

# Loci de rasgos binarios que influyen en la expresión del comportamiento higiénico de las abejas melíferas

## Binary trait loci that influence the expression of honey bee hygienic behavior

Miguel E. Arechavaleta-Velasco<sup>a</sup>, Greg J. Hunt<sup>b</sup>, Marla Spivak<sup>c</sup>, Carmen Camacho-Read<sup>d</sup>

### RESUMEN

Este estudio se realizó para detectar loci de rasgos binarios (BTL) que influyen en la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras y para localizar marcadores genéticos asociados a estos BTL en un mapa de ligamiento. Se recolectaron abejas que realizaron el comportamiento higiénico y abejas que no realizaron el comportamiento higiénico de una colonia producto de una retrocruza. Se construyó un mapa genético utilizando marcadores AFLP generados a partir del ADN de las abejas que realizaron el comportamiento higiénico. Se realizó una prueba de bondad de ajuste a cada marcador del mapa para detectar desviaciones en el patrón de segregación esperado (1:1). Los marcadores que presentaron desviaciones significativas del patrón de segregación esperado en las abejas que realizaron el comportamiento higiénico, se generaron en el grupo de abejas que no realizó el comportamiento. Los marcadores que presentaron desviaciones en el patrón de segregación esperado en las abejas que realizaron el comportamiento higiénico pero no en el grupo que no realizó el comportamiento, se sometieron a una prueba de homogeneidad para detectar asociaciones entre el marcador y la expresión del comportamiento higiénico. Doce de los marcadores presentaron desviaciones en el patrón de segregación en las abejas que realizaron el comportamiento ( $P < 0.05$ ), pero no en el grupo de abejas que no realizó el comportamiento ( $P > 0.05$ ), y nueve de los marcadores estuvieron asociados a la expresión del comportamiento higiénico ( $P < 0.05$ ). Los nueve marcadores genéticos representan siete BTL que influyen en la expresión del comportamiento higiénico de las abejas.

**PALABRAS CLAVE:** Abejas melíferas, Comportamiento higiénico, Loci de rasgos binarios, *Apis mellifera* L.

### ABSTRACT

This study was conducted to detect binary trait loci (BTLs) that influence the expression of hygienic behavior of individual honey bee workers and to locate genetic markers that are associated to these BTLs on a genetic map derived from bees that perform hygienic behavior of a backcross colony. Samples of workers that perform hygienic behavior and workers that not perform hygienic behavior that were used as controls were collected from the colony. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were produced from DNA samples of bees that perform hygienic behavior. A genetic map was generated, and a goodness-of-fit test was performed for each marker in the map to look for deviations from the 1:1 expected segregation pattern of the marker genotypes. For those markers that significantly deviated from the 1:1 ratio in the bees that perform hygienic behavior, AFLPs were generated from samples of control bees. Those markers that showed a skewed segregation pattern in the bees that perform hygienic behavior, but not in the controls were analyzed with a 2X2 chi-square to test for associations between the markers and the expression of the trait. Twelve markers were deviated from the expected segregation pattern in the bees that perform hygienic behavior ( $P < 0.05$ ), but not in the control bees ( $P > 0.05$ ) and nine of these markers were associated with the expression of hygienic behavior ( $P < 0.05$ ). The nine markers represented seven putative BTLs that influence honey bee hygienic behavior.

**KEY WORDS:** Honey bee, Hygienic behavior, Binary trait loci, *Apis mellifera* L., BTL.

Recibido el 9 de abril de 2010. Aceptado el 13 de julio de 2010.

<sup>a</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 1 Carretera a Colón, Ajuchitlan, Querétaro, 76280. Tel. (419) 292-0249 Ext.106 arechavaleta.miguel@inifap.gob.mx. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Department of Entomology, Purdue University.

<sup>c</sup> Department of Entomology, University of Minnesota.

<sup>d</sup> Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

## INTRODUCCION

El comportamiento higiénico es una característica que confiere resistencia a las abejas en contra de las enfermedades. En las colonias que expresan esta característica, las obreras son capaces de detectar crías enfermas o muertas dentro de las celdas del panal, retirar la cubierta de cera de las celdas y remover a la cría afectada para posteriormente sacarla de la colmena, limitando de esta forma la diseminación de la enfermedad en el ambiente interno de la colmena<sup>(1,2,3)</sup>. El comportamiento higiénico es un factor en la resistencia de las abejas a enfermedades como la Loque Americana<sup>(4,5)</sup>, la Cría de Cal<sup>(6,7,8)</sup>, y *Varroa destructor* A.<sup>(9,10,11)</sup>.

La expresión del comportamiento higiénico se debe a efectos genéticos<sup>(4,12,13)</sup> y un estudio sugiere que los efectos maternos son importantes<sup>(14)</sup>, así mismo algunos factores ambientales afectan la expresión del comportamiento<sup>(15,16,17)</sup>. Rothenbuhler<sup>(12)</sup> propuso que la expresión del comportamiento higiénico era de carácter recesivo y estaba controlada por dos loci. Sin embargo, un análisis posterior de los datos sugiere que el modelo de dos loci no es adecuado<sup>(18)</sup>. Un estudio reciente en el que se utilizaron marcadores moleculares RAPD identificó siete loci de rasgos cuantitativos (QTL) que influyen sobre la expresión del comportamiento higiénico medido como una característica a nivel del fenotipo de toda la colonia de abejas<sup>(13)</sup>.

El fenotipo de una colonia de abejas para una característica de comportamiento, depende de la proporción de obreras de la colonia que expresan ese comportamiento. Un aspecto importante en el estudio de la genética del comportamiento de las abejas, es identificar los loci y genes que influyen en la expresión de las características a nivel del fenotipo de las abejas obreras, con objeto de entender cómo es que comportamientos que están determinados por efectos genéticos en abejas individuales, determinan el fenotipo de toda una colonia.

El comportamiento higiénico es un rasgo que si se mide a nivel del fenotipo de una abeja obrera individual, puede ser considerado como un rasgo binario, ya que cuando una colonia es desafiada

## INTRODUCTION

Hygienic behavior is a trait that confers resistance to honey bees against diseases. In colonies that express this behavior, the workers are able to detect, uncap and remove infected and dead brood from the combs in order to avoid the dissemination of diseases into the colony environment<sup>(1,2,3)</sup>. Hygienic behavior has proven to be a factor in the resistance of honey bee colonies to American Foulbrood<sup>(4,5)</sup>, to Chalkbrood<sup>(6,7,8)</sup>, and to *Varroa destructor* A.<sup>(9,10,11)</sup>.

The expression of hygienic behavior is due to genetic effects<sup>(4,12,13)</sup>, and a study suggests that maternal effects are important<sup>(14)</sup>, also some environmental factors affect the expression of the trait<sup>(15,16,17)</sup>. Rothenbuhler<sup>(12)</sup> proposed that the expression of hygienic behavior was controlled by two loci with recessive effects. A subsequent analysis of Rothenbuhler's data suggests that the two loci model was not strongly supported by the data<sup>(18)</sup>. A recent study that used RAPD molecular markers, identified seven suggestive quantitative trait loci (QTLs) influencing hygienic behavior measured as a colony trait<sup>(13)</sup>.

The phenotype of honey bee colony for a behavioral trait, depends on the proportion of workers in the colony that express that trait. An important issue for the study of honey bee behavioral genetic, is to identify loci and genes that influence the expression of this type of traits in worker bees, in order to understand how does behavioral traits that are determined by genetic effects in individual honey bee determine the phenotype of a whole honey bee colony.

The expression of hygienic behavior of an individual bee can be considered as a binary trait. At any one time, when a colony is exposed to infected or dead brood, an individual bee, that is exposed to the stimulus, either performs hygienic behavior or not.

Binary traits can be associated with genetic markers included in linkage maps<sup>(19,20)</sup> in order to detect and locate binary trait loci (BTL) in the genome that influence these traits<sup>(21,22,23)</sup>. QTLs and BTLs have been identified that influence the expression

con cría muerta, una abeja obrera en particular que este expuesta al estímulo responderá realizando o no realizando el comportamiento higiénico.

Utilizando pruebas de homogeneidad, los rasgos binarios pueden ser asociados con marcadores moleculares incluidos en mapas de ligamiento<sup>(19,20)</sup> con objeto de detectar y localizar loci de rasgos binarios (BTL) dentro del genoma que influyen sobre estas características<sup>(21,22,23)</sup>. Se han identificado QTL y BTL que influyen sobre la expresión de características de comportamiento en abejas a nivel del fenotipo de los individuos para el comportamiento de pecoreo<sup>(24)</sup> y para el comportamiento defensivo<sup>(23,25,26)</sup>.

Todos los estudios que se han llevado a cabo sobre genética del comportamiento higiénico se han realizado midiendo el fenotipo de toda la colonia. Es importante determinar la relación que existe entre la expresión de este comportamiento a nivel de abejas obreras individuales y el fenotipo de la colonia. El objetivo de este estudio fue detectar y localizar BTL que influyen sobre la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras a nivel del fenotipo de los individuos, en un mapa de ligamiento construido utilizando marcadores polimórficos por longitud de los fragmentos de ADN (AFLP).

## MATERIALES Y METODOS

### *Colonias experimentales*

Para el desarrollo del estudio se utilizaron dos líneas de abejas, una de alto comportamiento higiénico y una de bajo comportamiento higiénico desarrolladas en la Universidad de Minnesota. Se seleccionó una colonia de cada una de las líneas, y se crió una reina a partir de la colonia higiénica, la cual fue inseminada instrumentalmente con el semen de un zángano proveniente de la colonia no higiénica. A partir de esta reina se criaron 24 reinas F1 que se dividieron en dos grupos de 12 reinas. Cada una de las reinas de uno de los grupos fue inseminada instrumentalmente con el semen de un zángano, utilizando zánganos provenientes de la colonia de alto comportamiento higiénico, mientras que cada una de las reinas del otro grupo fue

of foraging behavior<sup>(24)</sup> and defensive behavior of individual honey bees<sup>(23,25,26)</sup>.

All the studies conducted to study the genetics of hygienic behavior have been performed measuring the phenotype of a whole honey bee colony. It is important to determine the relation between the expression of this trait at the level of individual honey bees and the phenotype of the colony. The objective of this study was to detect and locate BTLs on an amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) linkage map, that influence the expression of hygienic behavior of individual honey bees.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental Colonies*

Two lines of honey bees were used, one classified as hygienic and one classified as non-hygienic, these lines were generated at the University of Minnesota. One hygienic colony and one non-hygienic were selected. A queen was reared from the hygienic colony and was artificially inseminated with the semen of a drone from the non-hygienic colony. From this queen, 24 F1 queens were reared and divided into two groups. Twelve queens were single-drone artificially inseminated with drones from the hygienic colony and twelve queens were single-drone artificially inseminated with drones from the non-hygienic colony in order to produce two types of colonies composed of backcross workers. The F1 queens were daughters of the same diploid queen and the same haploid drone, so they had an average additive relationship of at least 0.75 and they share the same alleles inherited from the drone father that came from the non-hygienic colony.

Each queen was introduced into a small colony made with three frames of brood, two frames of honey and approximately 1.5 kg of bees. The colonies were kept in single deep Langstroth hives in the same apiary. All colonies were managed in the same way for a period of 60 d prior to the beginning of the experiments to allow time for workers in the colony to be replaced by daughters of the inseminated queens. The size of the colony was measured by the number of frames covered

inseminada con el semen de un zángano, utilizando zánganos de la colonia de la línea de bajo comportamiento higiénico, con el fin de producir dos grupos de colonias retrocruzadas. Las reinas F1 que encabezaron las colonias de los dos tipos de retrocruza eran hermanas hijas de la misma madre diploide y del mismo padre haploide, de tal forma que tenían una relación aditiva promedio de al menos 0.75, y compartían los mismos alelos que habían heredado de su padre, el zángano que provenía de la colonia de bajo comportamiento higiénico.

Las reinas fueron introducidas en colonias formadas por tres bastidores con cría, dos bastidores con miel y aproximadamente 1.5 kg de abejas obreras; las colonias se mantuvieron en colmenas tipo Langstroth que se ubicaron en un apiario. Todas las colonias recibieron el mismo manejo durante el desarrollo del estudio y se dio un periodo de 60 días para que las colonias se establecieran después de que las reinas iniciaran la postura de huevos, con objeto de que las obreras en la colonia fueran hijas de las reinas inseminadas antes de iniciar los experimentos. Se determinó el tamaño de la población de abejas de las colonias durante el desarrollo de los experimentos al contar el número de bastidores cubiertos con abejas y el número de bastidores que contenían cría en cada colmena, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar estas dos variables entre las colonias.

#### *Comportamiento higiénico de colonias retrocruzadas*

Para evaluar el comportamiento higiénico de las colonias y seleccionar a la colonia que tuvo el mejor desempeño se utilizó el método descrito por Spivak y Downey<sup>(27)</sup>. En cada colonia se seleccionó un bastidor que contenía celdas operculadas con pupas en el séptimo instar de desarrollo que presentaban ojos pigmentados. En cada bastidor se delimitaron tres áreas que contenían aproximadamente 35 celdas cada una insertando en la cera del panal tres tubos de metal de 4.5 cm de diámetro y 12 cm de alto. Se vertieron dos dosis de 50 ml de nitrógeno líquido con un intervalo de 2 min entre dosis en cada tubo, con objeto de sacrificar por congelamiento a las pupas en el interior de las celdas sin alterar la cubierta de

with bees and the number of frames with brood, a Kruskal-Wallis test was applied to compare this variable between colonies.

#### *Expression of hygienic behavior at the colony level*

The hygienic behavior of the experimental colonies was tested using the method described by Spivak and Downey<sup>(27)</sup>, to perform the test, a frame containing capped reedeye pupae was removed from each colony. Three areas containing approximately 35 capped cells were delimited in the frame by inserting three metal tubes of 4.5 cm of diameter and 12 cm tall in the comb. Two doses of 50 ml of liquid nitrogen were poured into each tube, with an interval of 2 min, in order to freeze-kill the pupae inside the cells. The areas containing the dead brood were marked and the frames were reintroduced at the center of the nest into their respective colonies. Twenty-four hours later the frames were removed from the colonies, to count the number of cells that contained freeze-killed pupae that were uncapped and the number of cells that were uncapped and the dead pupae was removed. The hygienic behavior of the colonies was tested in three different occasions following this procedure allowing a 24 h period between each repetition.

To identify genotypic differences in the proportion of cells cleaned between backcross types and between colonies, data were analyzed using an analysis of variance under a nested design.

#### *BTL associated to the expression of hygienic behavior of individual bees*

To identify BTLs that influence the expression of hygienic behavior of individual bees, the colony that showed the highest hygienic behavior was selected; this colony came from the high hygienic behavior backcross. The queen of this colony was introduced into a cage made from plastic queen excluder and wood. The queen excluder allowed worker bees to pass and care for the queen and the brood, but not allowed the queen to move out from the frame. A comb with empty cells was introduced in the cage to force the queen to laid eggs in the comb for a period of 48 h in order to obtain a frame with eggs of the approximately same age.

cera. Se marcaron las áreas en el panal que contenía a la cría que fue sacrificada, y los bastidores se introdujeron en el centro del nido de cría de sus colonias. Veinticuatro horas después se removieron los bastidores y se contó el número de celdas que contenían pupas que fueron sacrificadas, en donde las abejas removieron el opérculo, y el número de celdas que contenían pupas que fueron sacrificadas en donde las abejas removieron el opérculo y a la pupa muerta. El comportamiento higiénico de las colonias se evaluó en tres ocasiones siguiendo este procedimiento, dejando un periodo de 24 h entre repetición de la prueba.

Para identificar diferencias entre los dos tipos de retrocruzas en la proporción de celdas en las que las abejas sólo removieron el opérculo sin retirar a la cría muerta, y en la proporción de celdas en las que removieron el opérculo y retiraron a la cría muerta, en relación al total de celdas donde se sacrificó la cría, se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo en donde se incluyó el efecto del tipo de retrocruza, el efecto de colonia anidado dentro del tipo de retrocruza, el efecto de la repetición y el error experimental.

*Identificación de BTL asociados a la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras*

Para identificar BTL que influyen en la expresión del comportamiento higiénico a nivel del fenotipo de abejas obreras individuales, se seleccionó la colonia que presentó el comportamiento higiénico más alto, esta colonia pertenecía al grupo de colonias retrocruzadas hacia alto comportamiento higiénico. La reina de esta colonia se introdujo en una jaula para bastidor de cámara de cría construida con madera y paneles laterales formados por excluidor de reinas de plástico, que permitió el paso de abejas obreras hacia el interior para atender a la reina y a la cría, pero no permitió que la reina se saliera de la jaula. Dentro de la jaula se colocó un bastidor con panal cuyas celdas estaban vacías, para que la reina pusiera huevos de obrera durante un periodo de 48 h con el fin de obtener huevos de aproximadamente la misma edad. Después de 48 h la reina fue enjaulada en otro bastidor con celdas vacías y el bastidor en donde puso los huevos

Then the queen was caged into another frame and the frame with eggs was placed in the center of the colony. The queen was confined on four different combs for a period of 8 d, in order to have enough bees of approximately the same age for the assay. The maximum age difference between bees of different frames was eight days and the variation within bees of the same frame was 48 h.

Eighteen (18) days after eggs were laid, the frames were introduced into cages with 2.0 mm wire mesh to contain the workers that emerge. The cages with the frames were kept in an incubator at 36 °C and 70 % relative humidity. The bees that emerge each day were marked on the thorax with a colored numbered tag using different colors to group them according to the day of emergence.

The marked bees were introduced into an observation hive built from wood and two Plexiglas lateral panels. The panels had four circular windows of 10 cm in diameter, to reach the interior of the hive. The size of observation hive was enough to contain a small colony with two deep frames, one on top of each other. A total of 3,000 marked bees were introduced with their queen into the observation hive, with two combs; one containing capped brood and the other containing honey from the source colony. Into each of the two combs two holes of 4.5 cm in diameter were cut. The observation hive was set in a laboratory, where the bees have access to the outside through a tube of 10 cm in diameter and 20 cm long that was set at a window. The colony was fed with syrup made from three parts of honey and one part of water and with a paste of pollen, powder sugar and honey during the tests period.

A frame from another colony, containing pre-emerging pupae was placed into a freezer at -20 °C to kill the brood and it was cut into circular segments of 4.5 cm. Two weeks after the colony was set in the laboratory two pieces of comb with freeze killed brood were inserted in the holes of the frames through the windows of the observation hive.

To record the bees that performed the hygienic behavior, the bees of the colony were observed through the Plexiglas, for a period of 7 d during

fue colocado en el centro del nido de cría de la colmena. La reina fue confinada en cuatro bastidores diferentes durante ocho días con objeto de contar con un número suficiente de abejas de aproximadamente la misma edad para realizar el estudio. La diferencia máxima de edad entre las abejas de bastidores diferentes fue de ocho días y la variación entre abejas del mismo bastidor fue de 48 h.

Dieciocho (18) días después de que la reina puso los huevos, los bastidores fueron introducidos en jaulas con malla de alambre de 2.0 mm para contener a las abejas que emergieran de las celdas. Las jaulas con los bastidores se colocaron en una incubadora a 36 °C y 70 % de humedad relativa. Las abejas que emergieron cada día fueron marcadas pegándoles placas de plástico numeradas de diferentes colores en el tórax, con objeto de identificar a cada abeja en forma individual y formar grupos de acuerdo al día en que emergieron.

Las abejas marcadas fueron introducidas en una colmena de observación construida con madera y paneles laterales de acrílico transparente. Los paneles laterales tenían cuatro ventanas circulares de 10 cm de diámetro por las cuales se podía acceder al interior de la colmena. La colmena de observación tenía la capacidad de contener en su interior una colonia de abejas pequeña formada por dos bastidores de cámara de cría, que se colocaban uno encima del otro. La colonia se formó utilizando dos bastidores, uno que contenía cría operculada y otro que contenía miel; se introdujeron 3,000 abejas marcadas junto con la reina de la colonia. En cada uno de los dos bastidores se cortaron dos hoyos de 4.5 cm de diámetro en el panal a la altura de las ventanas de los paneles de acrílico. La colmena de observación se colocó en un laboratorio en donde las abejas tuvieron acceso al exterior a través de un tubo de acrílico de 10 cm de diámetro y 20 cm de largo que se ubicó en una ventana. La colonia fue alimentada en forma continua con jarabe elaborado con tres partes de miel de abeja por una parte de agua y con una pasta elaborada con polen, azúcar pulverizada y miel durante el tiempo en que se realizaron los experimentos.

Se obtuvo un bastidor que contenía cría operculada de otra colonia, el bastidor se colocó a -20 °C con

6 h each day, divided in two sessions, the first from 0900 to 1200 and the second from 1400 to 1700, the pieces of comb with freeze killed brood were replaced every time it was needed when the bees removed the dead pupae.

The two components of the trait, uncapping and removing were studied. Any bee that chews or removes part of the cap from a cell was considered to perform the uncapping behavior. Any bee that introduced her head into a cell containing a dead pupae and take out a piece of the pupae was considered to perform the removing behavior. Records of the bees that performed the uncapping and removing were collected.

At the end of the assay the bees in the colony was sacrificed by placing the observation hive at -80 °C for 12 h and each bee that were recorded performing any of the behaviors were recovered and introduced into an individual 1.5 ml plastic tube. Samples of bees that not participate in any of the behaviors studied in this experiment were collected as controls. The bees were kept at -80 °C until the DNA analysis was performed.

DNA was extracted from the 94 bees that performed hygienic behavior during the assay, from 94 control bees, from the drone father of the colony and the drone father of the F1 queens. DNA extraction involved grinding the bees in lysis solution (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1.1 M NaCl), followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation of the DNA<sup>(28)</sup>. The DNA of each individual bee was quantified with a fluorometer and diluted to a final concentration of 14 ng/ml in double distilled water.

AFLP markers<sup>(29)</sup> were generated from DNA samples of the 94 bees that performed the hygienic behavior, the drone father of the colony and the drone father of the F1 queens to identify the phase of the genetic markers. To produce the AFLP markers, the DNA of each individual bee was digested with two restriction endonucleases, *EcoRI* and *MseI* to generate restriction fragments. The DNA fragments were ligated to *EcoRI* and *MseI* adapters that function as primer binding sites that

objeto de sacrificar a la cría por congelación, y se cortaron segmentos de panal que contenían cría operculada muerta de 4.5 cm de diámetro.

Dos semanas después de que se estableció la colonia en el laboratorio, se insertaron en cada uno de los hoyos que se hicieron en el panal de los bastidores, los segmentos de panal con la cría que fue sacrificada por congelación utilizando las ventanas de los paneles laterales de la colmena de observación. Con objeto de identificar a los individuos que realizaron el comportamiento higiénico, se observaron a las abejas de la colonia a través de los paneles de acrílico, por un periodo de siete días durante 6 h diarias divididas en dos sesiones, la primera de 0900 a 1200, y la segunda de 1400 a 1700, los segmentos de panal con cría muerta fueron reemplazados en el interior de la colonia en la medida que las abejas removieron a las pupas muertas.

Se estudiaron los dos componentes del comportamiento higiénico: la remoción del opérculo de cera de las celdas que contenían a las pupas muertas y la remoción de cría muerta de la celda. Cualquier abeja obrera que mordiera y retirara parte del opérculo se consideró que estaba participando en la remoción del opérculo de cera. Cualquier abeja que introdujo la cabeza en el interior de una celda y removió un pedazo de cría muerta fue considerada como que estaba participando en la remoción de la cría. Se registró la placa de identificación individual de las abejas obreras que participaron en la remoción del opérculo en las celdas con cría muerta y el de las abejas que removieron a la cría muerta de las celdas.

Al finalizar el periodo de estudio las abejas de la colonia fueron sacrificadas colocando la colmena de observación a -80 °C durante 12 h; se recuperaron a las abejas que realizaron cualquiera de los dos componentes del comportamiento higiénico y se introdujeron en un tubo individuales de 1.5 ml. Así mismo, se recolectaron abejas que no realizaron el comportamiento higiénico de los mismos grupos de edad incluidos en las abejas que sí realizaron el comportamiento higiénico para ser utilizadas como grupo testigo. Las abejas

flank template DNA for amplification. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a first amplification reaction (preamplification) using an *EcoRI* primer 5' AGA CTG CGT ACC AAT TC and a *MseI* primer 5' GAT GAG TCC TGA GTA AC. The PCR conditions were twenty cycles of denaturing at 94 °C for 30 sec, annealing at 56 °C for one minute and extension at 72 °C for one minute.

The products of the preamplification were used as template for a second set of PCR called selective amplification using two more primers: an *EcoRI* primer containing two selective nucleotides that was previously labeled using <sup>33</sup>P, and an *MseI* primer containing two selective nucleotides. The *EcoRI* primers differ in the last two bases at the 3' end: E1, -AA; E2, -AC; E3, -AG; E4, -AT. The *MseI* primers differ in the last three bases at the 3' end: M1, -CAA; M2, -CAC; M3, -CAG; M4, -CAT; M5, -CTA; M6, -CTC; M7, -CTG; M8, -CTT.

The PCR was performed under the following conditions: one cycle at 94 °C for 30 sec, 65 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min; followed by 12 cycles of denaturing at 94 °C for 30 sec, annealing at 65 °C for 30 sec, with a ramp time of 5 min to reach the extension temperature of 72 °C for 1 min. The annealing temperature was decreased by -0.7 °C per cycle during the 12 cycles, giving a touch down phase of 13 cycles. This was followed by 22 cycles at 94 °C for 30 sec, 65 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min. Selective amplification products were separated on a 42 X 36 cm 6% denaturing polyacrylamide gels with 1X TBE. The gel was transferred to chromatography papers and dried in a gel dryer. Twenty-eight selective amplifications were performed for each sample, using four *EcoRI* primers and eight *MseI* primers.

Linkage analysis was performed with Joinmap 3.0 software (Van Ooijen and Voorrips 2001), coding the data as a backcross. The mapping procedure for each linkage group used the following parameters: a minimum LOD value of 3.0 for linkage, a maximum recombination between markers of 0.40 and a maximum jump in the goodness of fit of 5.0. The Kosambi function was used to estimate genetic distances from the recombination fractions<sup>(31)</sup>.

recuperadas se mantuvieron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizaron los análisis moleculares.

Se extrajo el ADN de las 94 abejas que participaron con mayor frecuencia realizando el comportamiento higiénico durante el período de estudio y de 94 abejas del grupo testigo, así como del zángano padre de la colonia experimental y del zángano padre de las reinas F1. La extracción del ADN involucró la maceración de las abejas en una solución de lisis (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 1.1 M NaCl), seguido de la extracción con fenol-cloroformo y la precipitación del ADN con etanol<sup>(28)</sup>. Se cuantificó la concentración del ADN de cada abeja con un fluorómetro y se diluyó el ADN a una concentración final de 14 ng/ml en agua bidestilada.

Se generaron marcadores AFLP<sup>(29)</sup> a partir del ADN de las 94 obreras que realizaron el comportamiento higiénico, el zángano padre de la colonia y del zángano padre de las reinas F1 con el fin de identificar la fase de los marcadores. Para producir los marcadores AFLP, el ADN de cada abeja fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *MseI* para generar fragmentos de restricción. Posteriormente se ligaron adaptadores para *EcoRI* y *MseI* a los extremos de los fragmentos de ADN generados que funcionaron como sitios para el acoplamiento de oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de restricción mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó una primera reacción de amplificación denominada preamplificación utilizando un oligonucleótido para *EcoRI* 5' AGA CTG CGT ACC AAT TC y un oligonucleótido para *MseI* 5' GAT GAG TCC TGA GTA AC. Las condiciones de la PCR fueron veinte ciclos de desnaturalización a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 seg, alineamiento a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min y extensión a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min.

El producto de la preamplificación fue utilizado para realizar un segundo grupo de reacciones de PCR denominado amplificación selectiva utilizando oligonucleótidos para *EcoRI* que contenían dos nucleótidos selectivos, y que fueron previamente marcados utilizando  $^{33}\text{P}$  y oligonucleótidos para *MseI* que contenían tres nucleótidos selectivos. Los oligonucleótidos para *EcoRI* difirieron en las últimas

To detect BTLs that influence hygienic behavior of individual bees a goodness of fit test was performed for each marker in the map to look for deviations from the 1:1 segregation of the genotypes that would be expected for a colony composed of backcross workers in the group of bees that performed hygienic behavior.

For those markers that significantly deviated from the 1:1 ratio in the bees that performed the hygienic behavior, AFLPs were generated from the sample of 94 control bees, following the procedure described above. A goodness of fit test was performed for each marker to look for deviations from the 1:1 segregation of the genotypes that would be expected for a colony composed of backcross workers

Those markers that showed a skewed segregation pattern in the hygienic bees but not in the controls at a 0.05 significance level were analyzed with a homogeneity test using a 2 X 2 Chi-square to test for associations between the AFLP markers and the expression of hygienic behavior to detect BTLs that influence the trait.

## RESULTS

### *Expression of hygienic behavior at the colony level*

No differences were found in the number of frames with brood and in the number of frames with bees ( $P > 0.05$ ) between the experimental colonies at the time that the colonies were tested, this indicates that the bee population among the colonies was not different.

During the study all the colonies performed the two components of the hygienic behavior, no colony was found that perform only the uncapping or the removing.

Hygienic behavior of the two backcrosses were different; differences were found for the proportion of cells that were uncapped and the pupae removed between backcross types ( $P < 0.01$ ), between colonies ( $P < 0.01$ ) and no differences were found between repetitions ( $P > 0.05$ ). The mean proportion of cells cleaned by the colonies of the hygienic backcross was  $95.32 \pm 1.00\%$ , while the non-



LOCOS DE RASGOS BINARIOS DEL COMPORTAMIENTO HIGIÉNICO DE LAS ABEJAS MELÍFERAS

dos bases en el extremo 3': E1, -AA; E2, -AC; E3, -AG; E4, -AT; y los oligonucleótidos para *MseI* difirieron en las últimas tres bases en el extremo 3': M1, -CAA; M2, -CAC; M3, -CAG; M4, -CAT; M5, -CTA; M6, -CTC; M7, -CTG; M8, -CTT.

La PCR se realizó en las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C por 30 seg, 65 °C por 30 seg y

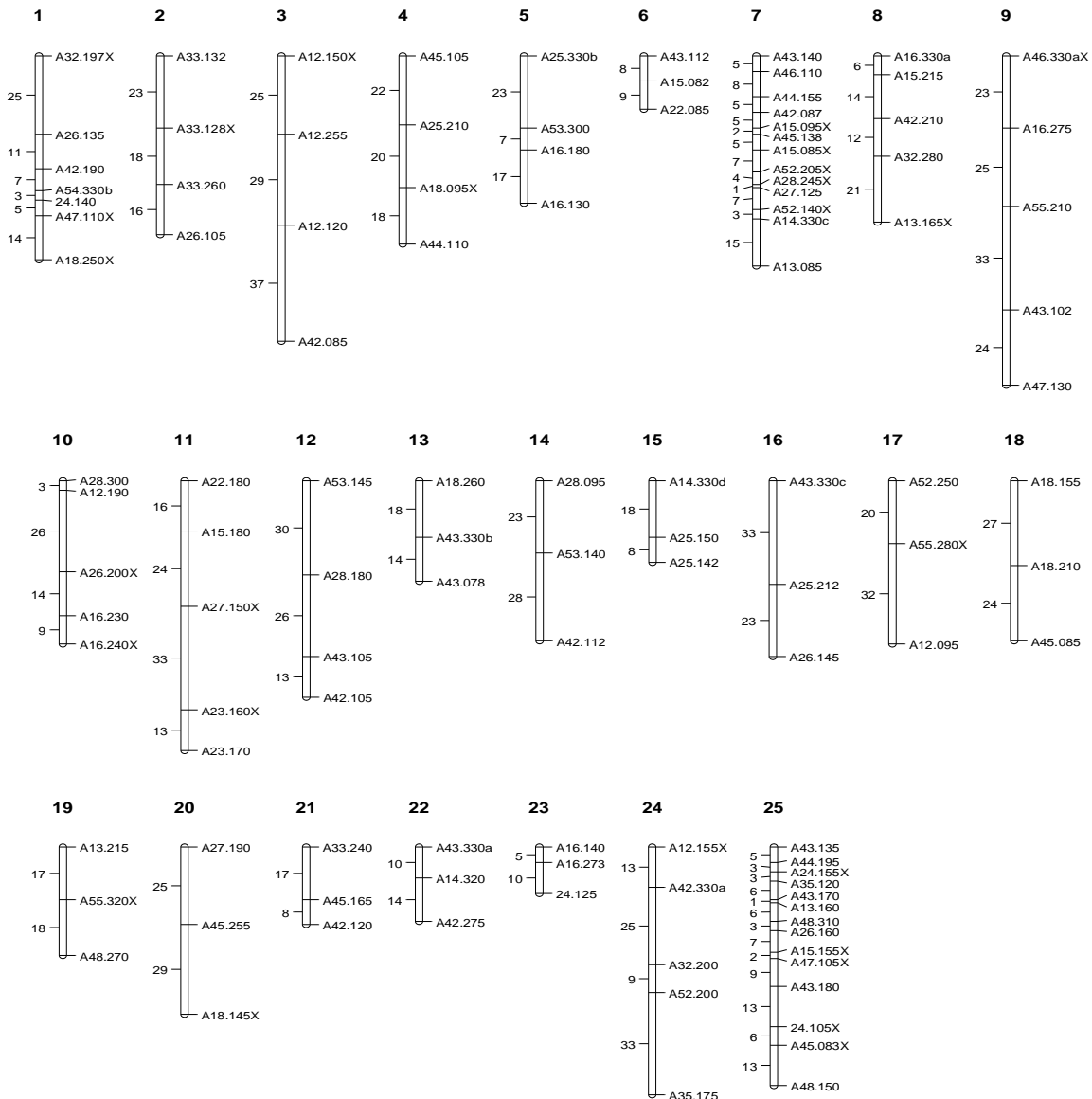
hygienic backcross colonies uncapped and removed 68.40 ± 1.06 % of the cells on average.

*BTL that influence the expression of hygienic behavior of individual bees*

All the bees that performed the hygienic behavior performed the two components of the trait; no

Figura 1. Mapa genético de abejas obreras que realizaron el comportamiento higiénico de una colonia producto de una retrocruza. Contiene 115 marcadores AFLP y expande 1346 cM del genoma de la abeja

Figure 1. Linkage map of honeybee worker that performed hygienic behavior from a backcross colony. The map includes 115 AFLP markers and expands 1346 cM of the honeybee genome



72 °C por 1 min; seguido de 12 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineamiento a 65 °C por 30 seg, con una rampa de tiempo de 5 min para alcanzar la temperatura de extensión de 72 °C por 1 min. La temperatura de alineamiento fue reducida en 0.7 °C por ciclo durante los 12 ciclos. Esto fue seguido por 22 ciclos a 94 °C por 30 seg, 65 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Los productos de la amplificación selectiva se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6% de 42 x 36 cm con TBE 1x. Los geles se transfirieron a papel para cromatografía y se secaron en un secador para geles. Se realizaron 28 amplificaciones selectivas, utilizando los cuatro oligonucleotidos para *EcoRI* y los ocho oligonucleotidos para *MseI*.

El análisis para generar el mapa genético se realizó utilizando el programa Joinmap 3.0<sup>(30)</sup>, codificando los datos como una retrocruza, el procedimiento para formar los grupos de ligamiento se realizó con los siguientes parámetros: un valor LOD mínimo de 3.0 para declarar ligamiento entre dos marcadores, una recombinación máxima entre

bees were detected that performed only one of the components.

A total of 234 polymorphic markers were generated from the sample of bees that performed hygienic behavior in the colony, 115 of these markers were incorporated into 25 linkage groups that span 1346 cM with an average space between makers of 11.70 cM (Figure 1).

Twelve markers showed deviations from the expected 1:1 segregation pattern in the genotypic frequencies of the bees that performed hygienic behavior ( $P < 0.05$ ), but not in the control bees ( $P > 0.05$ ) (Table 1). Nine of these markers showed a significant association with the expression of hygienic behavior ( $P < 0.05$ ) (Table 2).

The nine markers were located in six different linkage groups of the genetic map. Four of the markers were in different linkage groups (Groups 3, 6, 13 and 19), three of the markers were located together in linkage group 21 covering a region of

Cuadro 1. Marcadores genéticos que mostraron desviaciones en el patrón de segregación esperado (1:1) en el grupo de abejas que realizaron el comportamiento higiénico, pero no en el grupo de abejas testigo

Table 1. Genetic markers that showed deviation in the expected segregation pattern (1:1) in the group of honeybees that performed hygienic behavior, but not in the control group

Marker	Linkage group	Honeybees with hygienic behavior					Honeybees without hygienic behavior				
		n	Genotipes		x <sup>2</sup>	P	n	Genotipes		x <sup>2</sup>	P
			A	H			A	H			
A42.085	3	93	75	18	34.9	<0.001	89	39	50	1.4	0.24
A43.112	6	91	71	20	28.6	<0.001	96	57	39	3.4	0.07
A42.105	12	93	56	37	3.9	0.048	89	42	47	0.3	0.58
A43.330b	13	91	70	21	26.4	<0.001	96	57	39	3.4	0.07
A48.270	19	92	60	32	8.5	0.003	80	32	48	3.2	0.07
A27.190	20	93	58	35	5.7	0.017	96	50	46	0.2	0.66
A33.240	21	92	71	21	27.2	<0.001	93	54	39	2.4	0.12
A45.165	21	85	72	13	41.0	<0.001	89	49	40	0.9	0.34
A42.120	21	92	77	15	41.8	<0.001	88	48	40	0.7	0.40
A48.310	25	92	67	25	19.2	<0.001	82	40	42	0.1	0.75
A43.180	25	91	55	36	4.0	0.045	95	49	46	0.1	0.75
A48.150	25	91	36	55	4.0	0.045	76	45	31	2.6	0.11

A y H corresponden a las frecuencias absolutas de los alelos generados por el marcador.

marcadores de 0.40 y un salto máximo en la bondad de ajuste de 5.0. Se utilizó la función de Kosambi para estimar las distancias genéticas entre marcadores a partir de las fracciones de recombinación calculadas<sup>(31)</sup>.

Para detectar los BTL que influyen sobre la expresión del comportamiento higiénico a nivel del fenotipo de abejas individuales, se realizó una prueba de bondad de ajuste para cada marcador, que fue incorporado en el mapa con objeto de detectar desviaciones sobre el patrón de segregación esperado de 1:1 en los dos genotipos de cada marcador, para una colonia compuesta por abejas obreras retrocruzadas en el grupo de abejas obreras que realizaron el comportamiento higiénico.

Para aquellos marcadores que mostraron una desviación significativa del patrón de segregación 1:1 en los genotipos de las abejas que realizaron el comportamiento higiénico, se generaron marcadores AFLP en las 94 abejas del grupo testigo utilizando el procedimiento descrito. Se realizó una prueba de bondad de ajuste para cada marcador estudiado en el grupo testigo, con objeto de detectar desviaciones sobre el patrón de segregación esperado de 1:1 de los genotipos para una colonia compuesta por abejas obreras retrocruzadas.

Finalmente, aquellos marcadores que mostraron una desviación significativa del patrón de segregación esperado en las abejas que realizaron el comportamiento higiénico pero no en las abejas del grupo testigo a un nivel de significancia de 0.05, fueron analizados mediante una prueba de homogeneidad, utilizando una tabla de contingencia 2 X 2 para determinar si existía una asociación entre el marcador y la expresión del comportamiento higiénico.

**RESULTADOS**

*Evaluación del comportamiento higiénico de colonias retrocruzadas*

No se encontraron diferencias en el número de bastidores con cría, ni en el número de bastidores cubiertos con abejas de las colonias experimentales en el momento que se realizaron las pruebas para

Cuadro 2. Marcadores genéticos asociados a loci de rasgos binarios (BTL) que influyen en la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras

Table 2. Genetic markers associated to Binary trait loci (BTL) that influences on the expression of hygienic behavior of worker honeybees

Marker	Linkage group	χ <sup>2</sup>	P	BTL
A42.085	3	24.80	<0.0001	BTL 1
A43.112	6	6.68	0.010	BTL 2
A43.330b	13	5.82	0.016	BTL 3
A48.270	19	9.95	0.002	BTL 4
A33.240	21	6.86	0.009	BTL 5
A45.165	21	16.67	<0.0001	BTL 5
A42.120	21	16.66	<0.0001	BTL 5
A48.310	25	9.60	0.002	BTL 6
A48.150	25	5.64	0.018	BTL 7

25 cM and two markers were located in linkage group 25 with a distance of 53 cM and with the presence of six markers that were not associated to the expression of hygienic behavior between them (Figure 2).

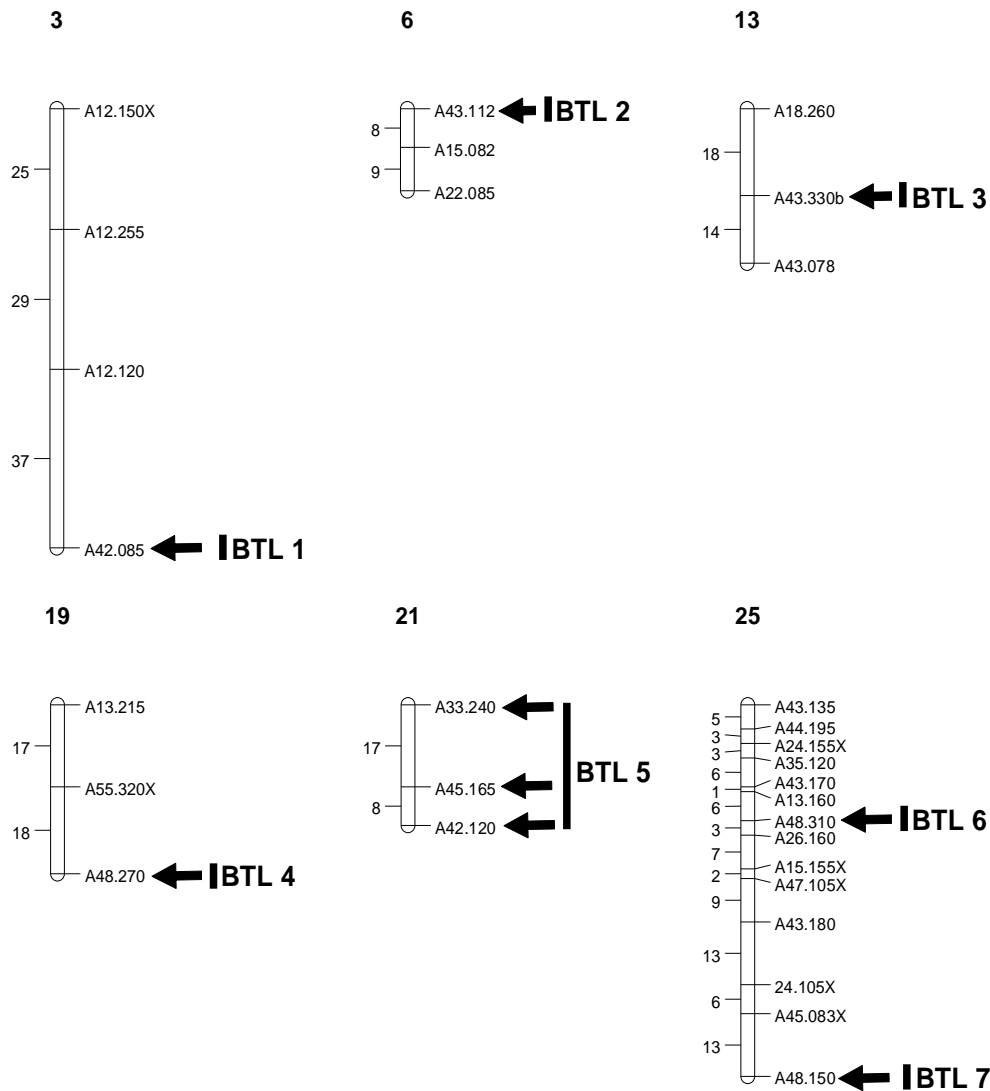
**DISCUSSION**

The linkage map expands 1346 cM, other maps expand 3450cM<sup>(32)</sup>, 3406cM<sup>(13)</sup> y 4114 cM<sup>(33)</sup>, the map generated in this study has a lower coverage in terms of marker density along the 186 Mb of the honey be genome<sup>(34)</sup> in comparison with the maps published previously.

Hunt y Page<sup>(32)</sup> y Lapidge *et al*<sup>(13)</sup> built their maps with RAPD markers generated from a random sample of haploid males that were sons of an F1 queen, while Solignac *et al*<sup>(33)</sup> use microsatellites generated from a random sample of diploid females that came from two backcrossed colonies; in our study the map was built using AFLP generated from a group of diploid workers that performed hygienic behavior from a backcrossed colony.

The results of this study indicate that nine marker located in six linkage groups were associated with

Figura 2. Loci de rasgos binarios (BTL) que influyen en la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras  
 Figure 2. Binary trait loci (BTL) that influence on the expression of the hygienic behavior of worker honeybees



medir el comportamiento higiénico, lo que indica que las poblaciones de abejas en las colonias no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ).

Durante el desarrollo del estudio no se detectaron colonias en las que las abejas sólo removieran el opérculo de cera sin retirar a la pupa muerta; todas las colonias realizaron los dos componentes del comportamiento higiénico.

El comportamiento higiénico de los dos tipos de retrocruza fue diferente, ya que se encontraron

the expression of the hygienic behavior of honey bee workers. Markers A42.085, A43.112, A43.330b and A48.270 were located in four different linkage groups that represent different genomic regions, which mean that each marker represent a BTL. Markers A48.150 and A48.310 were located in the same linkage group, however these markers are not linked since the genetic distance between them is 53cM, which indicates that these are two different regions of the honey bee genome; besides between these two markers other six markers were located that were not

diferencias en la proporción de celdas con cría muerta en las que las abejas removieron el opérculo, y de donde retiraron a las pupas muertas entre los dos grupos de colonias ( $P < 0.01$ ); se encontró que el comportamiento higiénico también fue diferente entre las colonias ( $P < 0.01$ ) y no se encontraron diferencias entre repeticiones ( $P > 0.05$ ). El porcentaje promedio de celdas que limpiaron las colonias de la retrocruza hacia alto comportamiento higiénico fue de  $95.32 \pm 1.00$ , mientras que el de las colonias de la retrocruza hacia bajo comportamiento higiénico fue de  $68.4 \pm 1.06$ .

*Identificación de BTL asociados a la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras*

Durante el desarrollo del estudio, todas las abejas obreras que participaron realizando el comportamiento higiénico en la colonia de observación realizaron los dos componentes del comportamiento: removieron el opérculo de cera y retiraron a la pupa muerta de las celdas; no se detectaron obreras que sólo realizaran uno de los componentes.

Se generaron 234 marcadores polimórficos a partir de la muestra de 94 abejas que realizaron el comportamiento higiénico en la colonia de observación, 115 de estos marcadores fueron incorporados al mapa genético que estuvo formado por 25 grupos de ligamiento que expanden 1346 cM del genoma de la abeja con una distancia promedio entre marcadores de 11.70 cM (Figura 1).

Doce de los marcadores que se incorporaron al mapa genético mostraron desviaciones significativas del patrón de segregación esperado 1:1 de los genotipos para una colonia compuesta por abejas obreras retrocruzadas en el grupo de abejas obreras que realizaron el comportamiento higiénico ( $P < 0.05$ ), pero no en los genotipos del grupo control de abejas que no realizaron el comportamiento higiénico ( $P > 0.05$ , Cuadro 1). Nueve de estos marcadores mostraron una asociación significativa con la expresión del comportamiento higiénico basado en una tabla de contingencia 2X2 ( $P < 0.05$ , Cuadro 2).

Los nueve marcadores que estuvieron asociados significativamente con la expresión del

associated with the expression of hygienic behavior, these suggests that each of the two markers are linked to two different BTLs. Markers A33.240, A45.165 y A42.120 were located in the same linkage group covering a region of 25 cM, this suggest that the three markers are linked to one BTL. This study identified seven BTLs associated with the expression of hygienic behavior of individual worker honey bees.

The results of this study indicates that specific regions in the honey bee genome influence on the expression of hygienic behavior at the level of individuals phenotype and that the genetic variation among the members of a family can be associated with the probability that a honey bee worker performs this behavior.

Lapidge *et al*<sup>(13)</sup> identified seven QTL associated with the expression of hygienic behavior measured at the level of the whole colony phenotype, in this study we identified seven BTL associated with the expression or hygienic behavior measured at the level of individual honey bees phenotype. The genetic map generated by Lapidge *et al*<sup>(13)</sup> has a better coverage of the honey bee genome, however, the number of loci detected in both studies is the same. It is not possible to know with the information generated in the two studies, if the BTLs associated with the expression of hygienic behavior of individual honey bees identified in this study correspond to the same genomic regions that represent the QTL associated with the expression of hygienic behavior of the whole honey bee colony identified by Lapidge *et al*<sup>(13)</sup>, since different markers were used, however, it is possible that some regions could be the same, since other studies has showed that QTL associated to behavioral traits, that were identified at the colony level phenotype also influence the expression of specific behaviors at the level of individual honey bees<sup>(24,25,26)</sup> and that BTL associated with the expression of a behavioral trait at the level of individual honey bees phenotype, correspond to QTL that were associated to the trait at the colony level phenotype.

BTL and QTL mapping is the first step in a strategy to identify candidate genes for hygienic behavior, by locating the BTLs identified by linkage mapping

comportamiento higiénico estuvieron ubicados en seis grupos de ligamiento del mapa genético. Cuatro de los marcadores estuvieron en grupos de ligamiento diferentes (Grupos 3, 6, 13 y 19), tres de los marcadores se ubicaron en forma adyacente cubriendo una región de 25 cM en el grupo de ligamiento 21 y dos marcadores se encontraron en el grupo de ligamiento 25 con una distancia de 53 cM entre ellos y con la presencia de seis marcadores no asociados a la expresión del comportamiento higiénico entre ellos (Figura 2).

## DISCUSION

El mapa de ligamiento generado en este estudio expande 1346 cM; otros mapas que han sido publicados anteriormente expanden 3450 cM<sup>(32)</sup>, 3406 cM<sup>(13)</sup> y 4114 cM<sup>(33)</sup>, de tal forma que el mapa generado en este trabajo tiene una menor cobertura en términos de densidad de marcadores a lo largo de las 186 Mb del genoma de la abeja<sup>(34)</sup>, en comparación con los mapas publicados previamente.

Hunt y Page<sup>(32)</sup> y Lapidge *et al.*<sup>(13)</sup> construyeron sus mapas utilizando marcadores RAPD generados a partir de una muestra aleatoria de machos haploides hijos de una reina F1, mientras que Solignac *et al.*<sup>(33)</sup> usaron micro satélites generados a partir de una muestra aleatoria de hembras diploides provenientes de dos colonias retrocruzadas. En nuestro estudio el mapa fue construido con marcadores AFLP generados a partir de un grupo de obreras diploides que realizaron el comportamiento higiénico de una colonia retrocruzada.

Los resultados de este trabajo indican que nueve marcadores ubicados en seis grupos de ligamiento estuvieron asociados con la expresión del comportamiento higiénico de las abejas obreras. Los marcadores A42.085, A43.112, A43.330b y A48.270 se localizaron en cuatro grupos de ligamiento diferentes que corresponden a regiones genómicas diferentes, de tal forma que cada uno representa un BTL. Los marcadores A48.150 y A48.310 se localizaron en un mismo grupo de ligamiento; sin embargo estos marcadores no se

in the corresponding regions in the honey bee genome. This approach takes advantage on the fact that the honey bee genome has been sequenced<sup>(34)</sup> and that the honey bee has one of the highest recombination rates among the eukaryotic organisms, it has been estimated that one cM represents between 52 and 45 kb in the honey bee genome<sup>(32,33)</sup>, this means that genetic distances relatively long in a linkage map represents small regions in the genome. Using this strategy Hunt *et al.*<sup>(35)</sup> identified candidate genes for pollen foraging behavior and for defensive behavior in the genomic regions that correspond to QTL and BTL associated to pollen foraging and the defensive behavior of honey bees.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

In this study we detect genomic regions that influence the probability that a worker honey bee performs hygienic behavior, this will contribute to understand the factors that influence the expression of this behavior at the level of individual honey bees, and how does the expression of hygienic behavior at the level of the workers of a colony determine the phenotype of the whole honey bee colony. The BTLs detected will help to identify candidate genes and molecular markers associated to this trait for its possible use in maker assisted breeding programs for the development of honey bees that are resistant to diseases. Hygienic behavior is a trait of interest for beekeeping and is important from the point of view of the evolution of honey bee social behavior, since it is a trait that workers perform as a generalized respond of the colony against pathogens and parasites.

*End of english version*

---

encuentran ligados, ya que existe una distancia de 53 cM entre ellos, lo que indica que se trata de dos regiones diferentes del genoma de la abeja, además entre estos dos marcadores se localizaron otros seis marcadores que no estuvieron asociados a la expresión del comportamiento higiénico, lo que sugiere que cada uno de estos dos marcadores se encuentran ligados a dos BTL diferentes. Los

marcadores A33.240, A45.165 y A42.120 se ubicaron dentro de un mismo grupo de ligamiento cubriendo una región de 25 cM, lo que sugiere que los tres marcadores se encuentran ligados a un mismo BTL. De tal forma que en este trabajo se identificaron siete BTL asociados con la expresión del comportamiento higiénico de abejas obreras individuales.

Los resultados obtenidos indican que regiones específicas del genoma de la abeja influyen sobre la expresión del comportamiento higiénico a nivel del fenotipo de los individuos, y que la variación genética entre miembros de una misma familia puede ser asociada a la probabilidad de que una abeja obrera realice este comportamiento.

Lapidge *et al*<sup>(13)</sup> identificaron siete QTL asociados a la expresión del comportamiento higiénico medido a nivel del fenotipo de toda la colonia de abejas; en nuestro trabajo se identificaron siete BTL asociados a la expresión del comportamiento higiénico medido a nivel del fenotipo de abejas individuales. El mapa genético desarrollado por Lapidge *et al*<sup>(13)</sup> tiene una mejor cobertura del genoma de la abeja que el generado en este trabajo, sin embargo, a pesar de esta diferencia el número de loci que se detectaron en los dos trabajos fue el mismo. No es posible saber con la información generada en estos dos estudios, si los BTL asociados a la expresión del comportamiento higiénico de abejas individuales identificados en este trabajo corresponden a las mismas regiones genómicas que los QTL asociados a la expresión del comportamiento higiénico de toda la colonia identificados por Lapidge *et al*<sup>(13)</sup>, ya que se utilizaron marcadores moleculares diferentes; sin embargo, existe la posibilidad que algunas de las regiones sean las mismas, ya que otros estudios han demostrado que QTL asociados a características de comportamiento que originalmente fueron identificados a nivel del fenotipo de las colonias, también influyen sobre la expresión de comportamientos específicos a nivel de abejas individuales<sup>(24,25,26)</sup> y que BTL asociados a la expresión de características de comportamiento a nivel del fenotipo de abejas individuales, corresponden a QTL que fueron asociados a características medidas a nivel del fenotipo de las colonias<sup>(23)</sup>.

La identificación de BTL y QTL es el primer paso en una estrategia que busca identificar genes candidatos que afectan la expresión del comportamiento higiénico, al relacionar los BTL identificados por medio del mapeo genético con las regiones correspondientes en el genoma de la abeja. Esta estrategia busca aprovechar que el genoma de la abeja ha sido secuenciado en su totalidad<sup>(34)</sup>, y que la abeja tiene una de las más altas frecuencias de recombinación dentro de los organismos eucariontes; se ha estimado que un cM representa entre 52 y 45 kb en el genoma de la abeja<sup>(32,33)</sup>, lo que implica que distancias genéticas relativamente grandes dentro de un mapa de ligamiento representan regiones pequeñas dentro del genoma. Utilizando esta estrategia Hunt *et al*<sup>(35)</sup> identificaron genes candidatos para el pecoreo de polen y para el comportamiento defensivo dentro de las regiones genómicas que corresponden a QTL y BTL asociados al pecoreo de polen<sup>(24)</sup> y al comportamiento defensivo de las abejas<sup>(23,26,36)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

En este estudio se detectaron regiones genómicas que influyen en la probabilidad de que una abeja obrera realice el comportamiento higiénico, lo que contribuirá a entender los factores que influyen en la expresión de este comportamiento a nivel de abejas obreras individuales, y cómo es que la expresión del comportamiento higiénico a nivel de los individuos que forman a la colonia determina el fenotipo de toda la colonia de abejas. Los BTL detectados facilitarán la identificación de genes candidatos y marcadores moleculares asociados a esta característica, para su posible uso en programas de mejoramiento genético por selección asistida por marcadores, que busquen desarrollar colonias de abejas resistentes a enfermedades. El comportamiento higiénico es una característica de interés para la apicultura, y es importante desde el punto de vista de la evolución del comportamiento social de las abejas, ya que se trata de un rasgo de comportamiento que realizan las abejas obreras como una respuesta generalizada de la colonia en contra de los patógenos y parásitos que la afectan.

## LITERATURA CITADA

1. Park OW. Disease resistance and American foulbrood. *Am Bee J* 1936;76:12-15.
2. Park OW, Pellet FC, Paddock FB. Disease resistance and American foulbrood. *Am Bee J* 1937;77:20-25.
3. Rothenbuhler WC, Thompson VC. Resistance to American foulbrood in honey bees. 1. Differential survival of larvae of different genetic lines. *J Econ Entomol* 1956;49:470-475.
4. Rothenbuhler WC. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Anim Behav* 1964;12:578-583.
5. Spivak M, Gilliam M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World* 1998;79:124-134.
6. Gilliam M, Taber S, Richardson GV. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* 1983;1:29-39.
7. Miline CP Jr. Honey Bee (Hymenoptera:Apidae) Hygienic behavior and resistance to Chalkbrood. *Ann Entomol Soc Am* 1983;4:387.
8. Spivak M, Gilliam M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa. Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World* 1998;79:169-186.
9. Guzmán-Novoa E, Vandame R, Arechavaleta ME. Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in México. *Apidologie* 1999;30:173-182.
10. Arechavaleta-Velasco ME, Guzmán-Novoa E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 2001;32:157-174.
11. Ibrahim A, Spivak M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* 2006;37:31-40.
12. Rothenbuhler WC. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. *Am Zool* 1964;4:111-123.
13. Moritz RFA. A reevaluation of the Two-locus model for hygienic behavior in Honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Hered* 1988;79:257-262.
14. Lapidge KL, Oldroyd BP, Spivak M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* 2002;89:565-568.
15. Trump RF, Thompson VC, Rothenbuhler WC. Behaviour Genetics of nest cleaning in honeybees. V. Effect of previous experience and composition of mixed colonies on response to disease-killed brood. *J Apicult Res* 1967;6:127-131.
16. Unger P, Guzmán-Novoa E. Maternal effects on the hygienic behavior of Russian X Ontario hybrid honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Hered* 2010;101:91-96.
17. Thompson VC. Behavior genetics of nest cleaning in honeybees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *J Apicult Res* 1964;3:25-30.
18. Palmquist Momot J, Rothenbuhler WC. Behavior genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *J Apicult Res* 1971;10:11-21.
19. Ewens WJ, Spielman RS. The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am J Hum Genet* 1995;57:455-464.
20. Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1998;62:450-458.
21. Wilcox PL, Amerson HV, Kuchlman EG, Liu HL, O'Malley DM, Sederoff RR. Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3859-3864.
22. McIntyre LM, Coffman CJ, Doerge RW. Detection and localization of a single binary trait locus in experimental populations. *Genet Res* 2001;78:79-92.
23. Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ. Binary trait loci that influence Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) guarding behavior. *Ann Entomol Soc Am* 2004;97(1):177-183.
24. Page RE, Fondrk MK, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Humphries MA, Nguyen K, et al. Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *J Hered* 2000;91:474-479.
25. Guzmán-Novoa E, Hunt GJ, Uribe JL, Smith C, Arechavaleta-Velasco M.E. Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honeybee defensive behavior: Results of colony and individual behavioral assays. *Behav Genet* 2002;32(2):95-102.
26. Arechavaleta-Velasco ME, Hunt GJ, Emore C. Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bees. *Behav Genet* 2003;33(3):355-362.
27. Spivak M, Downey DL. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 1998;91:64-70.
28. Hunt GJ. Insect DNA extraction protocol. In: Michelli MR, Bova R editors. *Fingerprint methods based on arbitrary primed PCR*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1997:21-24.
29. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, Van de Lee T, Homes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4407-4414.
30. Van Ooijen JW, Voorrips RE. JoinMap® Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen, Netherlands. Plant Research International. 2001.
31. Kosambi DD. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenetic* 1944;12:172-175.
32. Hunt GJ, Page, RE. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 1995;139:1371-1382.
33. Solignac M, Mougél F, Vautrin D, Monnerot M, Cournet JM. A third-generation microsatellite-based linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, and its comparison with the sequence-based physical map. *Genome Biol* 2007;8(R66):1-14.
34. Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 2006;443:931-949.
35. Hunt GJ, Amdam GV, Schlipalius D, Emore C, Sardesai N, Williams CE, et al. Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. *Naturwissenschaften* 2007;94:247-267.
36. Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Fondrk MK, Page RE. Quantitative trait loci for honey bee stinging behavior and body size. *Genetics* 1998;148:1203-1213.