

Africanización de colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en tres regiones climáticas del norte de México

Carlos A. Medina Flores^{a*}

0000-0002-9330-565X

Ernesto Guzmán Novoa^b

0000-0001-5632-0642

M. M. Hamiduzzaman^b

0000-0003-1078-8519

Jairo Aguilera Soto^a

0000-0002-4741-4695

Marco A. López Carlos^a

0000-0002-8163-5264

^a Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 Universidad Autónoma de Zacatecas
 Carretera Panamericana
 sección Zacatecas-Fresnillo km 31.5, El Cordovel,
 Gral. Enrique Estrada, Zacatecas, 98500, México

^b School of Environmental Sciences
 University of Guelph
 Guelph, ON, N1G 2W1, Canada

***Autor para correspondencia:**

Tel: +52 4789851255

Correo electrónico:

carlosmedinal@hotmail.com

Resumen

El propósito de esta investigación fue analizar el proceso de africanización de colonias manejadas de abejas (*Apis mellifera*) en tres ecoambientes del norte de México para determinar la frecuencia de fenotipos y genotipos africanos y europeos. Las colonias (n = 151) muestreadas se distribuyen en tres regiones del estado de Zacatecas: 1) semiseca templada, 2) semiseca semicálida y 3) subhúmeda templada. El tipo de ADN_{mt} se determinó mediante PCR-RFLP y el morfotipo, por medio del Sistema Rápido de Identificación de Abejas Africanizadas (FABIS, por sus siglas en inglés). Del total de colonias muestreadas en todas las regiones, los análisis de ADN_{mt} revelaron una frecuencia significativamente más elevada de linaje materno europeo (77.5%) que de africano (22.5%; $P < 0.0001$). Los análisis morfométricos clasificaron al 47% de las colonias como europeas y al 42.4% como africanizadas. La frecuencia de colonias con mitotipo y morfotipo o africano o europeo varió significativamente ($P < 0.05$) en cada región y sugiere un mayor grado de africanización en la región semiseca semicálida. En cambio, la frecuencia más elevada de las colonias con mitotipo y morfotipo europeo se presentó en la región semiseca templada. Los resultados sugieren que el ambiente afecta el grado de africanización de las colonias de abejas en el norte de México. Las colonias establecidas en zonas de mayor altitud y con climas más templados tendrán genotipos más europeos que las colonias establecidas en regiones tropicales. Se discuten diversas hipótesis para explicar estos resultados.

Palabras clave: *Apis mellifera*; Africanización; Morfotipo; Mitotipo; Clima; Zacatecas; México.

Introducción

Las llamadas abejas africanizadas constituyen una población híbrida producto del cruzamiento de subespecies europeas de abejas melíferas (ej.: *Apis mellifera mellifera*) con la abeja africana (*Apis mellifera scutellata*) importada en 1956 a Brasil (Kerr, 1967; Whitfield et al., 2006). Las abejas africanizadas se caracterizan por su elevado comportamiento defensivo y migratorio (Nogueira-Neto, 1964). El fenómeno de africanización inició a partir de la liberación de colonias de abejas africanas (*A. m. scutellata*) en 1956 (Kerr, 1967). El genotipo africano se vio favorecido

Recibido: 2015-09-11

Aceptado: 2015-12-20

Publicado: 2015-12-24

Información y declaraciones adicionales
 en la página 7

© Derechos de autor:

Carlos A. Medina Flores et al. 2015

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
 Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

por las condiciones tropicales de Brasil y por la ausencia de depredadores naturales (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011); entonces las colonias de abejas africanizadas se dispersaron a un ritmo de más de 300 km al año, desplazando a la abeja europea en los trópicos (Taylor, 1977; Hall, 1992).

Actualmente, las abejas africanizadas están presentes en la mayor parte de Sudamérica, virtualmente todo Centroamérica (Smith, 1991), México y el sur de los EUA, ocupando un rango aproximado de 20 millones de kilómetros cuadrados (Rinderer *et al.*, 1993). Su alta capacidad colonizadora constituye una de las invasiones biológicas más rápidas y espectaculares de las que se tenga conocimiento (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

La frecuencia del genotipo europeo ha disminuido en los trópicos debido a la africanización de las colonias de abejas, a consecuencia de factores tales como superioridad numérica y comportamiento de los zánganos africanizados (lo que les confiere ventaja sobre los zánganos europeos en la fecundación de reinas); usurpación de colonias europeas por enjambres de abejas africanizadas; ventajas en el proceso de selección natural, como su elevada tasa de reproducción y migración (enjambrazón y evasión); dominancia y ventaja reproductiva de las subfamilias con genotipo africano sobre las de origen europeo; resistencia y tolerancia a enfermedades; menor tiempo de desarrollo, y mayor comportamiento defensivo y de pillaje, entre otros (Schneider *et al.*, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

Las abejas africanizadas se detectaron por primera vez en México en 1986, en el estado de Chiapas, y 20 años más tarde ya estaban establecidas en todas las entidades del país (Quezada-Euán, 2007; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). La africanización es uno de los principales problemas que afectan a la industria apícola en México (Uribe *et al.*, 2003). El impacto negativo de este fenómeno es consecuencia del aumento del comportamiento defensivo, migratorio y de evasión de las abejas melíferas (Guzmán-Novoa, 2004; Guzmán-Novoa, 2011). Lo anterior ha provocado el abandono de la actividad en algunas regiones, cambios significativos en el manejo de estas abejas, muerte de personas y animales, incremento en los costos de producción y reducción del número de colonias y de la producción de miel, en relación con el manejo de abejas europeas (Uribe-Rubio *et al.*, 2003; Guzmán-Novoa, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

Existe mucha información sobre el proceso de africanización de las colonias de abejas para el sureste de México (Quezada-Euán 2000; Clarke *et al.*, 2002), pero muy poco se sabe acerca de este proceso bajo otras condiciones climáticas, prácticas apícolas y densidad de abejas europeas de otras regiones de América del Norte; tal es el caso de Zacatecas. Por ello, y considerando que no hay estudios que analicen la frecuencia de africanización en las colonias de abejas en zonas ubicadas en altitudes y climas variados, particularmente en el norte de México, esta investigación tuvo como objetivo determinar la frecuencia de colonias manejadas de abejas melíferas con fenotipos y mitotipos africanos y europeos en tres diferentes ecoambientes en el norte de México, dentro del estado de Zacatecas.

Materiales y métodos

Ubicación y muestreo

Durante dos semanas de octubre del 2011, se recolectaron muestras de abejas de 151 colonias de melíferas distribuidas en 25 apiarios comerciales. De cada apiario se muestreó el 20% del total de cada colonia. Las colonias pertenecían a diferentes productores y se localizaban en 15 municipios de tres regiones ecológicas de Zacatecas, México (22°57' N, 102°42' O). Cada porción seleccionada contenía unas 40 abejas obreras que se conservaron en etanol al 90%. Cada una de estas muestras se usó para determinar su ascendencia, o europea o africana. Las características climáticas y florales más relevantes de cada región se detallan en la [figura 1](#) y se describen a continuación.

Región semiseca templada

Es el área de mayor extensión en el territorio estatal (60% de la superficie) y es la más árida. Las características climatológicas relativas medias anuales son: precipitación de 469 mm, temperatura de 15°C y humedad de 54%, y el tipo de vegetación dominante es el pastizal mediano abierto (INEGI, 2005). Se evaluaron y muestrearon colonias de abejas distribuidas en los municipios de Fresnillo, Villanueva, Villa García, Guadalupe, Ojo Caliente y Zacatecas, en altitudes entre 1800 y 2400 m sobre nivel del mar.

Región subhúmeda templada

Los valores relativos medios anuales de esta región son: precipitación de 680 mm, temperatura de 18°C y humedad de 66.7%, y posee una vegetación tipo bosque latifoliado esclerófilo caducifolio (INEGI, 2005). Las muestras se tomaron de los municipios de Tepechitlán, Tlantenango, Momax, Nochistlán y Valparaíso, a altitudes entre 1200 y 2000 m sobre nivel del mar.

Región semiseca semicálida

Esta región se encuentra al sur de Zacatecas y tiene los siguientes valores relativos medios anuales: precipitación de 704 mm, temperatura de 19.5°C y humedad de 55%. El tipo de vegetación es selva baja caducifolia (INEGI, 2005). Las colonias muestreadas estaban ubicadas en los municipios de Tabasco, Jalpa, Juchipila y Moyahua, a altitudes entre 1000 y 1400 m sobre nivel del mar.

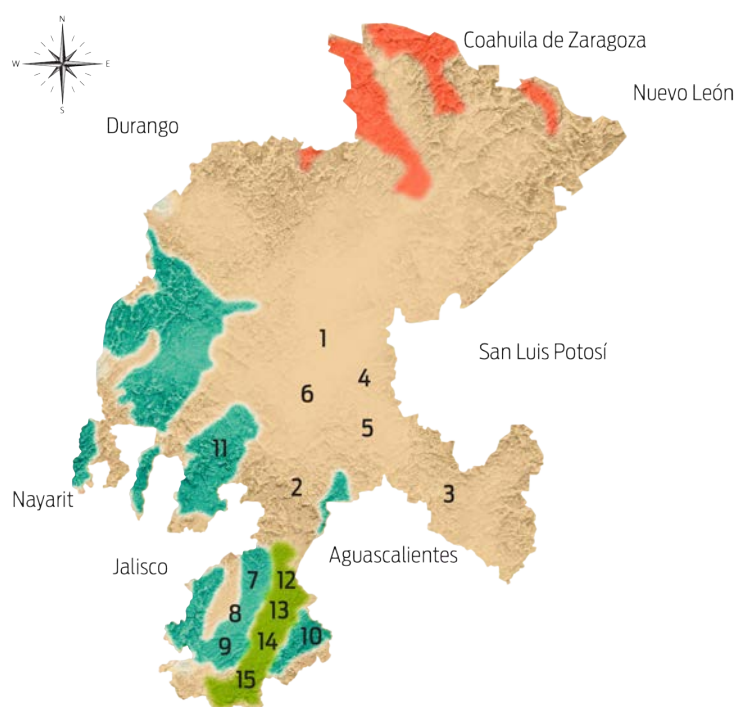


Figura 1. Mapa de relieve de Zacatecas, con la ubicación de los sitios de muestreo en las regiones: **semiseca templada**: Fresnillo (1), Villanueva (2), Villa García (3), Guadalupe (4), Ojo Caliente (5) y Zacatecas (6); **subhúmeda templada**: Tepechitlán (7), Tlantenango (8), Momax (9), Nochistlán (10) y Valparaíso (11); **semiseca semicálida**: Tabasco (12), Jalpa (13), Juchipila (14) y Moyahua (15).

Morfotipo y mitotipo

Para determinar el tipo morfológico de las abejas (morfotipo), se utilizó el Sistema Rápido de Identificación de la Abeja Africana (FABIS, por sus siglas en inglés; *Sylvester, 1987*). Por colonia, se diseccionó el ala anterior derecha de 30 abejas obreras; las alas se

montaron en diapositivas de plástico y se exhibieron a través de un proyector de diapositivas. Después, estas alas se midieron con una regla, se calculó su longitud real utilizando la fórmula de [Sylvester y Rinderer \(1987\)](#), y se obtuvo el promedio de las 30 alas.

Por colonia, los valores promedio de la longitud de ala se utilizaron para calcular la probabilidad de africanización. Las colonias con un promedio por encima de 9.001 mm se clasificaron como europeas, mientras que aquellas con un promedio por debajo de 8.968 mm se clasificaron como africanizadas y las colonias con promedios entre 8.968 y 9.001 mm se consideraron intermedias o mixtas.

Además, por colonia se utilizaron cinco abejas para determinar su haplotipo mitocondrial (mitotipo). Esto se llevó a cabo mediante la extracción de ADN de las muestras de abejas, muestras que se sometieron a amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos. Para ser más rigurosos, de acuerdo con [Nielsen *et al.* \(1999\)](#) las muestras se trataron con enzimas de restricción para producir y analizar marcadores de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) en un gel. Los análisis de los marcadores permitió clasificar las muestras en mitotipo o africano o europeo.

Los análisis morfométricos de las abejas se realizaron en la Unidad Académica de Veterinaria de la Universidad de Zacatecas, México, mientras los análisis moleculares para determinar el mitotipo se llevaron a cabo en la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de Guelph, Canadá.

Análisis estadístico

Las colonias se clasificaron de acuerdo con el morfotipo y mitotipo de sus abejas (africanas o europeas) para cada una de las regiones investigadas, y se compararon sus frecuencias por medio de pruebas de chi-cuadrada. Para evaluar con más objetividad el efecto de la región sobre el grado de africanización, las colonias se analizaron por separado según morfotipo, mitotipo o genotipo (colonias que tanto en los análisis morfométrico y de mitotipo resultaron ser o de ascendencia africana o europea). Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa de cómputo Sistema de Análisis Estadístico ([SAS Institute, 2002](#)).

Resultados

Del total de colonias muestreadas, el análisis morfométrico clasificó al 42.4% de las colonias como africanizadas y al 47% como europeas ($\chi^2 = 35.6$, $n = 151$, $P < 0.0001$); el resto de estas colonias (10.6%) tenían abejas cuya longitud intermedia de ala no permitió clasificarlas en las categorías establecidas por FABIS ([Sylvester, 1987](#)). Los análisis de ADN_{mt} arrojaron que la frecuencia de linaje materno africano fue de 22.5%, mientras que la frecuencia de descendencia materna europea fue de 77.5% ($\chi^2 = 45.6$, $n = 151$, $P < 0.0001$).

Las diferencias en las frecuencias de los morfotipos africanos y europeos fueron significativas, tanto intrarregión como entre las tres regiones, y sugieren un mayor grado de africanización en la zona semiseca semicálida, mientras que la

Cuadro 1. Número y porcentaje de colonias con morfotipo africano y europeo en las regiones semiseca templada, subhúmeda templada y semiseca semicálida de Zacatecas, México.

Morfotipo	Semiseca templada (n=50)	Subhúmeda templada (n=50)	Semiseca semicálida (n=51)
Africano (A)	7 (14%) ^a	22 (44%) ^b	35 (69%) ^c
Europeo (E)	36 (72%) ^a	23 (46%) ^b	12 (24%) ^c
A vs E	$\chi^2 = 33.64$, $P < 0.0001$	$\chi^2 = 12.28$, $P = 0.002$	$\chi^2 = 30.47$, $P < 0.0001$

Literales diferentes (a, b, c) en una misma línea indican diferencias significativas basadas en el análisis de χ^2 (chi-cuadrada): región semiseca templada vs subhúmeda templada ($\chi^2 = 10.58$, $n = 88$, $P = 0.001$), vs semiseca semicálida ($\chi^2 = 30.54$, $n = 90$, $P < 0.0001$); región subhúmeda templada vs semiseca semicálida ($\chi^2 = 6.38$, $n = 92$, $P = 0.011$).

Cuadro 2. Número y porcentaje de colonias de abejas con mitotipo africano y europeo en las regiones semiseca templada, subhúmeda templada y semiseca semicálida de Zacatecas, México.

Mitotipo	Semiseca templada (n=50)	Subhúmeda templada (n=50)	Semiseca semicálida (n=51)
Africano (A)	6 (12%) ^a	14 (28%) ^b	14 (27%) ^b
Europeo (E)	44 (88%) ^a	36 (72%) ^b	37 (73%) ^b
A vs E	$\chi^2 = 28.88$, $P < 0.0001$	$\chi^2 = 9.68$, $P = 0.0019$	$\chi^2 = 10.37$, $P = 0.0013$

Literales diferentes (a, b, c) en una misma línea indican diferencias significativas basadas en el análisis de χ^2 (chi-cuadrada): región semiseca templada vs subhúmeda templada ($\chi^2 = 3.8$, $n = 100$, $P = 0.05$), vs semiseca semicálida ($\chi^2 = 4.0$, $n = 101$, $P = 0.045$); región subhúmeda templada vs semiseca semicálida ($\chi^2 = 0.003$, $n = 101$, $P = 0.95$).

mayor frecuencia del morfotipo europeo se presentó en la zona semiseca templada (cuadro 1).

En relación con los mitotipos de las abejas en las tres zonas de estudio, la frecuencia de mitotipos europeos fue significativamente más alta que la de mitotipos africanos. Sin embargo, hubo una frecuencia significativamente más baja de colonias con mitotipo africano en la región semiseca templada que en la subhúmeda templada y la semiseca semicálida, pero entre estas dos últimas no hubo diferencia significativa (cuadro 2).

Solo 12% de las muestras (18 de 151) que resultaron con morfotipo africano tenían también mitotipo africano, mientras que 41% (62 de 151) tenían morfotipo y mitotipo europeo. Estas 80 colonias de genotipos extremos se analizaron por separado, considerándolas como de genotipos más africanos o más europeos. La frecuencia de colonias con genotipos extremos se muestra en el cuadro 3; nuevamente se evidencia que la frecuencia de genotipos africanos fue mayor en la región semiseca semicálida y nula en la semiseca templada.

Discusión

En 1991, por primera vez se reportó la presencia de las abejas africanizadas en el estado de Zacatecas (SAGARPA, 2005), y este es el primer estudio que revela la proporción de fenotipos y genotipos africanos en tres regiones de gran importancia apícola, regiones con diferente clima y altitud en el estado de Zacatecas.

Cuadro 3. Número y porcentaje de colonias de abejas con genotipo africano y europeo (colonias con morfotipo y mitotipo del mismo origen) en las regiones semiseca templada, subhúmeda templada y semiseca semicálida de Zacatecas, México.

Genotipo	Semiseca templada (n=33)	Subhúmeda templada (n=22)	Semiseca semicálida (n=25)
Africano (A)	0 (0%) ^a	5 (22.7%) ^b	13 (52%) ^c
Europeo (E)	33 (100%) ^a	17 (77.3%) ^b	12 (48%) ^c
A vs E	$\chi^2 = 0.00$, P = 0.000	$\chi^2 = 6.54$, P = 0.01	$\chi^2 = 0.040$, P = 0.84

Literales diferentes (a, b, c) en una misma línea indican diferencias significativas basadas en el análisis de χ^2 (chi-cuadrada): región semiseca templada vs subhúmeda templada ($\chi^2 = 8.25$, n = 55, P = 0.0041), vs semiseca semicálida ($\chi^2 = 22.11$, n = 58, P < 0.0001); región subhúmeda templada vs semiseca semicálida ($\chi^2 = 4.24$, n = 47, P = 0.0394).

Si se comparan los resultados aquí obtenidos con los de los escasos estudios realizados en los estados del norte de México, se observa que en Zacatecas existe una frecuencia similar de mitotipos africanos (22.5%) respecto a lo reportado en Baja California Sur (21%), pero inferior a la de Sonora (48%) y Baja California Norte (50%) (Zamora *et al.*, 2008). Sin embargo, con respecto al altiplano de México (Uribe *et al.*, 2003), la frecuencia de colonias con mitotipo africano fue 9% superior en Zacatecas. Recientemente, Domínguez-Ayala *et al.* (2015) señalaron que Zacatecas es el estado del norte de México con la menor proporción de mitotipos africanos, 12.5%, resultado que es 10 puntos porcentuales menor a lo encontrado en esta investigación, en la cual el número de muestras fue mayor al analizado por Domínguez-Ayala *et al.*

La proporción de colonias con abejas de diferentes morfotipo y mitotipo varió significativamente entre las regiones de estudio. Se encontró una mayor proporción de colonias con morfotipo o mitotipo europeo en la región semiseca templada que en las zonas subhúmeda templada y semiseca semicálida, en las cuales se observó una mayor proporción de morfotipos y mitotipos africanos. Estos resultados indican un mayor grado de africanización en las colonias de las zonas semiseca semicálida y subhúmeda templada, y un menor grado de africanización en las colonias de la zona semiseca templada, lo que sugiere que un efecto ambiental está implicado en la introgresión de genes africanos en las colonias de abejas comerciales. Esta conclusión coincide con los resultados de Domínguez-Ayala *et al.* (2015), quienes indican que en México existe un gradiente climático en la distribución del mitotipo africano.

Es probable que las diferencias entre las regiones en las frecuencias obtenidas de las colonias con ascendencia predominantemente o europea o africana se deban, al menos en parte, a las diferencias en el clima, la disponibilidad de los recursos florales y los sitios de anidación. En la región semiseca templada analizada, la vegetación es más escasa y la temperatura más baja, lo que reduce la reproducción de colonias durante el invierno y su vegetación proporciona un menor número de sitios de anidación que en las regiones subtropicales. Por lo tanto, es menos probable que las colonias de abejas enjambren y establezcan poblaciones silvestres en climas templados que en ambientes más tropicales (Otis, 1991; Clarke *et al.*, 2002). Las regiones tropicales y subtropicales son más favorables para que se produzca la introgresión de genes africanos en las colonias comerciales; esto se debe a que las abejas africanizadas se adaptan mejor a estos ambientes y, a dife-

rencia de las europeas, muestran mayor habilidad para reproducirse y dispersarse en los trópicos (Schneider *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005). La alta densidad de colonias de abejas africanizadas en ambientes tropicales se debe al incremento del apareamiento de zánganos africanos con reinas vírgenes europeas procedentes de colonias comerciales (Rinderer, 1991). Además, los enjambres africanizados con frecuencia usurpan las colonias comerciales en ambientes tropicales (Danka *et al.*, 1992). En apiarios comerciales como los muestreados, los apicultores cuentan con abejas descendientes de abejas europeas que prevalecían antes de la llegada de las abejas africanas a Zacatecas. Por lo tanto, una mayor proporción de introgresión de genes africanos en esta población pudo haber ocurrido vía paterna, principalmente a través del apareamiento entre reinas vírgenes de colonias comerciales y zánganos de origen africano producidos por colonias silvestres (Clarke *et al.*, 2002). Este proceso de africanización de las colonias comerciales explica por qué en esta investigación se clasificaron más colonias africanizadas por medio del análisis morfológico que por análisis mitocondrial, que solo detecta la herencia materna.

Por otro lado, y debido a que el estudio se hizo en colonias comerciales, el posible reemplazo de reinas, realizado por los productores, es otro factor que pudiera haber influido en las frecuencias de morfotipos y mitotipos en las diferentes regiones, ya que esta práctica reduce la probabilidad de introgresión de genes africanos en poblaciones de abejas comerciales (Zamora *et al.*, 2008). Sin embargo, esto se discutió con los productores y no hay evidencia que sugiera que en la región semiseca templada se hubiera llevado a cabo un mayor reemplazo de reinas que en las otras regiones.

Conclusión

Los resultados sugieren que el clima afecta el grado de africanización de las colonias de abejas en el norte de México. Entonces, se espera que las colonias establecidas en regiones de mayor altitud y con climas más templados mantengan genotipos de abejas más europeos que las colonias establecidas en regiones tropicales.

Financiamiento

Esta investigación tuvo financiamiento parcial del NSERC Canadá, subvención concedida a Ernesto Guzmán-Novoa.

Agradecimientos

A Laura G. Espinosa, José L. Uribe, Carlos F. Aréchiga y Ramón Gutiérrez por sus invaluables sugerencias en una versión anterior del manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Carlos A. Medina-Flores: Diseñó el estudio, realizó todos los análisis y escribió parte del manuscrito.

Ernesto Guzmán-Novoa: Diseñó el estudio y escribió parte del manuscrito.

MM Hamiduzzaman: Realizó el análisis de PCR-RFLP e interpretó los resultados.

Jairo Aguilera Soto: Recolectó las muestras, analizó los resultados y revisó el manuscrito.

Marco A. López Carlos: Ayudó con los análisis morfométricos de las abejas y con el análisis estadístico.

Referencias

- 1) Clarke KE, Rinderer TE, Franck P, Quezada-Euán JJG, Oldroyd BP. 2002. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution*, 56(7):1462-1474. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01458.x
- 2) Danka RG, Hellmich RL, Rinderer TE. 1992. Nest usurpation, supersedure and colony failure contribute to Africanization of commercially managed European honey bees in Venezuela. *Journal of Apicultural Research*, 31(3-4):119-123.
- 3) Domínguez-Ayala R, Moo-Valle H, May-Itzá WDJ, Medina-Peralta S, Quezada-Euán JJG. 2015. Stock composition of northern neotropical honey bees: mitotype and morphotype diversity in Mexico (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 1-11. DOI: 10.1007/s13592-015-0414-6
- 4) Guzmán-Novoa E, Uribe RJL. 2004. Honey production by european, africanized and hybrid honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico. *American Bee Journal*, 144:318-320.
- 5) Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A, Guzmán G, Espinosa LG. 2011. History, colonization and impact of the africanized honey bee in Mexico. *Veterinaria México*, 42(2):149-178.
- 6) Hall GH. 1992. DNA studies reveal processes involved in the spread of New World African Honeybees. *Florida Entomologist*, 75(1):51-59. DOI: 10.2307/3495480
- 7) [INEGI] Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2005. Municipios de Zacatecas, pp. 234-235.
- 8) Kerr WE. 1967. The history of the introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal*, 39:3-5.
- 9) Nielsen DI, Ebert PR, Page RE Jr, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E. 2000. Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(1):1-6.
- 10) Nogueira-Neto P. 1964. The spread of a fierce African bee in Brazil. *Bee World*, 45(3):119-121.
- 11) Otis GW. 1991. Population biology of the africanized honey bee. In: Spivak M, Fletcher D, Breed M. *The African Honey Bee*. Boulder, Colorado, USA: Westview Press, pp. 213-234.
- 12) Pinto AM, Rubink WL, Patton JC, Coulson RN, Johnston JS. 2005. Africanization in the United States: replacement of feral european honey bees (*Apis mellifera* L.) by an african hybrid swarm. *Genetics*, 170:1653-1665.

- 13) Quezada-Euán JG. 2000. Hybridization between european and africanized honeybees in tropical Yucatan, Mexico. II. Morphometric, allozymic and mitochondrial DNA variability in feral colonies. *Apidologie*, 31(3):443-454. DOI: 10.1051/apido:2003010
- 14) Quezada-Euán JG. 2007. A retrospective history of the expansion of africanized honeybees in México. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46(4):295-300. DOI: 10.1080/00218839.2007.11101412
- 15) Quezada-Euán JG, Medina LM. 1998. Hybridization between european and africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) in tropical Yucatan, Mexico. I. Morphometric changes in feral and managed colonies. *Apidologie*, 29(6):555-568.
- 16) Rinderer TE, Hellmich RL. 1991. The processes of africanization. In: Spivak M, Fletcher D, Breed M. *The African Honey Bee*. Boulder, Colorado, USA: Westview Press, pp. 373-398.
- 17) Rinderer TE, Oldroyd BP, Sheppard WS. 1993. Africanized bees in the U.S. *Scientific American*, 269:52-58.
- 18) [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de información y estadística agroalimentaria (SIAP). 2005. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> [access: 14 jul 2011].
- 19) SAS Institute. 2002. *Statistical software Ver. 9.0*. [en línea] Cary, North Carolina, USA.
- 20) Schneider SS, DeGrandi-Hoffman G, Smith DR. 2004. The african honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. *Annual Review Entomology*, 49(1):351-376. DOI: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123359
- 21) Smith DR. 1991. African bees in the Americas: insights from biogeography and genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 6(1):17-21.
- 22) Sylvester HA, Rinderer TE. 1987. Fast Africanized Bee Identification System (FABIS) Manual. *American Bee Journal*, 127(7):511-516.
- 23) Taylor OR. 1977. The past and possible future spread of africanized honey bees in the Americas. *Bee World*, 58:19-30.
- 24) Uribe RJL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa BA, Zozaya RJA. 2003. Efecto de la africanización sobre la producción de miel, comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en el altiplano mexicano. *Veterinaria México*, 34(1):47-59.
- 25) Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D, Tsutsui ND. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799):642-645.
- 26) Zamora O, Domínguez R, Alaníz-Gutiérrez L, Quezada-Euán JG. 2008. Frequency of european and african-derived morphotypes and haplotypes in colonies of honey bees (*Apis mellifera*) from NW México. *Apidologie*, 39(4):388-396. DOI: 10.1051/apido:2008016

Africanization of honey bees (*Apis mellifera*) in three climatic regions of northern Mexico

Carlos A. Medina Flores^{a*}

0000-0002-9330-565X

Ernesto Guzmán Novoa^b

0000-0001-5632-0642

M. M. Hamiduzzaman^b

0000-0003-1078-8519

Jairo Aguilera Soto^a

0000-0002-4741-4695

Marco A. López Carlos^a

0000-0002-8163-5264

^a Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma de Zacatecas
Carretera Panamericana sección
Zacatecas-Fresnillo km 31.5, El Cordovel,
Gral. Enrique Estrada, Zacatecas, 98500, México

^b School of Environmental Sciences
University of Guelph
Guelph, ON, N1G 2W1, Canada

***Corresponding author:**

Tel: +52 4789851255

Email address:

carlosmedina1@hotmail.com

Abstract

This study was conducted to analyze the process of Africanization of managed honey bee (*Apis mellifera*) colonies by determining the frequency of African and European morphotypes and mitotypes (m_{mt} DNA) in three different ecological environments of northern Mexico. Colonies ($n=151$) were sampled in 1) temperate semi-dry; 2) semi-warm semi-dry; and 3) temperate sub-humid regions in the state of Zacatecas. The m_{mt} DNA type was determined by PCR-RFLP and the morphotype by the Fast Africanized Bee Identification System (FABIS). Out of all the colonies sampled in all areas, the m_{mt} DNA analysis showed a significantly higher frequency of European maternal lineage (77.5%) than of African maternal lineage (22.5%; $P < 0.0001$). The morphometric analysis classified 47% of the colonies as European and 42.4% of them as Africanized. The frequency of colonies with African or European mitotypes and morphotypes varied significantly between regions ($P < 0.05$) with results indicating a higher degree of Africanization in the semi-warm semi-dry region. Conversely, the highest frequency of colonies with the European morphotype and mitotype occurred in the temperate semi-dry region. These results suggest that the environment affects the degree of Africanization of honey bee colonies in northern Mexico. Colonies established at higher altitudes and in more temperate climates have more European genotypes than colonies established in tropical regions. Several hypotheses are discussed to explain these results.

Keywords: *Apis mellifera*; Africanization; Morphotype; Mitotype; Climate; Zacatecas; Mexico.

Received: 2015-09-11

Accepted: 2015-12-20

Published: 2015-12-24

Additional information and declarations
can be found on page 7

© Copyright 2015
Carlos A. Medina Flores et al.

open access 



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Introduction

The so-called Africanized honey bees are a hybrid population derived from the interbreeding of the European honey bee subspecies (e.g., *Apis mellifera mellifera*) and the African subspecies *Apis mellifera scutellata* imported into Brazil in 1956 (Kerr, 1967; Whitfield et al., 2006). Africanized bees are characterized by their highly defensive and migratory behaviors (Nogueira-Neto, 1964). The phenomenon of Africanization began following the release of the African bee (*A. m. scutellata*) colonies in 1956 (Kerr, 1967). The African genotype was favored by the

tropical conditions of Brazil and the absence of natural predators (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011); Africanized bee colonies dispersed at a rate of over 300 km per year, displacing European honey bees in the tropics (Taylor, 1977; Hall, 1992). At the present time, Africanized bees are well established in most of South America, virtually all of Central America (Smith, 1991), Mexico and the Southern USA, occupying a range of approximately 20 million km² (Rinderer *et al.*, 1993). The high colonizing ability of these bees is one of the fastest and most spectacular biological invasions known to date (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

The frequency of the European genotypes has decreased in the tropics due to the Africanization of honey bee colonies as a result of factors such as numerical superiority and the behavior of Africanized drones (which gives them an advantage over European drones in mating queens); usurpation of European colonies by swarms of Africanized bees; advantages resulting from the process of natural selection such as their high reproduction rate and migration (swarming and absconding behaviors); dominance and reproductive advantages of subfamilies of the African genotype compared to those of European origins; and resistance and tolerance to disease, shorter developmental time, higher defensive and robbing behavior, etc. (Schneider *et al.*, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

In Mexico, Africanized bees were first detected in 1986 in the state of Chiapas, and 20 years later, they had become well established in all states of the country (Quezada-Euan 2007; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). The Africanization of honey bee colonies is one of the main problems affecting the Mexican beekeeping industry (Uribe *et al.*, 2003). The negative impact of this phenomenon is a result of increased defensive, migratory and evasive behaviors of bees (Guzmán-Novoa and Uribe, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011). This has resulted in the abandonment of beekeeping in some regions, significant changes in the management of these bees, the death of people and animals, increased production costs and a reduction in number of colonies and honey production relative to managing European bees (Uribe-Rubio *et al.*, 2003; Guzmán-Novoa and Uribe, 2004; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011).

There is a considerable amount of information about the Africanization process of honey bee colonies in the southeast part of Mexico (Quezada-Euan, 2000; Clarke *et al.*, 2002), but little is known about this process in other regions of North America with different climatic conditions, beekeeping practices and densities of European bees, such as is the case in the state of Zacatecas, Mexico. Therefore, considering that there are no studies analyzing the Africanization process in honey bee colonies located at different altitudes and climates in northern Mexico, the objective of this study was to determine the frequency of managed honey bee colonies with African and European phenotypes and mitotypes in three different ecological environments in the state of Zacatecas.

Materials and methods

Location and sampling

Samples of bees were collected during two weeks in October of 2011, from 151 commercial honey bee colonies distributed in 25 commercial apiaries. Bee samples were collected from 20% of the total number of colonies of each apiary.

The sampled colonies belong to different producers and were located in 15 municipalities in three ecological regions of Zacatecas, Mexico (22°57'N, 102°42'W). Each sample consisted of approximately 40 worker bees that were stored in 90% ethanol. The samples were used to determine the African or European ancestry of the bees. The relevant climatic and floral characteristics of each region are described below and are presented in Fig. 1.

Temperate semi-dry region

This is the largest region in the state of Zacatecas (60% of its area) and also the driest. The average annual precipitation, temperature and relative humidity are 469 mm, 15 °C and 54%, respectively, and the dominant type of vegetation is semi-open grassland (INEGI, 2005). The evaluation and sampling process were conducted in colonies located in the municipalities of Fresnillo, Villanueva, Villa García, Guadalupe, Ojo Caliente and Zacatecas at altitudes between 1800 and 2400 m above sea level.

Temperate sub-humid region

This region is characterized by average annual rainfall, temperature and relative humidity of 680 mm, 18 °C and 66.7%, respectively, and the dominant vegetation type is sclerophyllous broadleaf deciduous forest (INEGI, 2005). The samples were taken from hives located in the municipalities of Tepechitlán, Tlantenango, Momax, Nochistlán and Valparaíso at altitudes between 1200 and 2000 m above sea level.

Semi-warm semi-dry region

This region is located in the southern part of the state and is characterized by average annual rainfall, temperature and relative humidity of 704 mm, 19.5 °C and 55%, respectively; the type of vegetation is tropical deciduous forest (INEGI, 2005). The colonies sampled were located in the municipalities of Tabasco, Jalpa, Juchipila and Moyahua at altitudes between 1000 and 1400 m above sea level.

Morphotype and mitotype

To determine the morphological type of bees (morphotype), the Fast Africanized Bee Identification System (FABIS; Sylvester and Rinderer, 1987) was used. Briefly, the right forewing of 30 workers per colony were dissected and mounted on plastic slides and projected on a screen using a slide projector. Then, they were measured with a ruler and using the formula provided by Sylvester and Rinderer (1987), their actual length was calculated and an average of the 30 wings was obtained. The average values for wing length per colony were used to calculate the probability of Africanization. Colonies with an average above

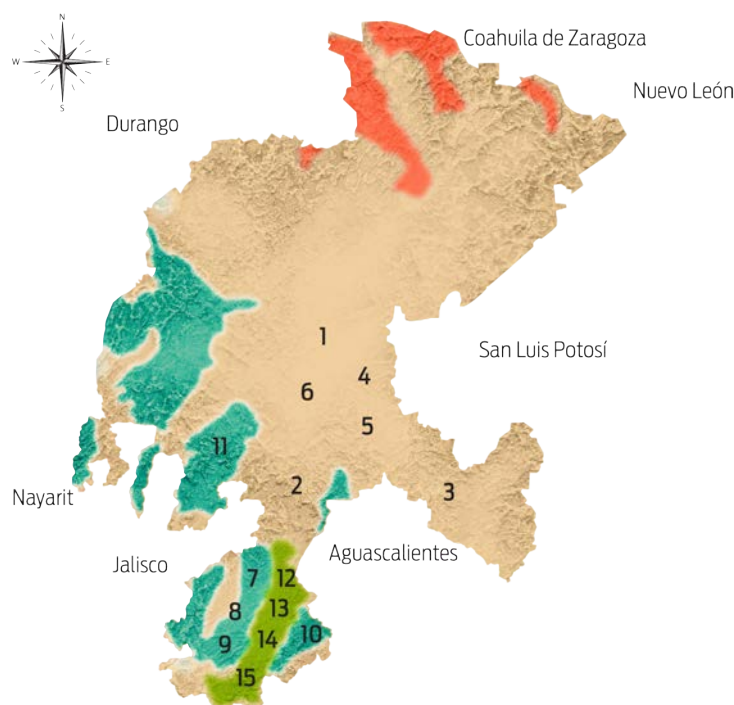


Figure 1. Relief map of Zacatecas, with the location of sampling sites in regions: **temperate semi-dry**: Fresnillo (1), Villanueva (2), Villa García (3), Guadalupe (4), Ojo Caliente (5) and Zacatecas (6); **temperate sub-humid**: Tepechitlán (7), Tlantenango (8), Momax (9), Nochistlán (10) and Valparaíso (11); **semi-warm semi-dry**: Tabasco (12), Jalpa (13), Juchipila (14), and Moyahua (15).

9.001 mm were classified as European, while those with an average below 8.968 mm were classified as Africanized. Colonies with mean values between 8.968 and 9.001 mm were considered intermediate or mixed.

Additionally, 5 bees per colony were used to determine their mitochondrial DNA haplotype (mitotype). This was conducted by extracting DNA from bee samples and subjecting it to PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification using specific primers. Additionally, the samples were further treated with restriction enzymes to produce and analyze RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markers on a gel as per [Nielsen *et al.* \(1999\)](#). The analyses of the markers allowed the classification of the samples as having an African or European mitotype.

The morphometric analyses of the bees were performed at the Veterinary Academic Unit, University of Zacatecas, Mexico. The molecular analyses to determine the mitotype of the bees were performed at the School of Environmental Sciences, University of Guelph, Canada.

Statistical analyses

Colonies were classified according to their bees' morphotype and mitotype (African or European) for each of the regions that were sampled, and their frequencies were subjected to chi-square tests for comparisons. To more objectively assess the effect of region on the degree of Africanization, colonies were separately analyzed by morphotype, mitotype, or genotype (colonies that in both classifications were either European or African-derived). All statistical analyses were performed using Statistical Analysis System ([SAS Institute, 2002](#)).

Results

Out of the total number of colonies sampled in all areas, the morphometric analysis classified 42.4% of the colonies as Africanized and 47% as European ($\chi^2 = 35.6$, $n = 151$, $P < 0.0001$). The rest of the sampled colonies (10.6%) had bees with intermediate measurements which did not allow classification into the categories established by FABIS ([Sylvester, Rinderer, 1987](#)). The _{mt}DNA analysis showed that the frequency of African maternal lineage was 22.5%, whereas the frequency of European maternal ancestry was 77.5% ($\chi^2 = 45.6$, $n = 151$, $P < 0.0001$).

The frequency of colonies with African and European morphotypes varied significantly in each region and between the three regions, suggesting a greater degree of Africanization in the semi-warm semi-dry region, while the higher frequency of colonies with European morphotype occurred in the temperate semi-dry region ([Table 1](#)).

Regarding honey bee mitotypes in the three study areas, the frequency of European mitotypes was significantly higher than that of African mitotypes in all areas. However, there was a significantly lower frequency of colonies with African mitotype in the temperate semi-dry region compared to the temperate sub-humid and the semi-warm semi-dry regions, but there was no significant difference between these two regions ([Table 2](#)).

Table 1. Number and percentage of colonies with African and European morphotypes in temperate semi-dry, temperate sub-humid and semi-warm semi-dry regions in Zacatecas, Mexico.

Morphotype	Temperate semi-dry (n=50)	Temperate sub-humid (n=50)	Semi-warm semi-dry (n=51)
African (A)	7 (14%) ^a	22 (44%) ^b	35 (69%) ^c
European (E)	36 (72%) ^a	23 (46%) ^b	12 (24%) ^c
A vs E	$\chi^2 = 33.64$, $P < 0.0001$	$\chi^2 = 12.28$, $P = 0.002$	$\chi^2 = 30.47$, $P < 0.0001$

Different letters on the same line represent significant differences based on χ^2 tests: temperate semi-dry region vs temperate sub-humid region ($\chi^2 = 10.58$, $n = 88$, $P = 0.001$) vs semi-warm semi-dry region ($\chi^2 = 30.54$, $n=90$, $P < 0.0001$); temperate sub-humid vs semi-warm semi-dry regions ($\chi^2 = 6.38$, $n = 92$, $P = 0.011$).

Table 2. Number and percentage of honey bee colonies with African and European mitotypes in the temperate semi-dry, temperate sub-humid and semi-warm semi-dry regions in Zacatecas, Mexico.

Mitotype	Temperate semi-dry (n=50)	Temperate sub-humid (n=50)	Semi-warm semi-dry (n=51)
African (A)	6 (12%) ^a	14 (28%) ^b	14 (27%) ^b
European (E)	44 (88%) ^a	36 (72%) ^b	37 (73%) ^b
A vs E	$\chi^2 = 28.88$, $P < 0.0001$	$\chi^2 = 9.68$, $P = 0.0019$	$\chi^2 = 10.37$, $P = 0.0013$

Different letters on the same line represent significant differences based on χ^2 tests: temperate semi-dry region vs temperate sub-humid region ($\chi^2 = 3.8$, $n = 100$, $P = 0.05$) vs semi-warm semi-dry region ($\chi^2 = 4.0$, $n = 101$, $P = 0.045$); temperate sub-humid vs semi-warm semi-dry regions ($\chi^2 = 0.003$, $n = 101$, $P = 0.95$).

Only 12% of the samples (18 of 151) with African morphotype also had the African mitotype, while 41% (62 of 151) had both the European morphotype and mitotype. These 80 colonies with extreme genotypes were analyzed separately according to whether they were more African or more European genotypes, respectively. The frequency of colonies with extreme genotypes is shown in Table 3, indicating once again that the African genotype frequency was higher in the semi-warm semi-dry zone and null in the temperate semi-dry zone.

Discussion

The presence of Africanized bees in the state of Zacatecas, Mexico, was first reported in 1991 (SAGARPA, 2005), although this study reveals for the first time the proportion of African phenotypes and genotypes in the most important bee-keeping regions, in three different climates and at different altitudes in the state of Zacatecas.

A comparison of the results of this study with those of the few previously published studies that were carried out in northern states of Mexico shows that the frequency of African mitotypes in Zacatecas (22.5%) is similar to that reported for Baja California Sur (21%) but lower than that reported for Sonora (48%) and Baja California Norte (50%) (Zamora *et al.*, 2008). However, in comparison with the high plateau of Mexico (Uribe *et al.*, 2003), the frequency of colonies with African _{mt} DNA was 9% higher in Zacatecas. Recently, Domínguez-Ayala *et al.*

Table 3. Number and percentage of colonies with African and European genotypes (morphotype and mitotype of the same origin) in the temperate semi-dry, temperate sub-humid and semi-warm semi-dry regions in Zacatecas, Mexico.

Genotype	Temperate semi-dry (n=33)	Temperate sub-humid (n=22)	Semi-warm semi-dry (n=25)
African (A)	0 (0%) ^a	5 (22.7%) ^b	13 (52%) ^c
European (E)	33 (100%) ^a	17 (77.3%) ^b	12 (48%) ^c
A vs E	$\chi^2 = 0.00$, $P = 0.000$	$\chi^2 = 6.54$, $P = 0.01$	$\chi^2 = 0.040$, $P = 0.84$

Different letters on the same line represent significant differences based on χ^2 tests: temperate semi-dry region vs temperate sub-humid region ($\chi^2 = 8.25$, $n = 55$, $P = 0.0041$) vs semi-warm semi-dry region ($\chi^2 = 22.11$, $n = 58$, $P < 0.0001$); temperate sub-humid vs semi-warm semi-dry regions ($\chi^2 = 4.24$, $n = 47$, $P = 0.0394$).

(2015) reported that Zacatecas is the state in the Northern part of Mexico with the lowest proportion of African mitotypes, 12.5%, a result that is 10% lower than that found in the present study with a larger number of samples.

The proportion of colonies with bees of different morphotypes and mitotypes varied significantly between the study regions. A higher proportion of colonies with European-derived morphotypes or mitotypes was found in the temperate semi-dry region than in the temperate sub-humid and semi-warm semi-dry regions, where higher frequencies of African-derived morphotypes and mitotypes were observed. These results indicate a higher degree of Africanization in colonies of the semi-warm semi-dry and temperate sub-humid regions and a lower degree of Africanization in colonies of the temperate semi-dry area, suggesting environmental effects on the flow and introgression of African genes into commercial colonies of honey bees. This finding is in agreement with the results from Domínguez-Ayala *et al.* (2015), who indicated that a climatic gradient of African mitotype distribution exists in Mexico.

The differences in the frequency of colonies with predominantly European or African ancestry between regions may have resulted, at least in part, from differences in climate and the availability of floral resources and nesting sites in these areas. In the temperate semi-dry region that we studied, blossoms are scarcer, colder temperatures reduce colony reproduction during the winter, and its vegetation provides fewer nesting sites than in the subtropical regions. Thus, it is less likely for bee colonies to swarm frequently and to establish feral populations in temperate climates than in more tropical environments (Otis, 1991; Clarke *et al.*, 2002). Tropical and subtropical regions are more favorable for African gene introgression into commercial colonies because Africanized bees are better adapted to these environments than are European-derived bees. They show greater ability to reproduce and spread in the tropics than their European counterparts (Schneider *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005). The higher density of Africanized colonies of honey bees in tropical environments allows for increased mating of virgin queens from commercial colonies with African-derived drones (Rinderer and Hellmich, 1991). Additionally, a higher rate of usurpation of commercial colonies by Africanized bee swarms would be expected in tropical environments (Danka *et al.*, 1992). In managed apiaries such as those sampled, beekeepers had a European maternal bee lineage before the arrival of Africanized bees in Zacatecas. Therefore, most of the introgression of African genes in these populations may have occurred paternally, mainly through mating between virgin queens from commercial colonies and drones of African

origin that were produced by feral colonies (Clarke *et al.*, 2002). This process of Africanization of commercial colonies would explain why more colonies were classified as African-derived by morphometric analyses than by mitochondrial analysis, which only detects maternal inheritance.

In addition to the above and because the study was conducted in commercial colonies, the possible replacement of queens by beekeepers is another factor that may have influenced the frequency of morphotypes and mitotypes in different regions because this practice reduces the probability of introgression of African genes in commercial bee populations (Zamora *et al.*, 2008). However, this matter was discussed with the producers and there is no evidence to suggest that the practice of requeening in the temperate semi-dry zone was greater than in the other regions.

Conclusion

In conclusion, these results suggest that environment affects the degree of Africanization of honey bee colonies in northern Mexico. It is expected that colonies established at higher altitudes and in more temperate climates will have more European genotypes than colonies established in tropical regions.

Funding

This research was partially supported by an NSERC-Canada grant given to Ernesto Guzmán Novoa.

Acknowledgements

We thank Laura G. Espinosa, José L. Uribe, Carlos F. Aréchiga and Ramón Gutiérrez for their valuable suggestions on an earlier version of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

Carlos A. Medina Flores: conceived the study, performed all assays, and wrote part of the manuscript.

Ernesto Guzmán Novoa: conceived the study and wrote part of the manuscript.

M. M. Hamiduzzaman: performed the PCR-RFLP analyses and interpreted the results.

Jairo Aguilera Soto: collected the samples, analyzed the results and revised the manuscript.

Miguel A. López Carlos: helped with the morphometric analyses of bees and the statistical analyses.

References

- 1) Clarke KE, Rinderer TE, Franck P, Quezada-Euán JJG, Oldroyd BP. 2002. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution*, 56(7):1462-1474. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01458.x
- 2) Danka RG, Hellmich RL, Rinderer TE. 1992. Nest usurpation, supersedure and colony failure contribute to Africanization of commercially managed European honey bees in Venezuela. *Journal of Apicultural Research*, 31(3-4):119-123.
- 3) Domínguez-Ayala R, Moo-Valle H, May-Itzá WDJ, Medina-Peralta S, Quezada-Euán JJG. 2015. Stock composition of northern neotropical honey bees: mitotype and morphotype diversity in Mexico (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 1-11. DOI: 10.1007/s13592-015-0414-6
- 4) Guzmán-Novoa E, Uribe RJL. 2004. Honey production by european, africanized and hybrid honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico. *American Bee Journal*, 144:318-320.
- 5) Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A, Guzmán G, Espinosa LG. 2011. History, colonization and impact of the africanized honey bee in Mexico. *Veterinaria México*, 42(2):149-178.
- 6) Hall GH. 1992. DNA studies reveal processes involved in the spread of New World African Honeybees. *Florida Entomologist*, 75(1):51-59. DOI: 10.2307/3495480
- 7) [INEGI] Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2005. Municipios de Zacatecas, pp. 234-235.
- 8) Kerr WE. 1967. The history of the introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal*, 39:3-5.
- 9) Nielsen DI, Ebert PR, Page RE Jr, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E. 2000. Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(1):1-6.
- 10) Nogueira-Neto P. 1964. The spread of a fierce African bee in Brazil. *Bee World*, 45(3):119-121.
- 11) Otis GW. 1991. Population biology of the africanized honey bee. In: Spivak M, Fletcher D, Breed M. *The African Honey Bee*. Boulder, Colorado, USA: Westview Press, pp. 213-234.
- 12) Pinto AM, Rubink WL, Patton JC, Coulson RN, Johnston JS. 2005. Africanization in the United States: replacement of feral european honey bees (*Apis mellifera* L.) by an african hybrid swarm. *Genetics*, 170:1653-1665.
- 13) Quezada-Euán JJG. 2000. Hybridization between european and africanized honeybees in tropical Yucatan, Mexico. II. Morphometric, allozymic and mitochondrial DNA variability in feral colonies. *Apidologie*, 31(3):443-454. DOI: 10.1051/apido:2003010
- 14) Quezada-Euán JJG. 2007. A retrospective history of the expansion of africanized honeybees in México. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46(4):295-300. DOI: 10.1080/00218839.2007.11101412
- 15) Quezada-Euán JJG, Medina LM. 1998. Hybridization between european and africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) in tropical Yucatan, Mexico. I. Morphometric changes in feral and managed colonies. *Apidologie*, 29(6):555-568.

- 16) Rinderer TE, Hellmich RL. 1991. The processes of africanization. In: Spivak M, Fletcher D, Breed M. *The African Honey Bee*. Boulder, Colorado, USA: Westview Press, pp. 373-398.
- 17) Rinderer TE, Oldroyd BP, Sheppard WS. 1993. Africanized bees in the U.S. *Scientific American*, 269:52-58.
- 18) [SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de información y estadística agroalimentaria (SIAP). 2005. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> [access: 14 jul 2011].
- 19) SAS Institute. 2002. *Statistical software Ver. 9.0*. [en línea] Cary, North Carolina, USA.
- 20) Schneider SS, DeGrandi-Hoffman G, Smith DR. 2004. The african honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. *Annual Review Entomology*, 49(1):351-376. DOI: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123359
- 21) Smith DR. 1991. African bees in the Americas: insights from biogeography and genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 6(1):17-21.
- 22) Sylvester HA, Rinderer TE. 1987. Fast Africanized Bee Identification System (FABIS) Manual. *American Bee Journal*, 127(7):511-516.
- 23) Taylor OR. 1977. The past and possible future spread of africanized honey bees in the Americas. *Bee World*, 58:19-30.
- 24) Uribe RJL, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Correa BA, Zozaya RJA. 2003. Efecto de la africanización sobre la producción de miel, comportamiento defensivo y tamaño de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en el altiplano mexicano. *Veterinaria México*, 34(1):47-59.
- 25) Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D, Tsutsui ND. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799):642-645.
- 26) Zamora O, Domínguez R, Alaníz-Gutiérrez L, Quezada-Euán JG. 2008. Frequency of european and african-derived morphotypes and haplotypes in colonies of honey bees (*Apis mellifera*) from NW México. *Apidologie*, 39(4):388-396. DOI: 10.1051/apido:2008016