



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

Efecto del alimento larval sobre el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo en reinas de *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini) criadas *in vitro*.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

**Médico Veterinario Zootecnista
Adriana Morales Cuevas**



POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES

Director:

Dr. José Javier G. Quezada Euán

Mérida, Yuc., México, Septiembre de 2018



UADY
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**COORDINACIÓN GENERAL
DEL SISTEMA DE POSGRADO,
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN**

POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**ALUMNA: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
ADRIANA MORALES CUEVAS**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. LUIS MEDINA MEDINA
CCBA-UADY**

**M. EN C. HUMBERTO MOO VALLE
CCBA-UADY**

**DR. WILLIAM MAY ITZÁ
CCBA-UADY**

**DRA. VIRGINIA MELÉNDEZ RAMÍREZ
CCBA-UADY**

**M. EN C. JOSÉ CHAVIER DE ARAUJO FREITAS
CCBA-UADY**

MÉRIDA, YUCATÁN, OCTUBRE DEL 2018

Declaratoria de originalidad:

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

Dedicatoria y agradecimientos

...A mi padre

- A mi madre y hermana, por su paciencia y su apoyo incondicional durante cada etapa de mi vida.

- Agradezco al Dr. José Javier Quezada Euán por su asesoría y paciencia durante la realización de este trabajo.

- Al Dr. Klaus Hartmann Hartfelder, por su asesoría y hospitalidad durante mi estancia en Ribeirão Preto.

- A los miembros del comité tutorial por sus valiosos comentarios y correcciones oportunas durante cada etapa del proceso. Sus consejos y motivación fueron vitales para la conclusión de este trabajo.

- A Héctor por su amor, paciencia y consejos.

- Al M. en C. Carlos Sauri Arceo por ser maestro, amigo y consejero.

- A mis amigos.

- A todos aquellos extraños amables que me brindaron apoyo desinteresadamente.

Resumen

En abejas sin aguijón con determinación trófica de la casta reina el tiempo de desarrollo de las reinas es más prolongado y al momento de emerger son de mayor tamaño que las obreras. En insectos un factor proximal mediante el cual se producen diferencias en el tiempo del desarrollo es la cantidad de alimento que reciben los individuos durante su fase larvaria; sin embargo, esto aún no había sido documentado en abejas sin aguijón. Además, es posible que exista relación entre el tamaño de las reinas y su potencial reproductivo. El objetivo del trabajo fue determinar si la cantidad de alimento larval es un factor causante de diferencias en el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo en reinas vírgenes de *S. pectoralis* criadas *in vitro*. En el presente estudio se criaron reinas *in vitro* utilizando como tratamientos 3 niveles de alimento larval (86, 94.6 y 98.9 μ l). Se evaluó el tiempo de desarrollo en días a partir de la fecha del traslarve. El tamaño corporal se evaluó considerando cinco variables morfométricas. El potencial reproductivo fue evaluado de manera indirecta comparando el tamaño y peso fresco del abdomen. Además, se utilizaron 20 reinas vírgenes de las que se colectó hemolinfa para la detección y evaluación de la concentración relativa de vitelogenina; lo cual fue asociado al tamaño del abdomen de las mismas. Se observaron diferencias significativas en el tiempo de desarrollo y tamaño corporal ($P < 0.05$), lo cual coincide con lo reportado en trabajos previos, donde se ha observado que las diferencias en el tiempo de desarrollo están asociadas al tamaño de los individuos y éste a su vez es mediado por la cantidad de alimento durante la fase larval. En el tamaño abdominal se observaron dos patrones en las reinas criadas *in vitro* (abdomenes pequeños y grandes). Además, en 4 reinas naturales se observó que la concentración relativa de vitelogenina se incrementó conforme al tamaño abdominal. En conclusión, la cantidad de alimento larval tuvo en efecto sobre el tamaño corporal y tiempo de desarrollo en reinas de *S. pectoralis* criadas *in vitro*. Sin embargo, el efecto del alimento larval sobre el potencial reproductivo no fue concluyente en este trabajo.

Palabras clave: Reina virgen, Alimento larval, Tiempo de desarrollo, *Scaptotrigona pectoralis*, Reproducción, Castas.

Summary

Development time on queen caste of stingless bees with trophic determination is longer; at emergence the queens are bigger than workers. The differences on development time could be generated by larval food on larval phase; however, this aspect has not been documented on stingless bees yet. Furthermore, the possible relation between queen's body size and reproductive capacity has not been explored yet. The aim of this study was to determine if larval food is a factor that induces differences on development time in queens of *Scaptotrigona pectoralis* rearing *in vitro*. In this study we used three treatments; the queens were reared with three levels of larval food (86, 94.6 y 98.9 μ l). Development time was evaluated in days since the tralarse date. We determined the body size with 5 morphometric variables. In order to evaluate the reproductive potential in queens reared *in vitro* we weighed the fresh abdomens. In addition, 20 virgin queens were used, from which hemolymph was collected for the detection and evaluation of the relative concentration of vitellogenin; which was associated with abdominal size. Results on this study indicate significant differences on development time and body size between treatments ($P < 0.05$). Previous studies agree with that; records indicate that body size and development time are associated. The body size depends of amount of larval food. Also, we found two patterns of abdominal size (small and big abdomens). In addition we observed that concentration of vitellogenin increased jointly to abdominal size in 4 natural queens. In conjunct, our data suggest differences in development time and body size caused by larval food. The effect of larval food on the reproductive potential is not clear.

Keywords: Gyne, Larval food, Development time, *Scaptotrigona pectoralis*, Reproduction, Caste.

Índice

Hoja de votos aprobatorios	II
Declaratoria de originalidad:	III
Dedicatoria y agradecimientos	IV
Resumen	V
Summary.....	VI
Índice de figuras	VIII
Índice de cuadros	IX
Índice de anexos	X
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Generalidades de la tribu Meliponini	3
2.2 Determinación de castas	4
2.3 Regulación hormonal de la determinación de castas.....	6
2.4 Tiempo de desarrollo y aptitud reproductiva.....	9
3. Hipótesis	11
4. Objetivo general.....	11
4.1 Objetivos específicos	12
5. Referencias.....	12
6. Artículo	17
Resumen.....	18
Summary	19
Introducción	20
Materiales y métodos	21
Resultados	26
Discusión.....	32
Referencias.....	36
Anexos	40

Índice de figuras

Figura 1. Efecto de la alimentación larval en la síntesis de hormona juvenil (HJ) en períodos de sensibilidad y después del 5° instar larval.....	8
Figura 2. Obrera (izquierda) y reina (derecha) de <i>S. pectoralis</i> (Fotografía por Quezada-Euán).....	11
Figura 3. Variables morfométricas (1= Ancho de la cabeza, 2= Distancia intertegular, 3= Longitud del mesonoto, 4= Longitud del escapo, 5= Ancho del segundo tergito del abdomen, 6= Longitud del ala anterior) (Figura modificada de Hartfelder y Engels, 1992).....	23
Figura 4. Distribución de los valores propios del componente principal 1 y componente principal 2.....	29
Figura 5. Peso fresco del abdomen (mg) en reinas criadas <i>in vitro</i> con 86µl, 94.6µl y 98.9µl de alimento larval.....	30
Figura 6. Ancho del segundo tergito del abdomen (AT) en reinas criadas <i>in vitro</i> con tres niveles de alimento larval.....	30
Figura 7. Patrón de proteínas en la hemolinfa de reinas de <i>S. pectoralis</i> en gel de poliacrilamida 5% (SDS-PAGE).....	31
Figura 8. Patrón de proteínas en la hemolinfa de reinas de <i>S. pectoralis</i> en gel de poliacrilamida 5% (SDS-PAGE).....	31
Figura 9. Concentración relativa de vitelogenina y ancho del segundo tergito (AT) en mm de reinas vírgenes de colonias naturales de <i>S. pectoralis</i>	32

Índice de cuadros

Cuadro 1. Tiempo de desarrollo de reinas de <i>S. pectoralis</i> criadas <i>in vitro</i>	26
Cuadro 2. Variables morfométricas representativas del tamaño corporal en reinas de <i>S. pectoralis</i> criadas <i>in vitro</i>	27
Cuadro 3. Valores propios y porcentaje de la varianza explicada por los primeros dos componentes principales obtenidos de cinco variables morfométricas.....	28
Cuadro 4. Valores propios y porcentaje de la varianza explicada por los primeros dos componentes principales obtenidos de cinco variables morfométricas.....	28

Índice de anexos

Anexo 2. Método de colecta de hemolinfa en reina virgen de <i>S. pectoralis</i>	40
Anexo 2. Procedimiento para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
Anexo 3. Procedimiento de cuantificación de vitelogenina mediante el programa Image J versión 15.1r.....	43
Anexo 4. Procedimiento de cuantificación de vitelogenina mediante el programa Image J versión 15.1r	44

1. Introducción

En insectos, el tamaño corporal está asociado al éxito reproductivo de las hembras (fecundidad) mientras que, en machos se asocia a su capacidad de apareamiento (Badyaev, 2002; Jarosik y Honek, 2007; Teder, 2014). Estudios realizados en insectos demuestran que el tamaño corporal de un individuo generalmente es proporcional a la duración de su desarrollo. Por otra parte, Blanckenhorn (2007), menciona que extender el tiempo de desarrollo es una estrategia mediante la cual los individuos pueden incrementar su tamaño corporal y obtener ventajas reproductivas.

Un mecanismo proximal mediante el cual se producen diferencias en el tiempo de desarrollo de insectos holometábolos es la cantidad de alimento que reciben los individuos durante la fase larvaria (Araújo *et al.*, 2012). En abejas sin aguijón pertenecientes a la tribu Meliponini, se ha observado que el sistema endocrino reacciona a estímulos trofogénicos capaces de inducir diferencias durante el desarrollo pre-imaginal (Hartfelder, 1987). Por ejemplo, la cantidad de alimento proporcionado a larvas femeninas de *Scaptotrigona depilis* (que se desarrollan como obreras o reinas) se asocia fuertemente con el tamaño corporal, aunque se desconoce su relación con el tiempo de desarrollo (Menezes *et al.*, 2013).

En estudios previos se ha reportado que pueden surgir reinas de celdas de tamaño normal, estas reinas ingieren menos alimento como larvas y son de menor tamaño (Ribeiro *et al.*, 2006). En algunas especies de meliponinos se ha demostrado que el tamaño corporal de la reina es importante, ya que, reinas pequeñas ponen menor cantidad de huevos que reinas de mayor tamaño (Ribeiro y Alves, 2001). Por lo tanto, es posible que exista algún tipo de compensación (trade-off) entre tiempo de desarrollo, tamaño corporal y capacidad reproductiva. De ser así reinas que reciben mayor cantidad de alimento larval, pueden tardar más en desarrollarse, pero pueden obtener la ventaja de una mayor capacidad reproductiva que reinas que reciben menos alimento larval pero que se desarrollan a mayor velocidad.

Además, González-Acereto (2008), reportó las reinas de *S. pectoralis* son de mayor tamaño al momento de emerger que las obreras y tienen un tiempo de desarrollo más largo. En esta especie el destino de la casta de la larva se determina por la cantidad de

alimento que es proporcionado a las celdas reales por las obreras adultas (Michener, 2007). Por las consideraciones anteriores se asume que el alimento larval pudiera ser un factor causante de las diferencias en el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y características reproductivas de esta especie.

Por otra parte, las abejas sin aguijón constituyen el grupo más diverso de abejas eusociales y juegan un papel importante como polinizadoras de la vegetación nativa. Su función ecológica es esencial para la existencia de plantas cultivables y silvestres en regiones tropicales de América. Con la finalidad de desarrollar estrategias eficaces de conservación se han realizado estudios relacionados con la crianza de reinas *in vitro* (Faustino *et al.*, 2002; Menezes *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2016). Sin embargo, se necesita información adicional sobre los factores que afectan a la biología reproductiva de los individuos criados artificialmente. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la cantidad de alimento larval proporcionado *in vitro* a larvas femeninas de *S. pectoralis* sobre el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de la tribu Meliponini

De acuerdo a su clasificación taxonómica, la Tribu Meliponini (abejas sin aguijón) se ubica dentro de la familia Apidae, subfamilia Apinae. Con más de 500 especies (y 100 probablemente que no han sido descritas), constituye el grupo más grande y diverso de abejas altamente eusociales (Michener, 2013). Los meliponinos se encuentran distribuidos únicamente en las zonas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Nogueira-Neto, 1997; Rasmussen y Cameron, 2010). En áreas tropicales los meliponinos son las abejas más comunes y juegan un papel importante como polinizadores de la vegetación nativa, lo cual, representa una función ecológica esencial para la existencia de plantas cultivables y silvestres (Roubik, 1995; Slaa *et al.*, 2006).

Al igual que otras colonias de insectos eusociales, los meliponinos dependen de actividades cooperativas y están conformadas en su mayoría por obreras que se encargan del acopio de recursos, labores de construcción, alimentación de la reina y larvas; mientras que los machos cumplen la función reproductiva masculina. Las abejas pertenecientes a la Tribu Meliponini tienen características distintivas que difieren de otras Apidae corbiculadas; el aguijón se encuentra atrofiado en reinas y obreras, la venación de las alas es reducida, el basitarso posterior es más delgado en la base, carece de aurícula, y la tibia posterior de la obrera tiene un peine de setas rígidas conocido como penicillum (Michener, 2007; Barth *et al.*, 2008).

En colonias de abejas sin aguijón se ha observado que la producción de reinas vírgenes se correlaciona positivamente con la cantidad de polen almacenado (Van Veen *et al.*, 2004). En los géneros con determinación trófica de la casta reina el reemplazo de una reina fisiogástrica (por pérdida) depende de la presencia de celdas reales o reinas vírgenes jóvenes. Normalmente sólo un número reducido de reinas vírgenes son viables. Es por ello que el sistema de producción constata de reinas vírgenes minimiza el riesgo de la pérdida irreversible de la reina (Engels *et al.*, 1990). En ese sentido, la crianza *in vitro* es forma eficiente de obtener un gran número de reinas vírgenes en abejas sin aguijón con determinación trófica de la casta reina. Además, bajo

condiciones adecuadas se pueden producir reinas de manera masiva; por lo que, la producción de reinas *in vitro* puede ser útil para los esfuerzos de multiplicación de colonias (Menezes *et al.*, 2013).

2.2 Determinación de castas

En la tribu Meliponini el aprovisionamiento de alimento para las larvas es de forma masiva. El alimento larval consiste en provisiones semilíquidas, compuesta de polen, secreciones de las glándulas hipofaríngeas y néctar o miel (Menezes *et al.*, 2007). Las celdas de cría se construyen verticalmente y la reina ovíparita encima del alimento larval que las obreras aprovisionan previamente, posterior a la puesta del huevo las obreras cierran las celdas de cría. En meliponinos no existe contacto entre larvas y adultos; las celdas de cría sólo se abren cuando emergen las abejas al final de su desarrollo (Hartfelder y Engels, 1989; Menezes *et al.*, 2007; Michener, 2007). El alimento se encuentra disponible para la larva después de que eclosiona; ésta flota sobre el alimento, la capa líquida se consume antes de que la larva en desarrollo alcance el material más sólido. Por lo tanto, cualquier diferencia cuantitativa podría estar relacionada con el desarrollo de los adultos emergentes, ya que, con más alimento la larva pasa más tiempo en la capa líquida (Velthuis, 1976; Michener, 2007).

Las colonias de abejas sin aguijón están compuestas por individuos de ambos sexos (machos y hembras) y de dos castas (reinas y obreras). Se conocen dos sistemas de determinación de castas en Meliponini; el primero dado por factores tróficos y el segundo por factores trofogenéticos (Michener, 2007). En el primer sistema se produce un número reducido de reinas y la arquitectura del nido de cría tiene panales horizontales separados por pilares; en los márgenes de estos, las obreras ocasionalmente construyen celdas reales de mayor tamaño, y estas celdas se abastecen con cantidades más grandes de alimento larval, generalmente el doble o el triple de la cantidad depositada en celdas normales. La larva femenina en una celda real puede sobrealimentarse y desarrollarse como reina como consecuencia del consumo de grandes cantidades de alimento. Hartfelder *et al.* (2006), menciona que el comienzo de

la metamorfosis es retrasado y el tiempo total de desarrollo de las reinas es más largo en comparación con el de las obreras.

En especies cuya distribución de celdas es en racimo, como el caso del género *Frieseomelitta*, no hay construcción anticipada de celdas reales; en este caso, las obreras fusionan dos celdas contiguas y una larva de mayor edad puede romper la celda de otra e ingerir el alimento almacenado en esa celda y desarrollarse como reina. Además, en este género las obreras pueden construir una celda auxiliar que contiene únicamente alimento larval. Las celdas entonces se unen y la larva consume las provisiones en su propia celda así como en la auxiliar, produciendo una reina (Faustino *et al.*, 2002; Michener, 2007).

El segundo sistema está dado por factores trofogenéticos, y es encontrado en el género *Melipona*. En este género todas las larvas reciben la misma cantidad de alimento larval y se ha sugerido el control individual del destino de castas, esto basado en el hecho de que las reinas y obreras son del mismo tamaño y son criadas a partir de celdas idénticas (Wenseleers *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos autores han argumentado en contra de la libre determinación, y han señalado posibles influencias sociales o ambientales. La principal evidencia de tales influencias es que la producción de reinas en *Melipona* no es constante, sino que está influenciado en cierta medida por factores estacionales y la cantidad de alimentos introducidos en cada celda (Moo-Valle *et al.*, 2001; Wenseleers *et al.*, 2004). Asimismo, Kerr (1950), sugirió que la determinación de castas en la *Melipona* se rige por un sistema de dos alelos de dos loci, en el que solamente las hembras dobles heterocigotas se desarrollan como reinas; por lo que el 25% de las hembras en colonias de *Melipona* se podrían desarrollar como reinas. Sin embargo, de forma natural la proporción potencial de reinas rara vez se cumple (Wenseleers *et al.*, 2004).

De manera excepcional en algunas especies de abejas sin aguijón diferente a *Melipona* pueden surgir reinas a partir de celdas de obrera. Estas reinas ingieren menos alimento como larvas y son de menor tamaño por lo que son llamadas reinas "miniatura" o "enanas". Aunque en algunas especies de abejas sin aguijón se produce una gran cantidad de reinas miniatura, se ha reportado que solo un pequeño porcentaje de ellas son capaces de aparearse y encabezar colonias (Ribeiro, 2004). En una revisión sobre

reinas vírgenes miniatura de *Plebeia remota* realizada por Ribeiro (2004), propuso que las reinas vírgenes miniatura eran menos exitosas que las normales, ya que, como ocurre con *Schwarziana quadripunctata* existe la posibilidad de que sean eliminadas "selectivamente" por las obreras, además de su menor probabilidad de apareamiento inducido por machos discriminantes y su reducida capacidad para efectuar el vuelo nupcial. Sin embargo, se observó que después del apareamiento, las reinas *P. remota* normales y miniatura parecen tener las mismas oportunidades de reemplazar a las reinas de una colonia. Esto indica que el tamaño, en esta especie, no está relacionado con la selección de la reina (Ribeiro *et al.*, 2006).

También se han estudiado los aspectos de la capacidad de puesta de huevos y la fecundidad. En el caso de *S. quadripunctata*, las reinas miniatura parecen tener una menor capacidad para poner huevos, probablemente porque tienen una cantidad menor de ovarios que las reinas de tamaño normal. No obstante, en *P. remota*, las reinas miniatura y normal ponen cantidades similares de huevos (Ribeiro *et al.*, 2006). En ese estudio no encontraron una correlación significativa entre la tasa de oviposición y las variables morfométricas lo que demostró que en esa especie el tamaño de la reina tampoco está relacionado con su capacidad de postura. Esto se ve reforzado por el hecho de que el número de ovarios es el mismo en reinas de diferentes tamaños.

Por otra parte, en *S. quadripunctata* se ha reportado que existe una correlación fuerte entre el tamaño de las reinas y el tamaño de los huevos. Esto podría tener como consecuencia la producción de individuos más pequeños, a menos que la cantidad de alimento disponible para su desarrollo sea grande (Ribeiro y Alves, 2001).

2.3 Regulación hormonal de la determinación de castas

En meliponinos la cantidad y/o calidad de alimento larval se asocia a diferencias fisiológicas que afectan el desarrollo y morfología de las larvas. El sistema endócrino desempeña una función integrativa y la información generada por una señal química se transmite a todos los tejidos y células de forma coordinada para sincronizar e integrar el desarrollo de las estructuras morfológicas segmentarias y los órganos internos

durante la metamorfosis. En insectos sociales, la expresión de las características específicas de cada casta está controlada por la hormona juvenil (HJ) y los ecdisteroides, que son producidos por la *corpora allata* y glándula protorácica respectivamente (Hartfelder, 1987; Hartfelder *et al.*, 2006).

En abejas sin aguijón el papel de la HJ ha sido ampliamente explorado en el desarrollo de castas mediante la aplicación de análogos de HJ. En *Scaptotrigona* dichos experimentos demuestran la existencia de un período de sensibilidad a la HJ en la fase de hilado del capullo en el último instar larval para el desarrollo de la casta reina u obrera (Fig. 1) (Hartfelder, 1987; Hartfelder y Rembold, 1991; Hartfelder *et al.*, 2006).

En *S. postica*, Hartfelder (1987), observó que la síntesis de HJ por la *corpora allata* durante el penúltimo y último instar larvario es de 30 a 80% mayor en reinas que en obreras. La síntesis tardía de HJ en larvas de *S. postica* demuestra un patrón de actividad de la *corpora allata* responsable de la regulación de la metamorfosis. Al final del período de alimentación, las larvas destinadas a convertirse en reinas aparentemente no disminuyen el nivel de actividad de la *corpora allata* tan rígidamente como las larvas de las obreras. En la fase de hilado inicial, las larvas de reina reanudan la síntesis de HJ más rápidamente y con mayor frecuencia que las larvas de las obreras.

La modulación pronunciada a corto plazo resultante de la síntesis de HJ justo antes de una ventana temporal de susceptibilidad a la HJ, muestra que se construye una señal hormonal, cuando se ha tomado una vía de desarrollo polimórfico (obrero o reina) (Hartfelder, 1987). Además, durante el estadio pre-pupal y pupal de *S. postica* el título de ecdisteroides es mucho más alto en reinas que en obreras. El título de ecdisteroides en la fase de pupa, es un factor regulador importante para la pigmentación de la cutícula de la abeja adulta. Probablemente también para otros programas morfogénicos llevados a cabo en el periodo pupal de metamorfosis (Hartfelder *et al.*, 2006). En *M. quadrifasciata*, se observó que los ecdisteroides juegan un papel en la programación específica de casta en la fusión de los ganglios abdominales (Hartfelder *et al.*, 2006).

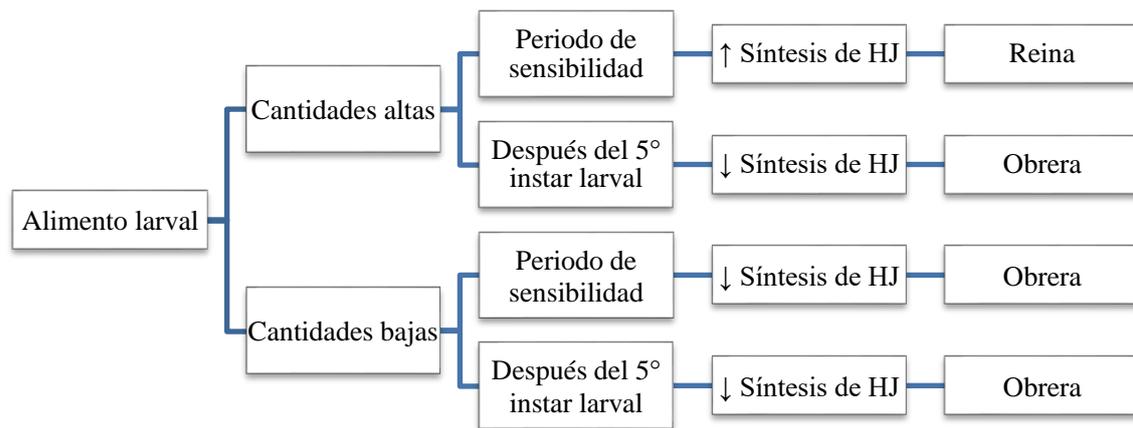


Figura 1.- Efecto de la alimentación larval en la síntesis de hormona juvenil (HJ) en períodos de sensibilidad y después del 5º instar larval.

Además, Cardoso-Júnior *et al.* (2017), identificaron una interacción inhibitoria entre el factor endocrino sistémico de la HJ y la vitelogenina, lo cual resulta fundamental para la reproducción de insectos; ya que la vitelogenina es una proteína que representa el principal parámetro de la fertilidad femenina (Engels y Engels, 1977).

El título de vitelogenina en la hemolinfa ha sido profundamente investigado en abejas melíferas, pero sólo preliminarmente en abejas sin aguijón. Estudios en *S. postica* y *M. quadrifasciata* demuestran que las reinas adultas tienen un título de vitelogenina mucho mayor que las obreras (Hartfelder *et al.*, 2006). La hemolinfa de las abejas recién emergidas (reinas y obreras) no contiene vitelogenina en esta etapa pueden ser consideradas como infértiles. La síntesis de vitelogenina comienza en las hembras con más de cinco días de edad. El título de vitelogenina luego aumenta rápidamente y se puede decir que las abejas están en una fase subfértil. La fase fértil comienza hacia el final de la segunda semana de vida del imago y se caracteriza por un marcado aumento en el tamaño de los ovarios. Las reinas se vuelven fisiogástricas y su peso corporal aumenta considerablemente (Engels y Engels, 1977).

En otras abejas sociales se ha observado una relación positiva entre la vitelogenina y la longevidad en la casta de la reina. La fecundidad y longevidad de la reina permiten que las colonias se desarrollen hasta un tamaño donde la producción de individuos reproductivos y la reproducción de la colonia (enjambre) son posibles. Se ha documentado que la vitelogenina afecta la longevidad de las abejas mediante la

captación de radicales libres. De este modo, la resistencia al estrés oxidativo de una abeja se asocia positivamente con su nivel de vitelogenina. El descubrimiento de esta relación sugirió que se podrían explicar los diferentes patrones de longevidad de las abejas y de las castas (Harwood *et al.*, 2017).

En insectos la vitelogenina es sintetizada por los ovarios y los cuerpos grasos. Los cuerpos grasos funcionan principalmente en la inmunidad, síntesis de proteínas y almacenamiento de nutrientes. Durante el ciclo reproductivo femenino la tasa de producción de vitelogenina por los cuerpos grasos es coordinada por los ecdisteroides y la HJ. Se requiere una señal ecdisteroide para que las células de los cuerpos grasos puedan sintetizar la vitelogenina a niveles elevados, mientras que la HJ modula la velocidad de producción. La síntesis de vitelogenina, la captación ovárica y la maduración de ovocitos, son procesos altamente condicionados a la disponibilidad suficiente de nutrientes (Guidugli *et al.*, 2005; Amdam *et al.*, 2011; Harwood *et al.*, 2017).

2.4 Tiempo de desarrollo y aptitud reproductiva

La diferencia en el tiempo de desarrollo entre machos y hembras es uno de los principales mecanismos proximales para producir el dimorfismo sexual del tamaño (DST) en insectos (Teder, 2014). El fenómeno del DST se define como la diferencia en tamaño corporal medio entre macho y hembra dentro de una misma especie. Típicamente se supone que el tiempo de desarrollo y el dimorfismo sexual son rasgos que están correlacionados positivamente. La fecundidad o éxito reproductivo femenino en insectos se encuentra más estrechamente relacionada con el tamaño corporal que los componentes principales del éxito reproductivo masculino, en particular su capacidad de apareamiento (Jarosik y Honek, 2007). Las hembras de la mayoría de las especies de abejas están adaptadas para la búsqueda de alimento y cuidado de la cría; tienen estructuras para la recolección y transporte de polen, además de adaptaciones morfológicas para la construcción del nido. Los machos, por el contrario, contribuyen muy poco, o nada, en la construcción del nido y cuidado de la cría. A su vez, carecen de estructuras asociadas para la colecta de polen, y su morfología y fisiología está adaptada para detectar y asegurar hembras para el apareamiento (Stewart, 2016).

Un enfoque cuantitativo para evaluar la posible capacidad reproductiva de los individuos, radica en comparar la masa o la dimensión de los mismos, ya que, en insectos el tamaño corporal es generalmente proporcional a la duración del desarrollo (Teder, 2014). En la abeja sin aguijón *S. postica* se realizaron análisis discriminantes entre sexos y castas y se detectaron cuatro caracteres morfológicos con un máximo potencial distintivo para casta y sexo: longitud del escapo de la antena, ancho del segundo tergito abdominal, longitud del mesonoto en el tórax y ancho de la cabeza (Hartfelder y Engels, 1992).

En las abejas sin aguijón los ciclos de desarrollo han sido poco estudiados. La duración total del desarrollo tan sólo es conocida para pocas especies principalmente en obreras pero no en individuos sexuados (Nates-Parra *et al.*, 1989). Se ha observado que el tiempo de desarrollo es variable entre especies; sin embargo, de manera generalizada comprende los estadios de: huevo, larva, pre-pupa, pupa y adulto o imago (Michener, 2007). Como en la mayoría de los himenópteros, los huevos de abejas que se han fertilizado se desarrollan en hembras; los que no se fertilizan se convierten en machos. El sexo está controlado por alelos principalmente el loci complementario de determinación sexual (CSD) del cual existen múltiples alelos. La heterocigosis o hemicigosis en el gen CSD determina la feminización de la larva (Michener, 2007).

En *Scaptotrigona* las reinas son criadas en celdas de cría más grandes llamadas celdas reales, mientras que los machos y las obreras se crían en celdas más pequeñas. Las celdas reales se suministran con más alimento larval que las celdas de obreras y machos (Cruz-Alves y Cruz-Landim, 2002; Menezes *et al.*, 2013). González-Acereto (2008), menciona que en *S. pectoralis* el tiempo de desarrollo de las reinas es más largo que el de obreras y machos y al momento de emerger las reinas son de mayor tamaño que las obreras y que los machos (Fig. 2).



Figura 2.- Obrera (izquierda) y reina (derecha) de *S. pectoralis* (Fotografía por Quezada-Euán).

Además, en reinas de *S. postica* criadas *in vitro* se ha observado que el tamaño corporal está influenciado por la cantidad de alimento consumido por las larvas (Menezes *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha medido con exactitud el tiempo de desarrollo de reinas respecto a obreras y machos en géneros de meliponinos distintos a *Melipona*, aunque se piensa que es mayor (Wille 1983; González-Acereto; 2008).

3. Hipótesis

La cantidad de alimento larval es un factor causante de diferencias en el tiempo de desarrollo, el tamaño corporal y el potencial reproductivo en reinas de *S. pectoralis* criadas *in vitro*.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de la cantidad de alimento larval proporcionado *in vitro* a larvas femeninas de *S. pectoralis* sobre el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo.

4.1 Objetivos específicos

- I. Determinar si la cantidad de alimento larval es un factor causante de diferencias en el tiempo de desarrollo en reinas vírgenes de *S. pectoralis* criadas *in vitro*.
- II. Establecer si hay efecto de la cantidad de alimento larval sobre el tamaño corporal en reinas vírgenes de *S. pectoralis* criadas *in vitro*.
- III. Establecer si el tamaño del abdomen es una característica asociada a la síntesis de vitelogenina en reinas vírgenes de *S. pectoralis* criadas *in vitro*.

5. Referencias

- Amdam, G. V., Fennern, E., Havukainen, H. 2011. Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Pp. 17-1919.
- Araújo, M., Gil, H. L., de-Almeida, A. 2012. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. *Malaria Journal*. 11:261.
- Badyaev, A. V. 2002. Growing apart: an ontogenetic perspective on the evolution of sexual size dimorphism. *Trends in Ecology & Evolution*. 17:369–378.
- Barth, F. G., Hrncir, M., y Jarau, S. 2008. Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini). *Journal of Comparative Physiology A*, 194:313-327.
- Blanckenhorn W, Dixon D, Fairbairn M, Foellmer W, Gibert P, van der Linde K, Meier R, Nylin S, Pitnick S, Schoff C, Signorelli M, Teder T, Wiklund C. 2007. Proximate Causes of Rensch's Rule: Does Sexual Size Dimorphism in Arthropods Result from Sex Differences in Development Time? *The American Naturalist* 169:245–257.

- Cardoso-Júnior, C. A. M., Fujimura, P. T., Santos-Júnior, C. D., Borges, N. A., Ueira-Vieira, C., Hartfelder, K., Bonetti, A. M. 2017. Epigenetic modifications and their relation to caste and sex determination and adult division of labor in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Genetics and Molecular Biology*, 40:61-68.
- Cruz Alves dos Santos, T., y Cruz-Landim, C. 2002. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19:703-714.
- Dos Santos, F. C., Sousa, P. D., Blochtein, B. 2016. *In vitro* rearing of stingless bee queens and their acceptance rate into colonies. *Apidologie*. 47:539-547.
- Engels W. and Engels E. 1977. Vitellogenin und Fertilität bei Stachellosen Bienen. *Insectes Sociaux*. 24:71-94.
- Engels W., Imperatriz-Fonseca, V.L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: *Social Insects: An Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (Engels W., Ed), Springer Verlag, Berlin. Pp. 167-230.
- Faustino, C., Silva-Matos, E., Mateus, S., y Zucchi, R. 2002. First record of emergency queen rearing in stingless bees. *Insectes Sociaux*. 49:111-113.
- González-Acereto, J. A. 2008. Cría y Manejo de Abejas sin Aguijón en México. Editorial: Planeta Impresores. México. Pp: 54-58
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simoes, Z., Hartfelder, K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *Federation of European Biochemical Societies*. Pp: 4961-4965.
- Hartfelder, K. 1987. Rates of juvenile hormone synthesis control caste differentiation in the stingless bee *Scaptotrigona postica depilis*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 196:522-526.

- Hartfelder, K., Makert, G., Judice, C., Pereira, G., Santana, W., Dallacqua, R., y Bitondi, M. 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37:144-163.
- Hartfelder, K., y Engels, W. 1989. The composition of larval food in stingless bee: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. *Insectes Sociaux*, 36:1-14.
- Hartfelder, K., y Engels, W. 1992. Allometric and multivariate analysis of sex and caste polymorphism in the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Insectes Sociaux*, 39:251-266.
- Hartfelder, K., y Rembold, H. 1991. Caste-specific modulation of juvenil hormone III content and ecdisteroides titer in postembryonic development of stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 160:617-620.
- Harwood, G.P., Ihie, K. E., Havukainen, H. S., Amdam, G. V. 2017. Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. *Hormones, Brain and Behavior*. 3a Edición. Elsevier. Pp. 407-413 Recuperado de: https://books.google.com.mx/books?id=NT8oCwAAQBAJyprintsec=frontcoverhl=esysource=gbs_ge_summary_rycad=0#v=onepageyqyf=false
- Jarosik, V., y Honek, A. 2007. Sexual differences in insect development time in relation to sexual size dimorphism. In *Sex, Size y Gender Roles, Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. Fairbairn D.J. Blanckenhorn W. U. Szekely T. Nueva York: Oxford University Press. Pp. 205 - 213.
- Kerr, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*, *Genetics* 35:143-152.
- Menezes, C., Bonneti, A., Amaral, I., y Kerr, W. E. 2007. Alimentação larval de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Estudo. *Bioscience Journal*, 23:70-75.

- Menezes, C., Vollet-Neto, A., y Fonseca, V. L. I. 2013. An advance in the *in vitro* rearing of stingless bee queens. *Apidologie*, 44:491-500.
- Michener, C. D. 2007. The bees of the world (2nd ed). Baltimore: Johns Hopkins University Press, Pp. 907-908
- Michener, C. D. 2013. The Meliponini. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik D (eds) Pot-honey: a legacy of stingless bees. Springer, Nueva York, Pp. 3-17
- Moo-Valle, H., Quezada-Euán, J. J., y Wenseleers, T. 2001. The effect of food reserves on the production of sexual offspring in the stingless bee *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*. 48:398- 403.
- Nates-Parra, G., Villa Lopera, A., y Vergara, B. C. 1989. Ciclo de desarrollo de *Trigona (Tetragonisca) angustula*, Latreille 1811 (Hymenoptera, Trigonini). *Acta Biológica Colombiana*. 1:91-98.
- Nogueira Neto, P. 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis. Pp. 33-34
- Rasmussen, C., y Cameron, S. A. 2010. Global stingless bee phylogeny supor ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99:206-232.
- Ribeiro, M. de F., y Alves, D. de A. 2001. Size variation in *Schwarziana quadripunctata* queens (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Revista de Etología*. 3:59-65.
- Ribeiro, M. F. 2004. Miniature queens in stingless bees- a review. Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas. Pp. 280-284
- Ribeiro, M. F., Wenseleers, T., Santos, P. 2006. Miniature queens in stingless bee: basic facts and evolutionary hypothesis. *Apidologie*. 191-206

- Roubik D.W. 1995. Stingless bee colonies for pollination, in: Roubik D.W. (Ed.), Pollination of cultivated plants in the tropics, FAO Agric. Serv. Bull. 118, Rome. Pp. 150–154. Recuperado de: www.fao.org/3/a-v5040e.pdf
- Slaa, E. J., Sánchez C. L., Sampaio, M. B., Frouke, E. H. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. Springer Verlag. Pp. 293-315.
- Stewart, S. 2016. Bee Time: Lessons from the Hive. *Antigonish Review*. 184:73-76.
- Teder, T. 2014. Sexual size dimorphism requires a corresponding sex difference in development time: a meta-analysis in insects. *Functional Ecology*, 28:479-486. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12172>
- Velthuis, H. 1976. Environmental, Genetic and Endocrine Influences in Stingless Bee. In Phase and caste determination in insects (Endocrine aspects). Gran Bretaña: Pergamon press. Pp: 35-37
- Wenseleers, T., Hart, A. G., Ratnieks, F. L., y Quezada-Euán, J. 2004. Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii*. *Ethology*, 110:725-736.
- Wille, A. 1983. Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*, 28:41-64.
- Van Veen, J. W., Arce Arce, H. G., y Sommeijer, M. J. 2004. Production of queens and drones in *Melipona beecheii* (Meliponini) in relation to colony development and resource availability. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 15:35-39.

6. Artículo

Efecto del alimento larval sobre el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y características reproductivas en reinas vírgenes de *Scaptotrigona pectoralis* criadas *in vitro* (Hymenoptera: Meliponini)

Adriana Morales Cuevas¹, J.J.G. Quezada-Euán¹, Hartfelder H. K².

¹Departamento de Apicultura, Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Carretera a Xmatkuil Km. 15.5 Apartado Postal núm. 116 C.P. 97315. Mérida, Yucatán, México. Tel. +52 (999) 942-3200. Fax. +52 (999) 942-3205.

² Departamento de biología celular y molecular y agentes biopatogénicos de la Facultad de Medicina de Universidad de São Paulo en Ribeirão Preto. Av. Bandeirantes, 3.900 Monte Alegre, C.P. 14040-900 Teléfono: (16) 3315-400

E-mail address of contact author: queuan@uady.mx (J. J. G. Quezada-Euán¹).

El siguiente documento fue elaborado acorde a las normas editoriales de la revista *Insectes Sociaux* y será enviado para su publicación a dicha revista.

Resumen

En las reinas de abejas sin aguijón con determinación trófica el tiempo de desarrollo es prolongado y al momento de emerger son de mayor tamaño que las obreras; un factor proximal es la cantidad de alimento que reciben los individuos durante su fase larvaria. El objetivo del trabajo fue determinar si la cantidad de alimento larval es un factor causante de diferencias en el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo en reinas vírgenes de *S. pectoralis* criadas *in vitro*. Las reinas se criaron utilizando 3 niveles de alimento larval (86, 94.6 y 98.9 μ l). Se evaluó el tiempo de desarrollo en días a partir del traslarve. El tamaño corporal se evaluó utilizando 5 variables morfométricas. El potencial reproductivo fue evaluado de manera indirecta comparando el tamaño y peso del abdomen. Además, se utilizaron 20 reinas vírgenes para evaluar la concentración relativa de vitelogenina. Se observaron diferencias significativas en el tiempo de desarrollo y tamaño corporal; lo cual coincide con trabajos previos cantidad de alimento se asoció al tamaño corporal y este a su vez es proporcional al tiempo de desarrollo. En relación al tamaño abdominal encontramos dos patrones en las reinas criadas *in vitro*. En 4 reinas naturales la concentración de vitelogenina se incrementó conforme al tamaño abdominal. En conclusión, la cantidad de alimento larval tuvo en efecto sobre el tamaño corporal y tiempo de desarrollo en reinas de *S. pectoralis* criadas *in vitro*. El efecto del alimento larval sobre el potencial reproductivo no fue concluyente en este trabajo.

Palabras clave: Reina virgen, Alimento larval, Tiempo de desarrollo, *Scaptotrigona pectoralis*, Reproducción, Castas.

Summary

Queens with trophic determination of stingless bees has a longer development time and bigger size than workers; larval food on larval phase could be a proximal factor, but has not been documented yet. The aim of this study was to determinate if larval food is a factor that induces differences on development time in queens of *Scaptotrigona pectoralis* rearing *in vitro*. In this study we used three treatments; the queens was rearing with three levels of larval food (86, 94.6 y 98.9 μ l). Development time was evaluated in days since the traslarve date. We determine the body size with 5 morphometric variables. In order to evaluate the reproductive potential in queens reared *in vitro* we weigh the fresh abdomens. In addition, 20 virgin queens were used, from which hemolymph was collected for the detection and evaluation of the relative concentration of vitellogenin; which was associated with abdominal size. Results on this study indicate significant differences on development time and body size between treatments. Previous studies agree with that; records indicate that body size and development time are associated. The body size depends of amount of larval food. Also, we found two patters of abdominal size. In addition we observed that concentration of vitellogenin increased jointly to abdominal size in 4 natural queens. In conjunct, our data suggest differences in development time and body size caused by larval food. The effect of larval food on the reproductive potential is not clear.

Keywords: Gyne, Larval food, Development time, *Scaptotrigona pectoralis*, Reproduction, Caste.

Introducción

El tamaño corporal de los insectos generalmente es proporcional a la duración de su desarrollo. Asimismo, en hembras el éxito reproductivo (fecundidad) está más relacionado con el tamaño corporal, mientras que, en machos el éxito reproductivo se asocia a su capacidad de apareamiento (Badyaev 2002; Jarosik y Honek 2007; Teder 2014). En insectos holometábolos, un mecanismo proximal mediante el cual se generan estas diferencias en el desarrollo es la cantidad de alimento que reciben los individuos durante la fase larvaria (Araújo et al. 2012).

En *S. pectoralis* la determinación de castas es trófica y el tiempo de desarrollo de las reinas es más largo; al momento de emerger son de mayor tamaño que las obreras y los machos. En especies con determinación de castas trófica, las reinas se crían en celdas reales y reciben mayor cantidad de alimento larval que machos y obreras (Roubik 2005). De forma similar a como ocurre en otros insectos, es probable que en meliponinos la cantidad de alimento larval que se proporciona a los individuos tenga un efecto sobre el tiempo de desarrollo. Se ha observado que el sistema endocrino reacciona a estímulos trofogénicos capaces de inducir diferencias durante el desarrollo pre-imaginal (Hartfelder 1987). Por ejemplo, la cantidad de alimento proporcionado a larvas femeninas (que se desarrollan como obreras o reinas) en *S. depilis* se asocia fuertemente con el tamaño corporal aunque se desconoce su relación con el tiempo de desarrollo (Menezes et al. 2013).

En muchas especies de meliponinos el tamaño corporal de la reina es importante, ya que, reinas pequeñas pueden poner menor cantidad de huevos que reinas de mayor tamaño (Ribeiro y Alves 2001). Por lo tanto, es posible que exista algún tipo de compensación (trade-off) entre tiempo de desarrollo, tamaño corporal y capacidad reproductiva. De ser así reinas que reciben mayor cantidad de alimento larval, pueden tardar más en desarrollarse, pero pueden obtener la ventaja de una mayor capacidad reproductiva que reinas que reciben menos alimento larval pero que se desarrollan a mayor velocidad. Conocer estos aspectos de la biología reproductiva de abejas sin aguijón permitirá elaborar estrategias que permitan entender los diferentes sistemas reproductivos existentes en esta Tribu.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la cantidad de alimento larval proporcionado *in vitro* a larvas femeninas de *S. pectoralis* sobre el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo.

Materiales y métodos

Área de estudio

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Apicultura del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (CCBA-UADY), ubicada en el kilómetro 15.5 de la carretera Mérida-Xmatkuil, México. El clima de la región es tropical con una temperatura promedio anual de 26.2°C (Marín et al. 2000).

Cría de reinas *in vitro*

Se emplearon 10 colonias de *S. pectoralis* alojadas en colmenas tipo T.I.G.B.A de 38 cm de largo, 12 cm de altura y 12.5 cm de ancho, de las cuales se extrajeron los panales para la obtención del alimento larval y larvas. Para la cría de reinas *in vitro* se tomó como base la metodología desarrollada por Menezes et al. (2013). Las colonias fueron inspeccionadas cada 24 horas para monitorear la construcción de nuevos panales, los cuales fueron necesarios para la colecta del alimento larval. Se requirió de panales recién construidos ya que en ese momento los individuos se encuentran en fase de huevo y aún no han comenzado a consumir el alimento. El huevo se retiró de cada celda y el alimento larval fue colectado con una micropipeta de 100µl y colocado en tubos de microcentrífuga de 1.5ml (Eppendorf); mismo que fue homogenizado con un agitador vórtex. El alimento larval se colocó 30 minutos en el equipo de esterilización con rayos UV para evitar la contaminación con microorganismos.

El alimento larval se depositó en placas de acrílico tipo ELISA con pocillos de 1.08 cm de diámetro y 0.7 cm de profundidad y se dejó sedimentar durante 24 horas a una temperatura de 28°C y una humedad del 100%. El volumen de alimento larval depositado en los pocillos varió de acuerdo a cada tratamiento, como se describe a continuación. En trabajos previos con *S. pectoralis* observaron que las reinas reciben alrededor de (86 µL) de alimento larval, lo cual corresponde a 3 veces la cantidad de

alimento depositada en celdas de obreras (28 μ L) (Gutiérrez et al. 2016). En el presente trabajo se produjeron reinas con tres niveles de alimento:

- I. Reinas criadas con 86 μ L de alimento larval (cantidad promedio de celdas reales naturales).
- II. Reinas criadas con 94.6 μ L de alimento larval (10% más de la cantidad de celdas reales naturales).
- III. Reinas criadas con 98.9 μ L de alimento larval (15% más de la cantidad de celdas reales naturales).

El incremento del 10% y 15% de alimento larval se seleccionó tomando como base un trabajo previo de Menezes (2013), donde se observó que el incremento de alimento larval en esa proporción provocó diferencias en el tamaño de reinas de *S. postica*. Para determinar la edad de las larvas fue necesario monitorear la construcción de panales periódicamente. Para obtener las larvas se colectaron panales con larvas de 24 horas de edad (en período de alimentación). La fecha apropiada para la colecta de las larvas se determinó por medio de la evaluación de 50 celdas de cría de 5 colonias. Las celdas fueron identificadas con un marcador Sharpie a partir del día que la reina ovipositó el huevo, posteriormente se abrieron las celdas cada 24 horas; se observó que el 98% se encontraba en fase de larva a partir del cuarto día de desarrollo.

Cuando se encontraron panales con larvas de 24 horas, estos fueron retirados completos cortando los conectivos y pilares del panal contiguo. Posteriormente fueron transportados al laboratorio, donde se retiró el opérculo de las celdas de cría con una pinza de disección y cada larva fue transferida a los pocillos preparados previamente con la cantidad exacta de alimento requerida para su desarrollo. Las larvas fueron colocadas en la superficie del alimento larval en posición horizontal, teniendo cuidado de mantener la orientación original observada en las celdas de cría, es decir, con los espiráculos en contacto con el aire, para ello fue necesario utilizar una aguja para traslarve la cual se introdujo de manera vertical a la pared de cada celda procurando que primero hiciera contacto con el alimento y posteriormente con la larva. Una vez transferidas las larvas de las celdas de cría a los pocillos de la placa de ELISA, ésta se colocó en un recipiente con 70 ml de agua dentro de una bolsa de plástico sellada herméticamente con el fin de mantener una humedad relativa del 90%, durante los 6

días posteriores al traslarve. En el séptimo día se redujo la humedad a un 75%, para ello se colocó 40 mg de NaCl en 70 ml de agua destilada creando una solución de saturada de sal. Se realizaron ensayos previos donde se monitoreo la humedad y temperatura se monitoreo dentro de las bolsas por medio de un registrador de datos (datalogger) marca Extech RHT10@.

Tiempo de desarrollo

El tiempo de desarrollo se registró en días a partir de la fecha del traslarve hasta la emergencia del imago. Se realizaron observaciones cada 24 horas durante el desarrollo de los individuos.

Tamaño corporal

El tamaño corporal de los individuos se determinó por medio de 5 variables: ancho de la cabeza (AC), longitud del escapo (LE), distancia intertegular (DIT), longitud del mesonoto (LM), ancho del segundo tergito abdominal (AT) y longitud de ala anterior (LA). Las variables seleccionadas contienen el máximo potencial distintivo de tamaño corporal entre reinas (Fig. 3) (Hartfelder y Engels 1992; Bullock 1998).

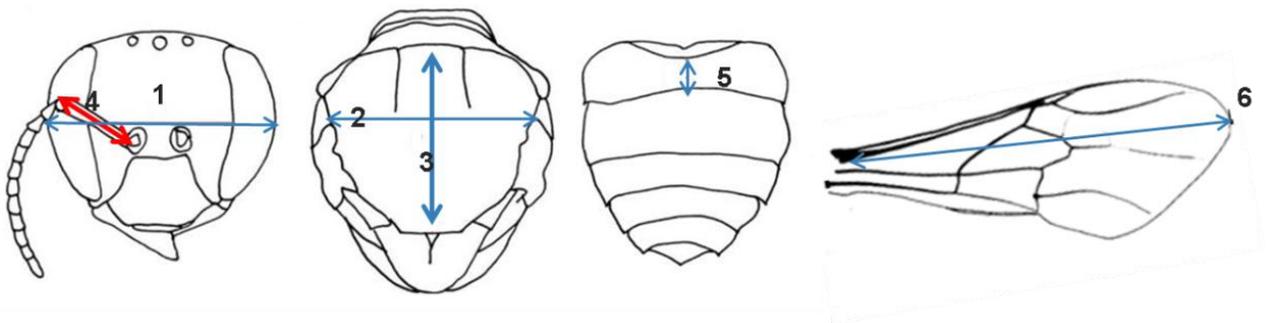


Figura 3.- Variables morfométricas (1= Ancho de la cabeza, 2= Distancia intertegular, 3= Longitud del mesonoto, 4= Longitud del escapo, 5= Ancho del segundo tergito del abdomen, 6= Longitud del ala anterior) (Figura modificada de Hartfelder y Engels, 1992).

Para el montaje de los individuos fue necesario colocar la cabeza, el tórax y el segundo tergito abdominal en un portaobjetos con plastilina con el fin de mantener cada estructura en su posición.

Cada estructura fue fotografiada a un aumento de 2x en un microscopio estereoscópico marca Leica®. Se utilizó el software Image J (Image Processing and Analysis in Java) versión 15.1r para marcar las distancias entre puntos de cada variable y posteriormente obtener la medida en escala milimétrica.

Potencial reproductivo

La dimensión del abdomen se seleccionó para evaluar el potencial reproductivo mediante la medición del ancho del segundo tergito del abdomen (AT) y peso fresco del mismo. En trabajos previos se ha sugerido que las diferencias en el tamaño abdominal entre reinas y obreras, podrían estar indicando rasgos funcionales de castas, como el estado de desarrollo de los órganos reproductores (Hartfelder y Engels 1992). En algunos insectos se ha demostrado que la fecundidad aumenta con respecto a la masa corporal (Leather 1988). El peso del abdomen se registró en miligramos; las abejas recién emergidas fueron colocadas individualmente dentro de un tubo Eppendorf y posteriormente pesadas en una balanza electrónica de laboratorio previamente calibrada, el tubo se taro previo al pesaje de las abejas. Además, se realizó un análisis de electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) para determinar si el tamaño del abdomen se encontraba asociado a la síntesis de esta proteína.

SDS-PAGE (Vitelogenina)

Para la cuantificación de vitelogenina se utilizaron 20 reinas vírgenes de 5 días de edad las cuales emergieron de celdas reales naturales y se mantuvieron en cajas de petri a una temperatura de 28°C; 10 de las reinas fueron alimentadas con jarabe de azúcar en una proporción de 2:1, y 10 fueron alimentadas con miel y polen con la finalidad de descartar que la alimentación después del desarrollo fuera un factor de confusión. Las reinas de 5 días fueron colocadas a -10°C en un congelador horizontal durante 40 segundos con la finalidad de reducir su metabolismo, posteriormente se colectó la hemolinfa por el método de muestreo por la antena (Anexo 1) propuesto por Borsuk et

al. (2017). Se colocó a la abeja en una superficie plana y se sostuvo por el tórax haciendo una leve presión con el dedo índice y pulgar, posteriormente con unas pinzas entomológicas se separó una antena con un movimiento enérgico. Con el dedo índice se presionó el abdomen con la finalidad de aumentar la presión de la hemolinfa y dando lugar a la aparición de una gota, a continuación se colocó un microcapilar con capacidad de 1 microlitro. Inmediatamente después de colectar la hemolinfa fue transferida a un tubo Eppendorf de 0.2 ml y congelada a -20°C . La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo tomando como base la metodología (Anexo 2) propuesta por Hartfelder et al. (2013), los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue y fueron escaneados e importados a Image J versión 15.1r (Anexo 3 y 4).

La cuantificación de vitelogenina fue relativa y se realizó dividiendo el valor de la banda de vitelogenina entre el valor de la banda de apo-lipoproteína. La mitad de las muestras se analizaron en el Departamento de biología celular y molecular y agentes biopatogénicos de la Facultad de Medicina de Universidad de São Paulo en Ribeirão Preto. Las 10 muestras restantes se analizaron en el Laboratorio de Apicultura Tropical del CCBA-UADY.

Análisis estadístico

Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk (Royston 1992), para evaluar la normalidad de los datos y el test de Levene (Nordstokke et al. 2010), para comprobar la homogeneidad de la varianza, para ambas pruebas se utilizó el programa estadístico PAST versión 3.20. Debido a que los datos no tuvieron una distribución normal y las varianzas no eran iguales se utilizó un análisis de modelos lineales generalizados (MLG) (Kung-Yee et al. 1986), y posteriormente el método de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher para las variables de tiempo de desarrollo y tamaño corporal (Day y Quinn 1989). Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico Statgraphics.

Por otra parte, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) para las variables de tamaño corporal con la finalidad de detectar aquellas que tuvieran mayor

peso en la variación de los datos (Jolliffe 2002), en el programa estadístico PAST versión 3.20.

Resultados

En total se obtuvieron 89 reinas vírgenes criadas *in vitro* de las cuales 27 correspondieron al tratamiento de 86µl de alimento de alimento larval, 24 a 94.6µl y 38 al de 98.9µl. Además, se colectaron en total 20 reinas vírgenes de 5 días de edad de colonias naturales las cuales fueron utilizadas para el análisis de vitelogenina.

Tiempo de desarrollo

De acuerdo al MLG la cantidad de alimento larval tuvo efecto significativo ($P<0.001$) sobre el tiempo de desarrollo de las reinas criadas *in vitro*. De acuerdo, al método de DMS de Fisher las reinas criadas con 86µl y 94.6µl tuvieron tiempos de desarrollos similares entre sí y diferente a las criadas con 98.9µl (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Tiempo de desarrollo de reinas de *S. pectoralis* criadas *in vitro*.

Tratamiento	86µl (n=27)	94.6µl (n=24)	98.9µl (n=38)
Tiempo (días)	39.4 ± 0.66 ^a	36.69 ± 1.25 ^a	43.50 ± 1.26 ^b

Las literales diferentes por columna indican diferencias estadísticamente significativas a $P<0.05$.

Tamaño corporal

La cantidad de alimento larval tuvo efecto significativo sobre las variables morfométricas AC, LM, LA, DIT y AT en reinas criadas *in vitro* ($P<0.001$). No se encontró efecto de la cantidad de alimento larval sobre LE (Cuadro 2).

De acuerdo al método de DMS de Fisher, en los tres tratamientos se observó que el AC, LM y LA fueron similares para el tratamiento de 86µl y 94.6 µl y estas a su vez

fueron diferentes al tratamiento de 98.9µl; siendo estas últimas las de mayor tamaño en estas variables. Las variables DIT y AT fueron diferentes para las reinas de 86µl y similares para para las reinas criadas con 94.6µl y 98.9µl; siendo estas las de mayor tamaño en estas variables.

Cuadro 2.- Variables morfométricas representativas del tamaño corporal en reinas de *S. pectoralis* criadas *in vitro*.

Variab	86µl (n=27)	94.6µl (n=24)	98.9µl (n=38)	Razón-F	Valor-P
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.		
AC (mm)	2.34 ± 0.13 ^a	2.30 ± 0.11 ^a	2.37 ± 0.07 ^b	7.55	0.00
LM (mm)	1.30 ± 0.16 ^a	1.23 ± 0.10 ^a	1.32 ± 0.09 ^b	6.5	0.00
LA (mm)	4.74 ± 0.23 ^a	4.85 ± 0.18 ^a	4.97 ± 0.19 ^b	8.20	0.00
DIT (mm)	1.61 ± 0.08 ^a	1.69 ± 0.09 ^b	1.73 ± 0.07 ^b	5.05	0.00
AT (mm)	1.21 ± 0.15 ^a	1.44 ± 0.12 ^b	1.54 ± 0.25 ^b	12.67	0.00
LE (mm)	1.10 ± 0.05 ^a	1.12 ± 0.01 ^a	1.13 ± 0.01 ^a	0.68	0.52

AC: ancho de la cabeza, LM: longitud del mesonoto, LA: longitud del ala anterior, DIT: distancia intertegular, AT: ancho del segundo tergito abdominal, LE: longitud del escapo. Las literales diferentes por columna indican diferencias estadísticamente significativas a $P < 0.05$.

El ACP de las variables morfométricas reveló que el componente principal 1 (CP1) y el componente principal 2 (CP2) explican el 87.76% de la variación de los datos (Cuadro 3). El coeficiente de asociación indicó que las variables que explican la variación agrupada en el CP1 son AC, LM y LA. Además, se observó que el coeficiente de asociación (peso) de las variables individuales fue similar y con valor positivo, por lo que se asoció con el tamaño corporal.

En el CP2 se observó que AT fue la variable con mayor peso con signo positivo seguida de LM y AC los cuales tuvieron signo negativo (Cuadro 4). Es probable que exista relación alométrica en las variables del CP2. En el gráfico de dispersión se muestra la distribución de los tratamientos en cada componente (Fig. 4).

Cuadro 3.- Valores propios y porcentaje de la varianza explicada por los primeros dos componentes principales obtenidos de cinco variables morfométricas.

Componente	Valor propio	Porcentaje de la varianza	Porcentaje acumulado
1	0.041	48.87%	48.8%
2	0.026	38.89%	87.76%
3	0.005	7.76%	95.5%
4	0.003	2.51%	98.06%
5	0.001	0.96%	100%

Cuadro 4.- Coeficientes de asociación de las 5 variables morfométricas obtenidos mediante el análisis de componentes principales.

VARIABLES	AC	LA	DIT	LM	AT
Componente 1	0.301	0.791	0.231	0.379	0.292
Componente 2	-0.320	-0.047	0.133	-0.385	0.853

AC: ancho de la cabeza, LM: longitud del mesonoto, LA: longitud del ala anterior, DIT: distancia intertegular, AT: ancho del segundo tergito abdominal, LE: longitud del escapo. Los números en negritas indican los coeficientes con peso más alto dentro de cada componente.

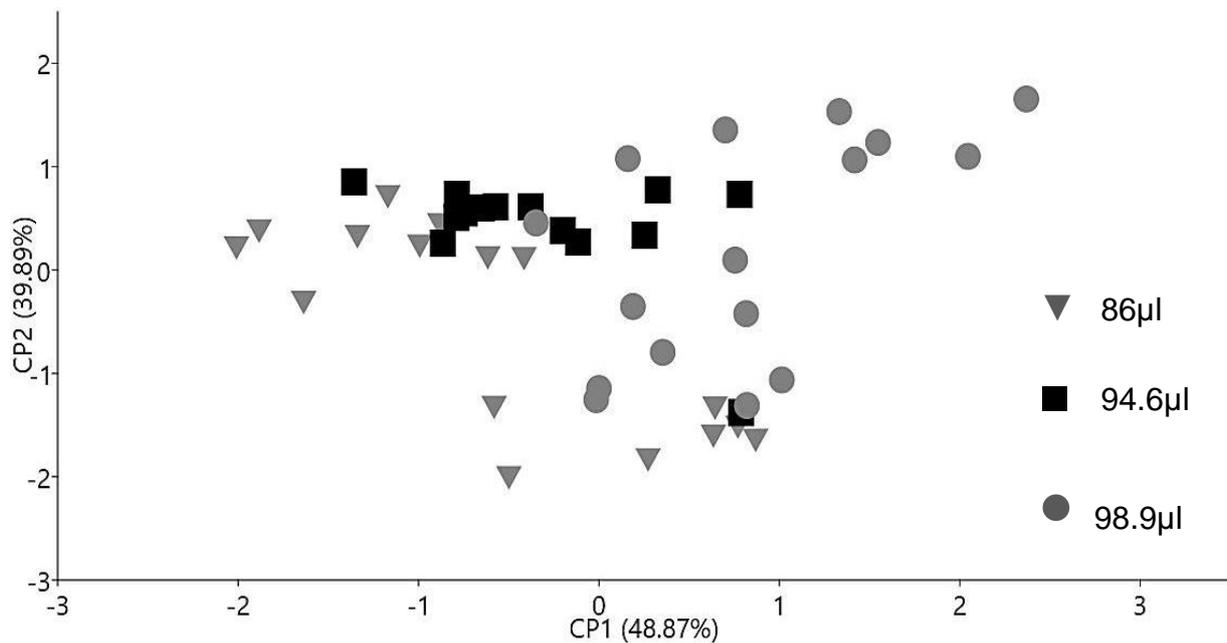


Figura 4.- Distribución de los valores propios del componente principal 1 y componente principal 2. El porcentaje de la varianza se señala entre paréntesis.

Potencial reproductivo

El peso fresco del abdomen fue diferente entre tratamientos ($P < 0.0001$) (Fig. 5). Del mismo modo se observó efecto de la cantidad de alimento larval sobre el AT ($P = 0.000$) (Fig. 6). De acuerdo al método de DMS de Fisher, las reinas criadas con 86µl fueron diferentes a las de 94.6µl y 98.9µl para ambas variables; siendo estas últimas las más grandes y pesadas.

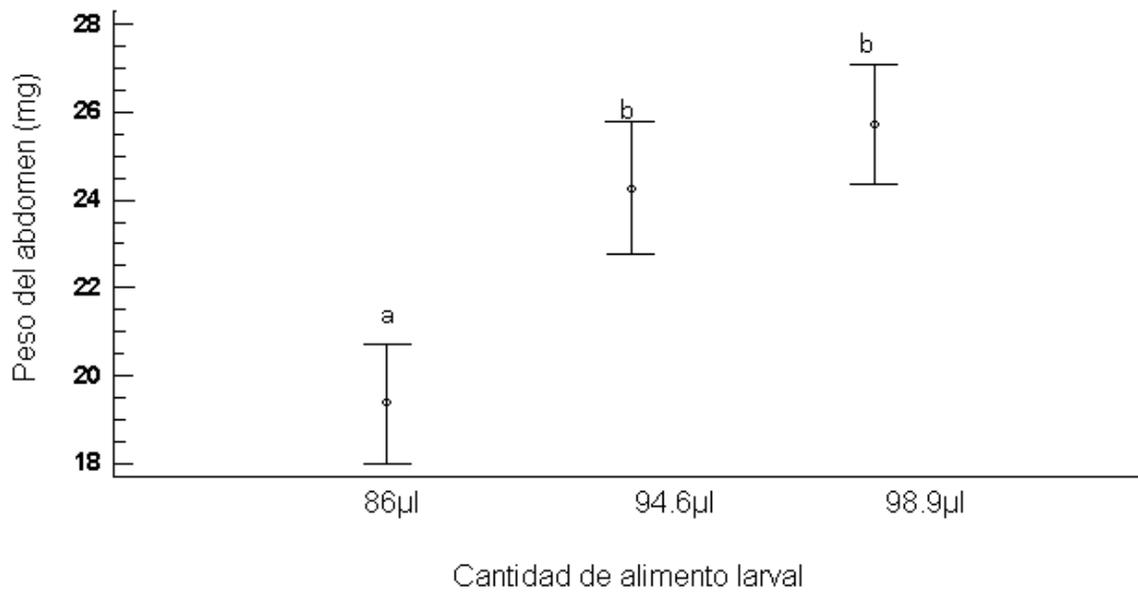


Figura 5. Peso fresco del abdomen (mg) en reinas criadas *in vitro* con 86 µl, 94.6 µl y 98.9 µl de alimento larval. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.0001$).

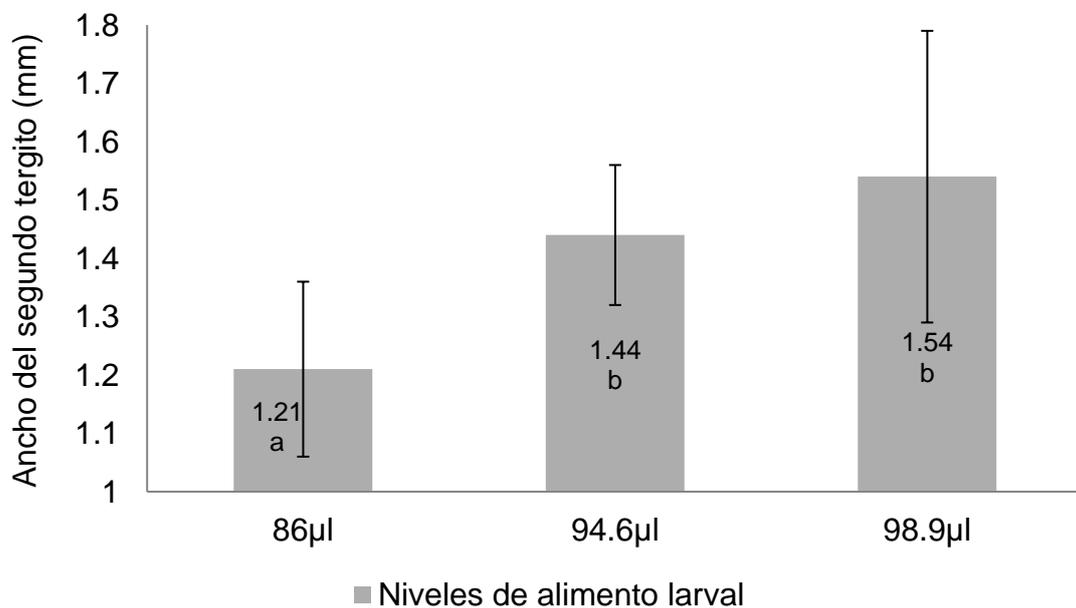


Figura 6.- Ancho del segundo tergito del abdomen (AT) en reinas criadas *in vitro* con tres niveles de alimento larval. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de vitelogenina (SDS-PAGE)

Se detectó vitelogenina 4 de las 20 muestras de hemolinfa que se analizaron (Fig. 7 y 8). Se calculó la concentración relativa y se observó si existía alguna asociación con el tamaño del abdomen (AT) (Fig. 9).

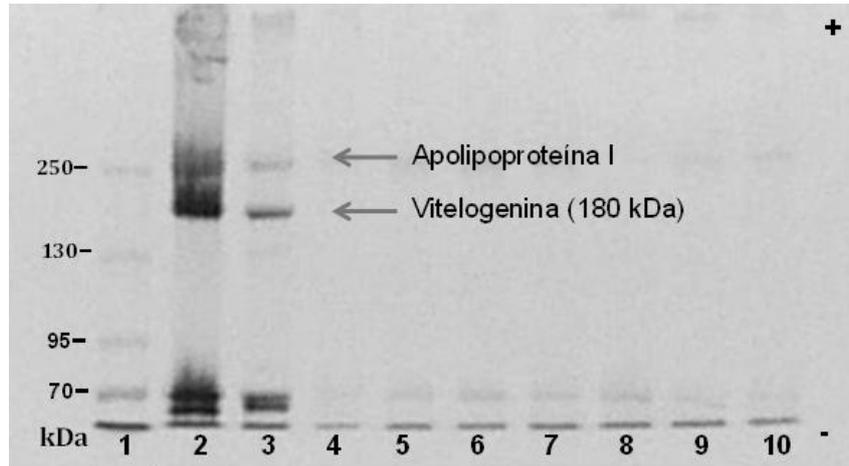


Figura 7.- Patrón de proteínas en la hemolinfa de reinas de *S. pectoralis* en gel de poliacrilamida 5% (SDS-PAGE). Columna 1: marcador de peso molecular 70-250 kDa, columna 2: nodriza de *Apis mellifera* (control), columna 3-10: reinas vírgenes de *S. pectoralis* de 5 días.

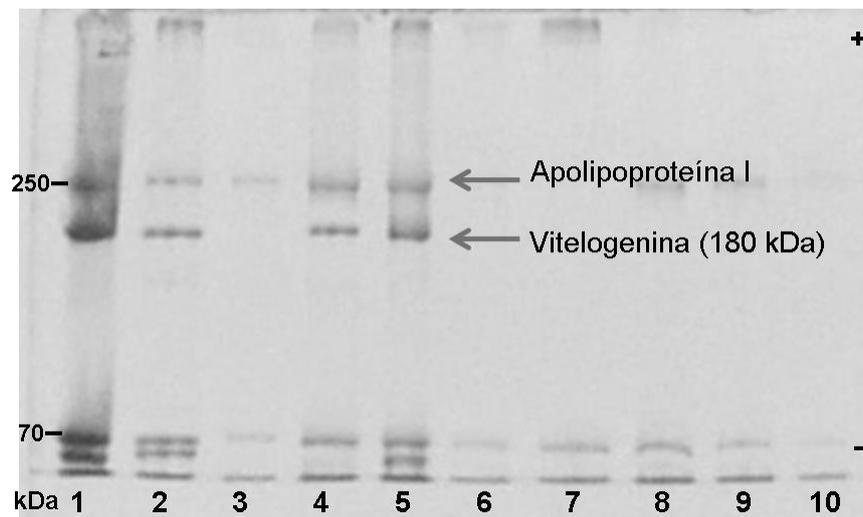


Figura 8.- Patrón de proteínas en la hemolinfa de reinas de *S. pectoralis* en gel de poliacrilamida 5% (SDS-PAGE). Columna 1: nodriza *A. mellifera* (control), columnas 2-10: reinas vírgenes de *S. pectoralis* de 5 días.

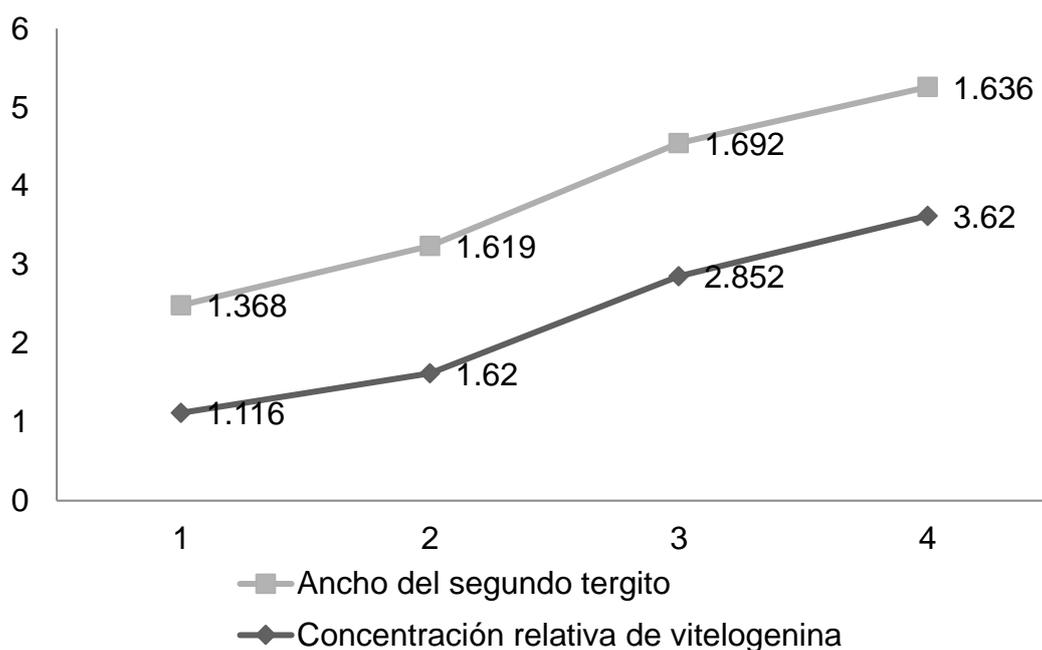


Figura 9.- Concentración relativa de vitelogenina y ancho del segundo tergito (AT) en mm de reinas vírgenes de colonias naturales de *S. pectoralis*.

Discusión

Los resultados del presente trabajo mostraron que la cantidad de alimento larval proporcionada *in vitro* es un factor que ocasiona diferencias en el tiempo del desarrollo en reinas *S. pectoralis*. Los hallazgos encontrados, coinciden con trabajos previos donde se ha sugerido que la duración del desarrollo pre-imaginal en abejas sin aguijón con determinación trófica de la casta reina depende del mayor suministro de alimentos durante la fase larval (Camargo 1992). Estas variaciones en el tiempo de desarrollo están reguladas por mecanismos complejos de control endocrino a nivel molecular, celular y fisiológico (Badyaev 2002). En *Scaptotrigona* se han observado períodos de sensibilidad a la HJ, y similar a lo que ocurre en *A. mellifera* la HJ podría estar ejerciendo su efecto a través de receptores de hormonas nucleares que influyen directamente sobre la expresión génica diferencial del desarrollo de la casta reina (Mirth y Riddiford 2007). Del mismo modo, en otras abejas eusociales, se ha señalado que las tasas de crecimiento son dependientes de la nutrición y a nivel celular son reguladas por vías de señalización de la insulina (ISS) y el objetivo de la rapamicina

(TOR) que interactúan con la HJ para el control del crecimiento ((Mirth y Riddiford 2007; Wheeler et al. 2014).

Asimismo, se ha señalado la presencia de un sensor de nutrientes mediado por TOR en los cuerpos grasos que detecta la disponibilidad de nutrientes y regula la señalización de la insulina en los tejidos periféricos, lo que a su vez controla las tasas de crecimiento de las larvas. Después de que las larvas inician la metamorfosis, el crecimiento se detiene. Para que el crecimiento se detenga en el momento correcto, las larvas deben superar un peso crítico. Por lo tanto, los mecanismos que controlan las tasas de crecimiento convergen en aquellos que evalúan el tamaño para garantizar que las larvas alcanzan el tamaño apropiado en la metamorfosis. Además, TOR parece actuar en la promoción de la síntesis y transcripción de proteínas los cuales son procesos promotores del crecimiento (Mirth y Riddiford 2007).

En abejas sin aguijón, los patrones de expresión génica siguen sin estudiarse, pero es posible que ocurra de manera similar a *A. mellifera*, ya que, los resultados obtenidos sugieren que el tamaño de las reinas en *S. pectoralis* depende de la regulación de la tasa de crecimiento. En *A. mellifera* el tamaño corporal pequeño de las obreras y sus ovarios rudimentarios llevan a la suposición de que el déficit nutricional causa menos cascadas de detección de nutrientes activadas que generan menores tasas de crecimiento (Mirth y Riddiford 2007; Cardoen et al. 2012). Para comprender mejor el complejo proceso de determinación de castas en las abejas sin aguijón, es necesario investigar los mecanismos reguladores endocrinos y genéticos que se desencadenan por estímulos nutricionales.

En este trabajo, el alimento larval tuvo efecto sobre el tamaño corporal de las reinas criadas *in vitro*. Los resultados obtenidos en el ACP, demostraron que el AC, LM y LA, fueron las variables de mayor peso dentro del CP1 el cual agrupó la mayor variación de los datos, por lo que se asociaron al tamaño de los individuos. No se encontró diferencias significativas en el tamaño corporal de las reinas criadas *in vitro* con 86 μ l y 94.6 μ l, sin embargo, estas fueron diferentes a las criadas con 98.9 μ l de alimento larval. Esto sugiere dos estrategias para la producción de reinas; aquellas que tienen un desarrollo corto (86 μ l y 94.6 μ l) y un tamaño pequeño y las que tienen un desarrollo largo y son de tamaño grande (98.9 μ l). Lo anterior indica que se requiere de

cierto umbral nutricional para que se desencadenen las diferencias en el tamaño corporal de las reinas. Los resultados obtenidos son consistentes con lo que se ha sugerido en trabajos previos en insectos, donde se ha reportado que el incremento en el tamaño corporal es mediado por el tiempo de desarrollo de los individuos (Blanckenhorn 2007). Por lo tanto, se sugiere una asociación entre el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal en reinas de *S. pectoralis*. Por otra parte, en abejas del mismo género se ha observado correlación entre el tamaño corporal de las reinas y el tamaño de sus huevos, lo cual podría tener como consecuencia la producción de individuos más pequeños (Ribeiro y Alves 2001).

En relación con el potencial reproductivo, el tamaño del AT y peso fresco del abdomen mostraron diferencias significativas entre las reinas criadas *in vitro* con 86µl y las criadas con 94.6µl y 98.9µl. Según los resultados obtenidos, cuando las reinas se crían con una cantidad intermedia es posible que exista una compensación entre el tamaño corporal y el tamaño del abdomen. Como resultado, las reinas tienen cuerpos pequeños, pero abdómenes grandes. Aunque no se cuenta con datos disponibles, es posible que estas variaciones en el tamaño también ocurran de manera natural cuando las reinas reciben diferentes cantidades de alimento.

En reinas de colonias naturales se observó la concentración de vitelogenina en la hemolinfa incrementó conforme al tamaño del abdomen, lo que podría indicar un desarrollo ovárico mayor (Engels y Engels 1977). Lo anterior es importante, ya que, la vitelogenina es necesaria para la formación de huevos y es considerada como el principal parámetro en la fertilidad; sin embargo, la cantidad de datos obtenidos en este estudio fue insuficiente para establecer una asociación (Engels y Engels 1977; Hartfelder et. al. 2006). En *A. melífera* se ha observado que la alimentación conduce al desarrollo del cuerpo graso e influye en la fisiología de las abejas recién emergidas (Basualdo et al. 2013). Esta proteína es sintetizada en las células de los cuerpos grasos y luego se secreta en la hemolinfa donde es absorbida por los ovocitos en el ovario a través del epitelio folicular (Paes de Oliveira y Cruz-Landim, 2004). En abejas sin aguijón los trabajos relacionados a la síntesis de vitelogenina en reinas aún son escasos. En *M. scutellaris*, *Friessomelita varia* y *S. postica* observaron que las tres especies de abejas sin aguijón difieren considerablemente en la modulación y la

expresión génica de la vitelogenina y su correspondiente nivel de proteína hemolinfa durante el desarrollo. Además, la transcripción de la vitelogenina y los niveles de proteína son bastante dispares en las abejas sin aguijón, lo que indica un control adicional a nivel de traducción o en el proceso de secreción. Esto podría estar reflejando un cambio en la regulación y la expresión génica de vitelogenina en cada especie; sin embargo, no se estableció ninguna relación con el tamaño de las estructuras reproductivas (Hartfelder y Rembold 1991; Pinto et al. 2002; Hartfelder et al. 2006).

A su vez, en *S. pectoralis* es probable el tamaño del abdomen se encuentre asociado a la síntesis y secreción de vitelogenina en la hemolinfa por un incremento en el tamaño de los cuerpos grasos y/o de los ovarios. Ya que, como se ha observado en otras abejas el desarrollo ovárico depende de la síntesis y absorción de proteínas vitelogénicas que se sintetizan en los cuerpos grasos (Wasielewski et al. 2011). Sin embargo, con el número limitado de datos generados en este trabajo, no es posible aseverar la participación del tamaño del abdomen en la síntesis de vitelogenina. Por lo que se recomienda la realización de nuevos estudios para ampliar la información al respecto. Para concluir, la cantidad de alimento larval ocasiona diferencias en el tamaño corporal y tiempo de desarrollo en reinas de *S. pectoralis* criadas *in vitro*. Sin embargo, el efecto del alimento larval sobre el potencial reproductivo no se pudo demostrar en este trabajo.

Referencias

- Araújo M, Gil H, de-Almeida A (2012) Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. *Malar J* 11:261. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-261>
- Badyaev AV (2002) Growing apart: an ontogenetic perspective on the evolution of sexual size dimorphism. *Trends Ecol Evol* 17:369–378. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02569-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02569-7)
- Basualdo M, Barragan S, Vanagas L, García C, Solana H, Rodríguez E, Bedascarrasbure E (2013) Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* <http://dx.doi.org/106:1553-8>
- Blanckenhorn W, Dixon D, Fairbairn M, Foellmer W, Gibert P, van der Linde K, Meier R, Nylin S, Pitnick S, Schoff C, Signorelli M, Teder T, Wiklund C (2007) Proximate Causes of Rensch’s Rule: Does Sexual Size Dimorphism in Arthropods Result from Sex Differences in Development Time? *Am. Nat.* 169:245–257. <https://doi.org/10.1086/510597>
- Borsuk G, Ptaszyńska A, Olszewski K, Domaciuk M, Krutmuang P, Paleolog J. (2007) A New Method for Quick and Easy Hemolymph Collection from Apidae Adults. *PloS one* 12:2-9 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170487>
- Bullock SH (1999) Relationships among body size, wing size and mass in bees from a tropical dry forest in Mexico. *J Kans Entomol. Soc* 72:426-439. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0554-y>
- Camargo C (1972) Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Rev Brasil Biol* 32:133-138 <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752002000300007>

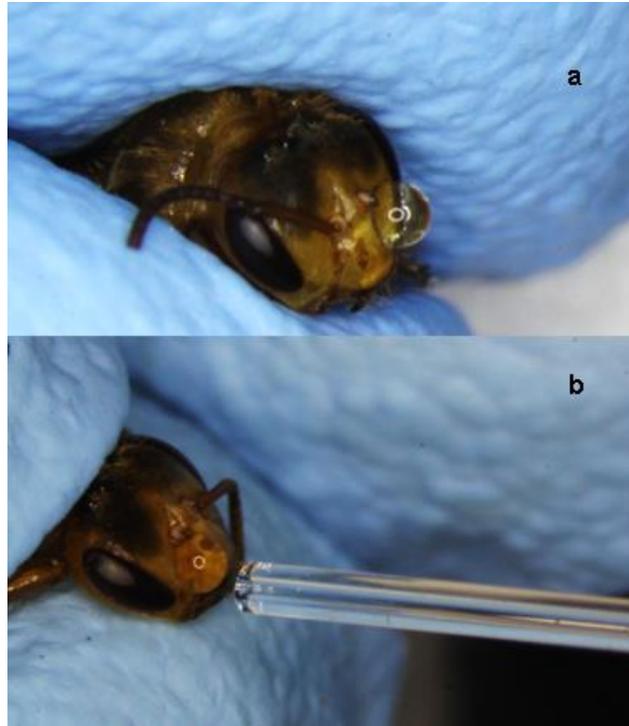
- Cardoen D, Ernst UR, Boerjan B, Bogaerts A, Formesyn E, de Graaf DC, Wenseleers T, Schoofs L, Verleyen P (2012) Worker honeybee sterility: a proteomic analysis of suppressed ovary activation. *J Proteome Res* 4:2838-50. <http://dx.doi.org/10.1021/pr201222s>
- Day W, Quinn P (1989) Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecol Monogr* 59:433-463. <http://dx.doi.org/10.2307/1943075>
- Engels W and Engels E (1977) Vitellogenin und Fertilität bei Stachellosen Bienen. *Insectes Soc* 24:71–94. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02223280>
- Hartfelder K, Bitondi M, Brent C, Guidugli-Lazzarini K, Simões Z, Stabentheiner A, Tanaka E, Wang Y (2013) Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. *J. Api. Res* 521:4-8. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.06>
- Hartfelder K, Makert G, Judice C, Pereira G, Santana W, Dallacqua R, Bitondi M (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37:144-163. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006013>
- Hartfelder K, y Engels W (1992) Allometric and multivariate analysis of sex and caste polymorphism in the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Insectes Soc* 39:251-266. <http://doi.org/10.1007/BF01323946>
- Jarosik V, y Honek A (2007) Sexual differences in insect development time in relation to sexual size dimorphism. In Fairbairn D, Blanckenhorn W, Szekely (ed). *Sex, Size y Gender Roles, Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. T, Oxford University Press, Nueva York, pp 205-213.
- Jolliffe I (2002) *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York. pp 2-10
- Kung-Yee L, Scott I, Zeger (1986) Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73:13–22. <https://doi.org/10.1093/biomet/73.1.13>

- Leather SR (1988) Size, Reproductive Potential and Fecundity in Insects: Things Aren't as Simple as They Seem *Oikos* 51:386–389. <http://doi.org/10.2307/3565323>
- Leimar O, Hartfelder K, Laubichler M, Page R (2012) Development and evolution of caste dimorphism in honeybees – a modeling approach. *Ecol evol.* 2:3098–3109. <http://doi.org/10.1002/ece3.414>
- Marín L, Steinich J, Pacheco O, Escolero (2000). Hydrogeology a contaminated sole-source karst aquifer, Mérida, Yucatán, México. *Geofísica Int* 39:359–365.
- Menezes C, Vollet-Neto A, y Fonseca VL (2013). An advance in the *in vitro* rearing of stingless bee queens. *Apidologie* 44:491–500. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0197-6>
- Mirth C, Riddiford L (2007) Size assessment and growth control: How adult size is determined in insects. *BioEssays* 29:344–355. <https://doi.org/10.1002/bies.20552>
- Nordstokke D, Zumbo W, Bruno D (2010). A New Nonparametric Levene Test for Equal Variances. *Psicológica* 31:401–430.
- Oldham, S (2011) Obesity and nutrient sensing TOR pathway in flies and vertebrates: Functional conservation of genetic mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 22:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.002>
- Paes de Oliveira V, Cruz-Landim C (2004) Protein content and electrophoretic profile of fat body and ovary extracts from workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Meliponini). *Inheringia Ser Zool* 94:4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212004000400010>
- Pinto L, Hartfelder K, Bitondi M, Simões ZL. (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development, *J. Insect Physiol.* 48:783–790. [http://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00103-8](http://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00103-8)

- Ribeiro M, Alves D (2001) Size variation in *Schwarziana quadripunctata* queens (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). R. de Etol 3:59-65. <http://doi.org/10.1051/apido:2006046>
- Roubik D (1995) Stingless bee colonies for pollination. FAO Agric, pp 150-154
- Royston P (1992) Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality. Stat Comput 2:117. <https://doi.org/10.1007/BF01891203>
- Teder T (2014) Sexual size dimorphism requires a corresponding sex difference in development time: a meta-analysis in insects. Funct Ecol 28:479-486. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12172>
- Wasielewski O, Giejdasz K, Wojciechwichz M (2011) Ovary growth and protein levels in ovary and fat body during adult-wintering period in the red mason bee, *Osmia rufa*. Apidologie 42:749-758. <http://doi.org/10.1007%2Fs13592-011-0084-y>

Anexos

Anexo 1.- Método de colecta de hemolinfa en reina virgen de *S. pectoralis*.



Anexo 2.- Procedimiento para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Preparación de soluciones para electroforesis:

I. Buffer para electroforesis

Diluir en 1 litro de agua destilada:

3.03 g Tris

14.4 g de glicina

1 g de SDS

II. 1.5 M Tris buffer con pH DE 8.8

9 g de Tris- base

40 ml H₂O destilada

Usar 1N de HCl para ajustar pH a 8.8

Completar volumen para 50 ml

III. 0.25 m Tris buffer con pH de 6.8

1.5 g de Tris-base

40 ml H₂O destilada

Usar 1N de HCl para ajustar pH a 6.8

Completar volumen para 50 ml

IV. Solución de Acrilamida

15g de acrilamida

0.4 bis acrilamida

50 ml H₂O destilada

V. Buffer para muestras

Disolver 0.15g Tris, 2ml glicerol en 3.5 de H₂O destilada

Ajustar pH para 6.75

Después adicionar:

0.4 g SDS

1 ml 2-mercaptoeptanol o ditiotreitól (dtt)

2 mg de bromofenol blue

Completar con H₂O destilada para 100 ml

VI. Coomassie Brilliant Blue

Disuelva 0.25% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 en etanol, ddH₂O y ácido acético glacial [5: 5: 1 (v/v)].

Deje que la solución se mueva durante la noche en la oscuridad.

Filtra la solución

Mantener en una botella oscura

Preparación de las muestras

a.- Preparar las muestras de proteínas (hemolinfa) agregando la muestra al buffer de muestra en una relación 1: 1 (v / v). Preparar una muestra que contenga los marcadores de masa molecular, siguiendo las instrucciones del fabricante. Usar el mismo buffer de muestra que el utilizado para sus muestras. Las muestras y el marcador de masa molecular se calentaran en un punto de ebullición a baño maría durante 1 - 3 minutos para desnaturalizar la estructura de la proteína. Posteriormente dejar enfriar en hielo durante unos minutos.

b.- Centrifugar las muestras durante 5 minutos. Utilizar el sobrenadante solo para la aplicación al gel, ya que, el precipitado puede contener agregados de proteínas y ácidos nucleicos que puede causar rayas a lo largo del camino de separación.

Preparación del gel de poliacrilamida

Agregar:

- 2.0 ml de la solución de acrilamida
- 5 ml del buffer Tris pH 8.8
- 2.3 ml de ddH₂O
- 19 µl de Persulfato de amonio al 10%
- 40 µl de N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- Dejar polimerizar durante 10 minutos

Preparación del gel de apilamiento

Agregar:

- 0.375 ml de la solución de acrilamida
- 1.38 ml del buffer Tris pH 6.8
- 0.825 ml de ddH₂O
- 25 µl de Persulfato de amonio al 10%
- 10 µl de N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- Colocar el peine para hacer los pocillos que contendrán las muestras
- Dejar polimerizar durante 10 min

Electroforesis

- Preparar la cámara de electroforesis
- Colocar el buffer para electroforesis hasta que se cubra el gel
- Retirar el peine cuidadosamente
- Aplicar las muestras en cada pocillo
- Cerrar la cámara de electroforesis y aplicar una corrida constante de 15mA en un cuarto frío.

- Una vez terminada la electroforesis retirar el gel y teñir con Comassie Brilliant Blue durante 3 horas. Posteriormente retirar el excedente de colorante con acético glacial [5: 5: 1 (v/v)].
- Escanear el gel

Anexo 3.- Procedimiento de cuantificación de vitelogenina mediante el programa Image J versión 15.1r.

1. Importar imagen escaneada del gel en escala de grises.
2. Seleccionar opción de rectángulo y trazar enzima de la banda de interés (vitelogenina), posteriormente utilizar el comando Ctrl+1.
3. Seleccionar la segunda banda de interés y seleccionar comando Ctrl+2. Inmediatamente seleccionar comando Ctrl+3.
4. Se crearan dos gráficos que representan la intensidad y tamaño de la banda.
5. Delimitar el punto final del grafico trazando una línea en la parte inferior de este, y con la herramienta de barita seleccionar el área total.
6. El programa automáticamente arrojará correspondientes a cada banda.
7. Para obtener la concentración relativa de la proteína, dividir el valor de la banda de interés 2 (vitelogenina) entre el valor de la primera banda (apolipoproteína).

Anexo 4.- Procedimiento de cuantificación de vitelogenina mediante el programa Image J versión 15.1r.

