

Efecto del alimento larval en el perfil de hidrocarburos cuticulares y reconocimiento de reinas vírgenes de abejas *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini).

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR

**Médica Veterinaria Zootecnista
Eva Yolotzin Gutiérrez Gamiño**

Asesor:

Dr. José Javier G. Quezada Euán

Mérida, Yuc., México, Enero de 2015

Hoja de votos aprobatorios

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”.

Agradecimientos o dedicatorias

**¡A mi esposo Mario!
¡A mis padres Evangelina y Daniel!
¡A mis hermanos Daniela y Horacio!
¡Los amo!**

Agradezco a Mario, que desde que nos conocemos me ha demostrado un amor incondicional. Gracias por todo el apoyo y paciencia en este proceso. ¡Te amo!

Muchas gracias a mis papás y a mis hermanos, que desde lejos me apoyan, los extraño mucho.

A la familia Armenta que me acepto como parte de su familia y me apoya desde Orizaba.

A mi asesor, tutores y todos los miembros del departamento de Apicultura Tropical de la UADY que me ayudaron, enseñaron y aconsejaron a lo largo de la maestría. Con especial mención al Dr. William y Dr. Humberto.

A la FMVZ-UNAM y al departamento de Abejas que si no hubiera sido por ellos, no habría elegido esta especialidad.

A los miembros del sinodo que con sus opiniones se completo de manera exitosa esta investigación.

Gracias a todos ustedes por existir en mi vida. ¡¡Los quiero mucho!!

Resumen

Al parecer, todos los sistemas de determinación de castas en las abejas sin aguijón están en una forma u otra relacionada con la alimentación larvaria. Estudios previos indican que en *Apis mellifera* y especies del grupo *Trigona*, el único factor determinante para la diferenciación de castas y el tamaño final del individuo podría ser la cantidad de alimento larval consumido. Uno de los mecanismos que desempeñan un papel importante en el reconocimiento de los compañeros del nido son los hidrocarburos cuticulares (CHC's). La cantidad y composición de los alimentos ingeridos durante el estadio larval, podría influir en dicho reconocimiento, así como la aceptación o rechazo de una nueva reina en la colonia.

En el presente estudio se criaron reinas *in vitro* de *Scaptotrigona pectoralis*, a las cuales se les ofreció alimento larval de la misma especie, pero de diferente o de la misma colonia, se analizó cuantitativamente sus perfiles cuticulares para determinar la posible influencia del factor alimentario en la determinación de los CHC's de los individuos. También se evaluó la agresión de las obreras hacia las reinas vírgenes producidas en los diferentes tratamientos mediante bioensayos de reconocimiento por obreras de la misma y diferente colonia de origen. Nos basamos en el supuesto de que, así como en el reconocimiento de compañeros del nido, los CHC's son las señales clave para la aceptación o no de reinas nuevas en la colonia.

En base a los resultados, se concluye que tanto el alimento como el origen de la larva influyen en la expresión de hidrocarburos cuticulares. Lo anterior concuerda con otros estudios donde se menciona que los hidrocarburos están determinados genéticamente y que el medio ambiente (alimento), interfiere en la expresión de CHC's. Por otro lado, la respuesta agresiva de las obreras hacia las reinas parece no estar basada únicamente en los hidrocarburos presentes en la cutícula, sino que la relación entre señales de reconocimiento y agresión podría ser más compleja.

Palabras clave: Hidrocarburos cuticulares, *Scaptotrigona*, abeja sin aguijón, reconocimiento, cría de reinas

Summary

Apparently, all caste determination systems in stingless bees are related to larval feeding in one way or another. Previous studies indicate that the sole determining factor in caste differentiation and final size of an individual in *Apis mellifera* and *Trigona* species, could be the amount of larval food consumed. Cuticular hydrocarbons (CHCs) are one of the mechanisms that play an important role in nestmate recognition. The amount and composition of the food ingested during larval stages may influence such recognition, as well as the acceptance or rejection of a new queen in the colony.

In this study, *Scaptotrigona pectoralis* were bred *in vitro*, these were fed with larval food of the same species, from either a different or the same colony. Their cuticular profiles were quantitatively analyzed to determine the possible influence of the feeding factor in determining an individual's CHCs. Additionally, aggression was evaluated, from worker bees towards virgin queens produced in different treatments through recognition bioassays by worker bees of either a different or same origin colony. Based on the supposition that, just like for nestmate recognition, CHCs are key signals to accept new queens in a colony or not.

Based on the results, both feeding and the larvae's origin influence cuticular hydrocarbons' expression. This matches other studies' findings that mention hydrocarbons are genetically determined, and the environment (feeding) interferes in CHCs expression. Moreover, aggressive responses from worker bees towards queens does not appear to be based solely on the hydrocarbons present in the cuticle, but the relationship between recognition and aggression signals may be more complex.

Keywords: Cuticular hydrocarbons, *Scaptotrigona*, stingless bees, recognition, queen bee rearing

Índice general

Hoja de presentación	I
Hoja de votos aprobatorios.....	II
Declaratoria de originalidad.....	III
Agradecimientos o dedicatorias	IV
Resumen	V
Summary	VI
Índice de figuras	VIII
Índice de cuadros.....	IX
1. Introducción General.....	1
2. Revisión de Literatura	3
2.1 Importancia biológica y económica de las abejas sin aguijón	3
2.2 Características del alimento larval y relación en la determinación de castas ..	4
2.3 Producción <i>in vitro</i> de reinas en abejas sin aguijón.....	7
2.4 Reconocimiento de compañeros del nido en abejas sin aguijón.....	8
3. Objetivos	13
4. Hipótesis.....	13
5. Referencias.....	14
6. Artículo.....	24
6.1 Resumen.....	25
6.2 Introducción	27
6.3 Métodos.....	30
6.4 Resultados.....	39
6.5 Discusión.....	49
6.6 Agradecimientos.....	54
7 Principales hallazgos o aportaciones	61
8 Implicaciones	62
9 Conclusiones generales de la tesis.....	63
10 Sugerencias	64
11 Anexos	65

Índice de figuras

Figura 1. Representación gráfica de los resultados de los componentes principales (PC1 vs PC2) para reinas vírgenes producidas *in vitro* y obreras de las colonias de *Scaptotrigona pectoralis* derivados de hidrocarburos insaturados. El lote 1 se desarrollo con las colonias “a” y “b” 44

Figura 2. Representación gráfica de los resultados de los componentes principales (PC1 vs PC2) para reinas vírgenes producidas *in vitro* y obreras de las colonias de *Scaptotrigona pectoralis* derivados de hidrocarburos insaturados. El lote 2 se desarrollo con las colonias “c” y “d” 45

Índice de cuadros

Cuadro 1. Origen del alimento y genético de los cuatro individuos, para los cuatro lotes en la producción de reinas de <i>Scaptotrigona pectoralis</i> desarrolladas <i>in vitro</i>	33
Cuadro 2. Comparaciones realizadas entre tratamientos y los resultados esperados (según ANOVA) de acuerdo a la influencia del alimento y el origen de la larva en la expresión de los hidrocarburos.	37
Cuadro 3. Análisis de la calidad del alimento larval (media + E.E.)	39
Cuadro 4. Hidrocarburos cuticulares determinados en reinas vírgenes y obreras de <i>Scaptotrigona pectoralis</i>	40
Cuadro 5. Análisis de las comparaciones entre tratamientos de los <i>scores</i> del PC1 de las reinas vírgenes de <i>Scaptotrigona pectoralis</i> que se desarrollaron <i>in vitro</i> (ANOVA).....	43
Cuadro 6. Análisis de varianza de los <i>scores</i> obtenidos a partir de los hidrocarburos cuticulares de las obreras de las diferentes colonias de <i>Scaptotrigona pectoralis</i>	46
Cuadro 7. Medias de parámetros de agresividad en ensayos de reconocimiento de las reinas vírgenes de <i>Scaptotrigona pectoralis</i> desarrolladas <i>in vitro</i> por parte de obreras (media + E.E.).....	47
Cuadro 8. Relación de variables originales (hidrocarburos saturados e insaturados) con los factores principales 1 y 2 (PC1 y PC2).....	65
Cuadro 9. Proporciones relativas de hidrocarburos cuticulares (%) encontrados en reinas vírgenes del Lote 1 producidas <i>in vitro</i> de <i>Scaptotrigona pectoralis</i>	66
Cuadro 10. Proporciones relativas de hidrocarburos cuticulares (%) encontrados en reinas vírgenes del Lote 2 producidas <i>in vitro</i> de <i>Scaptotrigona pectoralis</i>	68
Cuadro 11. Proporciones relativas de hidrocarburos cuticulares (%) encontrados en obreras de <i>Scaptotrigona pectoralis</i>	70

1. Introducción General

Uno de los procesos esenciales para mantener la integridad de las sociedades de insectos es el reconocimiento eficaz de los compañeros del nido de aquellos que no lo son (Liang y Silverman 2000; Howard y Blomquist 2005). Señales químicas que son comunes para los miembros de la colonia (Sorvari *et al.* 2008) juegan un papel importante en el comportamiento y evolución de la capacidad de reconocimiento en los insectos (Liang y Silverman 2000).

Existen más de 50 estudios acerca del origen y la naturaleza de las señales utilizadas para discriminar entre compañeros del nido en insectos sociales. Recientemente se ha demostrado que los hidrocarburos cuticulares CHC's son los principales compuestos responsables en el proceso de discriminación entre individuos de la colonia (Howard y Blomquist 1982; Lahav *et al.* 1999; Thomas *et al.* 1999; Liang y Silverman 2000; Howard y Blomquist 2005; Le Conte y Hefetz 2008; Nunes *et al.* 2009a, 2009b; Tannure-Nascimento *et al.* 2009). La cutícula de cada individuo muestra un perfil químico único (Howard y Blomquist 2005), pero para poder reconocer a los compañeros del nido de los que no son, se cree que existe un perfil de compuestos base que es común para todos los miembros de la colonia (Crozier y Dix 1979; Richard *et al.* 2007). La variación de estos compuestos cuticulares está determinado genéticamente (Arnold *et al.* 1996; Nunes *et al.* 2009b) y al parecer al mismo tiempo mediado por el ambiente (Obin 1986; Crosland 1989, Richard *et al.* 2004, 2007). Dada la extensa presencia de hidrocarburos en el ambiente y la enorme capacidad de un insecto para adquirirlos y para perderlos, los hidrocarburos presentes en la cutícula del insecto puede variar según la temporada, su ubicación geográfica, material del nido, entre otros. (Vander Meer *et al.* 1989; Nowbahari *et al.* 1990; Nielsen *et al.* 1999). Aunado a esto también existe la variación ambiental intrínseca mediada por la alimentación. (Jutsum *et al.* 1979; Obin y Vander Meer 1988; Crosland 1989; Heinze *et al.* 1996; Nielsen *et al.* 1999; Silverman y Liang 2001; Richard *et al.* 2004, Thomas *et al.* 2005; Sorvari *et al.* 2008).

Liang y Silverman (2000) demostraron que las hormigas (*Linepithema humile*), rechazan a los individuos cuando los CHC's presentes en su cutícula derivaron de fuentes de alimento

distintas a las consumidas por el nido receptor. Por su parte, Sorvari *et al.* (2008) trabajaron con hormigas de la especie *Formica aquilonia* y mencionan que el comportamiento discriminatorio se altera cuando la dieta y el tamaño de las raciones es modificado, ya que el perfil cuticular de estas hormigas cambia, lo que indica que la cantidad y composición de los alimentos influye en el reconocimiento de los compañeros del nido.

Hasta ahora, son relativamente pocos los estudios realizados acerca de la composición y el funcionamiento de los CHC's en las abejas sin aguijón (Abdalla *et al.* 2003; Jungnickel *et al.* 2004; Buchwald y Breed 2005; Nunes *et al.* 2008, 2009a, 2009b, 2011; Ferreira-Caliman 2010; Jarau *et al.* 2010; Borges *et al.* 2012; Jones *et al.* 2012; Nascimento y Nascimento 2012; Septanil *et al.* 2012; Quezada-Euán *et al.* 2013). Se presume que existen variaciones en los compuestos cuticulares entre especies, colonias, edades y entre castas que permiten el reconocimiento de compañeras de nido (Abdalla *et al.* 2003; Nunes *et al.* 2008, 2009a, 2009b). En las abejas sin aguijón, los CHC's insaturados (alcanos y alquinos), alquenos y alcadienos figuran como los principales compuestos responsables de dicho reconocimiento (Abdalla *et al.* 2003; Jungnickel *et al.* 2004; Buchwald y Breed 2005; Pianaro *et al.* 2007; Nunes *et al.* 2008, 2009a; Nascimento y Nascimento 2012; Septanil *et al.* 2012, Quezada-Euán *et al.* 2013,). Sin embargo su función y origen no está del todo esclarecido.

En esta tesis se analizó si el origen del alimento larval condiciona el perfil de CHC's de las reinas vírgenes de abejas sin aguijón y si este puede relacionarse con la aceptación de las mismas por parte de las obreras de *Scaptotrigona pectoralis*.

2. Revisión de Literatura

2.1 Importancia biológica y económica de las abejas sin aguijón

Diversos factores han provocado una disminución en el número de colonias de abejas silvestres, causando gran preocupación a nivel mundial por los servicios de polinización que prestan (González-Acereto *et al.* 2006; Slaa *et al.* 2006). Las abejas sin aguijón son insectos eusociales que habitan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Michener 2007; Slaa *et al.* 2006).

El beneficio más importante de las abejas sin aguijón es la contribución a la polinización (Quezada-Euán *et al.* 2001). Sin embargo, también se obtienen beneficios como las propiedades medicinales atribuidas a los productos de las abejas sin aguijón (miel, resinas, propóleos y polen) que le pueden conferir un valor comercial que podría llegar a ser mucho más alto que el de la miel de *Apis mellifera* (Quezada-Euán *et al.* 2001; González-Acereto *et al.* 2006).

Este diverso grupo de insectos, juegan un papel ecológico importante como polinizadores de muchas especies de plantas silvestres en el Neotrópico y parecen buenos candidatos para futuras alternativas en la polinización comercial (Quezada-Euán *et al.* 2001; González-Acereto *et al.* 2006; Slaa *et al.* 2006).

Algunas de las ventajas de utilizar abejas sin aguijón son que una sola especie puede obtener recompensas florales de hasta 100 especies de plantas de forma anual (Slaa *et al.* 2006); los individuos tienden a especializarse en una sola especie floral durante un determinado tiempo, y este comportamiento es conocido como constancia floral, lo que conlleva a una polinización más eficiente y especializada; en general, tienen menos enfermedades, parásitos y plagas que las abejas melíferas, y varias especies de abejas sin aguijón han demostrado ser eficientes en polinizar cultivos en áreas cerradas y bajo condiciones climáticas adecuadas, esto los hace aptos para polinización en invernaderos (Slaa *et al.* 2006).

En las zonas templadas, las abejas melíferas (*A. mellifera*) y abejorros (*Bombus* spp.) han sido utilizados ampliamente para la polinización de cultivos en invernadero (Slaa *et al.* 2006). Sin embargo, en el Neotrópico, se ha utilizado más ampliamente las abejas melíferas de origen africano, pero su uso se ve restringido debido a su alta defensividad de la colonia y a su frecuente evasión cuando se requiere su traslado (Rinderer 1986). La utilidad de los abejorros como polinizadores se ve limitado porque no son colonias perennes y el número de pecoreadoras es generalmente pequeño, lo que implica un reemplazo de colonias varias veces al año, aumentando los costos de producción. Adicionalmente, si las colonias no son manejadas adecuadamente, pueden invadir los hábitats naturales y competir por los recursos con la apifauna nativa (Slaa *et al.* 2006).

Con la expansión actual del uso de invernaderos para el cultivo comercial de especies vegetales, el potencial de los Meliponinos como polinizadores se expande considerablemente (Cauich *et al.* 2004), por lo que la producción de colonias para este propósito puede convertirse en una actividad altamente remunerable.

Para poder utilizar las colonias a este nivel es necesario inducir la tecnificación de la actividad, es decir, modernizarla, hacerla eficiente y crear un mercado para sus productos y servicios (Quezada-Euán *et al.* 2001; González-Acereto *et al.* 2006).

2.2 Características del alimento larval y su relación en la determinación de castas

En *A. mellifera*, el alimento larval de las abejas obreras proviene principalmente de secreciones glandulares y el suministro está controlado por las abejas nodrizas, quienes ofrecen pequeñas cantidades de alimento progresivamente (Huang y Otis, 1991). A diferencia de lo que ocurre en *A. mellifera*, el alimento larval en Meliponinos no es completamente de origen glandular, de hecho parece que las secreciones glandulares de las obreras nodrizas sólo forman una pequeña porción del alimento larval en este taxón (Roulston y Cane 2002). En las abejas sin aguijón el alimento larval proviene de la mezcla que hacen las abejas nodrizas de néctar y polen (este último como principal componente proteico)

incorporando secreciones provenientes de las glándulas hipofaríngeas (Velthuis y Sommeijer 1991; Quezada-Euán *et al.* 2011).

El suministro de alimento larval en masa es el tipo de aprovisionamiento que realizan las abejas sin aguijón, este es llevado a cabo por las nodrizas que proporcionan la cantidad suficiente de alimento larval en las celdas de cría momentos antes de la postura de la reina, a lo anterior se le denomina “proceso de aprovisionamiento y oviposición” (POP, por sus siglas en inglés) (Sakagami 1982). Inmediatamente después del POP, las celdas son operculadas por las obreras, (Michener 2007), de esta forma no existe una alimentación progresiva como ocurre con las abejas melíferas en las cuales existe un contacto permanente de la cría y abejas nodrizas durante toda la fase larval (Huang y Otis 1991). El alimento es consumido por las larvas, hasta desarrollarse y convertirse en pupas, finalmente emerge como adulto. (Cruz-Landim *et al.* 1966). En insectos holometábolos, el crecimiento se detiene a principios de la metamorfosis, y el tamaño corporal en la última fase larval es crucial para determinar el tamaño del cuerpo adulto (Stieper *et al.* 2008).

Se ha observado que la nutrición proporcionada a los individuos, refiriéndose a la cantidad y calidad (por ejemplo, contenido nutricional de polen) de los recursos utilizados para la alimentación de las crías de insectos altamente sociales, repercute sobre el tamaño final del insecto con variaciones en sus dimensiones (Roulston *et al.* 2000; Roulston y Cane 2002, Quezada-Euán *et al.* 2011). En el orden Hymenóptera, como por ejemplo en las hormigas, las diferencias en el tamaño corporal de las obreras es una característica común en la colonia, asociado a la división de labores entre los miembros de la colonia (Medan y Josens 2005). Un fenómeno parecido dentro de la familia Apidae, se aprecia en abejorros eusociales, donde se observa que existe un efecto de la frecuencia y duración de los periodos de alimentación sobre el tamaño de los individuos (Ribeiro *et al.* 1999; Goulson *et al.* 2002; Spaethe y Weidenmuller 2002).

En abejas melíferas, ya que el alimento larval ofrecido a las crías proviene principalmente de secreciones glandulares y el suministro es controlado por las abejas nodrizas, que se encargan de proporcionarles pequeñas cantidades de alimento (Huang y Otis 1991), los individuos son

de tamaño relativamente más uniforme en comparación con otros taxa. Sin embargo, se ha documentado diferencias morfológicas en obreras presentándose tendencias estacionales en el desarrollo del número de ovarios y tamaño de las obreras (Roulston *et al.* 2000; Hoover *et al.* 2006).

En abejas eusociales, la determinación de castas está dada por factores tróficos o por factores trofogenéticos (Hartfelder *et al.* 2006). En el primer caso, la reina y las obreras surgen a partir de huevos fertilizados genéticamente idénticos y las larvas destinadas a convertirse en reinas consumen una mayor cantidad de alimento, en comparación con las que serán obreras que consumen una cantidad inferior (Lisboa *et al.* 2005; Hartfelder *et al.* 2006). En esta modalidad de determinación de castas, las larvas son genéticamente iguales ó totipotentes, si reciben alimento en una cantidad por encima de un umbral determinado, se desarrolla una abeja reina, situación similar a lo que ocurre en *A. mellifera* y especies del grupo *Trigona* (Hartfelder *et al.* 2006, Prato 2010, Baptistella *et al.* 2012). En las anteriores especies, excepto abejas del género *Frieseomelitta* y *Leurotrigona*, las cuales consumen alimento extra de la celda superior más cercana (Faustino *et al.* 2002); las reinas son criadas en celdas de mayor tamaño respecto a las de las obreras y machos, llamadas celdas reales, por lo tanto es posible para las obreras depositar una mayor cantidad de alimento en las celdas reales (Engels e Imperatriz-Fonseca 1990; Menezes *et al.* 2013). Al parecer, en Meliponini no existe ninguna diferencia cualitativa entre el alimento que se ofrece a las larvas que dan origen a las reinas y obreras, por lo que el único factor determinante para la diferenciación de castas parece ser la cantidad de alimento que reciben las larvas (Engels e Imperatriz-Fonseca 1990, Prato 2010, Baptistella *et al.* 2012, Menezes *et al.* 2013). Contrariamente al caso de las abejas melíferas, donde el alimento larval contiene un compuesto específico llamado “jalea real” que favorece el desarrollo de una reina, y que recibe en abundancia durante todo su desarrollo ontogénico (Hartfelder y Engels 1989; Hartfelder *et al.* 2006).

En el caso de la determinación de castas por factores trofogenéticos, primero influye el factor genético y ocurre en abejas del género *Melipona*, si existe homocigosis para cualquiera de los dos pares de alelos se produce obrera y cuando existe doble heterocigosis para ambos pares de alelos se produce una reina. Influye como segundo factor, la alimentación, aún

cuando un individuo sea genéticamente destinado a ser reina, sólo lo será si recibe suficiente cantidad de alimento y de excelente calidad. En abejas *Meliponas*, las celdas de cría de todos los individuos de la colonia son del mismo tamaño y las hembras obreras reciben un suministro inferior de alimento que las abejas destinadas a ser reinas (Lisboa *et al.* 2005; Hartfelder *et al.* 2006; Baptistella *et al.* 2012). El género *Melipona* presenta un alto porcentaje (25%) en la frecuencia de reinas que emergen de las celdas de cría y Kerr (1950) menciona que puede estar determinado por una predisposición genética y propuso un modelo de dos loci, cada uno con dos alelos, donde sólo hembras heterocigotos se convierten en reinas y dado que la reina madre siempre es heterocigoto para ambos loci, con lo cual serán reinas exactamente el 25% de todas las hembras.

Prato (2010) menciona que el tamaño final de la reina adulta está relacionado con la cantidad de alimento consumido y observó que en *Tetragonisca angustula* la diferencia en cuanto a la cantidad de alimento ofrecido a las larvas hembras es muy grande, con una proporción de 1:6.5 (obrero: reina) y se refleja en las dimensiones del adulto, por lo que las reinas de esta especie son notoriamente más grandes que las obreras, si se compara con otras especies como *Scaptotrigona aff depilis* donde la proporción es de 1:4 (Menezes 2010) y *Frieseomelitta varia* donde la relación es de 1:2 (Baptistella *et al.* 2012).

2.3 Producción *in vitro* de reinas en abejas sin aguijón

La cría artificial de reinas en abejas sin aguijón es un área relativamente nueva y por lo tanto con escasa información. Recientemente Baptistella *et al.* (2012) sugieren que el momento ideal para la transferencia de la celda natural a la celda artificial, es cuando la larva está en su último periodo de alimentación, es decir, cuando la larva tiene un color blanco lechoso y su intestino se observa lleno. Sin embargo, Prato (2010) obtuvo reinas con larvas más jóvenes (5-7 días después de la postura del huevo). Ambos mencionan que el factor responsable de la alta mortalidad en la producción de la cría artificial es la humedad, la cual debe estar al 75 % a una temperatura de $28^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Un segundo factor a consideración es la posición de la larva durante el traslarve, pues debe ser colocada cuidadosamente sobre la superficie del

alimento larval del mismo lado que se encontraba en la celda natural, dado que de esta manera le permitirá realizar el intercambio gaseoso a través del tegumento que está en contacto con el aire, evitando así su asfixia (Prato 2010; Baptistella *et al.* 2012). Por otro lado, Menezes *et al.* (2013) implementaron una metodología para la producción *in vitro* de reinas en *S. aff depilis* coincidiendo con Prato (2010) y Baptistella *et al.* (2012), respecto al factor humedad.

2.4 Reconocimiento de compañeros del nido en abejas sin aguijón.

El reconocimiento de los compañeros del nido es la capacidad de reconocer intrusos, parásitos o ladrones de otras colonias de la misma o diferente especie utilizando señales específicas de su colonia (Sorvari *et al.* 2008). Estas señales juegan un papel importante en el comportamiento y evolución de los insectos sociales (hormigas, avispas, abejas y termitas) (Liang y Silverman 2000; Howard y Blomquist 2005), ya que la eficacia en este proceso es esencial para mantener la integridad de sus sociedades (Liang y Silverman 2000). Para lograrlo, existe un continuo intercambio de señales de reconocimiento a través de la trofolaxis (es decir, el intercambio de alimento líquido de boca a boca) y alo-acicalamiento (Soroker *et al.* 2003). Sin embargo, las principales señales de reconocimiento parecen estar mediadas a través de olores presentados por compuestos químicos (Liang y Silverman 2000; Buchwals y Breed 2005), los cuales se cree que están principalmente representados por los CHC's (Howard y Blomquist 1982, Lahav *et al.* 1999 Thomas *et al.* 1999, Jungnickel *et al.* 2004, Buchwals y Breed 2005; Pianaro *et al.* 2007, Nunes *et al.* 2008, Nascimento y Nascimento 2012; Septanil *et al.* 2012, Quezada-Euán *et al.* 2013).

Los CHC's en conjunto con ácidos grasos forman una capa fina impermeable cerosa que consiste en compuestos de cadena larga que cubren la cutícula de los insectos (Sorvari *et al.* 2008). Según Lockey (1988), estas sustancias sirvieron originalmente como una protección contra la pérdida de agua y su función como feromonas evolucionó más tarde. La cutícula de cada individuo muestra un perfil químico único, que lleva las señales específicas de la especie, así como indicaciones sobre su nido de origen, edad, origen genético, casta, sexo, estado reproductivo y su función en la colonia (Breed *et al.* 1995; Arnold *et al.* 1996, 2000;

Howard y Blomquist 2005; Monnin 2006). Sin embargo, para poder discriminar entre individuos del nido de los que no lo son, se cree que existe un perfil de compuestos base que es común para todos los miembros de la colonia y que difiere en la proporción relativa de dichos compuestos respecto a los individuos de otras colonias (Crozier y Dix 1979; Jungnickel *et al.* 2004; Richard *et al.* 2007).

Un modelo de reconocimiento para compañeros del nido parece basarse en la abundancia relativa de los componentes individuales en lugar de un modelo general basada en la presencia o ausencia de señales independientes de reconocimiento (llamado “Indeseable-Ausente”) (Akino *et al.* 2004). Este modelo se ha identificado en abejas sin aguijón, Couvillon y Ratnieks (2008) estudiaron el comportamiento de reconocimiento de compañeros del nido con *F. varia* y mencionan que las abejas guardianas son capaces de discriminar a los individuos que son miembros de la colonia de los que no lo son, mediante señales olfativas. Si un insecto pretende entrar a la colonia se le permitirá ingresar a la colonia si: 1) presenta señales deseables (D-presentes), aunque no sea compañero del nido; y 2) si el ingresante no da señales indeseables (I-ausentes), aunque éste sea un intruso. La abeja *F. varia* respondió agresivamente únicamente en situación de I-ausentes y esto se explica ya que en el caso del patrón D-presentes, las guardianas tendrían más errores al permitir la entrada a intrusos, debido a la facilidad con que los intrusos se impregnan con el olor de la colonia (Liang y Silverman 2000). En cambio, utilizando el modelo I-ausentes cometieron menos errores al permitir la entrada a intrusos aunque más errores al negarla a miembros de la colonia, siendo este último error el menos perjudicial para la colonia (Couvillon y Ratnieks 2008).

La variación de estos compuestos cuticulares podría estar determinado genéticamente (Arnold *et al.* 1996; Nunes *et al.* 2009b), pero al mismo tiempo mediado por el ambiente (Obin 1986; Crosland 1989, Richard *et al.* 2004, 2007). Un aspecto no bien comprendido al respecto es el efecto del alimento sobre el perfil de hidrocarburos de los individuos. Liang y Silverman (2000) demostraron en hormigas argentinas (*Linepithema humile*), que los CHC's de esta especie al igual que en otros taxa eusociales son utilizados para el reconocimiento de los miembros de la colonia pero que sin embargo, estos pueden ser adquiridos de sus presas

influyendo sobre el perfil de hidrocarburos entre colonias. En sus experimentos ofrecieron dietas diferentes y encontraron que los hidrocarburos presentes en la cutícula de las obreras *L. humile*, son los mismos que presentaba su alimento, por consiguiente, sugieren que la dieta puede ser un importante factor que altera las señales de reconocimiento presentes en la superficie cuticular y por lo tanto la respuesta de los compañeros del nido a nuevos olores. Esta hipótesis se propone al observar que ocurre una respuesta de agresión a antiguos compañeros del nido que no fueron alimentados con las mismas presas que el nido de origen y por lo tanto los olores expresados eran diferentes, reafirmando la teoría de que los CHC's probablemente se derivan del medio ambiente (Jutsum *et al.* 1979; Heinze *et al.* 1996).

Sorvari *et al.* (2008) señalaron que en hormigas de la especie *F. aquilonia* la discriminación de individuos que no son del nido se produce más rápido y pronunciadamente cuando han sido alimentados con dieta y cantidades diferentes. Los resultados sugieren que cuando existen cambios en la disponibilidad y composición en la dieta se puede interrumpir el sistema de reconocimiento de los individuos de la colonia, al producirse cambios en el equilibrio nutricional que modifican las señales químicas de los individuos. Por medio de bioensayos probaron que el estado nutricional también afecta la respuesta de agresión, pues las hormigas hambrientas resultaron ser más agresivas. Por su parte, Thomas *et al.* (2005) realizaron una prueba de laboratorio similar, y mencionan que la disponibilidad de alimentos no afecta a la agresividad entre los nidos de la hormiga *L. humile*. Esto puede indicar que existen diferencias en los mecanismos de reconocimiento entre las dos especies. Pero ambos estudios coinciden en sugerir que la composición de la dieta determina el olor de la colonia y que los cambios en ella detonan la agresión entre los insectos.

Otras posibles fuentes de señales químicas usadas en el reconocimiento pueden provenir también del material de nidificación y el sustrato en el que se desplazan los insectos modificando su perfil de CHC's (Jutsum *et al.* 1979; Breed *et al.* 1995; Heinze *et al.* 1996; Nunes *et al.* 2011).

Por otra parte, en abejas, el papel de los hidrocarburos en el reconocimiento del nido es más complicado (Arnold *et al.* 2000). Los perfiles de CHC's pueden ser determinados

genéticamente, la variabilidad de estos compuestos difieren entre subfamilias debido a la poliandria de las reinas en abejas melíferas (Moritz y Heisler 1992; Nunes *et al.* 2008). En contraste, las abejas sin aguijón, en general son monoándricas (Strassmann 2001), lo que sugiere que los perfiles de los CHC's son genéticamente más homogéneos (Nunes *et al.* 2008).

Varios estudios en abejas sin aguijón mencionan que algunas especies son capaces de discriminar entre miembros de la colonia de los que no lo son y que dicho reconocimiento esta mediado por señales olfativas presentados por los lípidos cuticulares (Jungnickel *et al.* 2004; Buchwals y Breed 2005; Pianaro *et al.* 2007; Nunes *et al.* 2008). Jungnickel *et al.* (2004), Buchwals y Breed (2005), Pianaro *et al.* (2007) y Nunes *et al.* (2008) concuerdan en que los principales compuestos de la superficie cuticular son alcanos y alquenos de cadena larga (23 a 35 átomos de Carbono). Por su parte, Abdalla *et al.* (2003) reportaron que para *Melipona bicolor*, existen diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil químico de la cutícula entre las diferentes castas y sexos. Aunque, no se encontraron diferencias entre las obreras recién emergidas y las reinas vírgenes, donde el perfil químico cuticular cambió conforme la edad del individuo. Lo anterior concuerda con lo reportado por Nunes *et al.* (2008, 2009a, 2009b).

Nunes *et al.* (2011) mencionan que al igual que en hormigas (Jutsum *et al.* 1979; Heinze *et al.* 1996) y en abejas melíferas (Breed *et al.* 1995), en las abejas sin aguijón, el material con que se construye el nido podría servir como una fuente de compuestos para el reconocimiento de compañeros de la colonia, aunque esta visión ha sido desafiada por Jones *et al.* 2012

Recientemente, se ha encontrado que la similitud de CHC's puede ser un mecanismo por el que Meliponinos cleptobióticos pueden iniciar el ingreso a las colonias de sus hospederos (Quezada-Euán *et al.* 2013).

La mayoría de los estudios de reconocimiento de compañeros de nido en abejas sin aguijón están dirigidos a obreras. Esto parece plausible porque las obreras son los individuos que realizan el rechazo de los intrusos o aceptación de sus compañeros del nido, mientras que los individuos sexuales por lo general no participan en tales actividades. Sin embargo, el

reconocimiento de compañeros del nido para los individuos reproductores de la colonia puede ser igualmente importante que para las obreras, ya que la aceptación de reinas no emparentadas representa una desventaja genética para la colonia si la aceptara (Moritz y Neumann 2004).

La información respecto al mecanismo con el cual las obreras eligen a una reina virgen particular, como una reina nueva en la colonia, han sido discutidos; Jarau *et al.* (2009) menciona que en *Melipona beecheii*, el comportamiento de la reina influye en el rechazo o aceptación de la misma, donde mencionan que si la hembra corre rápidamente, con movimientos circulares y batiendo sus alas, desencadena ataques por parte de las obreras; por el contrario, las reinas que se quedaban inmóviles en el panal evitaban la conducta agresiva de las obreras. También observaron que una reina a la cual las obreras aceptaron, presentó un comportamiento donde su intención era agredir a las obreras, sugiriendo que su conducta es un modo de demostrar su dominancia ante las obreras.

Por su parte Van Oystaeyen *et al.* (2013) realizaron un estudio con *Melipona scutellaris* donde sugieren que una reina que no pertenece a un nido, adopta estrategias de comportamiento para ser aceptada en otro nido. Primeramente, identificaron que las reinas son selectivas, ya que buscan nidos que no tengan reina. Además, eligen el atardecer para intentar entrar en la colonia, pues es cuando las abejas guardianas reducen significativamente su eficiencia para vigilar. Sugieren que quizá la reina busque el nido durante el día cuando hay suficiente luz y esperan hasta más tarde para entrar a la colonia para así aumentar sus probabilidades de éxito. Sin embargo, no existe información sobre cómo ocurre el reconocimiento químico de reinas o zánganos emparentados o no emparentados en colonias de abejas sin aguijón.

Es posible que el reconocimiento de una reina virgen, como una reina nueva, podría estar determinado por señales olfativas (CHC's), los cuales quizá podrían estar determinados por el medio ambiente.

3. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto del alimento ofrecido a larvas de *Scaptotrigona. pectoralis* en el perfil de hidrocarburos cuticulares (CHC's) y reconocimiento de reinas de abejas vírgenes en la colonia.

Objetivos específicos

1. Determinar si existen diferencias en el perfil cuticular de las reinas vírgenes de *S. pectoralis* que se desarrollaron con el mismo o diferente alimento de acuerdo a si están emparentadas genéticamente o no lo están.
2. Evaluar las respuestas agresivas de obreras hacia las reinas vírgenes de *S. pectoralis* de acuerdo con el alimento con que fueron desarrolladas y el origen genético al que pertenecen.

4. Hipótesis

1. El perfil cuticular de las reinas de un mismo origen genético y criadas con alimento de distinto origen es diferente que el de reinas de un mismo origen genético criadas con alimento del mismo origen.
2. La respuesta agresiva de obreras a reinas criadas de larvas y con alimento de su misma colonia es diferente que la respuesta agresiva a reinas criadas de larvas de la misma colonia y con alimento de una colonia distinta.

5. Referencias

- Abdalla FC, Jones GR, Morgan ED, Cruz-Landim C (2003) Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepageletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genet Mol Res* 2:191-199.
- Akino T, Yamamura K, Wakamura S, Yamaoka R (2004) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nestmate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Appl Entomol Zool* 39:381-387. doi: 10.1303/aez.2004.381
- Arnold G, Quenet B, Cornuet JM, Masson C, De Schepper B, Estoup A, Gasul P (1996) Kin recognition in honeybees. *Nature* 379:498.
- Arnold G, Quenet B, Masson C (2000) Influence of social environment on genetically based subfamily signature in the honeybee. *J Chem Ecol* 26:2321-2333. doi: 10.1023/A:1005574810743
- Baptistella AR, Souza CCM, Santana WC, Egea SAE (2012) Techniques for the *in vitro* production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). *Sociobiol* 59:297-310
- Borges AA, Ferreira-Caliman MJ, Nascimento FS, Campos LAO, Tavares MG (2012) Characterization of cuticular hydrocarbons of diploid and haploid males, workers and queens of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Insect Soc* 59:479-486. doi: 10.1007/s00040-012-0242-x
- Breed MD, Garry MF, Pearce AN, Hibbard BE, Bjostad LB, Page Jr RE (1995) The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Anim Behav* 50:489-496. doi: 10.1006/anbe.1995.0263
- Buchwald R, Breed MD (2005) Nestmate recognition cues in the stingless bee *Trigona fulviventris*. *Anim Behav* 70:1331-1337. doi: 10.1016/j.anbehav.2005.03.017
- Cauich O, Quezada-Euán JGG, Macias-Macias JO, Reyes-Oregel V, Medina-Peralta S, Parra-Tabla V (2004) Behavior and pollination efficiency of *Nannotrigona perilampoides*

- (Hymenoptera: Meliponini) on greenhouse tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) in subtropical México. *J Econ Entomol* 97:475-481. doi: 10.1603/0022-0493-97.2.475
- Couvillon MJ, Ratnieks FLW (2008) Odour transfer in stingless bee marmelada (*Frieseomelitta varia*) demonstrates that entrance guards use an ‘undesirableabsent’ recognition system. *Behav Ecol Sociobiol* 62:1099-1105. doi: 10.1007/s0026g-007-0537-5
- Crosland MWJ (1989) Kin recognition in the ant *Rhytidoponera confusa* I. Environmental Odour. *Anim Behav* 37:912-919. doi: 10.1016/0003-3472(89)90135-8
- Crozier RH, Dix MW (1979) Analysis of two genetic models for the innate components of colony odour in social Hymenoptera. *Behav Ecol Sociobiol* 4:217-224. doi: 10.1007/BF00297645
- Cruz-Landim C, Akahira Y (1966) Influencia da Alimentação no Desenvolvimento de algumas Glândulas de *Trigona* (Scaptotrigona) *postica* Latreille (Hymenoptera, Apoidea). *Pap Avul Zool* 19:63-78
- Engels W, Imperatriz-Fonseca VL (1990) Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honey bees and stingless bees. En: Engels, W. (ed.) *Social insects: An evolutionary approach to castes and reproduction*. Springer-Verlag. USA. pp. 167–230
- Faustino CD, Silva-Matos EV, Mateus S, Zucchi R (2002) First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Insect Soc* 49:111-113. doi: 10.1007/s00040-002-8287-x
- Ferreira-Caliman MJ, Nascimento FS, Turatti IC, Mateus S, Lopes NP, Zucchi R (2010) The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *J Insect Physiology* 56:800-804. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.02.004

- González-Acereto JA, Quezada-Euán JJG, Medina-Medina LA (2006) New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatan: results of an integral program to rescue and promote the activity. *J Apicult Res* 45:234-239. doi: 10.3896/IBRA.1.45.4.14
- Goulson D, Peat J, Stout JC, Tucker J, Darvill B, Derwent LC, Hughes WOH (2002) Can alloethism in workers of the bumblebee, *Bombus terrestris*, be explained in term of foraging efficiency? *Anim Behav* 64:23-130. doi:10.1006/anbe.2002.3041
- Hartfelder K, Makert GR, Judice CC, Pereira GAG, Santana WC, Dallacqua R, Bitondi MMG (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37:144-163. doi: 10.1051/apido:2006013
- Heinze J, Foitzik S, Hippert A, Hölldobler B (1996) Apparent dear enemy phenomenon and environment-based recognition cues in the ant *Leptothorax nylanderii*. *Ethology* 102:510-522. doi: 10.1111/j.1439-0310.1996.tb01143.x
- Hoover SER, Higo HA, Winston ML (2006) Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *J Comp Physiol B* 176:55-63. doi: 10.1007/s00360-005-0032-0
- Howard RW y Blomquist GJ (1982) Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Ann Rev Entomol* 27:149-172. doi: 10.1146/annurev.en.27.010182.001053
- Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50:371–93. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130359
- Huang ZY, Otis GW (1991) Inspection and feeding of larvae by worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): Effect of starvation and food quantity. *J Insect Behav* 4:305-317. doi: 10.1007/BF01048280

- Jungnickel H, Da Costa AJS, Tentschert J, Patricio LRA, Imperatriz-Fonseca VL, Drijfhout F, Morgan ED (2004) Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Physiol* 50:761-766. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.05.011
- Jarau S, van Veen JW, Aguilar I, Ayasse M (2009) Virgin queen execution in the stingless bee *Melipona beecheii*: the sign stimulus for worker attacks. *Apidologie* 40:496–507. doi: 10.1051/apido/2009022
- Jarau S, van Veen JW, Aguilar I, Ayasse M (2010) A scientific note on virgin queen acceptance in stingless bees: evidence for the importance of queen aggression. *Apidologie* 41:38-39. doi: 10.1051/apido/2009045
- Jones SM., van Zweden, JS, Grüter C, Menezes C, Alves DA, Nunes-Silva P, Czaczkas T, Imperatriz-Fonseca VL, Ratnieks FLW (2012) The role of wax and resin in the nestmate recognition system of a stingless bee, *Tetragonisca angustula*. *Behav Ecol Sociobiol* 66:1-12. Doi: 10.1007/s00265-011-1246-7
- Jutsum AR, Saunders TS, Cherrett JM (1979) Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Anim Behav* 27:839-844. doi: 10.1016/0003-3472(79)90021-6
- Kerr WE (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* 35:143-152.
- Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK(1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86:246-249. doi: 10.1007/s001140050609
- Le Conte Y, Hefetz A (2008) Primer pheromones in social hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 53:523-542. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091434

- Liang D, Silverman J (2000) “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* 87:412–416. doi: 10.1007/s001140050752
- Lisboa LCO, Serrao JE, Cruz-Landim C, Campos LAO (2005) Effect of larval food amount on ovariole development in queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae). *Anat Histol Embryol* 34:179-184. doi: 10.1111/j.1439-0264.2005.00591.x
- Lockey KH (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp Biochem Physiol B* 89:595-645. doi: 10.1016/0305-0491(88)90305-7
- Medan V, Josens RB (2005) Nectar foraging behavior is affected by ant body size in *Camponotus mus*. *J Insect Physiol* 51:853-860. doi:10.1016/j.jinsphys.2005.03.016
- Menezes C (2010) A producao de rainhas e a multiplicacao de colonias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tesis de la Universidad de Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil
- Menezes C, Vollet-Neto A, Imperatriz-Fonseca VL (2013) An advance in the *in vitro* rearing of stingless bee queens. *Apidologie* 44:491-500. doi: 10.1007/s13592-013-0197-6
- Michener CD (2007) The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore, London
- Monnin T (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fennici* 43:515-530.
- Moritz RFA, Heisler T (1992) Super and half-sister discrimination by honey bee workers (*Apis mellifera* L.) in a trophallactic bioassay. *Insect Soc* 39:365-372. doi: 10.1007/BF01240621
- Moritz RFA, Neumann P (2004) Differences in nestmate recognition for drones and workers in the honeybee, *Apis mellifera* (L.). *Anim Behav* 67:681-688. doi: 10.1016/j.anbehav.2003.08.004

- Nascimento DL, Nascimento FS (2012) Acceptance threshold hypothesis is supported by chemical similarity of cuticular hydrocarbons in a stingless bee, *Melipona asilvai*. *J Chem Ecol* 38:1432-1440. doi: 10.1007/s10886-012-0194-7
- Nielsen J, Boomsma JJ, Oldham NJ, Petersen HC, Morgan ED (1999) Colony-level and season-specific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncorum*. *Insect Soc* 46:58-65. doi: 10.1007/s000400050113
- Nowbahari E, Lenoir A, Clement JL, Lange C, Bagneres AG, Joulie C (1990) Individual, geographical and experimental variation of cuticular hydrocarbon of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae): their use in nest and subspecies recognition. *Biochem System Ecol* 18:63-73.
- Nunes TM, Nascimento FS, Turatti IC, Lopes NP, Zucchi R (2008) Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Anim Behav* 75:1165-1171. doi: doi:10.1016/j.anbehav.2007.08.028
- Nunes TM, Turatti IC, Lopes NP, Zucchi R (2009a) Chemical signals in the stingless bee, *Frieseomelitta varia*, indicate caste, gender, age and reproductive status. *J Chem Ecol* 35:1172-1180. doi. 10.1007/s10886-009-9691-8
- Nunes TM, Turatti IC, Mateus S, Nascimento FS, Lopes NP, Zucchi R (2009b) Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. *Genet Mol Res* 8:589-595.
- Nunes TM, Mateus S, Turatti IC, Morgan E, Zucchi R (2011) Nestmate recognition in the stingless bee *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sources of chemical signals. *Anim Behav* 81:463-467. Doi: 10.1016/j.anbehav.2010.11.020
- Obin MS (1986) Nestmate recognition cues in laboratory and field colonies of *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae): effect of environment and role of cuticular hydrocarbons. *J Chem Ecol* 12:1965-1975. doi: 10.1007/BF01041858

- Obin MS, Vander Meer RK (1988) Source of nestmate recognition cues in the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Anim Behav* 36:1361-1370. doi: 10.1016/S0003-3472(88)80205-7
- Pianaro A, Flach A, Patricio EF, Nogueira-Neto P, Marsaioli AJ (2007) Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. *J Chem Ecol* 33:971-984. doi: 10.1007/s10886-007-9274-5
- Prato M (2010) Ocorrência natural de sexados, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), Tesis de la Universidad de Sao Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- Quezada-Euán JJG, May-Itzá W de J, González-Acereto JA (2001) Meliponiculture in México: problems and perspective for development. *Bee World* 82:160-167
- Quezada-Euán JJG, López-Velasco A, Pérez-Balam J, Moo-Valle H, Velazquez-Madrado A, Paxton RJ (2011) Body size differs in workers produced across time and is associated with variation in the quantity and composition of larval food in *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera, Meliponini). *Insect Soc* 58:31-38. doi: 10.1007/s00040-010-0113-2
- Quezada-Euán JJG, Ramírez J, Eltz T, Pokorny T, Medina R, Monsreal R (2013) Does sensory deception matter in eusocial obligate food robber systems? A study of *Lestrimelitta* and stingless bee hosts. *Anim Behav* 85:817:823. doi: 10.1016/j.anbehav.2013.01.028
- Ribeiro MF, Velthuis HHW, Duchateau MJ, Tweel I van D (1999) Feeding frequency and caste differentiation in *Bombus terrestris* larvae. *Insect Soc* 46:306-314
- Richard FJ, Hefetz A, Christides JP, Errard C (2004) Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology* 14:9-16. doi: 10.1007/s00049-003-0251-

- Richard FJ, Poulsen M, Hefetz A, Errard C, Nash DR, Boomsma JJ (2007) The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol* 61:1637-1649. doi: 10.1007/s00265-007-0395-1
- Rinderer ET (1986) *Bee genetics and breeding*. Academic Press. Orlando, Florida
- Roulston TH, Cane JH, Buchmann SL (2000) What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions or phylogeny? *Ecol Monogr* 70:617-643
- Roulston TH, Cane JH (2002) The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evol Ecol* 16:49-65. doi: 10.1023/A:1016048526475
- Roubik DW (1989) *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press. USA
- Sakagami SF (1982) Stingless bees. En: Hermann H.R. (Ed) *Social Insects*, Academic Press., New York. pp 361-423
- Septanil MPB, Mateus S, Turatti IT, Nunes TM (2012) Mixed colonies of two species of congeneric stingless bees (Hymenoptera: Apinae, Meliponini) display environmentally-acquired and endogenously-produced recognition signals. *Physiol Entomol* 37:72-80. doi: 10.1111/j.1365-3032.2011.00825.x
- Silverman J y Liang D (2001) Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. *Naturwissenschaften* 88:73-77. doi: 10.1007/s001140000198
- Slaa EJ, Sánchez-Chaves LA, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37:293-315. doi: 10.1051/apido:2006022

- Soroker V, Lucas C, Simon T, Fresneau D, Durand JL, Hefetz A (2003) Hydrocarbon distribution and colony odour homogenisation in *Pachycondyla apicalis*. *Insect Soc* 50:212-217. doi: 10.1007/s00040-003-0669-1
- Sorvari J, Theodora P, Turillazzi S, Hakkarainen H, Sundström L (2008) Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. *Behav Ecol* 19:441-447. doi: 10.1093/beheco/arm160
- Spaethe J, Weidenmüller A (2002) Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insect Soc* 49:142-146. doi: 10.1007/s00040-002-8293-z
- Stieper BC, Kupershtok M, Driscoll MV, Shingleton AW (2008) Imaginal discs regulate developmental timing in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 321:18-26. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.05.556
- Strassmann J (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insect Soc* 48:1-13. doi: 10.1007/PL00001737
- Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Dantas JO, Zucchi R (2009) Decision rules for egg recognition are related to functional roles and chemical cues in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Naturwissenschaften* 96:857-861. doi: 10.1007/s00114-009-0535-8
- Thomas ML, Parry LJ, Allan RA, Elgar MA (1999) Geographic affinity, cuticular hydrocarbons and colony recognition in the Australian meat ant *Iridomyrmex purpureus*. *Naturwissenschaften* 86:87-92. doi: 10.1007/s001140050578
- Thomas ML, Dixon A, Coggins V, Holway A (2005) Food availability and brood number do not influence intraspecific aggression in argentine ants. *Insect Soc* 52:108-113. doi: 10.1007/s00040-004-0782-9
- Van Oystaeyen A, Araujo-Alves D, Caliari-Oliveira R, Lima-do Nascimento D, Santos-do Nascimento, Billen J, Wenseleers T (2013) Sneaky Queens in *Melipona* bees

selectively detect and infiltrate queenless colonies. *Anim Behav* 86:603-609. doi: 10.1016/j.anbehav.2013.07.001

Vander Meer RK, Saliwanchik D, Lavine B (1989) Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*: implication for nestmate recognition. *J Chem Ecol* 15:2115-2125. doi: 10.1007/BF01207442

Velthuis HHW, Sommeijer MJ (1991) Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in stingless bees. En: Gupta A.P. (Ed) *Morphogenetic hormones of arthropods*. Rutgers University Press. USA. pp 346-383

6. Artículo

El origen del alimento larval afecta el perfil cuticular de las reinas vírgenes pero no la respuesta agresiva por parte de las obreras en abejas sin aguijón
Scaptotrigona pectoralis (Hymenoptera: Meliponini)

Origin of larval food affects the cuticular profile of Gynes but not the aggressive response by workers in the stingless bee *Scaptotrigona pectoralis*
(Hymenoptera: Meliponini)

Autores: Eva Y. Gutiérrez-Gamiño¹, Durcy V. Ruiz-Ciau², J.J.G. Quezada-Euán¹

Adscripción:

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.

²Laboratorio de Cromatografía, Facultad de Química, Campus de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 # 613 x 90. Colonia Inalámbrica. C.P. 97069. Mérida, Yucatán, México. Tel. +52 (999) 9225711 ext 38112.

E-mail address of contact author: qewan@uady.mx (J. J. G. Quezada-Euán).¹

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

6.1 Resumen

Hasta ahora, no se ha determinado el efecto que el alimento puede tener en el perfil de CHC's en abejas sin aguijón, sin embargo en otros himenóptera existe evidencia que parece indicar un efecto del mismo y que al modificar la dieta, la expresión de hidrocarburos cuticulares (CHC's) también cambia. Asimismo, se evaluó el perfil de CHC's sobre el reconocimiento de las reinas y la respuesta agresiva de obreras a reinas.

Para lo anterior, se criaron artificialmente abejas reinas de *Scaptotrigona pectoralis* con tratamientos en los que se les suministró alimento larval de su misma o diferente colonia teniendo: 1. Mismo origen genético y misma dieta (G=/A=); 2. Mismo origen genético y diferente dieta (G=/A≠); 3. Diferente origen genético y misma dieta (G≠/A=); y 4. Diferente origen genético y diferente dieta (G≠/A≠).

Extractos cuticulares de las reinas obtenidas en cada tratamiento se sometieron a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para determinar el efecto de alimento larval y origen genético sobre la similitud de perfiles cuticulares, los valores de las áreas debajo de los picos de cada analito se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA) mediante el cual se calcularon *scores* para los componentes 1 y 2 (PC1 Y PC2) mismos que se compararon entre tratamientos con un ANOVA. Asimismo, se realizaron bioensayos de reconocimiento de reinas por obreras de su misma o diferente colonia y se registró el tiempo de contacto agresivo (TCA), tiempo de contacto físico (TCF) y el índice de agresión (IA), con lo que fue posible calcular la respuesta agresiva (RA). Además se calculó la cantidad de obreras que agredían a las reinas, número de agresiones y la latencia. Los resultados obtenidos se analizaron con un ANOVA. A partir de los anteriores resultados se analizó el papel de los hidrocarburos en la aceptación de las nuevas reinas vírgenes.

Los resultados muestran evidencias de que los CHC's están influenciados por el alimento con que son criadas las reinas. Así mismo se encontró que el origen de la larva participa en la expresión de los hidrocarburos presentes en la cutícula de los insectos. Lo anterior

concuerta con estudios previos donde se menciona que en otros insectos los CHC's están determinados genéticamente y por la alimentación.

Así mismo se determinó que la agresión de las obreras hacia las reinas vírgenes no se basa únicamente en los CHC's y que por lo tanto la relación entre el reconocimiento de las reinas y la agresión es más compleja.

Palabras clave: Hidrocarburo cuticular, *Scaptotrigona*, abeja sin aguijón, reconocimiento, producción de reinas.

6.2 Introducción

Los insectos sociales (hormigas, avispas, abejas y termitas) presentan un comportamiento esencial para mantener la integridad de sus sociedades (Liang y Silverman 2000; Howard y Blomquist 2005), el cual les permite reconocer intrusos (individuos que no pertenecen a su nido), ladrones e inclusive parásitos que pueden ser de colonias de la misma o diferente especie (Sorvari *et al.* 2008). Este reconocimiento se basa en la detección de señales específicas de su colonia mediante el intercambio continuo de señales de reconocimiento a través de trofolaxis y alo-acicalamiento (Soroker *et al.* 2003). Sin embargo, parece que las principales señales de reconocimiento son olfativas presentadas por compuestos químicos (Liang y Silverman 2000; Buchwals y Breed 2005), los cuales se cree que están principalmente representados por los hidrocarburos cuticulares (CHC's) (Howard y Blomquist 1982, Lahav *et al.* 1999 Thomas *et al.* 1999, Jungnickel *et al.* 2004, Buchwals y Breed 2005; Pianaro *et al.* 2007, Nunes *et al.* 2008, Nascimento y Nascimento 2012; Septanil *et al.* 2012, Quezada-Euán *et al.* 2013).

La cutícula de cada individuo muestra un perfil químico único que lleva las señales específicas de la especie, así como indicaciones sobre su nido de origen, edad, origen genético, casta, sexo, estado reproductivo y su función en la colonia (Breed *et al.* 1995; Arnold *et al.* 1996, 2000; Howard y Blomquist 2005; Monnin 2006).

La variación de los CHC's podría estar determinado genéticamente (Arnold *et al.* 1996; Nunes *et al.* 2009b), pero al mismo tiempo mediado por el ambiente (Obin 1986; Crosland 1989, Richard *et al.* 2004, 2007). Liang y Silverman (2000) demostraron en hormigas (*Linepithema humile*), que los CHC's de los insectos son utilizados para el reconocimiento de los miembros de la colonia y que estos pueden ser adquiridos de sus presas. Por su parte, Sorvari *et al.* (2008) señalaron que en hormigas de la especie *Formica aquilonia* que la discriminación de individuos que no son del nido se produce más rápido y pronunciadamente cuando existen cambios en la cantidad y composición de la dieta ya que se interrumpe el sistema de reconocimiento de los individuos de la colonia. Thomas *et al.* (2005) realizaron una prueba de laboratorio similar, mencionando que la disponibilidad de alimentos no afecta

la agresividad entre los nidos de la hormiga *L. humile*. Estos autores coinciden en que la composición de la dieta determina el olor de la colonia y que los cambios en ella detonan la agresión entre los insectos, reafirmando la teoría de que los CHC's probablemente se derivan del medio ambiente (Jutsum *et al.* 1979; Heinze *et al.* 1996).

Por otro lado, mencionan que el material de nidificación y el sustrato en el que se desplazan los insectos contribuyen también en la composición de los CHC's (Nunes *et al.* 2011), aunque recientemente, Jones *et al.* 2012 cuestiona dicha suposición, debido a que en *Tetragonisca angustula* la resina utilizada por la colonia no funciona como una fuente primaria para el reconocimiento de compañeros del nido.

El establecimiento natural de una nueva reina en las colonias de todas las abejas altamente sociales se produce exclusivamente a través de “Enjambre” o la sustitución de la reina madre por una reina hija (Michener 2007). *Melipona* parece ser único en abejas eusociales ya que normalmente presenta selección natural intra colonia, las reinas vírgenes emergidas que no fueron elegidas por las obreras mueren por agresión o algunas son capaces de salir de la colonia y penetrar en colonias existentes (parasitismo intraespecífico) (Sommeijer *et al.* 2003). La selección intra colonia es hasta ahora desconocido, sin embargo Jarau *et al.* (2009) mencionan que en *Melipona beecheii*, el comportamiento de la reina influye en el rechazo o aceptación de la misma. También observaron que una reina puede ser aceptada si presenta un comportamiento de dominancia ante las obreras, mediante la agresión.

Por otro lado, las colonias son vulnerables al parasitismo social interespecífico e intraespecífico, esto sucede porque los parásitos sociales pueden beneficiarse nutricionalmente y también reproductivamente de los recursos de la colonia (Sommeijer *et al.* 2003; Alves *et al.* 2009; Wenseleers *et al.* 2010). Van Oystaeyen *et al.* (2013) realizaron un estudio con *Melipona scutellaris* donde encontraron que una reina virgen puede abandonar su nido de origen y puede adoptar estrategias de comportamiento para ser aceptada en un nido ajeno. Primeramente, identificaron que las reinas son selectivas, ya que buscan nidos que no tengan reina. Además, eligen el atardecer para intentar entrar en la colonia, pues es cuando las abejas guardianas reducen significativamente su eficiencia para vigilar.

Aunado a lo anterior, en abejas melíferas se han encontrado mecanismos mediante los cuales las obreras son capaces de discriminar entre reinas (Getz y Smith 1983; Moritz y Southwick 1986). Se menciona que existen señales volátiles determinadas genéticamente, las cuales sirven a las abejas obreras como patrón de reconocimiento (Moritz y Southwick 1986).

Varios estudios en abejas sin aguijón mencionan que algunas especies son capaces de discriminar entre miembros de la colonia de los que no lo son, y dicho reconocimiento está mediado por señales olfativas (Buchwals y Breed 2005), cuyos principales compuestos químicos son los hidrocarburos de cadena larga presentes en la cutícula (Jungnickel *et al.* 2004, Buchwals y Breed 2005; Nunes *et al.* 2008, Pianaro *et al.* 2007), representados, en su mayoría por alcanos y alquenos de cadena larga (23 a 35 átomos de Carbono) (Jungnickel *et al.* 2004; Buchwald y Breed 2005; Pianaro *et al.* 2007; Nunes *et al.* 2008; Nascimento y Nascimento 2012; Septanil *et al.* 2012, Quezada-Euán *et al.* 2013).

Las abejas obreras que cuidan la entrada a la colonia (abejas guardianas) representan la primera barrera ante los posibles intrusos a la colonia, estas abejas guardianas comparan su perfil de compuestos base (Richard *et al.* 2007), de no coincidir, provoca una reacción de ataque o agresión al posible invasor (Quezada-Euán *et al.* 2013). Por lo tanto, la medición de las respuestas agresivas parece una buena aproximación para evaluar la capacidad de reconocimiento químico en insectos sociales (Nascimento y Nascimento 2012).

En el presente estudio se produjeron abejas reinas *in vitro* de *S. pectoralis*. Las larvas recibieron alimento larval de la misma especie, así como de diferente o de la misma colonia y se analizó cuantitativamente sus perfiles cuticulares y la agresión hacia las reinas por parte de las abejas obreras mediante bioensayos de reconocimiento. Nos basamos en el supuesto de que, la agresión a las reinas vírgenes será menor por obreras de colonias de donde se obtuvo el alimento larval con que fueron criadas, así como del mismo origen genético.

6.3 Métodos

Localización del área de estudio y especie utilizada

El estudio se realizó en el Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA) de la Universidad Autónoma de Yucatán en Xmatkuil, ubicado al norte de la Península de Yucatán, México. Se llevó a cabo en el periodo de Febrero a Mayo de 2014. Se utilizaron ocho colonias (nombradas a, b, c, d, e, f, g y h) de abejas nativas de la especie *S. pectoralis* que se encontraban alojadas en cajas colmenas en el meliponario. La abeja *S. pectoralis* (conocida como Kantsac, en lengua Maya), se distribuye en regiones tropicales bajas a lo largo de la vertiente del golfo de México (Ayala 1999). Es una especie de tamaño mediano (5mm) de color dorado-rojizo con escasas vellosidades. La entrada de su nido se caracteriza por presentar forma de trompeta hecha de cerumen (González-Acereto 2008). Su población va de 800 hasta 5000 individuos, existe diferenciación sexual y la reina fisiogástrica es más grande que la obrera (González-Acereto 2008). Es considerada potencialmente apta para ser utilizada comercialmente en la producción de miel (González-Acereto *et al.* 2006).

Producción de reinas in vitro

Para la producción de reinas *in vitro* se tomó como base la metodología propuesta por Baptistella *et al.* (2012) y Menezes *et al.* (2013). Se tomaron dos panales por colonia, uno para coleccionar el alimento y otro para la colecta de larvas. Fue necesario monitorear las colonias a partir del inicio del desarrollo de un nuevo panal para asegurar que la calidad del alimento fuera similar y para que la edad de la larva fuera la idónea.

Se produjeron cuatro tratamientos:

- I. Reinas producidas con larvas de la misma colonia (mismo origen genético, G=) y mismo origen del alimento (A=): reinas G=A=
- II. Reinas producidas con larvas de diferente colonia (diferente origen genético G≠) pero criadas con alimento de la misma colonia (A=): reinas G≠A=

- III. Reinas producidas con larvas de la misma colonia (mismo origen genético $G=$) y criadas con alimento de diferente colonia ($A\neq$): reinas $G=A\neq$
- IV. Reinas producidas con larvas de diferente colonia ($G\neq$) y criadas con diferente alimento ($A\neq$): reinas $G\neq A\neq$. (Ver cuadro 1).

Por lo tanto se utilizan dos colonias por lote y en total se produjeron cuatro lotes de reinas con los mismos tratamientos usando diferentes colonias en cada uno.

Únicamente se utilizaron las reinas de los primeros dos lotes para el análisis de CHC's. Las reinas $G=A=$ y $G\neq A\neq$ explican el efecto de la genética y el alimento sobre los perfiles cuticulares. Los individuos $G\neq A=$ explican el efecto de la genética, mientras que las reinas $G=A\neq$ explican el efecto del alimento sobre la expresión de los CHC's.

De esta manera se pudo agrupar los tratamientos en 1) Mismo origen del alimento, genéticamente diferentes y, 2) Diferente origen del alimento, genéticamente iguales.

Para la colección del alimento larval se tomó un panal de la colonia, el cual tuviera celdas nuevas con cría (<2 días de construidos), se llevaron los panales al laboratorio y se desopercularon las celdas con un lápiz de punta fina, se retiró la larva con una aguja de traslarve, enseguida se colectó todo el alimento larval de las celdas con una micropipeta. El alimento se depositó en microtubos Eppendorf (capacidad de 1.5 mL), posteriormente fue homogenizado con un agitador vórtex (Thermolyne Maxi mis plus, 3200 rpm) de tal manera que el contenido de proteínas, azúcares y humedad fuera similar por individuos producidos dentro de un mismo lote. Fue necesario coleccionar mínimo 2.125 mL por tratamiento, que sirvió para alimentar a las larvas. Se depositó 85 μ L del alimento larval homogenizado en cada uno de los pocillos de una placa rectangular de acrílico tipo ELISA marca Sarstedt (en un ensayo preliminar se determinó que es necesaria esa cantidad de alimento para desarrollar una abeja reina de *S. pectoralis*). La placa tipo ELISA tiene 1.5 cm de espesor, con lados de 8.4 cm por 7.6 cm, con un total de 96 pocillos, cada uno de ellos tiene un diámetro de 4 mm y 8 mm de profundidad, con un volumen total de 100 ml cuyas dimensiones son aproximadas a las de las celdas reales naturales. Todos los materiales a utilizar se lavaron con agua hirviendo y se

esterilizaron bajo rayos UV durante 15 min para evitar la contaminación con microorganismos.

Las placas conteniendo el alimento se mantuvieron a una temperatura promedio de 28°C y 100% de humedad relativa durante 24 horas. Este procedimiento se realizó para conservar la humedad y evitar que el alimento sufra desecación y su consistencia líquida no se vea alterada. Además fue necesario esperar un día entre la transferencia de alimento y la transferencia de larvas para que hubiera una estratificación de los componentes del alimento como ocurre de manera natural en las celdas de cría. Una condición importante para los huevos y las larvas es que requieren flotar sobre el alimento.

Para el traslarve se requería que las larvas jóvenes se encontraran en la primera etapa de desarrollo (5-7 días después de la puesta del huevo) cuando ya hubieran iniciado el periodo de alimentación, para lo cual fue necesario monitorear las colonias revisando diariamente el panal que se iba a utilizar (a partir del inicio del desarrollo de un nuevo panal). Las larvas se asignaron a los tratamientos previamente descritos (ver Cuadro 1). Las celdas se deopercularon y las larvas con la edad adecuada se colocaron en los pocillos con alimento preparados anteriormente. Para esta transferencia se requirió de extremo cuidado pues las larvas no debían sumergirse en el alimento y debían ser colocadas lateralmente sobre la superficie del alimento, es decir, con un lado hacia arriba (contacto con el aire) donde existe un intercambio gaseoso y el otro lado hacia abajo (contacto con el alimento), por lo que es importante que la larva se colocara en la misma posición que como estaba naturalmente en la celda, de lo contrario las larvas no podrían respirar y morirían. La aguja de traslarve debía ser lisa, sin irregularidades en los bordes y ser manejada delicadamente por que las larvas pueden sufrir lesiones en el tegumento larval lo que pondría en peligro su supervivencia.

Para el desarrollo artificial, las larvas se mantuvieron a una temperatura promedio de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y a 100% de humedad relativa, durante cuatro días más. Para lograrlo se aislaron las placas en una habitación que conservaba la temperatura deseada. El mantenimiento de la humedad al 100% se logró colocando la placa en un recipiente plástico cuyas dimensiones eran 128 x 86 x 15 mm y llenando la parte inferior del recipiente con agua (50 mL),

posteriormente se recubrió el recipiente con una película plástica, logrando así el aislamiento de las larvas. El mantenimiento al 100% de humedad en los primeros cuatro días fue importante para evitar la desecación del alimento y para mantener su consistencia líquida porque si se deshidrataba se podría volver más viscoso y las larvas no hubieran podido ingerirlo.

Pasados los cuatro días, la humedad se redujo a 75%, mediante la sustitución del agua por una solución sobresaturada de NaCl (18 g de sal común en 50 mL de agua), sólo se verificó la humedad por observación, al notar que pocos granos de sal ya no eran disueltos. Al bajar la humedad a 75% se evitó la proliferación de hongos y además fue suficiente para evitar que se secase el tegumento de las larvas y pupas. Finalmente, las larvas estuvieron en observación todos los días hasta que se convirtieron en pupas, después se monitorearon cada tres días hasta la emergencia del adulto.

Al finalizar el desarrollo de las larvas se obtuvieron en promedio 28 reinas vírgenes de *S. pectoralis* para cada uno de los cuatro tratamientos, de los cuales únicamente fueron necesarios 25 por tratamiento.

Cuadro 1: Origen del alimento y genético de los cuatro individuos, para los cuatro lotes en la producción de reinas de *Scaptotrigona pectoralis* desarrolladas *in vitro*.

Tratamientos	Simbología
Mismo origen genético y del alimento	G=A=
Diferente origen genético y mismo alimento	G≠A=
Mismo origen genético y diferente alimento	G=A≠
Diferente origen genético y diferente alimento	G≠A≠

*La relación de los individuos depende de la colonia de la cual se tomaron las obreras para los bioensayos de reconocimiento, colonias “a, c, e y g” respectivamente para los lotes 1, 2, 3 y 4.

Estimación de la calidad del alimento larval

De cada una de las 8 colonias se tomaron muestras del alimento larval homogenizado, el cual nos sirvió para las estimaciones de la calidad del alimento. Se evaluó la humedad, porcentaje de azúcares y cantidad de proteína total.

La estimación de la humedad del alimento larval se llevó a cabo por diferencia de pesos (peso húmedo - peso seco), para llevarlo a cabo se tomó una cantidad de la muestra del alimento homogenizado y se depositó en un microtubo Eppendorf de 200 μ L que también fue pesado. Para obtener el peso seco, las muestras se sometieron a 60°C durante 24 h. Los pesos (mg) se obtuvieron con la ayuda de una balanza electrónica analítica (Mettler AC 100).

Para la estimación de azúcares totales, se colocó en un refractómetro (PDX-95 Refractómetro digital Brix 0-95%) una gota de la muestra del alimento larval homogenizado y se tomó lectura del porcentaje de azúcares registrado en el refractómetro.

Para la estimación de proteínas, se tomaron 3 aliquotas (50 μ L cada una) del alimento homogenizado de cada colonia, se depositó en un microtubo eppendorf de 200 μ L y se remitió al Laboratorio de Genética Molecular en la Universidad Nacional Autónoma de México. La estimación se llevó a cabo mediante una detección fluorescente (Bio-Protein assay®) utilizando un lector de microplacas (Beck-Man Coulter DTX 880 Detector multimodo a 590 nm). La cantidad de proteínas en mg/mL para cada colonia se obtuvo usando los cálculos generales de Bradford (1976).

Para la comparación de la calidad del alimento larval entre colonias se realizó un análisis de varianza.

Determinación del peso corporal de las reinas vírgenes

Inmediatamente después de la emergencia de los insectos, aproximadamente 45 días después del traslarve, se tomaron al azar 10 reinas vírgenes de las 25 que se obtuvieron por tratamiento (quedando 15 individuos disponibles para el análisis de CHC's), las cuales se pesaron y posteriormente éstas mismas fueron sometidas a los bioensayos de reconocimiento. Para la

determinación de su peso vivo, se introdujo cada reina en un microtubo Eppendorf y por diferencia de pesos, utilizando una balanza electrónica analítica (Mettler AC 100) se obtuvieron los pesos de cada una. Los pesos de las reinas vírgenes se compararon entre tratamientos con un ANOVA.

Además, se colectaron diez celdas de reinas criadas naturalmente, las cuales se retiraron de su panal, se incubaron en el Laboratorio del Departamento de Apicultura Tropical y se mantuvieron a una temperatura de 28 ± 2 °C a una humedad del 75-80 % hasta su emergencia y se determinó el peso de las mismas. Se realizó un ANOVA para comparar los pesos (mg) de las reinas producidas *in vitro* y las reinas criadas naturalmente.

Análisis de compuestos cuticulares

Para la obtención de los extractos de compuestos cuticulares de las reinas se tomó como base la metodología propuesta por Quezada-Euán *et al.* (2013).

De cada lote, se tomaron las 15 reinas restantes después de seleccionar 10 para los bioensayos. Estas reinas se sacrificaron sometiéndolas a congelación a 4 °C por 15 min y se dejaron posteriormente secar durante dos minutos. Inmediatamente después se realizó la extracción de los compuestos cuticulares, para lo cual, el cuerpo de cada abeja fue sumergido en 1 ml de hexano durante un minuto, contenido en un microtubo cilíndrico con capacidad de 2 mL con cuello y tapón de rosca marca Agilent Technologies. Después se retiró el cuerpo de la abeja reina y otra abeja fue sumergida en el mismo hexano durante un minuto, hasta obtener el extracto de 5 reinas. El mismo procedimiento se repitió con las 10 abejas reinas restantes, cinco por extracto, con lo cual se obtuvieron 3 extractos de reinas por tratamiento. En total se obtuvieron 12 extractos por lote.

Para la identificación y cuantificación de los analitos cuticulares se utilizó la cromatografía de gases (GC) por medio de un equipo (Agilent Technologies 6890) acoplado a espectrometría de masas (MS Agilent Technologies 5973N). La CG fue equipada con una columna de HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25µm) con un horno programado con una temperatura inicial de 60 °C hasta llegar a 300 °C subiendo de 10 °C por minuto y un

adicional de 15 minutos a la temperatura final. El volumen de inyección fue de 1 mL, en modo Splitless. En cuanto a las condiciones del detector selectivo de masas, la temperatura de la cámara de ionización fue de 230 °C y del cuadrupolo de 150 °C. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C. La energía de ionización de 70 eV (electron voltio), con un intervalo de adquisición de 35 a 700 uma (unidades de masa atómica). El tiempo total de análisis fue de 39 minutos. La caracterización de los componentes se consiguió mediante la comparación de los espectros de las masas y tiempos de retención con las provistas por las bibliotecas de espectros de masas disponibles en el mercado (NIST 98, Wiley 275 del espectro de masas Biblioteca, J. Wiley, Nueva York, NY, .UU.). La posición y configuración de los dobles enlaces de alquenos y alcadienos no fueron identificados. Si más de un isómero estaba presente, de acuerdo a su tiempo de retención, fueron numerados por orden de aparición. Con la ayuda del programa Chemstation Integrator se cuantificaron los CHC's y se determinó de cada analito, la altura y área de los picos y los porcentajes relativos obtenidos a partir de los cromatogramas. Para la comparación entre tratamientos se tomó en cuenta las áreas de los picos, los cuales se estandarizaron por peso y para ello se tomó la media de los pesos de las reinas y de las obreras, el valor más elevado fue el 100% y a partir de porcentaje se corrigieron los pesos de la media con el menor valor. Para facilitar el análisis de los datos se obtuvo las raíces cuadradas de cada compuesto.

Debido a la gran cantidad de analitos determinados, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para obtener un menor número de variables (los componentes principales) que explican la similitud o diferencia entre individuos al agrupar la máxima variación de los datos. Los hidrocarburos saturados y los insaturados se analizaron por separado ya que podrían tener un efecto diferente en el reconocimiento entre individuos (Nunes *et al.* 2008, 2009a, 2009b, 2011). Se obtuvieron los *scores* de seis compuestos principales (PC), pero sólo se analizaron los primeros dos debido a que éstos concentran la mayor variación en los datos.

Además, se tomaron 15 abejas obreras por cada colonia (N=120), las cuales se sacrificaron sometiénolas a congelación. Para la extracción de los compuestos cuticulares se realizó el mismo método anteriormente mencionado, obteniéndose 3 repeticiones por colonia con un total de ocho lotes (colonias).

Los *scores* obtenidos de los PC1 de los hidrocarburos saturados e insaturados de las reinas vírgenes de cada lote, se compararon entre tratamientos con un ANOVA (ver Cuadro 2). De igual manera se analizaron las diferencias existentes entre reinas y obreras.

Cuadro 2. Comparaciones realizadas entre tratamientos y los resultados esperados (según ANOVA) de acuerdo a la influencia del alimento y el origen de la larva en la expresión de los hidrocarburos.

Tratamientos comparados	Esperado en Alimento	Esperado en origen de la larva
G=A= vs G≠A=	No diferentes	Diferentes
G=A= vs G=A≠	Diferentes	No diferentes
G=A= vs G≠A≠	Diferentes	Diferentes
G≠A= vs G=A≠	Diferentes	Diferentes
G≠A= vs G≠A≠	Diferentes	No diferentes

Se compararon con un ANOVA los resultados de los *scores* obtenidos del PC1 de las obreras de cada una de las colonias que se utilizaron para los lotes 1 y 2.

Bioensayos de reconocimiento

Para los bioensayos de reconocimiento se tomó como base los trabajos realizados por Richard *et al.* (2004) y Thomas *et al.* (2005), quienes midieron el nivel de agresión en obreras de hormigas. Los tratamientos producidos para los bioensayos fueron los mismos que para el análisis de hidrocarburos, con la diferencia de que se analizaron los cuatro lotes. Cada bioensayo evaluó la respuesta agresiva de las obreras hacia las reinas de cada uno de los tratamientos. Las obreras se obtuvieron de la colonias “a, c, e y g” para los cuatro lotes respectivamente. El bioensayo se llevó a cabo inmediatamente después de que las reinas producidas fueron pesadas. Para llevarlo a cabo se obtuvieron obreras de cada colonia con la ayuda de un aspirador entomológico. Se colectó un total de 100 abejas obreras para cada tratamiento, mismas que se dividieron en 10 grupos con 10 abejas cada uno, cada grupo de

obreras se colocó dentro de un matraz de 50 mL en una habitación oscura durante 15 min para tranquilizarlas. Posteriormente, en cada matraz se introdujo una reina virgen y se video grabó el comportamiento agresivo de las obreras hacia la reina durante 5 min. El anterior procedimiento se repitió con las 9 reinas restantes de cada tratamiento. En total se sometieron a bioensayos 40 reinas por lote. Todos los individuos se utilizaron una sola vez en cada ensayo. Al finalizar los bioensayos de cada tratamiento, las obreras utilizadas se liberaron cerca de la entrada de su colonia.

Para medir la respuesta agresiva, se usaron las 4 categorías (índice de agresión) propuestas por Errard y Hefetz (1997) y que son: 0 =Contacto no agresivo, 1 = Agresión (ataque físico por mordedura o tirar de las antenas o patas), 2 = Lucha (agresión prolongada), 3 = Lesión o muerte de la reina. Se calculó una medida global de respuesta agresiva (AG) utilizando el modelo de Errard y Hefetz (1997):

$$AG = \frac{\sum_{i=1}^n A_i t_i}{T}$$

Donde A_i es el índice de agresión, t_i es la duración del contacto agresivo para cada caso y T es el tiempo de contacto físico entre las obreras y la reina virgen. Se obtuvieron las medias \pm error estándar de las respuestas agresivas para cada tratamiento y se realizó un análisis de varianza para verificar si existen diferencias entre cada tratamiento.

Además se obtuvo el número de obreras agresoras, número de agresiones y el tiempo al primer contacto agresivo (Latencia), se calcularon las medias \pm error estándar y se realizó un ANOVA para verificar si existían diferencias entre cada tratamiento, para lo cual se agruparon los tratamientos de las reinas vírgenes que estaban emparentadas y las que no estaban emparentadas con las obreras con quienes se enfrentaron en los bioensayos de reconocimiento.

Por último, con la prueba de ANOVA se compararon los pesos (mg) de las reinas que recibieron respuesta agresiva con los pesos de aquellas que no.

Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico INFOSTAT/L versión 2012.

6.4 Resultados

Estimación de la calidad del alimento larval

No se encontraron diferencias significativas entre las cuatro colonias utilizadas para obtener el alimento larval para las variables analizadas para determinar su calidad (ver Cuadro 3). Para el porcentaje de humedad se obtuvo una media de 78.46 ± 0.22 (E.E.) y un valor de $F_{(g,l)}=2.16_{(7,16)}$; $p=0.0952$. Por otra parte, la media para el porcentaje de azúcares fue de 48.63 ± 0.2 (E.E.) un valor de $F_{(g,l)}=2.08_{(7,16)}$; $p=0.1073$ y finalmente se determinó para las proteínas totales (ug/uL) una media 13.89 ± 0.45 (E.E.) y un valor de $F_{(g,l)}=0.22_{(7,16)}$; $p=0.9737$.

Cuadro 3: Análisis de la calidad del alimento larval (media \pm E.E.)

Colonia	% Humedad	% Azúcares	Proteínas totales (ug/uL)
a	78.67 ± 0.33	49 ± 0.0	12.94 ± 1.13
b	79.67 ± 0.33	49.67 ± 0.33	13.04 ± 0.45
c	77.67 ± 1.20	47.67 ± 0.88	13.88 ± 0.93
d	77.33 ± 0.33	47.67 ± 0.33	13.93 ± 1.1
e	79 ± 0.58	49 ± 0.58	14.29 ± 0.27
f	78 ± 0.0	48.33 ± 0.67	13.67 ± 3.53
g	79 ± 0.0	49 ± 0.0	15.06 ± 0.82
h	78.33 ± 0.33	48.67 ± 0.33	14.28 ± 0.54
Global	78.46 ± 0.22	48.63 ± 0.20	13.89 ± 0.45
F_(g,l);p	$2.16_{(7,16)}$; 0.095	$2.08_{(7,16)}$; 0.107	$0.22_{(7,16)}$; 0.973

Análisis de compuestos cuticulares

El análisis de compuestos cuticulares mostró un total de 40 hidrocarburos (CHCs) alifáticos (de los cuales 19 son saturados, donde se incluyen los ramificados y cíclicos) en el perfil cuticular entre ambas castas (ver Cuadro 4). El compuesto más abundante determinado en

las obreras fue la 2-Tridecanona, que no se encontró en las reinas vírgenes. El compuesto más abundante en las reinas vírgenes fue el Nonacoseno.

Cuadro 4: Hidrocarburos cuticulares determinados en reinas vírgenes y obreras de *Scaptotrigona pectoralis*

	Reinas vírgenes	Obreras
CHCs insaturados determinados	16	10
CHCs saturados determinados	13	10
Rango	C14- C31	C14- C31
Alcadienos	NE	Pentadecadieno Hexadecadieno
Alcanos ramificados	Metil docosano 11 pentil heneicosano 3 etil 5 (etilbutil) octadecano 11 metil heptacosano	Metil docosano
CHCs saturado cíclicos	Ciclotetracosano Ciclooctacosano	Ciclotetracosano
CHCs insaturado más abundante	Nonacoseno	Tricoseno
CHCs saturado mas abundante	Heptacosano	Tricosano

*CHCs = Hidrocarburos. NE= No encontrados

Análisis de CHC's saturados

La medida de la adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (Coeficiente KMO) mostró un valor de 0.79 y 0.69 para hidrocarburos saturados e insaturados respectivamente lo que significa que la matriz de datos es adecuada para el análisis de PCA.

Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron seis PC's. Los dos primeros PCs explicaron un 74% de la variación, el PC1 explicó el 56% de la variación total en los datos y el PC2 el 18%. Los coeficientes de asociación de las variables individuales con cada uno de los componentes (valor de correlación con las variables originales) indicaron que los analitos que mejor explican la variación agrupada en el PC1 son el Ciclooctacosano (0.98) y el

Octacosano (0.97). Por el contrario el Pentacosano (0.01) prácticamente no tuvo relación con el PC1. Para el caso del PC2, El Tricosano (0.66) es el analito que se relaciona más con él y el Octacosano (0.01) presentó una nula relación con el mismo (Anexo: Cuadro 8).


Los resultados del análisis de varianza que se realizó a los *scores* CHC's saturados del PC1 de los tratamientos del lote 1 (Cuadro 5), muestran que existen diferencias significativas al comparar $G=A=$ vs $G=A\neq$: $F_{(g,l)}=27.47_{(1,4)}$; $p=0.0063$ y $G\neq A=$ vs $G\neq A\neq$: $F_{(g,l)}=9.81_{(1,4)}$; $p=0.0351$, lo que sugiere que el alimento puede tener un efecto sobre los perfiles cuticulares, sin embargo, los grupos control, donde el alimento es el mismo en ambos tratamientos, es decir $G=A=$ vs $G\neq A=$ y en $G=A\neq$ vs $G\neq A\neq$ se encontró que existen diferencias significativas: $F_{(g,l)}=19.76_{(1,4)}$; $p=0.0113$ y $F_{(g,l)}=10.25_{(1,4)}$; $p=0.0329$, respectivamente, lo que indica que el origen de la larva podría estar interviniendo en la expresión de CHC's.


Para el lote 2 se observa que existen diferencias significativas al comparar $G=A=$ vs $G=A\neq$: $F_{(G,L)}=152.58_{(1,4)}$; $p=0.0002$ y $G=A=$ vs $G\neq A\neq$: $F_{(g,l)}=43.77_{(1,4)}$; $p=0.0027$, lo que indica un resultado similar del efecto del alimento, mientras que los resultados para $G=A=$ vs $G\neq A=$: $F_{(g,l)}=25.76_{(1,4)}$; $p=0.0071$, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas. Para los grupos control, en $G=A=$ vs $G\neq A=$ existieron diferencias significativas: $F_{(g,l)}=25.76_{(1,4)}$; $p=0.0071$, mostrando que el origen de la larva interfiere en los CHC's; mientras que en $G=A\neq$ vs $G\neq A\neq$: $F_{(g,l)}=3.70_{(1,4)}$; $p=0.1266$, no hubo evidencias de diferencias estadísticas, lo que podría significar que la combinación de criar reinas con el mismo alimento y la variación genética existente no fue lo suficientemente grande como para marcar diferencias en el perfil cuticular.

Analisis de CH's insaturados

Para el caso de los hidrocarburos insaturados los primeros dos PCs explicaron una variación del 68% de los datos, el PC1 explicó el 56% y el PC2 el 12% de la variabilidad total en este tipo de compuestos. Los coeficientes de asociación de las variables individuales con cada uno de los componentes (valor de correlación con las variables originales) indicaron que los analitos que mejor explican la variación agrupada en el PC1 son el 3-Eicoseno (0.97) y el Pentacoseno (-0.91). El Tetracoseno (0.04) prácticamente no se relaciona con el PC1. El 3

etil 5 (etilbutil) octadeceno (0.62) y el Docoseno (-0.60) resultaron los analitos que explican mejor el PC2. El Hexadecadieno (0.02) y el Triaceno (-0.04) presentaron una nula relación con el PC2 (Anexo, Cuadro 8).

Los resultados del análisis de varianza que se realizó a los *scores* de CHC's insaturados del PC1 de los tratamientos del lote 1 (Cuadro 5), muestran que existen diferencias significativas al comparar $G=A=$ vs $G=A\neq$: $F_{(g.l.)}=14.59_{(1,4)}$; $p=0.0188$ y $G\neq A=$ vs $G\neq A\neq$: $F_{(g.l.)}=9.35_{(1,4)}$; $p=0.0377$, concordando con los resultados esperados respecto al factor Alimento, sin embargo, los grupos control donde el alimento es el mismo en ambos tratamientos, es decir $G=A=$ vs $G\neq A=$ no existieron diferencias significativas (en la Figura 1 se observa la semejanza entre ambos tratamientos 

Para el lote 2 se observa que existen diferencias significativas al comparar $G=A=$ vs $G=A\neq$: $F_{(g.l.)}=14.58_{(1,4)}$; $p=0.0188$ y $G=A=$ vs $G\neq A\neq$: $F_{(g.l.)}=8.84_{(1,4)}$; $p=0.0410$, concordando con los resultados esperados respecto al factor Alimento, mientras que para los grupo control, en $G=A=$ vs $G\neq A=$ existieron diferencias significativas (en la Figura 2 se observan las diferencias entre los tratamientos 

42

Cuadro 5: Análisis de las comparaciones entre tratamientos de los *scores* del PC1 de las reinas vírgenes de *Scaptotrigona pectoralis* que se desarrollaron *in vitro* (ANOVA)

Lote	Tratamiento	Hidrocarburos insaturados		Hidrocarburos saturados	
		Medias (E.E.)	F _{(g.l.); p}	Medias (E.E.)	F _{(g.l.); p}
1	G=A= vs G≠A=	0.98 (0.10); 0.58 (0.08)	0.00 _{(1,4);} >0.99	1.00 (0.08); 0.26 (0.15)	19.76 _{(1,4);} 0.0113
	G=A= vs G=A≠	0.98 (0.10); 0.57 (0.04)	14.59 _{(1,4);} 0.0188	1.00 (0.08); 0.32 (0.10)	27.47 _{(1,4);} 0.0063
	G=A= vs G≠A≠	0.98 (0.10); 1.03 (0.12)	0.10 _{(1,4);} 0.7717	1.00 (0.08); 1.02 (0.19)	0.0049 _{(1,4);} 0.9477
	G≠A= vs G=A≠	0.58 (0.08); 0.57 (0.04)	0.03 _{(1,4);} 0.8630	0.26 (0.15); 0.32 (0.10)	0.11 _{(1,4);} 0.7547
	G≠A= vs G≠A≠	0.58 (0.08); 1.03 (0.12)	0.03 _{(1,4);} 0.0377	0.26 (0.15); 1.02 (0.19)	9.81 _{(1,4);} 0.0351
	G=A≠ vs G≠A≠	0.57 (0.04); 1.03 (0.12)	13.19 _{(1,4);} 0.0221	0.32 (0.10); 1.02 (0.19)	10.25 _{(1,4);} 0.0329
2	G=A= vs G≠A=	0.86 (0.09); 0.38 (0.08)	15.05 _{(1,4);} 0.0179	1.29 (0.07); 0.31 (0.18)	25.76 _{(1,4);} 0.0071
	G=A= vs G=A≠	0.86 (0.09); 0.49 (0.03)	14.58 _{(1,4);} 0.0188	1.29 (0.07); 0.43 (0.02)	152.58 _{(1,4);} 0.0002
	G=A= vs G≠A≠	0.86 (0.09); 0.54 (0.06)	8.84 _{(1,4);} 0.041	1.29 (0.07); 0.59 (0.08)	43.77 _{(1,4);} 0.0027
	G≠A= vs G=A≠	0.38 (0.08); 0.49 (0.03)	1.58 _{(1,4);} 0.2772	0.31 (0.18); 0.43 (0.02)	0.40 _{(1,4);} 0.56
	G≠A= vs G≠A≠	0.38 (0.08); 0.54 (0.06)	2.46 _{(1,4);} 0.1915	0.31 (0.18); 0.59 (0.08)	1.98 _{(1,4);} 0.2323
	G=A≠ vs G≠A≠	0.49 (0.03); 0.54 (0.06)	0.50 _{(1,4);} 0.5171	0.43 (0.02); 0.59 (0.08)	3.70 _{(1,4);} 0.1266

Al comparar con un ANOVA los *scores* obtenidos de los PCA's de los perfiles cuticulares del Lote 1 y Lote 2, se observó que no existieron diferencias significativas para el PC1 de los CHC's saturados: F_(g.l.)=1.2E-03_(1,22); p=0.9722, mientras que para los insaturados si existieron diferencias significativas: F_(g.l.)=5.23_(1,22); p=0.0321. Para los PC2's si existieron

diferencias significativas en los CHC's saturados: $F_{(g,1)}=16.02_{(1,22)}$; $p=0.0006$ y para los insaturados: $F_{(g,1)}=80.76_{(1,22)}$; $p<0.0001$. En la Figura 1 y 2, se puede observar los resultados anteriores.

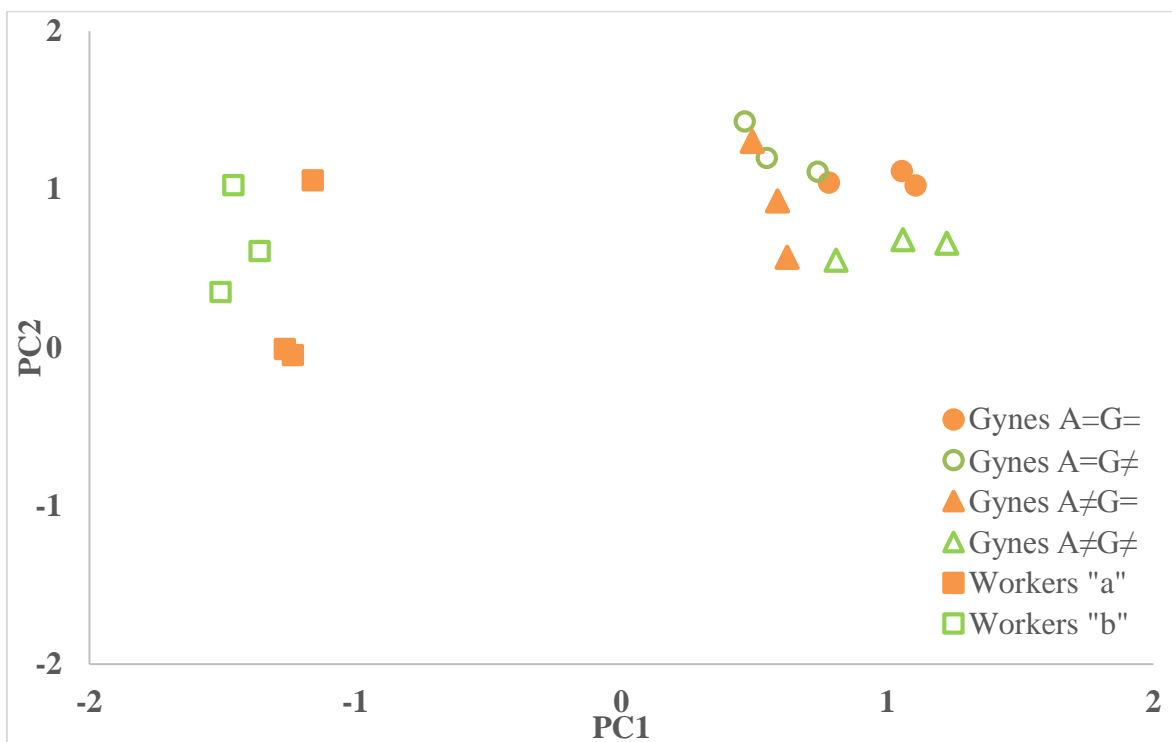


Figura 1: Representación gráfica de los resultados de los componentes principales (PC1 vs PC2) para reinas vírgenes producidas *in vitro* y obreras de las colonias de *Scaptotrigona pectoralis* derivados de hidrocarburos insaturados. El lote 1 se desarrollo con las colonias “a” y “b”.

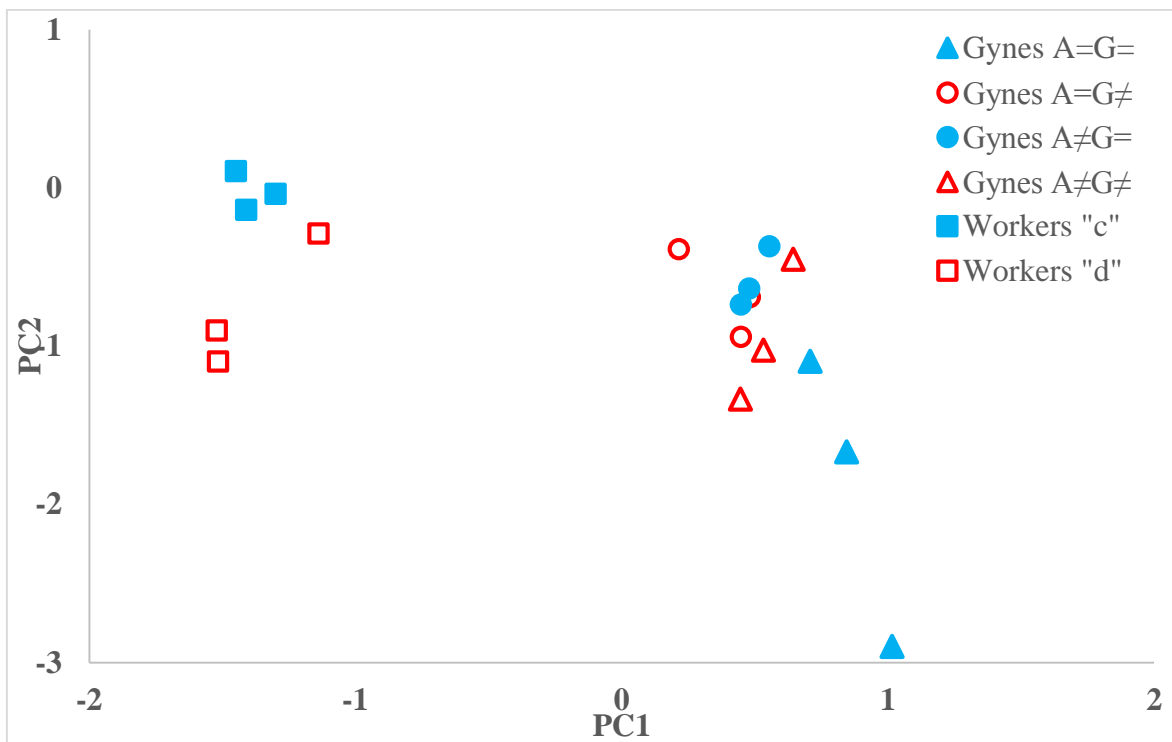


Figura 2: Representación gráfica de los resultados de los componentes principales (PC1 vs PC2) para reinas vírgenes producidas *in vitro* y obreras de las colonias de *Scaptotrigona pectoralis* derivados de hidrocarburos insaturados. El lote 2 se desarrollo con las colonias “c” y “d”.

Al comparar con un ANOVA los *scores* obtenidos de los PCA’s de los perfiles cuticulares de las reinas vírgenes y las obreras, se observó que existieron diferencias significativas entre castas para los PC1’s tanto de hidrocarburos saturados e insaturados: $F_{(g,1)}=246.73_{(1,34)}$; $p<0.0001$ y $F_{(g,1)}=646.70_{(1,34)}$; $p<0.0001$, respectivamente. Contrariamente, los resultados de los PC2’s para ambos tipos de hidrocarburos no mostraron diferencias significativas: $F_{(g,1)}=1.68_{(1,34)}$; $p=0.2038$ para saturados y $F_{(g,1)}=0.05_{(1,34)}$; $p=0.8296$ para insaturados (Figura 1).

Al analizar las varianzas de los perfiles cuticulares de las obreras de las cuatro colonias (Cuadro 6) que se utilizaron para desarrollar los lotes 1 y 2, se encontró que no existen diferencias en los hidrocarburos saturados del PC1: $F_{(g,1)}=3.58_{(3,8)}$; $p=0.0661$; ni en el PC2: $F_{(g,1)}=1.79_{(3,8)}$; $p=0.2263$. Sin embargo, existen diferencias significativas en los *scores* de los

hidrocarburos insaturados del PC1: $F_{(g.l.)}=6.19_{(3,8)}$; $p=0.0176$ y también para el PC2: $F_{(g.l.)}=6.40_{(3,8)}$; $p=0.0161$ de igual manera, existieron diferencias significativas para los *scores* del PC2 de los hidrocarburos insaturados: $F_{(g.l.)}=6.40_{(3,8)}$; $p=0.0161$, las colonias A y B resultaron con medias estadísticamente diferentes a la colonia D.

Cuadro 6: Análisis de varianza de los *scores* obtenidos a partir de los hidrocarburos cuticulares de las obreras de las diferentes colonias de *Scaptotrigona pectoralis*.

Colonia	PC1		PC2	
	Saturados (medias \pm E.E)	Insaturados (medias \pm E.E)	Saturados (medias \pm E.E)	Insaturados (medias \pm E.E)
A	-1.28 \pm 0.05	0.79 \pm 0.41a	-1.22 \pm 0.03	0.33 \pm 0.36c
B	-1.16 \pm 0.04	-0.65 \pm 0.26b	-1.44 \pm 0.04	0.66 \pm 0.2c
C	-1.41 \pm 0.03	0.40 \pm 0.11ab	-1.39 \pm 0.04	-0.03 \pm 0.07cd
D	-1.38 \pm 0.10	0.63 \pm 0.17a	-1.39 \pm 0.13	-0.76 \pm 0.24d
P	0.0661	0.0176	00.2263	0.0161
F (g.l.)	3.58 (3,8)	6.19 (3,8)	1.79 (3,8)	6.40 (3,8)

*Medias con una letra común (comparación entre columnas) no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Bioensayos de reconocimiento

Al analizar con Kruskal Wallis los datos de las medias de los parámetros de agresividad hacia las reinas vírgenes por parte de las obreras, se observó que no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas de las obreras que están emparentas con las reinas de las que si lo están (ver Cuadro 7), para la respuesta agresiva, en el lote 1: $F_{(g.l.)}=0.44_{(1,38)}$; $p=0.5134$, para el lote 2: $F_{(g.l.)}=0.14_{(1,38)}$; $p=0.7124$, para el lote 3: $F_{(g.l.)}=2.11_{(1,38)}$; $p=0.1543$ y para el lote 4: $F_{(g.l.)}=1.26_{(1,38)}$; $p=0.2693$.

Cuadro 7: Medias de parámetros de agresividad en ensayos de reconocimiento de las reinas vírgenes de *Scaptotrigona pectoralis* desarrolladas *in vitro* por parte de obreras (media \pm E.E).

Lote	Parentesco	IA	TCA	TCF	RA	OA	A	L
1	Emparentadas	0.35 (± 0.17)	8.85 (± 4.94)	29.7 (± 9.40)	0.19 (± 0.09)	0.40 (± 0.2)	0.40 (± 0.2)	249.55 (± 23.34)
	No emparentadas	0.15 (± 11)	10.44 (± 9.94)	20.47 (± 10.85)	0.1 (± 0.09)	0.3 (± 0.21)	0.3 (± 0.21)	277.7 (± 16.31)
	F_(g,l); p	0.32_(1,38); 0.35	0.02_(1,38); 0.88	0.41_(1,38); 0.52	0.44_(1,38); 0.51	0.12_(1,38); 0.72	0.12_(1,38); 0.72	0.98_(1,38); 0.32
2	Emparentadas	0.32 (± 0.17)	6.58 (± 3.19)	16.84 (± 5.53)	0.15 (± 0.08)	0.53 (± 0.37)	0.53 (± 0.37)	253.74 (± 24.26)
	No emparentadas	0.38 (± 0.18)	13.84 (± 10.51)	23.15 (± 11.63)	0.21 (± 0.14)	0.67 (± 0.37)	0.67 (± 0.37)	246.67 (± 23.51)
	F_(g,l); p	0.03_(1,38); 0.81	0.4_(1,38); 0.53	0.22_(1,38); 0.63	0.14_(1,38); 0.71	0.07_(1,38); 0.79	0.07_(1,38); 0.79	0.04_(1,38); 0.83
3	Emparentadas	0.58 (± 0.19)	10.66 (± 4.3)	48.45 (± 16.19)	0.14 (± 0.06)	1 (± 0.37)	0.89 (± 0.23)	217.89 (± 26.77)
	No emparentadas	0.86 (± 0.23)	20.63 (± 6.81)	64.54 (± 14.96)	0.36 (± 0.13)	1.71 (± 0.5)	1.24 (± 0.35)	212.48 (± 23.52)
	F_(g,l); p	0.52_(1,38); 0.42	1.46_(1,38); 0.23	0.53_(1,38); 0.46	2.11_(1,38); 0.15	1.27_(1,38); 0.26	0.49_(1,38); 0.48	0.02_(1,38); 0.87
4	Emparentadas	0.79 (± 0.21)	23.51 (± 8)	68.3 (± 15.05)	0.35 (± 0.1)	1.89 (± 0.61)	1.47 (± 0.43)	200.47 (± 27.40)
	No emparentadas	0.52 (± 0.19)	16.06 (± 6.07)	55.02 (± 16.39)	0.2 (± 0.09)	1.29 (± 0.57)	1.1 (± 0.45)	223.19 (± 25.72)
	F_(g,l); p	0.77_(1,38); 0.31	0.56_(1,38); 0.45	0.35_(1,38); 0.55	1.26_(1,38); 0.26	0.53_(1,38); 0.47	0.37_(1,38); 0.54	0.37_(1,38); 0.54

Tx= Tratamiento; IA= índice de agresión, TCA= Tiempo de contacto agresivo, TCF= Tiempo de contacto físico, RA= respuesta agresiva, OA= Número de obreras agresoras, A= Número de agresiones y L= Latencia

Al comparar los pesos (mg) de las reinas de *S. pectoralis* producidas *in vitro* que recibieron respuesta agresiva (n=48, 30%) de las que no la recibieron (n=112, 70%) por parte de las obreras en los bioensayos de reconocimiento, se obtuvo una media de 26.5 ± 0.6 (E.E.) y 27.3 ± 0.4 (E.E.) respectivamente. Al comparar ambos tipos de reina con ANOVA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(g.l.)} = 1.06_{(1,158)}$; $p = 0.3042$).

6.5 Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe evidencia suficiente de que el alimento afecta en la expresión de hidrocarburos cuticulares en abejas sin aguijón, incluso se muestran evidencias de que el origen de la larva también podría estar influyendo en la expresión de los mismos. Se observa que el perfil cuticular de reinas de un mismo origen genético y criadas con alimento de distinto origen es diferente. Para el Lote 1, tanto para CHC's saturados como insaturados, los resultados muestran que $G=A=$ vs $G=A\neq$ y $G\neq A=$ vs $G\neq A\neq$ concuerdan con los resultados esperados para indicar que el alimento influye en la expresión de CHC's, Para los CHC's insaturados también coinciden los resultados al comparar los tratamientos $G=A=$ vs $G\neq A=$. Sin embargo, sería recomendable que a futuro se verifique que tanto influye el factor genético en la expresión de CHC's ya que si el factor alimento participa en la expresión de CHC's, en los resultados de $G=A=$ vs $G\neq A\neq$ debieron existir diferencias, las cuales no se presentaron, lo que nos daría evidencias de que quizá las colonias estaban emparentadas y esta situación podría estar opacando las diferencias que deberían de haberse mostrado debido al factor alimento.

Para el Lote 2, tanto para saturados como insaturados, los resultados muestran que $G=A=$ vs $G=A\neq$ y $G=A=$ vs $G\neq A\neq$ también concuerdan con los resultados esperados para indicar que el alimento influye en la expresión de CHC's. Mientras que para $G=A=$ vs $G\neq A=$ y $G\neq A=$ vs $G\neq A\neq$ concuerdan con lo esperado de acuerdo al origen de las larvas lo que reforzaría la aseveración de que el alimento también podría estar influyendo en la expresión de CHC's.

Los resultados de $G\neq A=$ vs $G=A\neq$ no mostraron diferencias significativas para ninguna de las comparaciones realizadas (ni para lotes ni para saturados e insaturados), lo que nos podría estar indicando que al criar reinas a partir de una colonia con el alimento de otra y viceversa, los CHC's resultantes de todas las reinas serán similares.

El presente estudio proporciona un vínculo entre estudios previos que discuten acerca de que los perfiles cuticulares de los insectos podrían estar determinados por factores genéticos y medio ambientales (llámese alimento) y que los hidrocarburos cuticulares interfieren en la respuesta agresiva.

En este sentido, Arnold *et al* (2000) menciona que en *Apis mellifera*, la cutícula de los insectos se basa (en parte) por componentes genéticos y que difiere entre subfamilias, lo que sugiere que podría ser utilizado por las obreras como “etiquetas” para el reconocimiento de compañeros del nido. Por su parte, Nunes *et al* (2008) mencionan que las abejas sin aguijón deberían presentar una mayor homogeneidad en el perfil químico intracolonia, esto debido a que la reina (a diferencia de la reina de *Apis*) se aparea únicamente con un sólo macho. Por lo tanto, podríamos suponer que el perfil cuticular intercolonial debería presentar una mayor heterogeneidad, corroborando lo encontrado en los presentes resultados.

Por otro lado, los resultados obtenidos con Liang y Silverman (2000) muestran que en hormigas argentinas (*Linepithema humile*), los CHC's varían de acuerdo a la dieta con que son alimentadas, puesto que los perfiles encontrados en la cutícula de los insectos revelaron patrones similares a los presentes en la dieta con que fueron alimentados. Liang y Silverman (2000) también mencionan que el cambio en los perfiles cuticulares de los compañeros de nido deriva a una agresión intracolonia lo que podría indicar que los CHC's son utilizados para discriminar y reconocer a los individuos de su colonia.

Por su parte, los resultados presentados por Sorvari *et al.* (2008) muestran en hormigas de la especie *F. aquilonia* que al producirse cambios en el equilibrio nutricional que modifique las señales químicas de los individuos, ya sea por cambios en la cantidad y composición en la dieta, puede interrumpir el sistema de reconocimiento de los individuos de la colonia. Thomas *et al.* (2005) coincide con lo presentado por Sorvari *et al* (2008), pues sugieren que la composición de la dieta en *L. humile* determina el olor de la colonia y que los cambios en ella detonan la agresión entre los insectos. Lo anterior, en parte, coincide con nuestros resultados, el medio ambiente (alimento), representa una fuente para la expresión de los CHC's, pero difiere en las respuestas agresivas, ya que en nuestro estudio, la variación en el perfil cuticular no se reflejó en la discriminación de los compañeros del nido.

Si nuestro estudio mostró diferencias en los perfiles cuticulares tanto para el origen de la larva como alimentario y dado que todos los analitos están presentes en los cuatro tratamientos, quizá esta variación se deba a las diferencias existentes a la abundancia relativa,

al respecto, Akino *et al* (2004) mencionan que el reconocimiento intracolonia de insectos sociales parece basarse en la abundancia relativa de los componentes individuales en lugar de un modelo general basado en la presencia o ausencia independientes de señales de reconocimiento. Sí en nuestro estudio no se presentó una conducta agresiva, ¿significa que no hubo reconocimiento de los compañeros del nido? Estudios realizados por Martin *et al.* (2008 y 2009) muestran que la falta de agresión no significa necesariamente falta de reconocimiento, ya que la relación entre las señales de reconocimiento y la agresión podría ser más compleja. Por ejemplo, Breed *et al.* (1995) demostraron que los adultos emergen con su cutícula con lo que llaman “pizarra en blanco”, carente de cualquier señal de reconocimiento, mencionan que adquieren estas señales después de que se han expuesto al sustrato de su panal (Breed *et al.* 1995), siguiendo estas aseveraciones, quizá “la pizarra en blanco” para las reinas vírgenes de *S. pectoralis* está representada por los compuestos que se muestran en los cuadros 9 y 10 (sin tomar en cuenta la abundancia relativa) y por lo tanto este perfil base carece de señales de reconocimiento; o quizá, el comportamiento del individuo influye en su discriminación. Al respecto, Jarau *et al.* (2009) encontraron que en *M. beecheii*, el comportamiento de la reina influye en el rechazo o aceptación de la misma, mencionan que si la hembra corre rápidamente, con movimientos circulares y abatiendo sus alas, desencadena ataques por parte de las obreras, por el contrario, las reinas que se quedaban inmóviles en el panal evitaban la conducta agresiva de las obreras. También observaron que una reina a la cual las obreras aceptaron, presentó un comportamiento donde su intención era agredir a las obreras, ellos sugieren que su conducta es un modo de demostrar su dominancia ante las obreras (Jarau *et al.* 2009), en el presente estudio ocurrió lo contrario que lo reportado por Jarau *et al.* (2009), se observó que en las reinas donde predominó el contacto no agresivo por parte de las obreras, las reinas movían el abdomen en círculos, mientras se frotaban tórax, abdomen y antenas con el primer par de patas. Este comportamiento podría deberse, según lo mencionado anteriormente, a dos posibles situaciones, una es que este ritual sea un comportamiento de dominancia en la especie *S. pectoralis*, lo que nos indicaría que existen diferencias en el comportamiento de dominancia entre las tribus Meliponini y Trigonini; y dos, que quizá de esta manera las reinas logran disipar sus olores o feromonas de tal forma que las obreras las puedan reconocer como reinas nuevas. La trofolaxis fue otro

comportamiento que se logró observar con frecuencia en este estudio, al ocurrir este comportamiento, las obreras presentaban una conducta menos agresiva, Soroker *et al.* (2003) mencionan que esta conducta permite el reconocimiento de los individuos por medio de intercambio de señales, con la intención de mantener la integridad de la colonia.

Los hidrocarburos que se encontraron para las obreras tales como el tricosano y el pentacosano, concuerdan con los reportados para otras especies de abejas sin aguijón (Abdalla *et al.* 2003, Jungnickel *et al.* 2004; Pianaro *et al.* 2007). Al igual que Nunes *et al.* (2009b), nuestro estudio revela hidrocarburos con menos de 21 átomos de carbono, cuya función es hasta ahora desconocida.

En el estudio que realizó Quezada-Euán *et al.* (2013), la discriminación se llevó a cabo siguiendo el modelo de reconocimiento de compañeros del nido que parece basarse en la abundancia relativa de los componentes individuales en lugar del modelo general basado en la presencia o ausencia de señales independientes es el llamado indeseable-ausente (Akino *et al.* 2004), el cual predice que los individuos serán aceptados sólo si su plantilla no presenta compuestos indeseables es decir, diferentes a las de las abejas guardianas. Nuestro estudio parece seguir el modelo Indeseable-ausente, ya que las obreras no encontraron un compuesto indeseable que detonará una respuesta agresiva, por lo tanto, el modelo deseable-presente no concuerda con el presente estudio ya que de haberlo hecho, las abejas guardianas hubieran discriminado a las reinas vírgenes, porque no hay modo de que detectaran los compuestos deseables porque las reinas vírgenes no estaban impregnadas con olores de la colonia por que no estuvieron en ningún momento en contacto con ella. Con lo anterior podríamos suponer que el medio ambiente extrínseco también influye en la expresión de CHC's, concordando con otros estudios (Obin 1986; Crosland 1989; Richard *et al.* 2004, 2007).

Podemos concluir que la expresión de los hidrocarburos cuticulares de las reinas vírgenes de *S. pectoralis* podría estar determinado tanto por el origen de la larva como por el medio ambiente, en este caso el alimento. Sin embargo, hacen falta estudios más profundos y detallados para esclarecer la contribución relativa de ambos.

En lo que respecta al reconocimiento, la agresión de las obreras hacia las reinas vírgenes de *S. pectoralis* es un comportamiento que está determinado por diversos factores y no únicamente por los hidrocarburos cuticulares.

6.6 Agradecimientos

Agradecemos a los árbitros anónimos por sus valiosos comentarios sobre el manuscrito.

Se agradece a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio a través del proyecto “Conservación de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Meliponini): identificación de especies crípticas e indicadores de diversidad genética”. SEP-CONACYT 103341.

Por último, también se agradece al MC Humberto Moo Valle, al Dr. William May Itzá y al Dr. Víctor Parra Tabla y a todos los miembros del Departamento de Apicultura Tropical de la UADY por su valioso apoyo, consejos y colaboración para la realización de la presente tesis.

6.7 Referencias

- Abdalla FC, Jones GR, Morgan ED, Cruz-Landim C (2003) Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genet Mol Res* 2:191-199
- Alves DA, Imperatriz-Fonseca VL, Franco TM, Santos-Filho PS, Nogueira-Neto P, Billen J, Wenseleers T (2009) The queen is dead long live the workers: intraspecific parasitism by workers in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Mol. Ecol* 18: 4102-4111. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04323.x
- Akino T, Yamamura K, Wakamura S, Yamaoka R (2004) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nestmate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Appl Entomol Zool* 39:381-387. doi: 10.1303/aez.2004.381
- Arnold G, Quenet B, Cornuet JM, Masson C, De Schepper B, Estoup A, Gasul P (1996). Kin recognition in honeybees. *Nature* 379:498.
- Arnold G, Quenet B, Masson C (2000) Influence of social environment on genetically based subfamily signature in the honeybee. *J Chem Ecol* 26:2321-2333. doi: 10.1023/A:1005574810743
- Ayala R. (1999) Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomol Mexicana* 106:128.
- Baptistella AR, Souza CCM, Santana WC, Egea SAE (2012) Techniques for the *in vitro* production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). *Sociobiol* 59:297-310
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Breed MD, Garry MF, Pearce AN, Hibbard BE, Bjostad LB, Page Jr RE (1995) The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Anim Behav* 50:489-496. doi: 10.1006/anbe.1995.0263
- Buchwald R, Breed MD (2005) Nestmate recognition cues in the stingless bee *Trigona fulviventris*. *Anim Behav* 70:1331-1337. doi: 10.1016/j.anbehav.2005.03.017
- Crosland MWJ (1989) Kin recognition in the ant *Rhytidoponera confusa* I. Environmental Odour. *Anim Behav* 37:912-919. doi: 10.1016/0003-3472(89)90135-8
- Errar D, Hefetz A (1997) Label familiarity and discriminatory ability of ants reared in mixed groups. *Insectes Soc* 44:189-198. doi: 10.1007/s000400050040
- Getz WM, Smith KB (1983) Genetic kin recognition: honey bees discriminate between full and half sisters. *Nature* 302:147-148. Doi: 10.1038/302147a0
- González-Acereto JA, Quezada-Euán JG, Medina-Medina LA (2006) New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatan: results of an integral program to rescue and promote the activity. *J Apicult Res* 45:234-239. doi: 10.3896/IBRA.1.45.4.14
- González-Acereto JA (2008) Cría y manejo de abejas nativas sin aguijón en México. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Heinze J, Foitzik S, Hippert A, Hölldobler B (1996) Apparent dear enemy phenomenon and environment-based recognition cues in the ant *Leptothorax nylanderi*. *Ethology* 102:510-522. doi: 10.1111/j.1439-0310.1996.tb01143.x
- Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50:371-93. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130359
- Jarau S, van Veen JW, Aguilar I, Ayasse M (2009) Virgin queen execution in the stingless bee *Melipona beecheii*: the sign stimulus for worker attacks. *Apidologie* 40:496-507. doi: 10.1051/apido/2009022

- Jones SM., van Zweden JS, Grüter C, Menezes C, Alves DA, Nunes-Silva P, Czaczkes T, Imperatriz-Fonseca VL, Ratnieks FLW (2012) The role of wax and resin in the nestmate recognition system of a stingless bee, *Tetragonisca angustula*. Behav Ecol Sociobiol 66:1-12. Doi: 10.1007/s00265-011-1246-7
- Jungnickel H, da Costa AJS, Tentschert J, Flávia E, Patricio LRA, Imperatriz-Fonseca VL, Drijfhout F, Morgan ED (2004) Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera:Apidae). J Insect Physiol 50:761-766. doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.05.011
- Jutsum AR, Saunders TS, Cherrett JM (1979) Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. Anim Behav 27:839-844. doi: 10.1016/0003-3472(79)90021-6
- Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK(1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. Naturwissenschaften 86:246-249. doi: 10.1007/s001140050609
- Liang D, Silverman J (2000) “You are what you eat”: Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. Naturwissenschaften 87:412–416. doi: 10.1007/s001140050752
- Martin SJ, Vitikainen E, Helanterä H, Drijfhout FP (2008) Chemical basis of nest-mate discrimination in the ant *Formica exsecta*. Proc R Soc B Biol Sci 275:1271-1278.
- Martin SJ, Helanterä H, Kiss L, Lee YR, Drijfhout FP (2009) Polygyny reduces rather than increases nestmate discrimination cue diversity in *Formica exsecta* ants. Insectes Soc 56:375-383.
- Menezes C, Vollet-Neto A, Imperatriz-Fonseca VL (2013) An advance in the *in vitro* rearing of stingless bee queens. Apidologie 44:491-500. doi: 10.1007/s13592-013-0197-6

- Michener CD (2007) The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore, London
- Monnin T (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fennici* 43:515-530.
- Moritz RFA, Southwick EE (1986) Analysis of queen recognition by honey bee workers (*Apis mellifera* L.) in a metabolic bio-assay. *Exp Biol* 46:45-49
- Nascimento DL, Nascimento FS (2012) Acceptance threshold hypothesis is supported by chemical similarity of cuticular hydrocarbons in a stingless bee, *Melipona asilvai*. *J Chem Ecol* 38:1432-1440. doi: 10.1007/s10886-012-0194-7
- Nunes TM, Nascimento FS, Turatti IC, Lopes NP, Zucchi R (2008) Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Anim Behav* 75:1165-1171. doi: 10.1016/j.anbehav.2007.08.028
- Nunes TM, Turatti IC, Lopes NP, Zucchi R (2009a) Chemical signals in the stingless bee, *Frieseomelitta varia*, indicate caste, gender, age and reproductive status. *J Chem Ecol* 35:1172-1180. doi: 10.1007/s10886-009-9691-8
- Nunes TM, Turatti IC, Mateus S, Nascimento FS, Lopes NP, Zucchi R (2009b) Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. *Genet Mol Res* 8:589-595.
- Nunes TM, Mateus S, Turatti IC, Morgan E, Zucchi R (2011) Nestmate recognition in the stingless bee *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sources of chemical signals. *Anim Behav* 81:463-467. doi: 10.1016/j.anbehav.2010.11.020
- Obin MS (1986) Nestmate recognition cues in laboratory and field colonies of *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae): effect of environment and role of cuticular hydrocarbons. *J Chem Ecol* 12:1965-1975. doi: 10.1007/BF01041858

- Pianaro A, Flach A, Patricio EF, Nogueira-Neto P, Marsaioli AJ (2007) Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. *J Chem Ecol* 33:971-984. doi: 10.1007/s10886-007-9274-5
- Quezada-Euán JJG, Ramírez J, Eltz T, Pokorny T, Medina R, Monsreal R (2013) Does sensory deception matter in eusocial obligate food robber systems? A study of *Lestrimelitta* and stingless bee hosts. *Anim Behav* 85:817:823. Doi: 10.1016/j.anbehav.2013.01.028
- Richard FJ, Hefetz A, Christides JP, Errard C (2004) Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology* 14:9-16. doi: 10.1007/s00049-003-0251-3
- Richard FJ, Poulsen M, Hefetz A, Errard C, Nash DR, Boomsma JJ (2007) The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol* 61:1637-1649. doi: 10.1007/s00265-007-0395-1
- Septanil MPB, Mateus S, Turatti IT, Nunes TM (2012) Mixed colonies of two species of congeneric stingless bees (Hymenoptera: Apinae, Meliponini) display environmentally-acquired and endogenously-produced recognition signals. *Physiol Entomol* 37:72-80. doi: 10.1111/j.1365-3032.2011.00825.x
- Sommeijer MJ, Bruijin LLM de, Meeuwssen FJAJ, Slaa EJ (2003) Reproductive behaviour of stingless bees: nuptial flights and nest departing non-accepted gynes in *Melipona favosa*. *Entomologische Berichten* 63: 7-13.
- Soroker V, Lucas C, Simon T, Fresneau D, Durand JL, Hefetz A (2003) Hydrocarbon distribution and colony odour homogenisation in *Pachycondyla apicalis*. *Insectes Soc* 50:212-217. doi: 10.1007/s00040-003-0669-1

- Sorvari J, Theodora P, Turillazzi S, Hakkarainen H, Sundström L (2008) Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. *Behav Ecol* 19:441-447. Doi: 10.1093/beheco/arm160
- Thomas ML, Parry LJ, Allan RA, Elgar MA (1999) Geographic affinity, cuticular hydrocarbons and colony recognition in the Australian meat ant *Iridomyrmex purpureus*. *Naturwissenschaften* 86:87-92. doi: 10.1007/s001140050578
- Thomas ML, Dixson A, Coggins V, Holway A (2005) Food availability and brood number do not influence intraspecific aggression in Argentine ants. *Insect Soc* 52:108-113. doi: 10.1007/s00040-004-0782-9
- Van Oystaeyen A, Araujo-Alves D, Caliari-Oliveira R, Lima-do Nascimento D, Santos-do Nascimento, Billen J, Wenseleers T (2013) Sneaky Queens in *Melipona* bees selectively detect and infiltrate queenless colonies. *Anim Behav* 86:1-7. doi: doi:10.1016/j.anbehav.2013.07.001
- Wenseleers T, Alves DA, Francoy TM, Billen J, Imperatriz-Fonseca VL (2010) Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biol Lett* 11. doi: 10.1098/rsbl.2010.0819

7 Principales hallazgos o aportaciones

Este estudio demuestra que el alimento podría estar influyendo en la expresión de hidrocarburos en el perfil cuticular de los individuos producidos en colonias de abejas sin aguijón.

Este estudio es el primero en evaluar los CHC's y reconocimiento de reinas vírgenes, producidas *in vitro* y para la especie *S. pectoralis*.

De igual manera es el primero en desarrollar abejas reinas de abejas sin aguijón bajo condiciones artificiales en México y el primero a nivel mundial para la especie de *S. pectoralis*.

8 Implicaciones

Los resultados indican que el alimento puede tener influencia en la determinación de los perfiles de hidrocarburos de los individuos producidos en colonias de abejas sin aguijón, esto implica que el reconocimiento de individuos de una colonia puede depender no sólo de las señales químicas adquiridas en la etapa adulta cuando los individuos emergen sino también de factores medio ambientales durante su desarrollo. Habría que considerar este hallazgo en estudios futuros donde se analicen las fuentes que producen las señales químicas para el reconocimiento en este taxón.

9 Conclusiones generales de la tesis

El alimento ofrecido a larvas de reinas de *S. pectoralis* influye en la expresión de hidrocarburos cuticulares.

La respuesta agresiva de obreras hacia reinas vírgenes de *S. pectoralis* podría estar determinada por diversos factores y no solamente por los hidrocarburos cuticulares.

10 Sugerencias

Realizar estudios donde esclarezcan la participación de la genética y del alimento en la expresión de CHC's.

Llevar a cabo un análisis más profundo en la aceptación de una nueva reina enfocado a su comportamiento, ya que el mecanismo de reconocimiento parece ser más complicado que para el reconocimiento de los compañeros del nido.

Se sugiere llevar la técnica de cría de reinas al siguiente nivel, esto es, a la introducción y evaluación de las reinas resultantes como reproductoras de la colonia.

11. Anexos

Cuadro 8. Relación de variables originales (hidrocarburos saturados e insaturados) con los factores principales 1 y 2 (PC1 y PC2)

Variable (hidrocarburos saturados)	Correlación con PC1	Correlación con PC2	Variable (hidrocarburos insaturados)	Correlación con PC1	Correlación con PC2
Ciclooctacosano (C28)	0.98	0.10	Tetradeceno (C14)	0.57	-0.05
Octacosano (C28)	0.97	-0.01	Hexadeceno (C16)	0.38	-0.54
Nonadecano (C19)	0.96	0.15	Pentadecadieno (C15)	-0.37	-0.24
Heneicosano (C21)	0.96	0.18	Octadeceno (C18)	0.66	-0.46
Heptadecano (C17)	0.94	0.15	Nonadeceno (C19)	-0.77	-0.18
Heptacosano (C27)	0.91	0.15	Hexadecadieno (C16)	-0.89	0.02
Pentacosano (C25)	-0.01	0.60	3-Eicoseno (C20)	0.97	-0.05
Tricosano (C23)	-0.43	0.66	Heneicoseno (C21)	0.90	-0.22
Tetracosano (C24)	-0.45	0.65	Docoseno (C22)	-0.67	-0.60
Pentacosano (C25)	-0.01	0.60	Tricoseno (C23)	-0.66	-0.12
Docosano metil (C23)	-0.76	0.58	Tetracoseno (C24)	0.04	-0.33
Ciclotetracosano (C24)	-0.80	0.57	Pentacoseno (C25)	-0.91	-0.12
Eicosano (C20)	0.79	0.37	3 etil 5(etilbutil) octadeceno (C26)	0.58	0.62
Docosano (C22)	0.74	0.35	Hexacoseno (C26)	0.83	-0.50

11 pentil heneicosano (C26)	0.53	0.57	Heptacoseno (C27)	0.82	-0.12
3 etil-5(2etilbutil) octadecano (C26)	0.50	-0.53	Octacoseno (C28)	0.82	-0.39
Hexacosano (C26)	0.74	0.02	Nonacoseno (C29)	0.88	0.16
11 metil-heptacosano (C18)	0.73	0.54	Triacoteno (C30)	0.90	-0.04
Nonacosano (C29)	0.81	-0.06	Hentriacoteno (C31)	0.57	0.59
Tetradecano (C14)	-0.24	0.55			

Cuadro 9: Proporciones relativas de hidrocarburos cuticulares (%) encontrados en reínas vírgenes del lote 1 producidas *in vitro* de *Scaptotrigona pectoralis*

Analito	TR	IR	LOTE 1 (Reinas producidas con colonias A y B)											
			Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3			Tratamiento 4		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tetradeceno	10.314	1383	0.51	0.52	0.71	1.63	0.88	1.00	1.81	2.83	1.54	0.48	0.49	0.99
Tetradecano	10.475	1400	0.19	0.24	0.25	1.08	0.53	0.57	0.37	0.36	0.20	0.27	0.31	0.84
Hexadeceno	12.860	1655	0.97	0.94	1.24	2.54	1.96	2.38	2.25	3.21	2.29	0.60	1.03	2.04
Heptadecano	14.147	1793	0.12	0.16	0.27	0.28	0.25	0.28	0.33	0.55	0.36	0.30	0.32	0.37
Octadeceno	15.113	1897	0.85	0.81	1.22	3.06	1.52	1.74	2.45	3.32	2.02	0.74	0.99	1.90
Nonadeceno	16.049	1997	0.12	0.14	0.18	0.16	0.13	0.18	0.38	0.28	0.37	0.19	0.25	0.29
Nonadecano	16.283	2022	1.41	1.70	2.44	1.47	1.65	2.42	2.81	3.70	3.24	2.66	2.88	3.49

3-Eicoseno	17.219	2122	0.62	0.53	1.05	2.16	1.29	1.43	1.79	2.75	1.53	0.49	0.85	1.59
Eicosano	17.307	2132	0.74	0.82	1.11	1.03	1.03	1.02	1.85	1.64	1.60	1.17	1.53	1.63
Heneicoseno	18.009	2207	0.48	0.66	0.68	0.38	0.38	0.32	1.63	1.60	1.13	0.58	0.58	0.63
Heneicosano	18.156	2223	5.82	7.93	9.81	7.09	8.31	9.90	9.63	12.78	10.90	10.16	10.51	12.57
Docoseno (1)	18.931	2306	0.38	0.40	0.60	0.61	0.59	0.68	1.18	1.04	0.78	0.49	0.61	0.72
Docosano	19.136	2328	0.39	0.51	0.66	0.66	0.75	0.80	1.41	1.47	0.90	0.65	0.69	0.96
Tricoseno (1)	19.663	2384	5.64	4.82	4.66	4.21	3.80	2.87	8.14	7.75	13.22	5.40	5.09	4.75
Tricosano	19.941	2414	8.72	9.35	9.57	10.97	9.88	10.35	7.58	11.25	11.15	10.09	11.16	12.09
Metil docosano	20.175	2439	0.14	0.12	0.22	0.16	0.08	0.06	0.24	0.15	0.32	0.20	0.31	0.14
Tetracoseno	20.292	2452	0.16	0.18	0.23	0.25	0.35	0.31	0.27	0.22	0.54	0.30	0.33	0.40
Ciclotetracosano	20.511	2475	0.25	0.20	0.13	0.36	0.17	0.28	0.27	0.49	0.29	0.23	0.23	0.34
Tetracosano	20.789	2505	0.30	0.28	0.29	0.46	0.36	0.34	0.35	0.69	0.34	0.44	0.43	0.56
Pentacoseno (2)	21.477	2578	0.52	0.46	0.60	0.41	0.46	0.34	0.62	0.60	0.96	0.70	0.58	0.57
Pentacosano	21.594	2591	5.22	4.54	4.91	5.37	5.51	3.93	5.42	3.07	4.27	4.90	5.14	4.37
11 pentil heneicosano	21.857	2619	0.68	0.71	0.95	0.74	0.89	0.79	0.92	1.18	0.90	0.98	0.97	1.13
3-etil-5-etilbutil-octadeceno	21.974	2632	0.37	0.39	0.54	0.49	0.51	0.45	0.55	0.51	0.68	0.73	0.64	0.67
Hexacoseno (2)	22.047	2640	0.51	0.63	0.73	0.56	0.67	0.53	0.82	0.87	0.82	0.93	0.83	0.96
Hexacosano	22.369	2674	0.55	0.52	0.65	0.61	0.64	0.37	0.86	0.75	0.66	0.55	0.63	0.68
Heptacoseno (2)	22.954	2737	7.51	7.80	7.69	7.43	7.61	6.26	7.52	5.85	6.78	9.30	9.03	6.56
Heptacosano	23.115	2754	12.53	9.99	9.74	10.01	11.63	8.60	11.08	5.06	6.76	8.73	9.63	7.68
11-metilheptacosano	23.335	2778	2.21	1.84	1.97	1.30	1.62	1.68	1.82	1.56	1.57	2.00	2.08	1.73
Octacoseno	23.583	2804	0.19	0.28	0.53	0.28	0.29	0.28	0.25	0.43	0.46	0.59	0.26	0.38
Ciclooctacosano	23.744	2821	1.26	1.33	1.14	0.80	0.77	1.09	0.89	0.80	0.89	1.20	1.43	0.76
Octacosano	23.905	2839	0.78	0.58	0.84	0.62	0.32	0.56	0.62	0.74	0.51	0.65	0.74	0.53
Nonacoseno (1)	24.417	2893	30.35	31.96	26.20	27.46	26.65	31.15	17.38	17.79	16.28	25.04	20.63	20.04
Nonacoseno (2)	24.549	2908	5.50	4.76	4.55	3.69	5.18	4.28	4.34	2.75	3.05	4.63	4.49	4.30
Nonacosano	24.651	2918	1.38	1.42	1.58	0.79	1.35	1.50	0.87	0.80	1.57	1.40	1.65	1.81

Triacoteno	25.295	2987	0.99	0.98	0.95	0.39	1.11	0.61	0.31	0.50	0.49	1.01	1.21	0.82
Triacotano	25.412	3000	0.50	0.33	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hentriacoteno	26.012	Nc	0.96	1.03	0.58	0.34	0.71	0.48	0.80	0.51	0.46	1.03	1.31	0.56

TR: Tiempo de retención; IR: Índice de retención; “R”: repetición; nc: no calculado. Un guión indica que ese analito no fue identificado para esa repetición.

Cuadro 10: Proporciones relativas de hidrocarburos cuticulares (%) encontrados en reinas vírgenes del lote 2 producidas *in vitro* de *Scaptotrigona pectoralis*

Analito	TR	IR	LOTE 2 (Reinas producidas con colonias C y D)											
			Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3			Tratamiento 4		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tetradeceno	10.314	1383	0.51	0.52	0.72	1.25	2.04	2.94	1.25	1.08	0.96	0.62	0.97	1.34
Tetradecano	10.475	1400	0.20	0.27	0.53	0.92	0.94	1.62	-	-	-	-	-	-
Hexadeceno	12.860	1655	11.06	1.13	1.89	2.88	4.37	6.79	1.98	1.95	1.95	1.25	1.85	1.81
Heptadecano	14.147	1793	0.19	0.11	0.16	0.38	0.20	0.26	0.14	0.14	0.10	0.18	0.14	0.17
Octadeceno	15.113	1897	0.94	1.06	1.91	2.73	4.32	6.91	1.77	1.98	1.94	1.19	1.86	1.74
Nonadeceno	16.049	1997	0.22	0.19	0.37	0.50	0.12	0.40	0.26	0.12	0.19	0.29	0.24	0.23
Nonadecano	16.283	2022	1.47	1.16	1.65	3.05	1.72	2.63	2.06	1.44	0.85	1.52	1.38	1.74
3-Eicoseno	17.219	2122	0.69	0.79	1.16	1.96	2.59	4.39	1.11	1.15	1.24	0.81	1.23	1.32
Eicosano	17.307	2132	0.15	0.14	0.20	0.28	0.36	0.52	0.20	0.17	0.18	0.18	0.15	0.22
Heneicoseno	18.009	2207	0.91	0.73	1.04	0.92	0.48	0.81	1.32	0.72	0.85	1.76	0.79	0.58
Heneicosano	18.156	2223	6.42	5.35	7.30	11.24	6.30	9.16	10.33	7.14	3.73	5.28	5.79	6.44
Docoseno (1)	18.931	2306	0.18	0.14	0.07	0.08	0.20	0.24	0.19	0.07	0.18	0.29	0.14	0.17
Docoseno (2)	19.092	2323	0.28	0.38	0.55	1.68	1.23	2.50	0.66	0.57	1.03	0.75	1.29	0.71
Docosano	19.136	2328	0.65	0.45	1.94	0.96	1.41	1.32	0.79	0.58	0.66	0.54	0.73	0.81
Tricoseno (1)	19.663	2384	7.48	5.66	5.22	5.00	4.00	5.72	7.63	5.31	11.08	15.83	5.54	3.72

Tricosano	19.941	2414	11.62	12.05	9.98	10.01	8.57	9.36	12.95	12.03	11.88	10.42	8.15	7.36
Tetracoseno	20.292	2452	0.20	0.31	0.24	0.30	1.37	1.69	0.44	0.37	0.25	0.24	0.44	0.20
Tetracosano	20.789	2505	0.40	0.55	0.39	0.67	-	-	0.49	0.43	0.48	0.31	0.46	0.41
Pentacoseno (2)	21.477	2578	0.76	0.75	0.73	0.72	0.76	1.00	0.87	0.49	0.85	1.06	0.63	0.66
Pentacosano	21.594	2591	5.13	5.71	4.50	5.19	6.37	5.10	4.89	5.51	6.40	5.90	7.60	7.86
Hexacoseno (1)	21.930	2627	0.87	0.76	0.98	1.16	1.26	1.85	1.25	1.10	1.20	0.74	0.85	1.09
Hexacoseno (2)	22.047	2640	0.41	0.37	0.59	0.78	0.93	0.83	0.56	0.49	0.55	0.52	0.64	0.84
3 etil-5(2etilbutil) octadecano	22.296	2666	0.94	0.75	1.10	1.00	0.89	1.06	0.95	0.76	0.70	0.68	0.86	1.09
Hexacosano	22.369	2674	0.86	0.98	0.91	0.97	1.31	1.60	0.96	1.03	0.95	0.84	1.11	1.07
Heptacoseno (2)	22.954	2737	5.54	6.70	7.06	8.56	9.88	6.31	6.58	6.28	7.73	9.95	11.13	12.28
Heptacosano	23.115	2754	11.75	15.97	11.69	9.44	10.64	7.87	8.80	14.25	13.32	11.08	13.49	14.81
11-metilheptacosano	23.335	2778	1.89	2.51	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Octacoseno	23.583	2804	0.63	0.97	0.98	0.68	3.66	1.56	1.66	1.84	2.23	0.31	2.27	0.89
Ciclooctacosano	23.744	2821	1.14	1.35	2.03	1.32	1.39	0.86	1.07	1.20	1.12	0.95	0.93	1.40
Octacosano	23.905	2839	0.63	0.66	0.89	1.36	1.72	1.23	0.72	0.88	0.74	0.38	0.50	1.17
Nonacoseno (2)	24.549	2908	22.05	26.96	24.08	19.31	15.76	10.57	24.67	27.04	22.24	21.90	24.09	21.35
Nonacosano	24.651	2918	2.79	3.38	4.28	3.94	4.24	2.16	2.92	3.31	3.80	3.73	4.17	5.30
Triacoteno	25.295	2987	0.74	0.89	1.09	0.47	0.56	0.43	0.40	0.42	0.42	0.49	0.57	1.24
Triacotano	25.412	3000	0.29	0.32	0.68	0.30	0.44	0.32	0.17	0.14	0.19	-	-	-

TR: Tiempo de retención; IR: Índice de retención; “R”: repetición; nc: no calculado. Un guión indica que ese analito no fue identificado para esa repetición.

Cuadro 11: Proporciones relativas de hidrocarburos cuticulares (%) encontrados en obreras de *Scaptotrigona pectoralis*

Analito	TR	IR	Colonias											
			A			B			C			D		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tetradeceno	10.314	1383	1.03	0.68	0.77	0.68	1.19	0.73	0.84	0.95	0.95	0.89	0.96	0.76
Tetradecano	10.475	1400	0.56	0.17	-	-	-	-	2.29	3.44	2.15	1.56	1.19	1.25
Hexadeceno	12.860	1655	1.18	1.23	1.62	1.71	0.00	2.05	1.65	1.25	1.35	1.40	1.58	1.12
Pentadecadieno	13.900	1767	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.22	-	0.60
Octadeceno	15.113	1897	1.09	1.10	1.21	1.36	0.78	1.67	1.30	1.46	1.48	1.87	1.67	1.75
Nonadeceno	16.049	1997	0.86	0.78	0.65	1.23	0.91	1.20	0.80	0.87	1.18	1.02	1.00	0.91
Nonadecano	16.283	2022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecadieno	17.044	2104	0.45	0.09	0.25	0.46	0.24	0.19	0.29	0.15	0.27	0.40	0.00	0.19
Heneicosano	18.156	2223	0.40	0.41	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Docoseno (1)	18.931	2306	0.25	0.33	0.22	0.60	0.59	0.58	0.47	0.53	0.49	0.58	0.46	0.62
Docoseno (2)	19.092	2323	0.68	0.76	0.42	1.19	1.14	1.29	0.95	0.81	0.95	0.91	0.90	1.12
Docosano	19.136	2328	0.58	0.69	0.57	0.64	0.61	0.54	0.51	0.44	0.55	0.55	0.31	0.42
Tricoseno (1)	19.663	2384	27.52	29.14	27.87	42.96	41.04	44.35	38.23	37.95	38.93	35.23	35.14	34.72
Tricoseno (2)	19.730	2391	1.27	1.55	1.38	2.14	2.79	2.48	2.82	3.01	2.94	2.63	2.76	2.73
Tricosano	19.941	2414	34.02	35.71	37.55	32.03	26.53	28.78	26.08	26.01	26.42	25.07	25.30	22.96
Metil docosano	20.175	2439	0.96	1.07	1.17	1.36	1.35	1.37	1.75	1.68	1.68	1.55	1.54	1.55
Tetracoseno	20.292	2452	0.30	0.32	0.38	0.38	0.36	0.46	0.54	0.52	0.54	0.45	0.41	0.38
Ciclotetracosano	20.511	2475	1.19	1.25	1.17	1.81	1.80	1.83	2.17	2.06	2.08	1.89	1.85	1.94
Tetracosano	20.789	2505	1.41	1.39	1.49	1.24	1.09	1.37	1.22	1.14	1.11	1.21	1.33	1.43
Pentacoseno (1)	21.331	2563	2.63	2.44	2.72	3.67	3.40	4.02	4.77	3.99	4.53	4.08	3.96	4.21
Pentacoseno (2)	21.477	2578	0.92	0.84	0.89	1.29	1.32	1.53	1.56	1.66	1.57	1.54	1.51	1.64
Pentacosano	21.594	2591	14.53	13.43	13.44	-	9.30	0.00	7.70	8.70	7.83	10.80	13.56	15.80
Hexacosano	22.369	2674	0.55	0.44	0.83	0.70	0.84	0.82	0.51	-	-	0.59	-	0.45
Heptacoseno (1)	22.867	2727	1.18	1.00	1.16	0.64	0.56	0.81	0.58	0.64	0.38	0.82	0.61	0.63

Heptacoseno (2)	22.954	2737	0.47	0.47	0.53	0.51	0.35	0.52	0.36	0.38	-	0.54	0.34	0.42
Heptacosano	23.115	2754	2.11	1.91	1.68	1.44	1.44	1.82	1.21	1.40	1.20	1.71	1.97	0.26
Nonacoseno (2)	24.549	2908	1.40	0.96	0.53	0.85	0.84	0.77	0.52	0.47	0.44	0.80	0.49	0.51
Nonacosano	24.651	2918	0.64	0.56	0.37	0.40	0.85	0.82	0.49	0.49	0.48	0.68	0.61	0.94
Hentriacontano	26.114	Nc	1.81	1.27	0.69	0.70	0.68	0.00	0.40	0.00	0.50	0.00	0.55	0.71

Tiempo de retención; IR: Índice de retención; "R": repetición; Nc: no calculado. Un guión indica que ese analito no fue identificado para esa repetición.