de diferentes sustancias químicas que le permite controlar el comportamiento de individuos de la misma especie (Vásconez, 2017). Su muerte se produce en la vejez, siendo eliminada por las propias obreras, quienes producen una nueva reina (Agila, 2015)



Figura 2: Abeja Reina
Fuente: (Suasnávar et al., 2018).

2.1.1.2 Abeja Obrera

Las abejas obreras son hembras no desarrolladas sexualmente (Suasnávar et al., 2018). Realizan diversos tipos de trabajo dentro de la colmena: limpiar, alimentar, hacer cera, cuidar y pecorear (Mina & Sanchez, 2013). Estas funciones varían con la edad, tal y como se puede observar en la **Tabla 1** (Rubiano, 2016). Su rango de vuelo va hasta los 3 km de distancia, aunque puede llegar hasta 10 km cuando los recursos son limitados. Al encontrar un lugar donde pecorear, regresa a la colmena donde informa de la distancia y posición del sitio elegido mediante una danza (Agila, 2015).

Tabla 1

Funciones de la abeja obrera, de acuerdo a su edad.

<i>Edad (Días)</i>	<i>Nombre</i>	<i>Actividades</i>
<i>1-3</i>	<i>Aseadoras</i>	<i>Hace limpieza de los panales y de la colmena, aseando los huevos y larvas.</i>
<i>4-12</i>	<i>Alimentadoras, nodrizas</i>	<i>Elabora la alimentación para las larvas, produce jalea real y cuida de la crianza de nuevas reinas (nodrizas).</i>
<i>13-18</i>	<i>Constructoras</i>	<i>Produce cera, construye panales y participa en la crianza de reinas al construir las realeras.</i>
<i>19-20</i>	<i>Guardianas</i>	<i>Se encarga de la guardianía en la piquera de la colmena.</i>
<i>21-45</i>	<i>Pecoreadoras</i>	<i>Recolecta polen, propóleo y agua. Se le llama pecoreadora</i>

Fuente: (Suasnávar et al., 2018)



Figura 3: Abeja obrera
Fuente: (Suasnávar et al., 2018).

La abeja obrera transporta el néctar obtenido dentro de su vesícula melífera o buche, es aquí donde empieza el proceso de obtención de miel, la misma que es terminada por otras abejas en la colmena (Suasnávar et al., 2018). La miel recién depositada en celdas se denomina tierna, pasando a ser madura después de ser operculada (Vásconez, 2017), es decir, cuando las obreras tapan las celdas con cera (Mina & Sanchez, 2013).

Una colmena considerada fuerte posee entre 60 000 a 80 000 obreras, es decir, son la casta más poderosa. Su número puede bajar a 20 000 en climas templados (Rubiano, 2016).

2.1.1.3 Abeja Zángano

Los zánganos son los únicos machos en la colonia y nacen de huevos no fecundados en celdas más grandes que las obreras (Agila, 2015). Viven un promedio de 80 días si las obreras lo permiten, ya que suelen ser expulsados de la colmena en épocas de bajos recursos. No pueden vivir más de dos horas sin alimentarse (Suasnávar et al., 2018).

Su función radica básicamente en fecundar a la reina, para lo cual suelen agruparse fuera de la colonia que es el lugar donde realiza el vuelo nupcial (Suasnávar et al., 2018). La reina realiza un vuelo en vertical y es alcanzada solo por los zánganos más vigorosos (Rubiano, 2016). Una vez dada la fecundación, suelen morir para evitar la consanguinidad (Agila, 2015).

No se conoce de alguna función dentro de la colmena, pero se considera que ayudan a mantener el calor y a repartir el néctar (Rubiano, 2016).



Figura 4: Zángano

Fuente: (Suasnávar et al., 2018)

2.1.2 Taxonomía

La abeja de miel fue descrita por Linneo en 1758 (Mina & Sanchez, 2013). Tradicionalmente su clasificación se ha basado en métodos morfológicos basándose en 36 caracteres. A partir de esto, diversos taxónomos han encontrado variedades geográficas o subespecies que superan las 30 razas (Agila, 2015). Todas las razas de *Apis mellifera* se encuentran en lugares muy diversos; desde lugares fríos y de gran altura (Webster et al., 2017) hasta lugares cálidos en la costa (Vásconez, 2017), lo cual revela la facilidad que posee *Apis mellifera* para adaptarse a diferentes ambientes y climas (De la Rúa, 1999). La clasificación taxonómica según Borbor, 2015 es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Himenópteros

Familia: Apidae

Género: *Apis*

Especie: *mellifera*

2.1.3 Morfología

Su estructura se asemeja a la de otros insectos, no obstante existen diferencias o peculiaridades (Nation, 2002).

2.1.3.1 Cabeza

Posee forma de triángulo invertido formada por seis escleritos unidos entre sí, albergando a los ojos simples y compuestos, las antenas y el aparato bucal (Andrade, 2009).

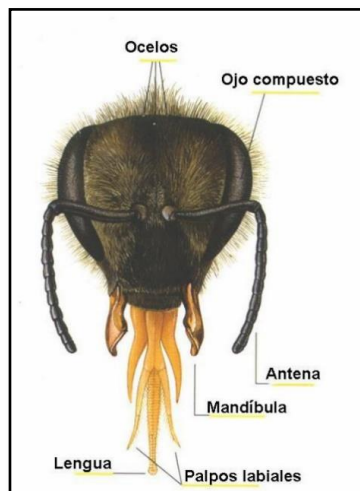


Figura 5: Cabeza de *Apis mellifera*

Fuente: (abejas.org, 2017).

2.1.3.1.1 Ojos

Son un total de cinco y de dos tipos: simples y compuestos.

Los ojos simples se encuentran situados entre los ojos compuestos, son tres y se encuentran cubiertos de pelo; su función es la visión a cortas distancias y en condiciones de casi oscuridad, es decir se asemejan a fotómetros (Nation, 2002).

Los ojos compuestos tienen como función la visión de colores, la misma que varía con la del humano al tener más agudeza hacia el espectro ultravioleta; en lo que respecta a su estructura, estos están formados por facetas hexagonales y por miles de ojos simples (Llorente, 2017).

El número de facetas depende de la casta de la abeja, siendo la reina con el menor número de facetas ($n = 4\ 920$) lo cual se debe a que sus salidas son escasas y siempre es dirigida por el enjambre; en las obreras el número de facetas es de $6\ 300$, que le sirven para localizar la colmena. Por último en los zánganos el número de facetas es de $13\ 090$, ya que necesitan más agudeza visual para localizar a las reinas vírgenes en su vuelo nupcial (Suasnávar et al., 2018).

2.1.3.1.2 Antenas.

Las antenas, en número de dos, emergen del centro de la cara, articulándose por medio de una membrana. Posee una parte rígida y otra flexible que posee segmentos llamados “artejos”, los mismos que varían siendo 12 en la reina y obreras y 13 en zánganos (Llorente, 2017).

Las antenas poseen una gran cantidad de órganos sensoriales responsables del tacto, pido y olfato. Su sentido del olfato está muy desarrollado, lo que le permite localizar e identificar miel (Rubiano, 2016). Este sentido actúa junto a la vista para establecer una gran selectividad floral, es decir, visitan a la misma especie en cada salida favoreciendo una perfecta polinización (Suasnávar et al., 2018).

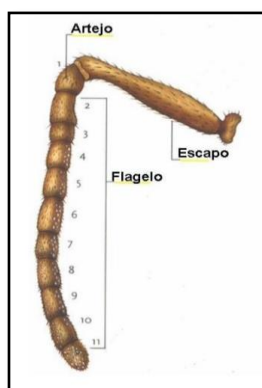


Figura 6: Antenas de *Apis mellifera*
Fuente: (abejas.org, 2017).

2.1.3.1.3 Aparato Bucal.

El aparato bucal se sitúa en la parte inferior de la cabeza (Llorente, 2017). En la parte inferior se puede observar una pieza transversal y cuadrangular llamado labro o labio superior; en este se encuentran unos lóbulos que se encargan del sentido del gusto (Suasnávar et al., 2018).

Poseen mandíbulas localizadas a ambos lados del labro cuya función es la de sujeción y moldeado. Estas mandíbulas son redondeadas por lo que son incapaces de dañar flores y frutas (Suasnávar et al., 2018).

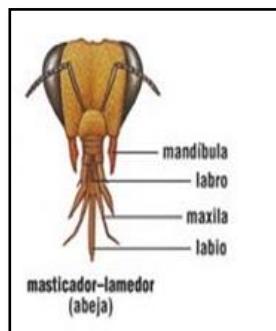


Figura 7: Estructura del aparato bucal
Fuente: (abejas.org, 2017).

2.1.3.1.4 Glándulas.

Son tres pares: 2 en la cabeza y una en el tórax (Rubiano, 2016). El primer par existe en abejas nodrizas ya que con esta alimenta a las larvas o a la reina. Los otros dos pares segregan saliva (Suasnávar et al., 2018).

2.1.3.2 Tórax

El tórax cuenta con una serie de espiráculos para la respiración y el aparato locomotor, constituido por tres anillos los mismo que poseen un par de patas; por otro lado entre el segundo y tercer segmentos se encuentran dos pares de alas membranosas. Los tres segmentos presentes son: protórax, mesotórax y metatórax, además de un segmento adicional llamado propodeo (Llorente, 2017).

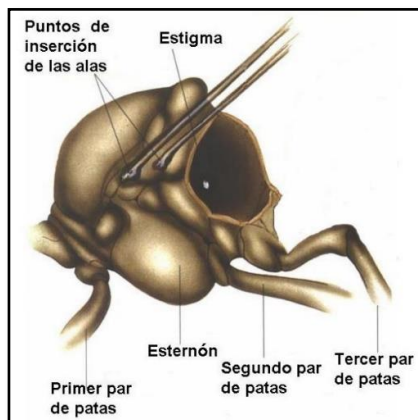


Figura 8: Tórax de *Apis mellifera*
Fuente: (abejas.org, 2017).

2.1.3.2.1 Alas.

En lo que respecta a las alas, estas están formadas por una membrana con una red de nervaduras quitinosas que la refuerzan y permiten el riego de la hemolinfa. Las más grandes se insertan en el metatórax y dos más pequeñas en el mesotórax. Las nervaduras convexas y cóncavas que se utilizan para clasificarlas (Nation, 2002). Durante el vuelo se unen las dos alas formando un solo par (Rubiano, 2016)

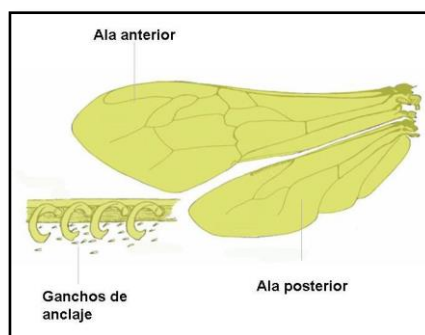


Figura 9: Alas de *Apis mellifera*
Fuente: (abejas.org, 2017).

2.1.3.2.2 Patas

Cada pata consta de 9 artejos. Las más grandes son el fémur, la tibia y el metatarso, el mismo que lleva dos garfios para caminar sobre superficies rugosas. Los garfios a la vez poseen una almohadilla que le permite caminar sobre superficies lisas.

2.1.3.3 Abdomen

Se compone de nueve segmentos con dos placas cada uno: dorsales o tergitas y ventrales o esternitas. Estas placas se encuentran unidas por membranas flexibles. El abdomen se encuentra recubierto de pelos y su longitud y coloración se utiliza para diferenciar por razas (Llorente, 2017). Se unen al tórax por un pedúnculo que le permite movilidad e independencia (Suasnávar et al., 2018).

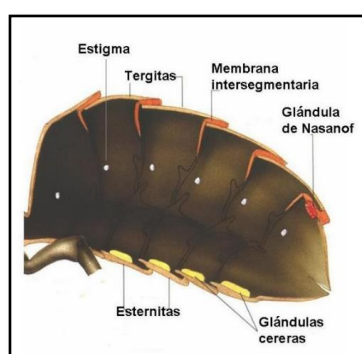


Figura 10: Abdomen de *Apis mellifera*

Fuente: (abejas.org, 2017).

2.1.4 Flora melífera y apicultura.

Se denomina flora melífera a aquellas plantas de las cuales la abeja obtiene néctar y polen (Vivas Espinosa, 2015). El conocimiento de la misma favorece los resultados de producción de miel (Andrade, 2009).

En el callejón andino la mayoría de la miel se obtiene a través de *Eucalyptus globulus*, entre otras especies cultivadas se encuentran plantas pertenecientes a esta zona como la alfalfa (*Medicago sativa*) y los cítricos (*Citrus sp*) (Cabrera, 2014).

2.1.5 Ciclo de Vida de la abeja.

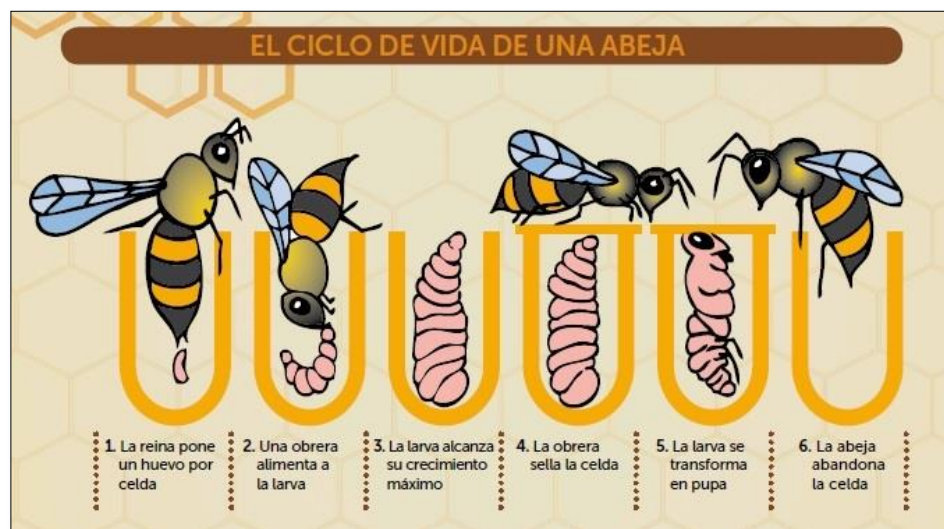


Figura 11: Ciclo de vida de *Apis mellifera*

Fuente: (abejas.org, 2017).

Poseen un ciclo de vida muy común a la de los insectos, es decir atraviesan metamorfosis completa: huevo, larva, prepupa, pupa y adulto (Borbor, 2015). La reina es la que se encarga de poner sus huevos dentro de células individuales de un panal de cera; los huevos fertilizados serán obreros y los no fertilizados serán zánganos (Suasnávar et al., 2018). Después de tres días los huevos eclosionan en larvas, que serán alimentadas por algunas abejas de la colmena. Al sexto día tejen capullos por siete o diez días más, para por últimos emerger como abejas (Nation, 2002). El ciclo biológico de las abejas depende de su casta, tal como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2

Ciclo biológico de Apis mellifera

Ciclo	Abeja Reina	Abeja obrera	Abeja Zángano
<i>En forma de huevo</i>	<i>3 días</i>	<i>3 días</i>	<i>3 días</i>
<i>En forma de larva</i>	<i>5.5 días</i>	<i>6 días</i>	<i>6.5 días</i>
<i>En forma de pupa</i>	<i>7.5 días</i>	<i>12 días</i>	<i>14.5 días</i>
Total de días	16 días	21 días	24 días

Fuente: (Suasnávar et al., 2018)

2.1.6 Distribución de *Apis mellifera* en Latinoamérica.

La mayoría de estudios en Latinoamérica se centran en el análisis morfométrico de *Apis mellifera*, debido a su bajo costo y facilidad (Cabrera, 2014). Otros estudios se centran en el peligro que actualmente corren las abejas debido a los diferentes cambios en su ambiente; además de centrarse en su productividad (Vandame & Palacio, 2010).

El país con más avances en el estudio de la distribución de *Apis mellifera* es Brasil seguido de Colombia (Souza et al., 2009). En Colombia, el interés del estudio de *Apis mellifera* ha aumentado después de que en varios estudios se comprobó la manera positiva en que la polinización por *Apis mellifera*, ayuda al cultivo de café (Vandame & Palacio, 2010).

Varias subespecies de *Apis mellifera* llegaron a Latinoamérica durante la colonización, siendo la *A. m. ligustica* (abejas italianas) la primera en ser introducida, mientras que la *A. mellifera scutellata* fue la última introducida en 1956 (Montoya-Pfeiffer, León, Chamorro, & Nates-Parra, 2016). También se conoce que en aquella época ya existía una gran afinidad por la meliponicultura en varias regiones a lo largo del continente, especialmente entre tribus indígenas (García-Olivares, Zaragoza-Trello, Ramirez, Guerrero-Peñaranda, & Ruíz, 2015).

2.2 Haplotipos.

De acuerdo a la NIH (National Human Genome), un haplotipo es un conjunto de variaciones de ADN o polimorfismos que tienden a ser heredados en conjunto (Bailey-Wilson, 2018). Este conjunto de variaciones se encuentran en el mismo cromosoma y son heredados juntos debido a que no suelen haber cruzamientos o recombinaciones entre ellos al estar tan cerca (Zhang & Niu, 2010).

2.2.1 Haplotipos en abejas.

Apis mellifera incluye un total de 26 subespecies, clasificados en 5 linajes de acuerdo a sus características morfométricas y distribución geográfica (Magnus, Tripodi, & Szalanski, 2014).

Los cinco linajes evolutivos en *Apis mellifera* son: C (Europa de este), M (Europa del Oeste), O (Orientales), A (africanos) y Y (jemenítica) (A. L. Szalanski et al., 2016). La relación entre las subespecies pertenecientes a este linaje ha sido redefinida en los últimos años gracias a los estudios a nivel genético (Magnus et al., 2014).

En la actualidad existen más de cien haplotipos agrupados en los cinco linajes (A. Szalanski & Magnus, 2015). Los datos de las secuencias de los mismos se encuentran disponibles en la base de datos GenBank (M. Meixner et al., 2013). Para el análisis de estos haplotipos se suele recurrir al ADN mitocondrial, específicamente al fragmento correspondiente al citocromo oxidasa C subunidad 1 y 2 (COX1 y COX2) (Magnus, Tripodi, & Szalanski, 2011). Este fragmento es rico en adeninas y tiaminas además de diferir dependiendo de la población (Syromyatnikov, Borodachev, Kokina, & Popov, 2018).

Al ser una especie ampliamente distribuida alrededor del mundo (Vásconez, 2017), existe una sustancial variación a nivel morfológico (Alattala, Ghamdia, Al Sharhia, & Fuchsb, 2014) y genético (M. Meixner et al., 2013); variaciones que responden a las adaptaciones para sobrevivir al medio (Webster et al., 2017). Entre las que se encuentran la resistencia a enfermedades, la adaptación a diversos climas, entre otros (Quezada-Euán, Pérez-Castro, & May-Itzá, 2003). Estas adaptaciones también se han visto influenciadas por el ser humano, debido al trato que estos dan a sus colmenas en lo que respecta a antibióticos, fungicidas, nivel de contaminación y transporte de colmenas de un lugar a otro (Magnus et al., 2014). Por ejemplo, varias de las adaptaciones dadas en *Apis mellifera* en nuestro continente, se dieron debido a la introducción de *Apis mellifera* traídas de África (A. Szalanski & Magnus, 2015).

2.3 Caracterización de *Apis mellifera*.

La caracterización suele darse por dos métodos: molecular y morfométrico (Farshineh, Vasfi, Firatli, & Bahreini, 2009); en el caso de la primera existen dos variantes: por microsatélites y por ADN mitocondrial (Nation, 2002). El análisis morfométrico por otro lado incluye el uso de programas informáticos especiales que facilitan el trabajo al investigador (Alattala et al., 2014).

Tradicionalmente la clasificación se daba solo por métodos morfométricos, pero la falta de diferencias morfológicas dadas en los últimos décadas ha llevado al uso de métodos moleculares (Irfan, Meixner, Ozkan, & Sheppard, 2006). Aun así, los estudios morfométricos son muy utilizados para el análisis de la distribución geográfica de las diversas especies de *Apis*, estos estudios no solo analizan las nervaduras de las alas, sino también, las características del tórax y la cabeza (Özkan, Gharleko, Özden, & Kandemır, 2009).

2.3.1.1 Morfometría geométrica.

La morfometría geométrica es un método sencillo para la identificación de especies que al igual que *Apis mellifera*, son grupos taxonómicos concretos (Borbor, 2015). También es definida como la fusión entre la biología y la geometría, analizando espacios tri y bidimensionales; permitiendo además analizar los cambios morfométricos (Cruz, 2017). Este método representa como ventaja el ser más económico y menos complejo que los métodos moleculares (García-Olivares et al., 2015).

El método morfométrico suele tomarse como un punto de partida en la investigación de *Apis mellifera*, pero no es considerado como un método exacto para clasificarlas, sino más bien para analizarlas (M. Meixner et al., 2013). A este se le debe adicionar un análisis molecular, ya que en muchos grupos, se ha comprobado, que no existen diferencias físicas (De la Rúa, Galian, & Serrano, 1999).

La diferencia principal entre la morfometría tradicional y la geométrica radica en que esta última permite el análisis de la forma y el tamaño de las estructuras bajo estudio (Cruz, 2017).

Para el análisis morfométrico se toma en cuenta puntos matemáticos llamados “landmarks”, los mismos que se asume que son homólogos (Palci & Lee, 2018). Entre las características de los “landmarks” tenemos: son de fácil ubicación en los organismos y proveen una cobertura adecuada de la forma (López, 2015). En *Apis mellifera* suelen tomarse entre 15 a 18 puntos de unión en las venaciones de las alas (M. Meixner et al., 2013).

Los “landmarks” pueden ser de tres tipos (Palci & Lee, 2018):

- **Tipo I:** Son yuxtaposiciones del tejido que señalan diferencias como por ejemplo: el punto de unión entre dos venas o el punto donde se unen dos huesos (Palci & Lee, 2018).
- **Tipo II:** Son zonas de máxima o mínima curvatura (López, 2015).
- **Tipo III:** Son puntos que señalan puntos extremos (López, 2015).

Una vez tomados los “landmarks”, se realiza análisis estadísticos; los principales en este caso son:

2.3.1.1.1 Análisis de las componentes principales (PCA)

Es un análisis que consiste en sintetizar información o número de variables a dos o tres dimensiones, a partir de la cual la muestra puede ser ubicada visualmente (M. Meixner et al., 2013). Constituye uno de los análisis más utilizados debido a su facilidad para interpretar (Farshineh et al., 2009).

2.3.1.1.2 Análisis de variables canónicas (CVA).

Es un análisis que consiste en la obtención de variables canónicas, al relacionar dos grupos de variables (M. Meixner et al., 2013). En este se maximizan las diferencias entre grupos; los ejes permiten visualizar que tan alejados se encuentran los grupos (Cruz, 2017)

2.3.1.1.3 Análisis cluster.

Conocida también como análisis de conglomerados, es una técnica cuyo objetivo es el agrupar elementos en “clusters” (Becerra, 2015). En este se construye un dendograma definiendo una distancia entre individuos; en nuestro caso se utilizará la distancia de Mahalanobis (Cruz, 2017).

2.3.1.2 Caracterización basada en ADN mitocondrial.

El ADN mitocondrial es una pequeña molécula circular con 16 000 pb aproximadamente; esta secuencia es transferida por la reina al resto de la colmena, es decir, es heredado maternalmente

(M. Meixner et al., 2013). Los ensayos para analizar ADN mitocondrial suelen ser simples y baratos; además, el ADN extraído es no recombinante (Garnery, Vautrin, Cornuet, & Solignac, 1991).

El uso de la técnica de ADN mitocondrial ha supuesto un gran avance en el estudio de la evolución de subespecies y razas, así mismo ha permitido el conocer su variabilidad genética (Garnery et al., 1991).

Se ha comprobado que en muchos grupos de abejas, no existen diferencias morfológicas externas, lo cual contrasta con la alta variabilidad del ADN mitocondrial. Así se ha corroborado la existencia de diferentes haplotipos dentro de un mismo grupo (De la Rúa et al., 1999).

La secuencia tRNA^{leu}-COII, es la utilizada para analizar ADN mitocondrial en *Apis mellifera* (Cánovas, De la Rúa, Serrano, & Galian, 2002). Esta secuencia se encuentra formada por dos distintas secuencias de nucleótidos llamadas P y Q; la secuencia P, a la vez, se puede dividir en P₀, P₁ y P₂ (M. Meixner et al., 2013).

Cada linaje evolutivo incluye una variante de la secuencia P combinada con un diferente número de secuencias Q, que van de 1 a 5 (M. Meixner et al., 2013). La secuencia Q tiene un tamaño de 192 a 197 pb, la secuencia P₀ posee 67 pb y puede faltar o presentar un delección, lo cual da origen a P₁ con 50 pb y P₂ con 52pb (De la Rúa et al., 1999).

CAPITULO III

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Participantes

El presente estudio fue financiado y realizado dentro del marco de actividades del proyecto de Vinculación con la Colectividad “Estudio epidemiológico y molecular de *Varroa* sp., en sistemas de producción de miel de abeja (*Apis mellifera*) en el cantón Rumiñahui – Ecuador”. Los análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicada en la Av. General Rumiñahui S/N y Sector La Colina (coordenadas: 0°18'53" Sur 78°26'36" Oeste).

Las muestras de *Apis mellifera* fueron obtenidas de diferentes apiarios ubicados a lo largo de las provincias del Carchi, Imbabura y Pichincha en Ecuador, estas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Sanidad Animal del Campus IASA I, sede Hda. El Prado de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE de la provincia de Pichincha, ubicada en Selva Alegre, Sangolquí (coordenadas 0°23'11.49" Sur 78°24'57.95" Oeste).

3.1.1 Periodo de la investigación

La investigación inició desde el 12 de septiembre del 2017 hasta el 01 de agosto del 2018.

3.2 Procedimientos

El presente proyecto de investigación constó de 3 fases que se describen a continuación:

3.2.1 Primera fase: Análisis morfométrico de *Apis mellifera*.

3.2.1.1 Procesamiento de las muestras.

Las muestras utilizadas en el presente trabajo fueron las mismas usadas en el trabajo de investigación titulado: “Estudio Epidemiológico de *Nosema* sp. en Apiarios de las Provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha – Ecuador, mediante microscopía de Fluorescencia” de Luis Fuentes, 2017. Estas muestras fueron almacenadas en tubos de ensayo con alcohol al 90% y a una temperatura de 4°C con el fin de conservarlas. En total se tomaron 20 especímenes por colmena de un total de 178. Las colmenas pertenecían a un total de 29 apiarios; 13 de los cuales se encontraban en Imbabura, 12 en Pichincha y 4 en Carchi.

3.2.1.2 Toma de fotografías.

Para las fotografías, se tomaron especímenes con alas intactas; las mismas que fueron extraídas con un bisturí para después ser depositadas en una caja Petri con gelatina. Se usó un espécimen por colmena.

Las cajas fueron colocadas en el estereomicroscopio, el mismo que se encontraba equipado con una cámara. Las fotografías fueron almacenadas en un computador para su posterior análisis.

3.2.1.3 Análisis morfométrico.

Las fotografías fueron digitalizadas usando los software TPS, el mismo que sirvió para marcar los puntos de unión de las venaciones de las alas en cada una de las fotografías (M. D. Meixner, Worobik, Wilde, Fuchs, & Koeniger, 2007), además de permitir obtener un archivo en el formato TPS. Los archivos en el formato deseado fueron analizados en el software MorphoJ, mientras que el dendrograma se obtuvo en PHYLIP.

3.2.1.3.1 Determinación de "landmarks".

Se eligieron un total de 16 puntos anatómicos, que fueron determinados por revisión bibliográfica.

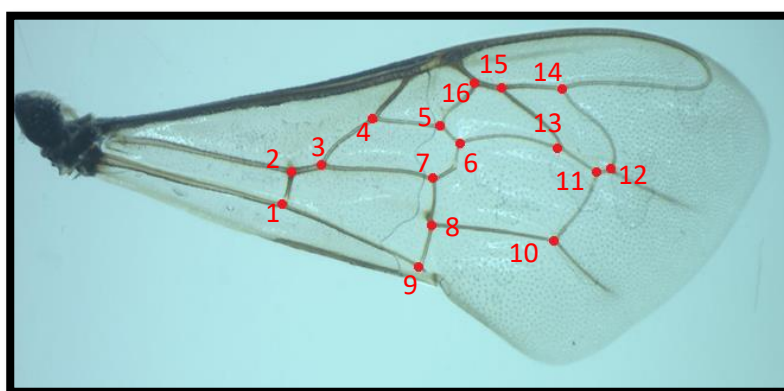


Figura 12: Landmarks" utilizados para el análisis morfométrico.

3.2.1.3.2 Análisis morfométrico.

Una vez obtenidos los “landmarks” se procedió a realizar tres tipos de análisis. El primero fue el Análisis de Componentes principales (PCA), el segundo fue el Análisis de variables canónicas (CVA) y el tercero el Análisis Cluster.

3.2.2 Segunda fase: Análisis molecular.

3.2.2.1 Extracción de ADN.

El proceso de extracción de ADN utilizado, fue el estandarizado por Dayana Sandoval et al. (datos no publicados). Se tomaron entre 5 a 10 abejas, de las cuales se extrajeron los abdómenes y se los coloco en tubos eppendorf de 2 mL.

La trituración se llevó a cabo después de colocar 300 μ L de tampón de extracción (0.03 M CTAB, 0.05M Tris, 0.01M EDTA, 1.1 M NaCl, pH 8.0), 4 μ L de proteínas K y 25 μ L de RNAsa. La muestra triturada se mezcla con vórtex para después incubarse durante 3 horas a 60°C. En este paso se pueden almacenar las muestras a -20°C si es necesario.

Se centrifuga durante un minuto a 14 000 rpm, el sobrenadante se pasa a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, al cual se le añade 300 μ L de fenol-cloroformo (1:1) o cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Una vez mezclado se centrifuga a 14 000 rpm durante 15min. Este paso se puede repetir para obtener mejores resultados.

El sobrenadante se coloca en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, al cual se le agrega 300 μ L de cloroformo para luego centrifugar a 10 000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante extraído se transfiere a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, al cual se le agregan 30 μ L de acetato de sodio (3M) y 600 μ L de etanol 95%. Se mezcla con cuidado y se almacena a -20°C durante una noche. Después se centrifugara a 10 000 rpm por 10 min. Se descarta el etanol.

Se añade 1mL de etanol 75% a 4°C, se utiliza el vórtex para de esta forma poder separar el pellet. Se centrifuga a 14 000 rpm durante 3 minutos. Se descarta el etanol y se deja secar.

La resuspensión se debe realizar utilizando agua destilada libre de nucleasas. Se incuba en baño María durante 10 min a 65°C. Por último se mezclará con cuidado para de esta manera disolver el pellet.

El ADN se debe almacenar a -80°C para evitar la degradación.

3.2.2.2 Optimización de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Para poder optimizar el ensayo de PCR, se utilizó un Master Mix modificado, el mismo que fue definido a partir de revisión bibliográfica. Durante la optimización se utilizaron muestras de ADN extraídas del Apiario 1 Colmena 5 (A1C5). El proceso fue realizado en el termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System.

Tabla 3

Cantidad de reactivos usados inicialmente en PCR para Apis mellifera.

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H2O	μL	N/A		14,5 - 15
Buffer	X	10,00	1,00	2,50
Primer E2	μM	10,00	0,80	2,00
Primer H2	μM	10,00	0,80	2,00
Cl2Mg	mM	25,00	1 - 1.5	1- 1,5
dNTP	mM	40,00	1,00	0,63
Taq	U/μL	5,00	0,60	0,12
ADN	ngr		5 - 25	1,5
Total				25,00

Cl2Mg: Cloruro de Magnesio; dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

Los primers empleados son los mismos del protocolo de Garney et al., 1991 (Tabla 3). Se ha demostrado que estos primers son los más específicos para poder amplificar la secuencia tRNA^{leu}-COII.

Tabla 4*Primers de la secuencia tRNA^{Leu}-COII que se utilizaron en el presente proyecto*

<i>Gen mitocondrial</i>	<i>Primer</i>	<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>T_m</i>
<i>tRNA^{Leu}-COII</i>	<i>Forward</i> (Posición 3363)	<i>E2</i>	<i>5' GGCAGAATAAGTGCATTG 3'</i>	<i>50°C</i>
	<i>Reverse</i> (Posición 3934)	<i>H2</i>	<i>5' CAATATCATTGATGACC 3'</i>	

G: guanina; A: adenina; T: tiamina; C: citosina

Fuente:(Garnery et al., 1991)

Los productos amplificados fueron cargados en gel de agarosa al 1.5% (Irfan et al., 2006), para después se visualizados en un ChemiDoc™ Imaging Systems.

Para la optimización se utilizó ADN extraído con el kit DNeasy Blood & Tissue Kits de Qiagen©, el mismo que garantiza la obtención de un ADN sin impurezas.

3.2.2.2.1 Temperatura de hibridación

Como punto de inicio para la optimización de la técnica PCR se usó las condiciones recomendadas por Szalanski *et al* (2016), a partir de esta se evaluó el gradiente de temperatura con diferentes rangos y se eligió la apropiada.

Tabla 5*Programa comúnmente empleado en la amplificación de mtADN en Apis mellifera*

<i>Fase</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos.</i>
<i>Inicio</i>	<i>94</i>	<i>5 minutos</i>	
<i>Desnaturalización</i>	<i>94</i>	<i>5 segundos</i>	<i>40</i>
<i>Alineamiento</i>	<i>45-53</i>	<i>1 minuto</i>	
<i>Extensión</i>	<i>72</i>	<i>1 minuto</i>	
<i>Elongación final</i>	<i>72</i>	<i>5 minutos.</i>	

Fuente: (A. L. Szalanski et al., 2016)

No se eligieron temperaturas mayores a 53°C y menores a 46°C, debido a que no se reportan temperaturas fuera de este rango.

3.2.2.2.3 Concentración de MgCl₂

Se probaron un total de 3 concentraciones de MgCl₂: 1, 1.25 y 1.5 M.

3.2.2.2.3 Número de ciclos.

Se probaron tres diferentes números de ciclos: 30, 35 y 40 ciclos.

3.2.2.2.4 Concentración de ADN.

Las muestras de ADN poseen concentraciones altas, las mismas que inhiben el proceso; por esta razón se diluyeron a un total de cinco concentraciones, de estas se escogerá la mejor. Las concentraciones elegidas son: 5, 10, 15, 20 y 25 ng/μL.

3.2.3 Tercera fase: Análisis de las secuencias para determinar haplotipos.

El ADN extraído de cada colmena fue sometido a la técnica PCR optimizada en la Segunda fase. En base a los resultados se tomó un representante por apiario, teniendo en cuenta el tamaño del amplicón; en algunos casos se tomaron dos o tres debido a que en un mismo apiario se encontraron amplicones de distintos tamaños.

En total se enviaron 42 productos a secuenciar, a los cuales se aplicó el método de Sanger. A partir de cada muestra se obtienen dos resultados, uno en sentido 5' y otro en sentido 3', usando cada uno de los primers expuestos en la **Tabla 4**. Las muestras fueron analizadas en MACROGEN, Corea del Sur.

3.2.3.1 Ensamblaje de secuencias

El objetivo de este proceso es obtener una secuencia consenso. Para esto se limpian las secuencias, para después alinearlas y ensamblarlas.

Antes del proceso de ensamblaje, se analizaron las secuencias en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). En esta herramienta se compara las secuencias obtenidas con las que se encuentran en GenBank. Este análisis es exploratorio.

Se tomó en cuenta solo las secuencias con buena calidad de secuenciación (>60%), además de que estas debían corresponder a *Apis mellifera*.

El ensamblaje se da utilizando la secuencia y el electroferograma proporcionado. Para este proceso se utilizó el programa Sequencer 5.4.6. Al finalizar, se guardó las secuencias alineadas y limpias.

3.2.3.2 Análisis filogenético.

Una vez obtenidas las secuencias consenso, estas se analizan en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para ver las similitudes de estas secuencias con la almacenadas en GenBank.

Todas las secuencias obtenidas en GenBank fueron guardadas, para después ser alineadas con las secuencias consenso, de acuerdo a esto se cortan las secuencias y se las guarda en formato fasta.

Los arboles filogenético de máxima verosimilitud se realizó siguiendo el modelo evolutivo de Kimura de dos parámetros con 1000 repeticiones, en el programa MEGA 6.06.

3.2.3.3 Frecuencia estadística

En base a los resultados obtenidos se realizará un análisis de la frecuencia de los linajes obtenidos, tanto de manera general en las tres provincias, como de manera individual.

3.2.3.4 Análisis morfométrico tomando en cuenta haplotipos.

También se realizó un análisis morfométrico tomando en cuenta, esta vez, los haplotipos para de esta forma ver si existe alguna diferencia morfológica entre los mismos.

CAPITULO IV

4 RESULTADOS

4.1 Primera fase: Análisis morfométrico de *Apis mellifera*.

Estos “landmarks” fueron tomados en las 178 fotografías, a las cuales se les realizó un análisis de Procrustes, tal como se puede observar en la Figura 14.

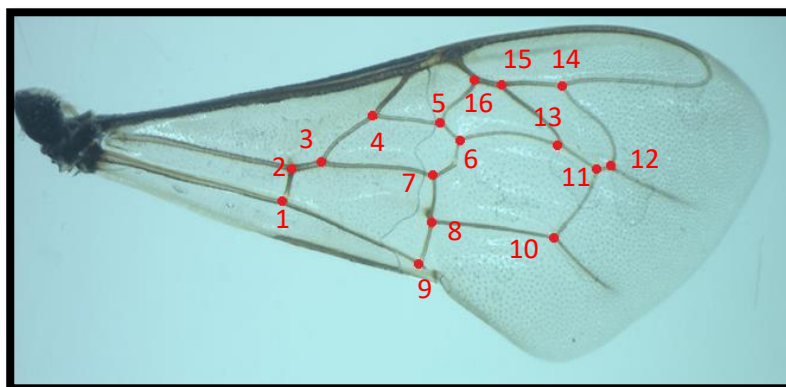


Figura 13: "Landmarks" utilizados para el análisis morfométrico.

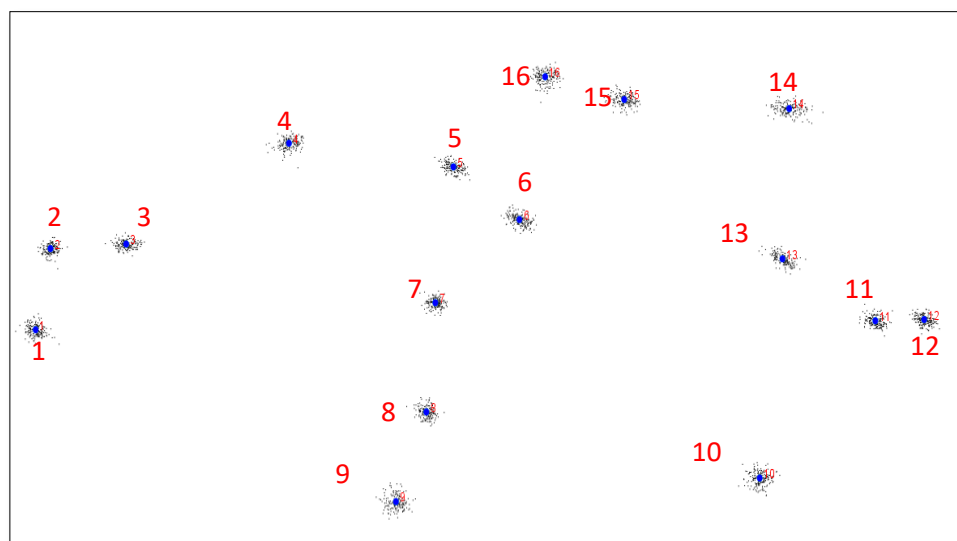


Figura 14: Análisis de procrustes en base a 16 "Landmarks". No se utilizaron puntos anatómicos de referencia.

4.1.1 Análisis de las componentes principales (PCA)

Al realizar el Análisis de Procrustes, las “landmarks” quedan superpuestas. A estos se le realizó un Análisis de los Componentes principales (PCA). En la Figura 15, se puede apreciar que las poblaciones entre las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha están superpuestas. Lo mismo que se repite si se toma en cuenta los cantones (Figura 16).

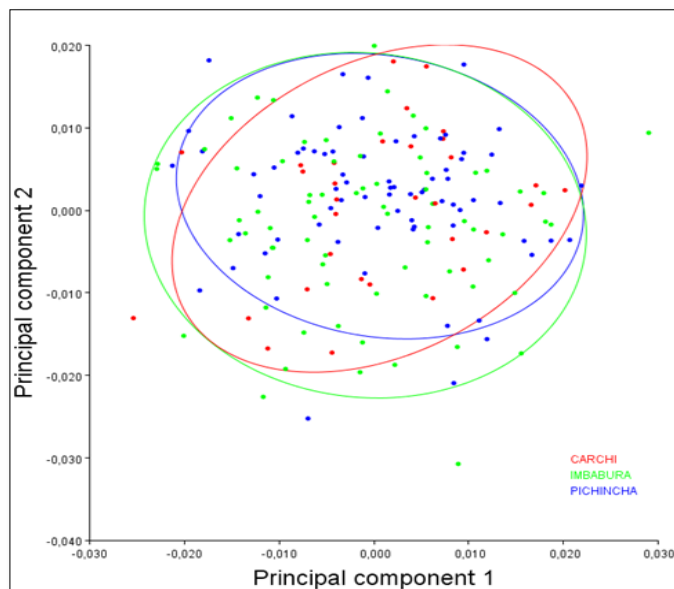


Figura 15: Análisis de componentes principales (PCA) a nivel de provincia.

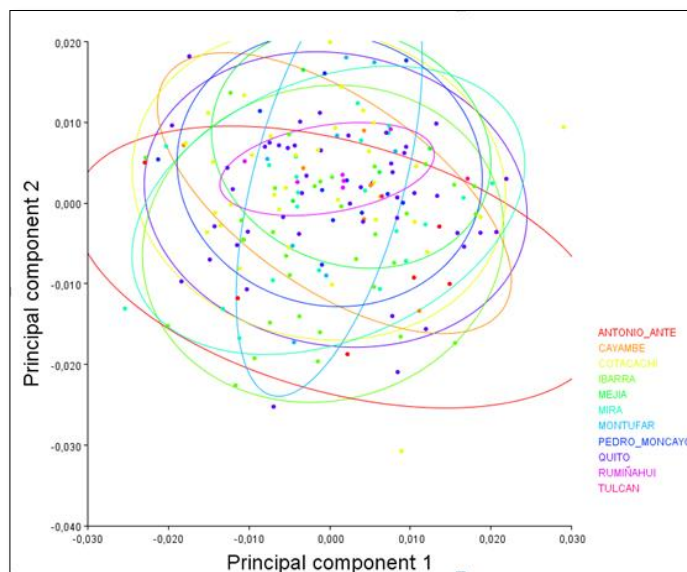


Figura 16: Análisis de componentes principales (PCA) a nivel de cantón.

4.1.2 Análisis de Variables Canónicas (CVA).

Se realizó el análisis de variables canónicas (CVA) como prueba confirmatoria, ya que de esta manera se puede maximizar la separación entre grupos y así conocer si existían varias especies de *Apis mellifera* en estos grupos. Los resultados por Provincias se pueden observar en la Figura 17; y por cantones en la Figura 18. Ambos resultados muestran que los grupos se superponen, es decir, no existen diferencias entre las poblaciones.

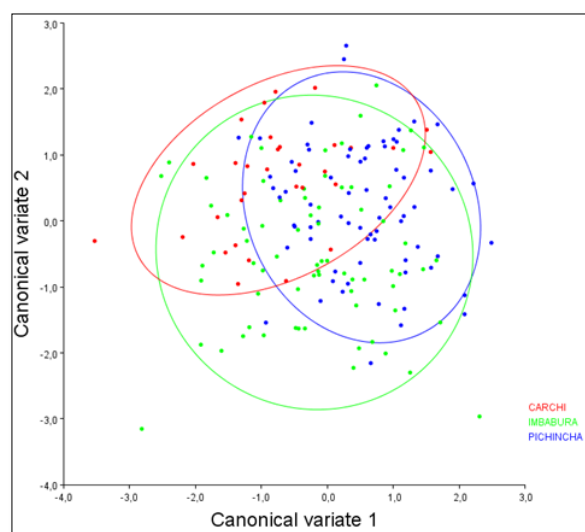


Figura 17: Análisis de Variables Canónicas (CVA) por Provincias.

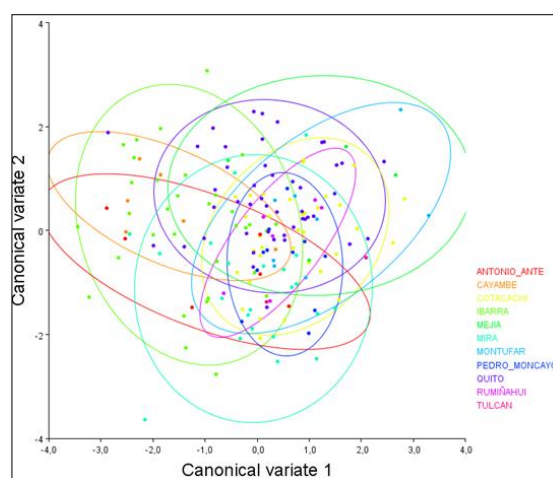


Figura 18: Análisis de Variables Canónicas (CVA) por Cantones.

4.1.3 Rejilla de deformación de CVA.

La información aportada por la rejilla nos permitirá observar cual punto aportó más información para poder diferenciar a las colmenas, tal y como se observan en la Figura 19.

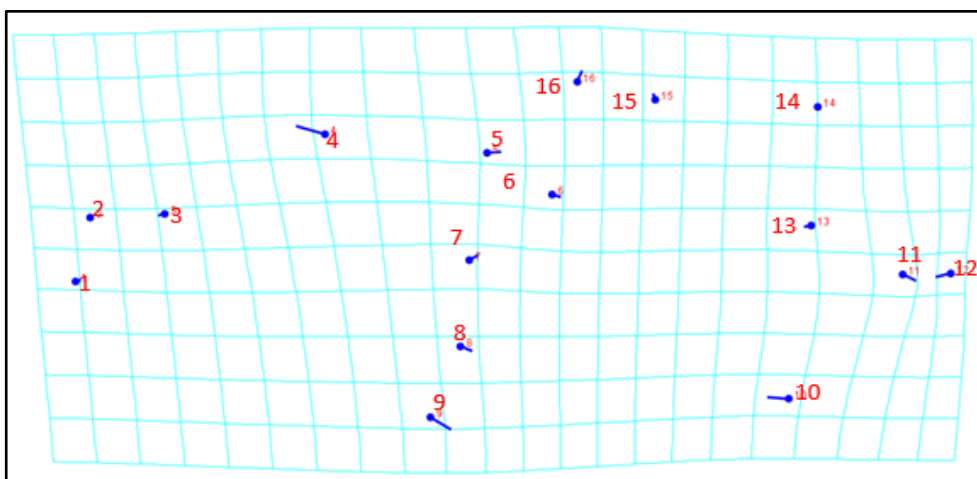


Figura 19: Rejilla de deformación de CVA a nivel de provincia.

Como se puede apreciar, a nivel de provincia son los puntos 4, 9, 10, 11 y 12, los que más información aportan para la diferenciación de colmenas.

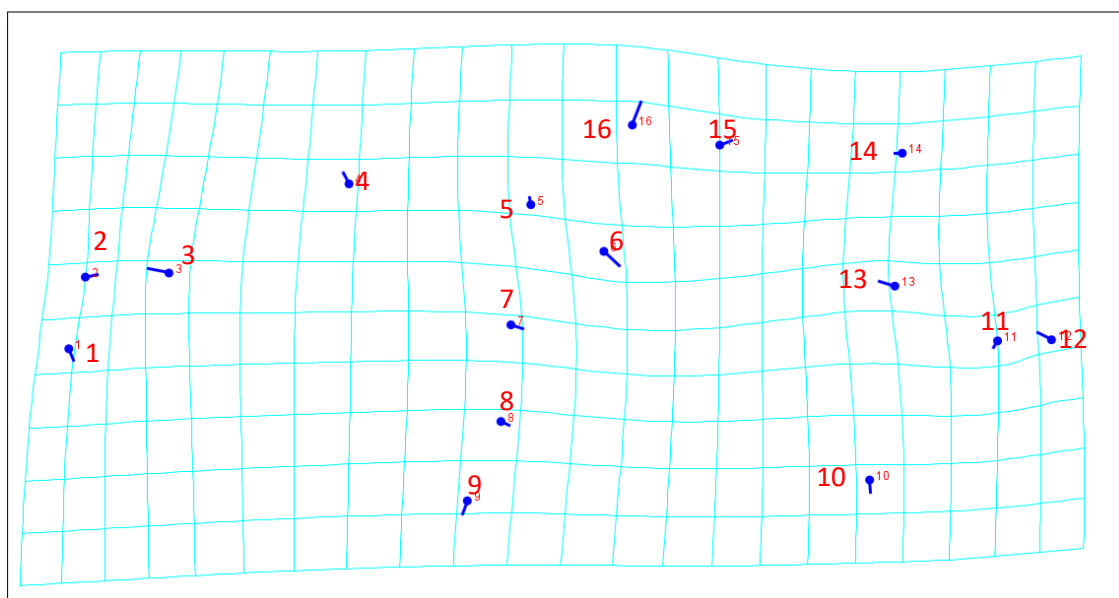


Figura 20: Rejilla de deformación de CVA a nivel de cantón.

Como se puede apreciar, a nivel de provincia son los puntos 3, 6, 12, 15 y 16; los que más información aportan para la diferenciación de colmenas.

4.1.4 Análisis Cluster

Se construyó un dendrograma, basado en el algoritmo UPGMA y la distancia de Mahalanobis; de esta manera se obtuvieron dos resultados: uno por provincia y otro por cantón (Figura 21).

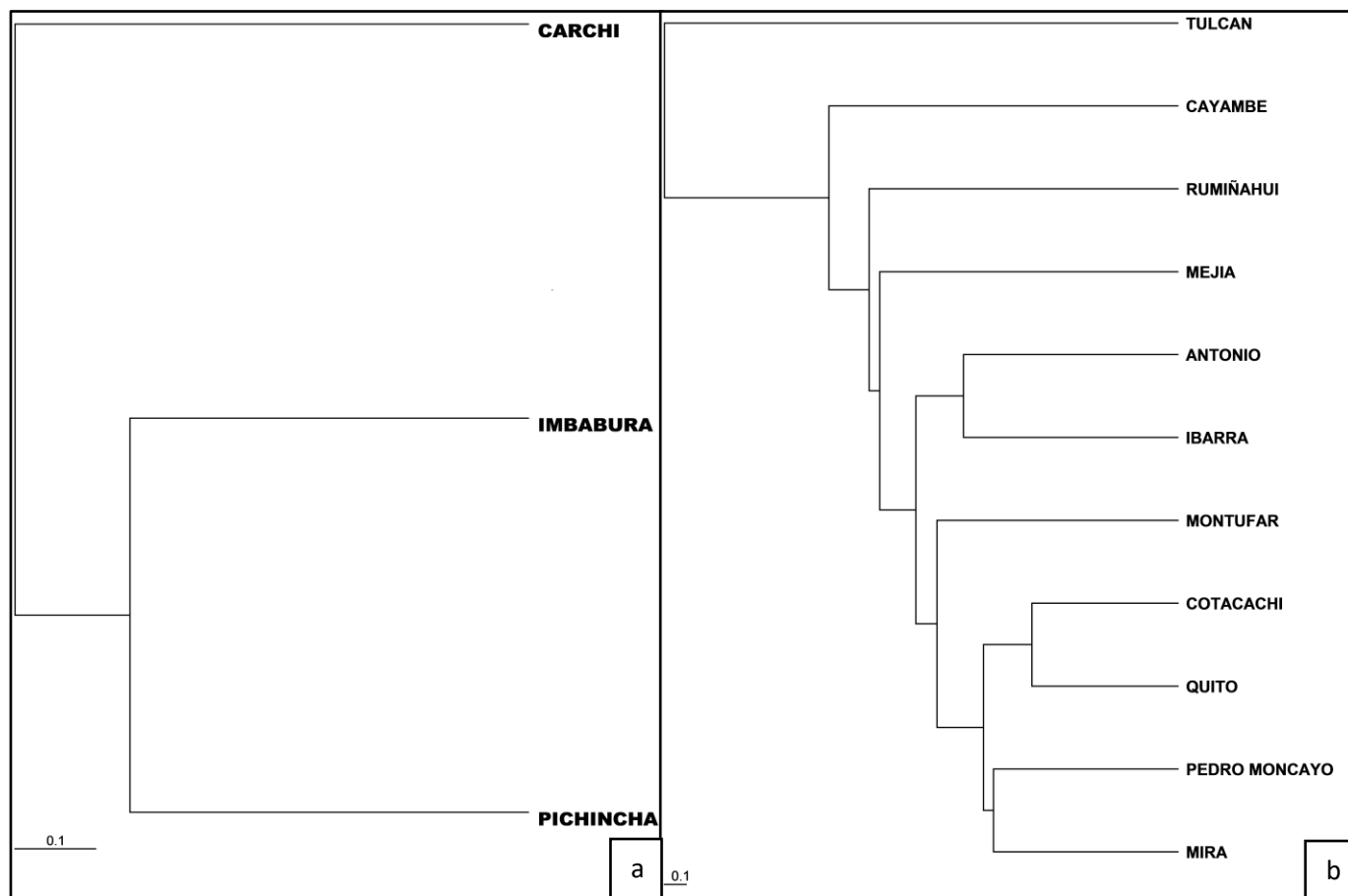


Figura 21: Diagrama de agrupamiento UPGMA (Análisis Cluster) por provincia (a) y por cantones (b).

En el gráfico (a) se puede apreciar que existen más semejanzas mientras más cercanas están las provincias, pero en el gráfico (b) no se repite esta tendencia.

En el caso de provincias y cantones también se analizaron si existían diferencias significativas (Tabla 6). En este análisis se toma en cuenta el p-value, el mismo que debe ser menor

a 0.05 debido a que las pruebas realizadas tienen un nivel de confianza del 95%. En base a esto se puede afirmar que existe diferencia significativa entre las provincias de Pichincha y Carchi.

Tabla 6

P-value para prueba de permutación para las distancias de Mahalanobis entre Provincias.

	<i>Carchi</i>	<i>Imbabura</i>
<i>Imbabura</i>	0.3477	
<i>Pichincha</i>	0.0291	0.1359

En la **Tabla 7**, se puede observar que si existen diferencias entre algunos cantones. Estos resultados no siguen la tendencia de la **Tabla 6**; debido a que algunos de los cantones en los que si existen diferencias, se encuentran cerca geográficamente.

Tabla 7

P-value para prueba de permutación para las distancias de Mahalanobis entre cantones.

	<i>Antonio Ante</i>	<i>Cayambe</i>	<i>Cotacachi</i>	<i>Ibarra</i>	<i>Mejía</i>	<i>Mira</i>	<i>Montúfar</i>	<i>Pedro Moncayo</i>	<i>Quito</i>	<i>Rumiñahui</i>
<i>Cayambe</i>	0.7337									
<i>Cotacachi</i>	0.2095	0.0085*								
<i>Ibarra</i>	0.9766	0.7494	0.0000001*							
<i>Mejía</i>	0.4783	0.2096	0.8323	0.3705						
<i>Mira</i>	0.8964	0.1137	0.1186	0.0168*	0.5075					
<i>Montúfar</i>	0.1571	0.0028*	0.3988	0.0064*	0.8664	0.1260				
<i>Pedro Moncayo</i>	0.4922	0.0026*	0.3704	0.0316*	0.6623	0.8000	0.2745			
<i>Quito</i>	0.3048	0.0245*	0.0729*	0.0002*	0.8970	0.0007*	0.2429	0.1765		
<i>Rumiñahui</i>	0.2061	0.1010	0.3340	0.1227	0.4716	0.4618	0.0490*	0.0433*	0.1131	
<i>Tulcán</i>	0.4951	0.1140	0.1406	0.1187	0.2006	0.1319	0.0194*	0.0224*	0.0260*	0.0664

(* $p < 0.05$)

4.2 Segunda fase: Análisis molecular.

4.2.1 Optimización de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

4.2.1.1 Temperatura de hibridación

Se puede observar que las muestras en las cuales se usó temperatura de hibridación de 46°C no existe banda visible.



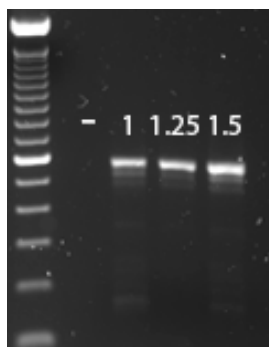
(-): control negativo; (+): control positivo; 45° – 53°: temperaturas analizadas

Figura 22: Optimización utilizando un gradiente de temperatura.

En estos resultados se puede apreciar que la banda obtenida a los 51°C es la más apropiada. El resto de bandas también presentaban una pequeña cantidad de bandas inespecíficas.

4.2.1.2 Concentración de MgCl₂.

Para la optimización con MgCl₂ se decidió utilizar una temperatura de 51°C, la misma que demostró ser la más apropiada de acuerdo a los resultados anteriores.



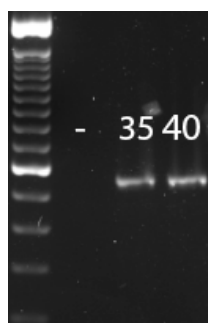
(-): control negativo; (+): control positivo; 1 mM-1.5 mM: concentraciones analizadas

Figura 23: Optimización utilizando tres concentraciones de MgCl₂.

Como se puede apreciar, la concentración de 1.25 mM muestra mejores resultados, por ende se decidió elegir esta para continuar con los ensayos.

4.2.1.3 Número de ciclos.

Para este ensayo se utilizaron las dos condiciones antes probadas como las mejores: temperatura de hibridación de 51°C y concentración de MgCl₂ de 1.25 mM.



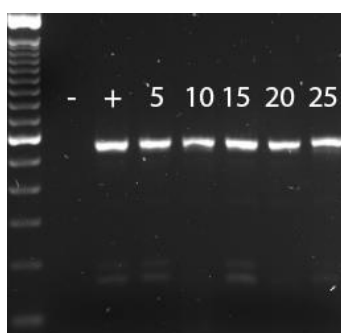
(-): control negativo; (+): control positivo; 35 a 40: ciclos analizados

Figura 24: Optimización utilizando 35 y 40 ciclos.

No se puede observar gran diferencia, por lo que se procedió a elegir una concentración adecuada.

4.2.1.4 Concentración de ADN.

El ensayo se realizó con las cinco concentraciones elegidas, a la cual se le sumo un control positivo, que era el ADN extraído sin diluir. El ADN extraído tenía una concentración de $27.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

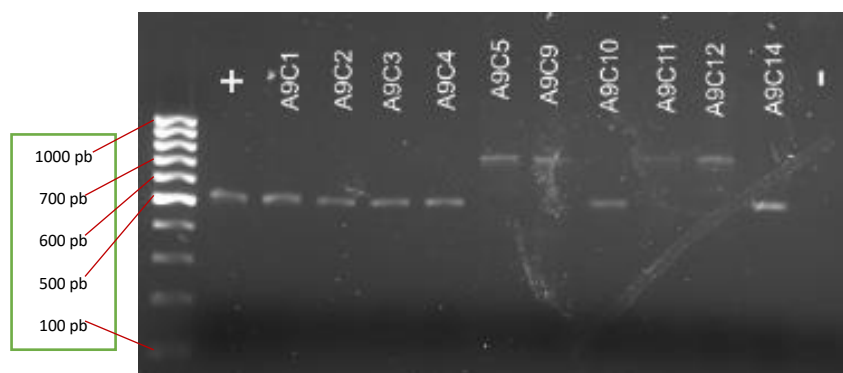


(-): control negativo; (+): control positivo; 5 a 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$: concentraciones analizadas.

Figura 25: Optimización utilizando diferentes concentraciones.

Este ensayo demostró que se pueden utilizar concentraciones que van desde $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ hasta $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$. De todas las concentraciones utilizadas fue la de $15 \text{ ng}/\mu\text{l}$, la que demostró ser la más apropiada.

Una vez optimizada la PCR, se probó su eficacia en muestras de ADN obtenidas manualmente; obteniéndose los resultados expuestos en la **Figura 26**. Los mismos que indican bandas con tamaños dentro del rango requerido.



(-): control negativo; (+): control positivo; A: Apiario C: Colmena

Figura 26: Resultados obtenidos en PCR aplicada en muestras de ADN extraídas manualmente.

4.3 Tercera fase: Análisis de las secuencias para determinar haplotipos.

La técnica de PCR optimizada se utilizó en las 177 muestras de ADN extraídas manualmente, cada una de estas muestras provenían de una colmena diferente. Los resultados de la electroforesis de cada colmena se pueden apreciar en el **Anexo 1**, los mismos que indican amplicones que poseen un tamaño adecuado (530 a 1230 pb).

Una vez obtenidas las secuencias consenso, se dieron los siguientes resultados en base a su comparación con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Estos pueden ser observados en la **Tabla 8**.

Tabla 8
Haplotipos encontrados por Apiario.

Muestra	Identidad	Identidad	Descripción
A1C11	100%	MF428426.1	Apis mellifera ligustica haplotype C1 COI-COII intergenic spacer.
A2C7	100%	MF428426.1	Apis mellifera ligustica haplotype C1 COI-COII intergenic spacer.
A4C2	100%	MF997431.1	Apis mellifera haplotype seq2 COI-COII intergenic spacer.
A4C5	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A5C1	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A5C11	100%	KX463851.1	Apis mellifera iberiensis haplotype A30 COI-COII intergenic spacer.
A6C4	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A6C6	99%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A7C5	99%	FJ890929.1	Apis mellifera haplotype A26c COI-COII intergenic spacer.
A8C2	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A8C4	100%	JQ746684.1	Apis mellifera iberiensis haplotype A31 COI-COII intergenic spacer.
A9C1	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A9C5			No encontró haplotipo
A10C1	99%	FJ890929.1	Apis mellifera haplotype A26c COI-COII intergenic spacer.
A10C5	99%	MF428426.1	Apis mellifera ligustica haplotype C1 COI-COII intergenic spacer.
A11C12	100%	FJ890929.1	Apis mellifera haplotype A26c COI-COII intergenic spacer.
A12C2	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A12C5	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A13C1	100%	MF997431.1	Apis mellifera haplotype seq2 COI-COII intergenic spacer.
A13C8	100%	KX463941.1	Apis mellifera iberiensis haplotype C2j COI-COII intergenic spacer.
A14C1	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A14C18	100%	MF997431.1	Apis mellifera haplotype seq2 COI-COII intergenic spacer.
A15C1	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A16C1	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A17C3	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A18C2	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A19C1	100%	KX463851.1	Apis mellifera iberiensis haplotype A30 COI-COII intergenic spacer.
A20C1	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A21C1	100%	FJ890929.1	Apis mellifera haplotype A26c COI-COII intergenic spacer.
A22C1	99%	MF997430.1	Apis mellifera haplotype seq1 COI-COII intergenic spacer.
A23C1	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A23C2	99%	KX463736.1	Apis mellifera iberiensis haplotype A1 COI-COII intergenic spacer.
A24C1	98%	GU326335.1	Apis mellifera haplotype A1e COI-COII intergenic spacer.
A24C3	100%	FJ743640.1	Apis mellifera haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A25C1	100%	MF428426.1	Apis mellifera ligustica haplotype C1 COI-COII intergenic spacer.

A25C6	98%	GU326335.1	<i>Apis mellifera</i> haplotype A1e COI-COII intergenic spacer.
A26C1	99%	HQ287900.1	<i>Apis mellifera</i> haplotype C31 cytochrome oxidase subunit II gene.
A27C2	100%	KX463736.1	<i>Apis mellifera iberiensis</i> haplotype A1 COI-COII intergenic spacer.
A27C3	100%	MF997430.1	<i>Apis mellifera</i> haplotype seq1 COI-COII intergenic spacer.
A28C1	100%	FJ743640.1	<i>Apis mellifera</i> haplotype A26a COI-COII intergenic spacer.
A29C1	100%	MF428426.1	<i>Apis mellifera ligustica</i> haplotype C1 COI-COII intergenic spacer.
A30C1	99%	FJ890929.1	<i>Apis mellifera</i> haplotype A26c COI-COII intergenic spacer.

Los resultados del árbol filogenético de máxima verosimilitud se observan a continuación.

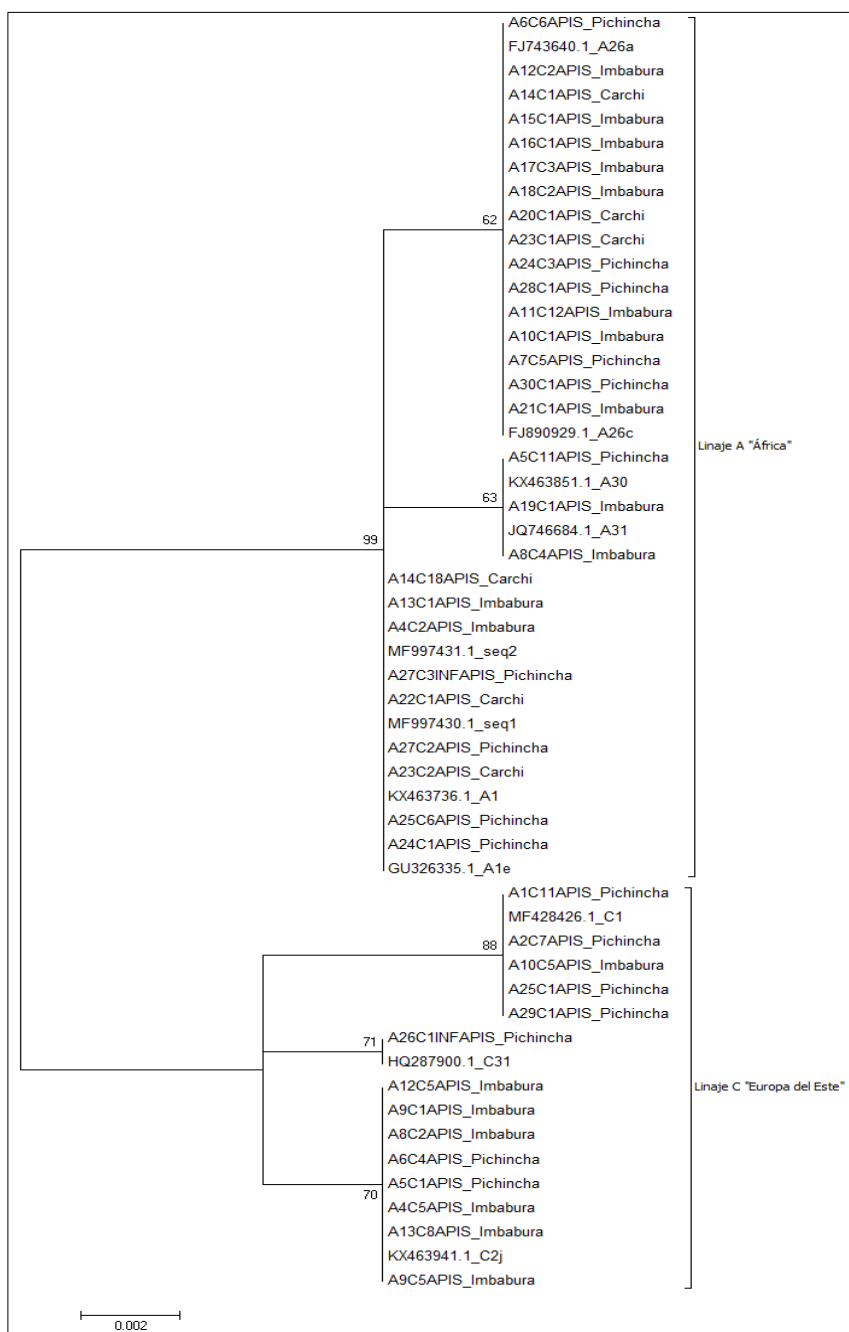


Figura 27: Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las muestras obtenidas en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha.

Como se puede observar en la **Figura 27**, cada una de las secuencias obtenidas se encuentra cerca de la secuencia de su respectivo haplotipo obtenido de NCBI.

A partir de los datos obtenidos se elaboró un análisis de frecuencia estadística con el fin de determinar la frecuencia de los linajes en la zona de muestreo. Estos resultados se pueden observar en el **Anexo 2**.

El linaje más frecuente fue el Linaje A con un total de 66.67% en comparación del Linaje C que obtuvo un 33.33%.

En el caso de la provincia del Carchi, el Linaje A fue el único presente con un porcentaje del 100%. En la provincia de Imbabura el Linaje A fue el más abundante con un 64.29% en comparación del Linaje C que se encontró en un 35.71%. Mientras que en la provincia de Pichincha fue el Linaje C el más abundante con un 53.85% en comparación al Linaje A con un 46.15%. En base a estos resultados se observa que el Linaje C aumenta hacia el sur de la región.

Para conocer la independencia de las variables se realizó una prueba de chi-cuadrado con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados pueden ser observados en la **Tabla 9**. Al obtenerse un p-value (0.1728) mayor a 0.05, podemos concluir que las variables son independientes; es decir, que el Linaje no se ve influenciado por la provincia.

Tabla 9

Prueba Chi-Cuadrado entre las variables Provincia y Linaje.

	<i>Carchi</i>	<i>Imbabura</i>	<i>Pichincha</i>	<i>Total</i>
<i>Linaje A "Africa"</i>	6	12	10	28
<i>Linaje C "Europa del Este"</i>	0	6	7	13
<i>Total</i>	6	18	17	41
P-value: 0.1728		χ^2 : 3.51		gl: 2

Los resultados de la distribución geográfica de los haplotipos se pueden observar en la **Tabla 10**. Estos indican la presencia del haplotipo A26a en las 3 provincias, por otro lado, el haplotipo A31 es exclusivo de las provincia de Imbabura, mientras que los haplotipos A1e y C31 son exclusivos de Pichincha. De los 11 haplotipos encontrados en general; 4 se encuentran en el Carchi, 7 en Imbabura y 9 en Pichincha.

Tabla 10*Distribución de haplotipos de acuerdo a localización geográfica.*

<i>Provincia</i>	<i>Cantón</i>	<i>Haplotipo presente</i>
Carchi	<i>Tulcán</i>	<i>seq1</i>
	<i>Montúfar</i>	<i>A1</i>
		<i>A26a</i>
	<i>Mira</i>	<i>seq2</i>
Imbabura	<i>Cotacachi</i>	<i>A26a</i>
		<i>C2j</i>
		<i>A30</i>
		<i>A26c</i>
	<i>Antonio Ante</i>	<i>seq2</i>
		<i>C2j</i>
	<i>Ibarra</i>	<i>A26c</i>
		<i>seq2</i>
		<i>A31</i>
		<i>C1</i>
Pichincha	<i>Cayambe</i>	<i>C2j</i>
		<i>A26a</i>
		<i>A26c</i>
	<i>Mejía</i>	<i>A26a</i>
		<i>A1e</i>
	<i>Pedro Moncayo</i>	<i>C1</i>
	<i>Quito</i>	<i>C2j</i>
		<i>A30</i>
		<i>A26a</i>
		<i>C31</i>
<i>A1</i>		
<i>Rumiñahui</i>	<i>seq1</i>	

4.3.1 Análisis morfométrico tomando en cuenta haplotipos.

Al tomar en cuenta los haplotipos en el análisis morfométrico se obtuvieron los resultados expuestos a continuación.

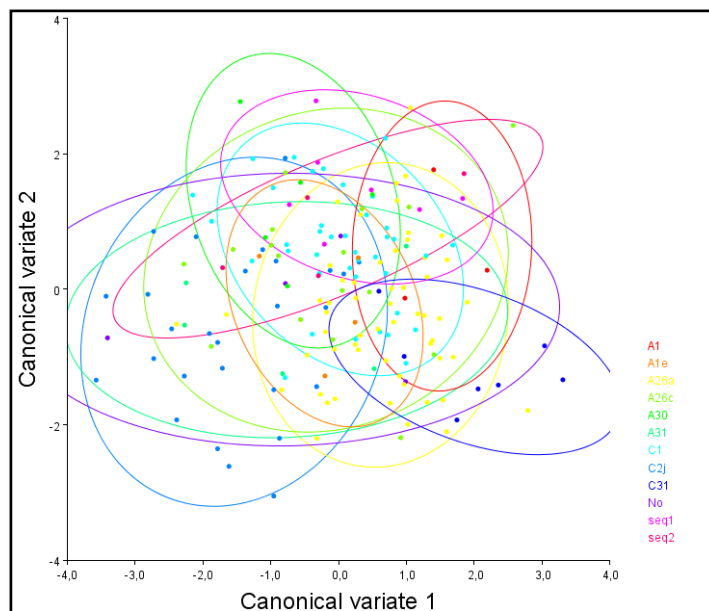


Figura 28: Análisis de Variables Canónicas (CVA) en base a los haplotipos encontrados en las tres provincias.

Como se puede observar en la **Figura 28**, todas las elipses se superponen, lo que indica que no existen diferencias entre grupos. Esto resultados se repiten en la **Figura 29**.

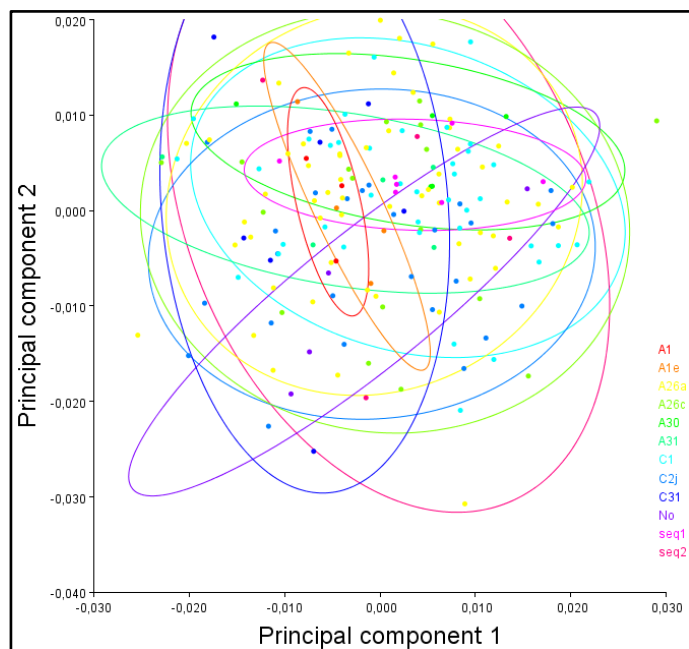


Figura 29: Análisis de componentes principales (PCA) en base a los haplotipos encontrados en las tres provincias.

CAPITULO V

5 DISCUSIÓN

5.1 Primera fase: Análisis Morfométrico de *Apis mellifera*.

Se considera un estudio morfométrico completo a aquel que analiza todas las características del organismo, tales como color, tamaño o forma (Paraíso, Lucas, & Kakaï, 2017); en nuestro caso solamente se analizaron las alas.

Los “landmarks” tomados en este proyecto son de Tipo I, debido a que señalan yuxtaposiciones en el tejido (Palci & Lee, 2018), que en este caso son los puntos de unión de las venaciones de las alas. El tomar como “landmarks” a estos puntos de unión es algo común en análisis morfométrico en *Apis mellifera* y en insectos alados en general (M. Meixner et al., 2013).

El análisis de los p-value para las distancias de Mahalanobis muestra que si existe una diferencia estadística entre las provincias de Pichincha y Carchi; además de mostrar diferencias entre algunos cantones; este hecho se corrobora al existir un $p\text{-value} < 0.05$ (Gutierrez & De la Vara, 2012). Las diferencias entre Pichincha y Carchi estarían justificadas debido a su distancia geográfica; pero en el caso de los cantones, esto no sucede al mostrarse diferencias incluso entre cantones situados geográficamente cerca; este hecho se vería justificado por la comercialización de colmenas o porque existe un mismo dueño para varias apiarios a lo largo de las tres provincias (Suasnávar et al., 2018).

Por otro lado los resultados parecen no coincidir con las gráficas obtenidas en PCA, las mismas que muestran que existe una superposición, es decir, no existe diferencias entre todas las colmenas analizadas; al ser una prueba que reduce el número de dimensiones a dos o tres factores principales reduciendo las variables no necesarias, se considera más preciso (De la Fuente Fernández, 2018). Los mismos resultados se repiten en CVA, un análisis cuyo objetivo es encontrar transformaciones lineales de los datos para maximizar las diferencias entre grupos (López, 2015), en este caso las gráficas muestran que no existe diferencias entre ninguno de los grupos tanto en el caso de Provincias como en cantones.

Se ha comprobado que las características del ambiente influye en las diferencias morfológicas de las abejas (Rašić & Stanisavljević, 2015). Nuestros resultados confirman lo anterior, al no mostrar variaciones en la morfología de las alas de *Apis mellifera*, debido a que las tres provincias poseen características climáticas casi similares. La falta de variación morfológica en estas colmenas puede deberse también a las técnicas de selección de individuos utilizadas comúnmente en la apicultura artesanal, un hecho que se ha comprobado reduce la variabilidad de las poblaciones (De la Rúa, Jaffé, Dall'Olio, Muñoz, & Serrano, 2009).

5.2 Segunda fase Optimización de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Para optimizar la técnica de PCR se tomó un protocolo de referencia, este protocolo se adecuó a las condiciones propias del laboratorio. En base a este se variaron las condiciones previamente mencionadas (Espinosa Asuar, 2004). En base a los valores iniciales, se suelen probar cantidades menores (Harris, 1998).

En base a referencias, se efectuó un gradiente para determinar la temperatura más adecuada. Los resultados expuestos en la **Figura 22**, muestran que la temperatura de 51°C fue la que mejor resultados obtuvo. Esto concuerda con la temperatura de annealing recomendada para los pares de primers empleados (Garnery et al., 1991); por otro lado, otras fuentes citan los 46°C como temperatura correcta (A. L. Szalanski et al., 2016), razón por la cual el gradiente empezó en esta temperatura.

El segundo parámetro variado fue la concentración de MgCl₂. En nuestro caso se tomaron concentraciones que iban de 1 a 1,5 mM, ya que según lo reportado por Kozmus *et al*, 2007 se toma como concentración apropiada a 1,5 mM; por otro lado, se suele tomar esta concentración, como concentración de inicio para la optimización (García Marín, 2005). Un cambio de 0,25 mM puede significar la diferencia entre conseguir un excelente producto y no conseguir ningún resultado (Harris, 1998), por esta razón las variaciones no sobrepasaban esta concentración una de la otra. El cloruro de magnesio actúa como co-factor en la reacción, por lo que debe estar en condiciones de 1 a 3 mM (García Marín, 2005).

El exceso de este compuesto puede producir productos inespecíficos, mientras que una baja concentración produce un bajo rendimiento (Rodríguez & Barrera, 2004). En los resultados expuestos en la **Figura 23**, se puede apreciar una gran cantidad de bandas inespecíficas, lo cual indicaría una alta concentración de magnesio; aun así se decidió tomar a 1,25 mM como la concentración más adecuada y variar otros factores.

Se tomaron en cuenta 35 y 40 ciclos para esta fase, debido a que de acuerdo a lo reportado por Szalanski *et al.*, 2016, se necesitan 40 ciclos para obtener una concentración adecuada de ADN en PCR. Por otro lado, la reducción de número de ciclos ayuda a reducir la cantidad de bandas inespecíficas aunque se obtiene menos producto (Espinosa Asuar, 2004).

Se evitó cantidades mayores a 40 ciclos, debido a que un número alto de ciclos puede dar origen a la producción de productos inespecíficos por hibridaciones inesperadas, además de bajar la productividad de la Taq polimerasa (Harris, 1998).

Los resultados expuestos en la **Figura 24** mostraron que 35 ciclos eran suficientes para obtener menos productos inespecíficos; aun así se procedió a hacer variaciones en la concentración de ADN, lo cual no es recomendado, ya que en optimización primero se varia la concentración del ADN molde y luego se estandarizan los ciclos (Rodríguez & Barrera, 2004).

La concentración de ADN con la cual se empezó la optimización es de 27.5 ng/ μ l, la cual es muy baja tomando en cuenta que los primeros ensayos reportados tenían concentraciones superiores a 150 ng/ μ l (M. Meixner *et al.*, 2013). En nuestro caso, se comprobó que esta PCR no servía a concentraciones mayores a 75 ng/ μ l, debido a que el exceso de ADN puede inhibir la reacción (Espinosa Asuar, 2004). Los resultados en cuanto a concentración de ADN (Figura 25) arrojaron que la concentración de 10 ng/ μ l era suficiente para obtener resultados óptimos.

El ADN control que se utilizó para la optimización provenía del Apiario 1 Colmena 5 y fue extraído con el Kit DNeasy Blood & Tissue Kits de Qiagen®, debido a que para optimización se requiere un ADN con alta pureza (Espinosa Asuar, 2004), algo que está garantizado por los fabricantes del kit. (Qiagen, 2018). Por lo que se comprobó si se podía aplicar estos mismos resultados a ADN extraído manualmente; debido a que se ha comprobado que mientras más limpia este la secuencia, mayor es la sensibilidad (Harris, 1998); algo que se ve

afectado en el ADN extraído manualmente, porque el fenol-cloroformo, el cloroformo alcohol-isoamílico y el etanol que son reactivos que se utilizan en extracciones manuales, inhiben la PCR (Espinosa Asuar, 2004). Los resultados de estas pruebas se pueden observar en el Anexo 1, donde se muestran diferentes ensayos hechos con ADN extraído sin ningún tipo de kit; demostrando que esta PCR optimizada también puede ser utilizada en ADN extraído manualmente.

5.3 Tercera fase: Análisis de las secuencias para determinar haplotipos.

Los resultados obtenidos en electroforesis indican que los especímenes analizados pertenecen a *Apis mellifera*, esto debido a que sus haplotipos poseen tamaños de bandas que oscilan entre los 530 a 1230 pb (M. Meixner et al., 2013).

Por otro lado se confirma la presencia del linaje A y C, los mismos que provienen de África y Europa del Este (A. L. Szalanski et al., 2016). La presencia de ambos linajes, incluso en un mismo apiario y en una misma colmena, son evidencia de un proceso de hibridación; el mismo que se ve favorecido por el clima cambiante de la región (Quezada-Euán et al., 2003). Este proceso de hibridación podría explicar la falta de diferencias morfológicas en las abejas obtenidas tal como se puede apreciar en las **Figuras 28** y **29**. La presencia de ambos linajes, además, ha sido reportado tanto en Colombia (Prada, Durán, Salamanca, & Del Lama, 2009), como en Perú (Quezada-Euán et al., 2003).

La presencia en nuestro país de la abeja africanizada se dio a principios de la década de los setenta (Vivas Espinosa, 2015), y se confirma con los análisis moleculares obtenidos en nuestro estudio donde existe un gran número de colmenas con este linaje; a este hecho se le denomina “Africanización” (Clarke, Rinderer, Franck, Quezada-euán, & Oldroyd, 2016).

La “Africanización” se da principalmente debido a las cualidades de la abeja africana, la cual se ha comprobado es más agresiva, resiste de mejor forma los climas cálidos, entra en equilibrio con la abeja europea en climas fríos, forman enjambres de manera mucho más rápida (Quezada-Euán et al., 2003) y mayor resistencia a *Varroa* y a infecciones virales (Tibatá et al., 2017). Existen dentro de nuestro estudio, algunos apiarios que poseen ambos linajes, lo cual

puede darse debido a la colonización por parte del linaje Africano (Branchiccela et al., 2014) o por acción directa del apicultor, quien coloca nuevas reinas en colmenas “huérfanas” (Suasnávar et al., 2018). Resultados similares han sido reportados en varios países a lo largo de Latinoamérica (Prada et al., 2009).

Al analizar la base de datos obtenida por Fuentes, 2017, y compararla con los resultados obtenidos, no se ve una tendencia significativa de los haplotipos en base a dueño del apiario o localización geográfica, tal como se puede apreciar en la **Tabla 10**; estos resultados fueron confirmados por la prueba Chi-cuadrado que se puede observar en la **Tabla 9**, que determinó que ambas variables (provincia y linaje) son independientes, al existir un valor de P-value(0.1728) menor al nivel de significancia escogido(0.05) (Becerra, 2015).

Ambos linajes han llegado a coexistir en mismos apiarios como en el caso de los apiarios 4, 6, 8, 10, 12 y 13; lo cual podría indicar que estos apiarios se encuentran en fase de “Africanización”(Clarke et al., 2016) o se encuentran en equilibrio, algo común en climas fríos (Quezada-Euán et al., 2003). La presencia de varios haplotipos dentro de una sola región ayuda a evitar efectos indeseables producto de la endogamia (De la Rúa & Sanchez, 2010).

De los haplotipos africanos obtenidos: A26a, A26c, A30, A1, A1e, A31, seq1 y seq2. Solo los cuatro primeros han sido reportados en Colombia y países adyacentes (Tibatá et al., 2017); mientras que en el caso de los cuatro últimos: A31 ha sido reportado en Europa (Pinto, Muñoz, Chávez-Galarza, & De la Rúa, 2012), A1e fue reportado por primera vez en los Estados Unidos (A. Szalanski & Magnus, 2015), sin ningún reporte del mismo en la región; y los dos últimos se encuentran en estudio. Al analizar los resultados de frecuencia, se puede observar una tendencia a la “Africanización” hacia el norte, siendo el Carchi, la provincia con mayor frecuencia del Linaje Africano y la Provincia de Pichincha la menor; al ser Colombia un país donde se ha reportado la “Africanización” como un problema (Prada et al., 2009), se podría deducir que ha habido entrada de *Apis mellifera* por la frontera. Esta zona puede ser considerada una zona de hibridación, debido a alta frecuencia de linaje Africano (Diniz, Egea Soares, Sheppard, & Del Lama, 2003).

En el caso del haplotipo C1 este es abundante dentro de Buenos Aires - Argentina; además de mostrar una alta predominancia en países vecinos (Branchiccela et al., 2014), en nuestro caso este fue el segundo haplotipo de Europa del Este más abundante.

El haplotipo C2j fue descrito por primera vez en Serbia (Nedic, Stanisavljevic, & Stanisavljević, 2009) y no existen registros de este haplotipo dentro de países cercanos (Prada et al., 2009). Aun así, este es el haplotipo de Europa del Este más abundante dentro de esta región; lo cual podría deberse a importaciones o tráfico de reinas (Branchiccela et al., 2014) o a una mutación dada en la posición 3587 en la que se cambia una guanina por una adenina, a dos deleciones en la posición 3534 y 3428, y al cambio de una citosina por una timina en la posición 3767 en el ADN mitocondrial (Nedic et al., 2009). Los haplotipos del linaje C se diferencian entre sí en un total de cinco posiciones nucleotídicas (De la Rúa & Sanchez, 2010).

En el caso del haplotipo C31, este fue reportado por primera en Estados Unidos. En los últimos años, han aumentado la cantidad de abejas reinas importadas de este país (Vásconez, 2017), lo cual también podría explicar la entrada de estos haplotipos, (A. Szalanski & Magnus, 2015).

La presencia de haplotipos no reportados en países vecinos sugiere que en la actualidad se están importando reinas provenientes de Europa y África, algo muy común en la apicultura actualmente a lo largo de toda Latinoamérica (Branchiccela et al., 2014).

A este grupo de haplotipos se le suma los resultados obtenidos en el Apiario 9 colmena 5, el mismo que no encontró coincidencia con el software Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Este resultado podría indicar la presencia de un nuevo haplotipo, el mismo que parece formar parte del linaje C. Este haplotipo podría tratarse de un producto de hibridación (Quezada-Euán et al., 2003).

La no presencia de los otros tres linajes restantes, coinciden con los resultados de varios países de la región como Perú, Colombia, Uruguay y Argentina; los mismos que no han reportado su ingreso (Branchiccela et al., 2014).

Los haplotipos suelen diferenciarse uno de otros por pequeños cambios dados en determinadas partes (Zhang & Niu, 2010), lo cual explica la gran variedad existente. Es esta la

razón por la cual al realizar el análisis para obtener el árbol filogenético de máxima verosimilitud, no se pudo apreciar grandes diferencias en algunas ramas; para evitar esto se recomienda el realizar clonación de los productos de PCR (Evans et al., 2013) .

CAPITULO VI

6 CONCLUSIONES

- No existen diferencias morfométricas entre los especímenes de *Apis mellifera* tomados en las tres provincias, por lo que no fue posible la caracterización por este medio.
- Bajo las condiciones del laboratorio, la PCR mostró sensibilidad en concentraciones de 5 a 75 ng/ul de ADN; utilizando 1,25 mM de MgCl₂ con 35 ciclos y una temperatura de annealing de 51°C.
- La PCR optimizada pudo determinar amplicones con un peso entre 530 y 1230 pb en los 178 apiarios.
- Se comprobó la presencia del Linaje A (proveniente de África) con un total de ocho haplotipos(A26a, A26c, A30, A31, seq1, seq2, A1 y A1e); y del linaje C (proveniente de Europa del Este) con un total de 3 haplotipos(C1, C31 y C2j); estos resultados demuestran que actualmente esta región está en un proceso de “Africanización”.
- De los haplotipos encontrados, 4 se encuentran en Carchi, 7 en Imbabura y 9 en Pichincha.

7 RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el estudio en otras provincias, especialmente en aquellas en las que *Apis mellifera* podría significar un problema para el ecosistema; debido al peligro que representan por su agresividad lo que las ha llevado a ser consideradas como un problema de salud pública en algunos países.
- El capacitar a apicultores acerca de la necesidad de conocer el tipo de *Apis mellifera* que poseen en sus apiarios, para de esta forma reducir el nivel de Africanización.

- Empezar medidas para regular la “Africanización” en *Apis mellifera*, debido a los graves problemas que esto conlleva para especies endémicas y humanos.
- Se recomienda realizar un ensayo de RFLP-PCR, el mismo que ayudará a determinar si los resultados obtenidos en el Apiario 9 colmena 5 pueden ser considerados como parte de un nuevo haplotipo.
- Repetir el estudio utilizando clonación, si es que se requiere el acentuar las diferencias entre las secuencias, ya que la clonación permite el reducir el número de bases nucleotídicas que se pierden durante la secuenciación.

CAPITULO VII

8 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Agila, R. (2015). *Diagnóstico de la Producción Apícola y Meliponícola en los cantones de Macará, Paltas y Gonzanamá de la Provincia de Loja*. Universidad Nacional de Loja.
- Alattala, Y., Ghamdia, A. Al, Al Sharhia, M., & Fuchsb, S. (2014). Morphometric characterisation of the native Honeybee , *Apis mellifera* Linnaeus , 1758 , of Saudi Arabia. *Zoology in the Middle East*, (October 2015). <https://doi.org/10.1080/09397140.2014.944431>
- Bailey-Wilson, J. (2018). Haplotype. Retrieved from <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=99>
- Becerra, J. (2015). *Estadísticas Descriptiva*. Retrieved from http://132.248.164.227/publicaciones/docs/apuntes_matematicas/34_Estadistica_Descriptiva.pdf
- Borbor, J. A. (2015). *RESPUESTAS DE LAS ABEJAS (Apis mellifera) A DIFERENTES ALTERNATIVAS DE ALIMENTACIÓN EN LA COMUNA DE OLON, PROVINCIA SANTA ELENA*. Universidad Estatal Península de Santa Elena. Retrieved from <http://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/2242/1/UPSE-TIA-2015-025.pdf>
- Bradbear, N. (2018). La apicultura y los medios de vida sostenibles. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s00.htm#Contents>
- Branchiccela, B., Aguirre, C., Parra, G., Estay, P., Zunino, P., & Antúnez, K. (2014). Original article Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 years of Africanization. *Apidologie*, (Mgap 2012). <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0293-2>
- Cabrera, J. (2014). *La Apicultura en el Ecuador: Antecedentes Históricos*.
- Cánovas, F., De la Rúa, P., Serrano, J., & Galian, J. (2002). VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN POBLACIONES DE APIS MELLIFERA IBERICA DE GALICIA (NW ESPAÑA). *Archivos de Zootecnia*, 51, 441–448. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/495/49519604.pdf>
- Clarke, K., Rinderer, T., Franck, P., Quezada-euán, J., & Oldroyd, B. (2016). The Africanization of Honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan : A Study of a Massive Hybridization Event across. *Society for the Study of Evolution*, 56(7), 1462–1474.
- Cruz, C. (2017). *Determinación de las Especies de Varroa presentes en apiarios del Valle de Los Chillos (Ecuador), mediante morfometría geométrica*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Retrieved from <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13584/1/T-IASA I-005357.pdf>
- De la Fuente Fernández, S. (2018). *ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP) (Primera)*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- De la Rúa, P. (1999). *Variabilidad genética , análisis molecular y filogenia de poblaciones*

ibéricas y canarias de Apis mellifera (Linneo 1758) (Hymenoptera : Apidae) Variabilidad genética , análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de Apis mellifer. Universidad de Murcia.

- De la Rúa, P., Galian, J., & Serrano, J. (1999). Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de abejas de la miel (*Apis mellifera* L .) de la región de Murcia. *Investigaciones Agronómicas*, 14(May 2014). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/277265194_Variabilidad_del_ADN_mitocondrial_cn_poblaciones_de_abejas_de_la_miel_Apis_mellifera_L_de_la_region_de_Murcia
- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., & Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40, 263–284.
- De la Rúa, P., & Sanchez, O. (2010). *Caracterización molecular de abejas de la APICOLA MALKA S.R.L. de Argentina J.*
- Diniz, N. M., Egea Soares, A. E., Sheppard, W. S., & Del Lama, M. (2003). Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetic and Molecular Biology*, 52, 47–52.
- Espinosa Asuar, L. (2004). Guía práctica sobre la técnica de PCR. In *Las herramientas moleculares* (pp. 517–540).
- Evans, J. D., Schwarz, R. S., Chen, Y. P., Budge, G., Cornman, R. S., Rúa, P. De, ... Pinto, M. A. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera* Métodos estándar para la investigación molecular en *Apis mellifera* 摘要, 1(4), 1–54. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>
- FAO. (2018). Principales enfermedades de las abejas melíferas. Retrieved from <http://teca.fao.org/es/read/8676>
- Farshineh, M. B., Vafsi, H., Firatli, C., & Bahreini, R. (2009). Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, (November 2015). <https://doi.org/10.1051/apido/2008068>
- García-Olivares, V., Zaragoza-Trello, C., Ramirez, J., Guerrero-Peñaranda, A., & Ruíz, C. (2015). Caracterización rápida de la biodiversidad usando morfometría geométrica : Caso de estudio con abejas sin aguijón (*Apidae : Meliponini*) del sur de Ecuador. *Avances En Ciencias E Ingenierías.*, (May).
- García Marín, C. (2005). *Estandarización de la Técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para detección de Salmonella spp . en alimentos.* Universidad de Costa Rica.
- Garnery, L., Vautrin, D., Cornuet, J., & Solignac, M. (1991). Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data Phylogenetic relationships, (January 1990).
- Gutierrez, H., & De la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de Experimentos* (Tercera). México D.F: Mc Graw.
- Harris, E. (1998). *A low-cost approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques.* (K. Nazreen, Ed.). New York: Oxford University Press.

- Insuasty-Santacruz, E., Martínez-Benavides, J., & Jurado-Gámez, H. (2016). Identificación de Flora y Análisis Nutricional de Miel de Abeja Para la Producción Apícola. *Biotechnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 14(1), 37–44.
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)37-44](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)37-44)
- Irfan, K., Meixner, M., Ozkan, A., & Sheppard, W. (2006). Genetic characterization of honey bee (*Apis mellifera cypria*) populations in northern Cyprus *. *EDP Sciences*, 37, 547–555.
- Llorente, J. (2017). *Anatomía externa de las abejas*. Retrieved from <http://abejas.org/anatomia-externa-de-las-abejas/>
- López, A. (2015). Notas Morfometría geométrica : el estudio de la forma y su aplicación en biología. *Temas de Ciencia Y Tecnología*, 19, 53–59.
- Magaña, A., Lanz, P., Pacheco, O., Velázquez, C., & Navarro, A. (2017). *Autoreproducción de abejas reina*. (C. de Postgraduados, Ed.) (Primera Ed). México.
- MAGAP. (2018). Ecuador tiene potencial para la Apicultura. *Ministerio de Agricultura Y Ganadería*. Retrieved from <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-tiene-potencial-para-la-apicultura/>
- Magnus, R., Tripodi, A. D., & Szalanski, A. L. (2011). Mitochondrial DNA diversity of honey bees , *Apis mellifera* L . (Hymenoptera : Apidae) from queen breeders in the United States. *Journal of Apicultural Science*, 55(January).
- Magnus, R., Tripodi, A., & Szalanski, A. (2014). Mitochondrial DNA Diversity of Honey Bees (*Apis mellifera*) from Unmanaged Colonies and Swarms in the United States. *Biochemical Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10528-014-9644-y>
- Meixner, M. D., Worobik, M., Wilde, J., Fuchs, S., & Koeniger, N. (2007). *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe - Morphometric variation and determination of its range limits. *Apidologie*, 38(March), 1–9. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Meixner, M., Pinto, M. A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., & Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* Métodos estándar para la caracterización de las subspecies y ecotipos de *Apis mellifera* 摘要, 1(4), 1–28.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>
- Mina, W., & Sanchez, G. (2013). *Estudio de la Factibilidad para la Implementación de una Granja Apícola Extractora de Apitoxina en la Finca “Dos Ríos”, sector Nanegalito, provincia de Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- Montoya-Pfeiffer, P. M., León, D., Chamorro, F., & Nates-Parra, G. (2016). *Apis mellifera* como polinizador de cultivos en Colombia. *Iniciativa Colombiana de Polinizadores - Abejas*, (December), 95–105.
- Nation, J. (2002). *Insect physiology and biochemistry*. (C. Press, Ed.) (Third Edit).
- Nedic, N., Stanisavljevic, J. D., & Stanisavljević, L. (2009). Molecular characterization of the honeybee *Apis mellifera carnica* in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 4(May 2014).
<https://doi.org/10.2298/ABS0904587N>
- Özkan, A., Gharleko, M. M., Özden, B., & Kandemir, İ. (2009). Multivariate Morphometric

- Study on *Apis florea* Distributed in Iran. *Turkish Journal of Zoology*, 33, 93–102.
- Palci, A., & Lee, M. (2018). Geometric morphometrics, homology and cladistics: review and recommendations. *Cladistics*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/cla.12340>
- Paraíso, A., Lucas, R., & Kakaï, G. (2017). Compliance of the Morphometric Characteristics of Bees in Benin with Those of *Apis mellifera Adansonii* Compliance of the Morphometric Characteristics of Bees in Benin with Those of *Apis mellifera Adansonii*, (January). <https://doi.org/10.3923/je.2017>
- Pérez- Ziegele, H. (2007). *Evaluación del efecto del ácido fórmico sobre Varroa destructor Anderson & Trueman (Mesostigmata: Varroidae), aplicado en otoño, sobre colonias de Apis mellifera L.(Hym: Apidae) en Valdivia*. Universidad Austral de Chile. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fap438e/doc/fap438e.pdf>
- Pinto, M. A., Muñoz, I., Chávez-Galarza, J., & De la Rúa, P. (2012). The Atlantic side of the Iberian Peninsula : a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity. *Apidologie*, 43, 663–673. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0141-1>
- Prada, C., Durán, J., Salamanca, G., & Del Lama, M. (2009). Population genetics of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae) from Colombia. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 48(August 2015). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.1.02>
- Qiagen. (2018). DNeasy Blood & Tissue Kits. In *DNeasy Blood & Tissue Kits*.
- Quezada-Euán, J., Pérez-Castro, E., & May-Itzá, W. (2003). Hybridization between European and African-derived honeybee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Perú. *Apidologie*, 34, 217–225. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Rašić, S., & Stanisavljević, L. (2015). Use of geometric morphometrics to differentiate selected lines of Carniolan honeybees (*Apis mellifera carnica*) in ... USE OF GEOMETRIC MORPHOMETRICS TO DIFFERENTIATE SELECTED LINES OF CARNIOLAN HONEYBEES (APIS MELLIFERA CARNICA) IN. *Archives of Biological Sciences*, (June). <https://doi.org/10.2298/ABS140224054R>
- Rodríguez, I., & Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3), 323–336.
- Rubiano, M. (2016). *Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblamiento de las colmenas en España: estudio de causas y consecuencias*. Universidad Complutense de Madrid.
- Souza, D. ., Evangelista-Rodrigues, Ribeiro, F., Álvarez, P., Farias, E. S. ., & Pereira, W. . (2009). ANÁLISES MORFOMÉTRICAS ENTRE APIS MELLIFERA DA MESORREGIÃO DO SERTÃO PARAIBANO *, 58(221), 65–71.
- Strange, J. P., Garnery, L., & Sheppard, W. S. (2008). Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation, (March 2017). <https://doi.org/10.1007/s10841-007-9093-6>
- Suasnívar, M., de León, G., & Guzmán, M. (2018). *Manual Básico de Apicultura*. Ciudad de Guatemala. Retrieved from <http://coba.com.gt/wp-content/uploads/2015/07/MANUAL-BASICO-DE-APICULTURA-I.pdf>

- Syromyatnikov, M. Y., Borodachev, A. V, Kokina, A. V, & Popov, V. N. (2018). A Molecular Method for the Identification of Honey Bee Subspecies Used by Beekeepers in Russia. *Insects*, 9(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/insects9010010>
- Szalanski, A. L., Tripodi, A. D., Trammel, C. E., & Downey, D. (2016). Mitochondrial DNA genetic diversity of honey bees , *Apis mellifera* , in Hawaii. *Apidologie*, 1908(47), 679–687. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0416-4>
- Szalanski, A., & Magnus, R. (2015). Mitochondrial DNA characterization of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L .) populations from the USA Mitochondrial DNA characterization of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L .) populations from the USA mellifera L .) africanizada de los EEUU. *Journal of Apicultural Research*, 8839(September). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.06>
- Tibatá, V. M., Arias, E., Corona, M., Botero, F. A., Figueroa-ramírez, J., & Junca, H. (2017). Determination of the Africanized mitotypes in populations of honey bees (*Apis mellifera* L .) of Colombia. *Journal of Apicultural Research*, 8839(December), 1–9. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1409065>
- Vandame, R., & Palacio, M. A. (2010). Salud de las abejas en Latinoamérica : un frágil equilibrio debido a la agricultura y la apicultura de baja intensidad. *17º CONGRESO INTERNACIONAL DE ACTUALIZACIÓN APÍCOLA*.
- Vásconez, J. (2017). *Análisis de los Costos de Producción de la Miel de Abeja en Ecuador*. Universidad San Francisco de Quito.
- Vivas Espinosa, L. (2015). *PREVALENCIA DE NOSEMA (Nosema spp .) EN COLMENARES DE LA REGIÓN NORTE Y CENTRO NORTE DEL ECUADOR JAIR QUITO – ECUADOR*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Webster, M., Hasselmann, M., Wallberg, A., & Scho, C. (2017). Two extended haplotype blocks are associated with adaptation to high altitude habitats in East African honey bees. *PloS One*, 1–30. <https://doi.org/10.5061/dryad.jn630.Funding>
- Yogesh, K., & Khan, M. S. (2014). Genetic variability of European honey bee , *Apis mellifera* in mid hills , plains and tarai region of India, 13(8), 916–925. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13142>
- Zhang, Y., & Niu, T. (2010). Haplotype Structure. *Handbook on Analyzing Human Genetic*, 25–77. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69264-5>

