



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Desarrollo de protocolos para la crianza *in vivo* y obtención de castas *in vitro* de una especie modelo de abeja sin aguijón (Hymenoptera: Apidae:Meliponini)”.**

Tesis que presenta

**DELIA MARIELA MORENO CALIX**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)**

**Mérida, Yucatán, México**

**2023**

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.  
C.POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Delia Mariela Moreno Calix** titulado “**Desarrollo de protocolos para la crianza *in vivo* y obtención de castas *in vitro* de una especie modelo de abeja sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas, en la línea de Investigación de Regulación de la Transcripción y Morfogénesis, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna y Co directora Karla Janeth Cantarero, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

**Atentamente**

---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 17 de Abril de 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Biología y a la Coordinación Regional de Posgrados de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras en el Valle de Sula, por hacer las gestiones convenio con CICY.

Al CICY por la calidad en Investigación Científica evidenciada en sus Investigadores y programa Académico. A ECOSUR, en especial al Joven Lázaro, gracias por su apoyo en la obtención y traslado de especímenes.

Al Laboratorio de Biotecnología de la UNAG, especialmente a la Ing. Sanabria por facilitarme su calidez, tiempo, espacios y recursos para la realización de mis pruebas *in vitro* en su laboratorio.

Al Laboratorio de Inmunología de la UNAH-CU, en especial al PhD. Jorge Carrasco, quien sembró en mí el interés por hacer ciencia en la biología molecular y por apadrinar gran parte de mi proyecto.

A mi comité Tutorial. Al Dr. Enrique Castaño de la Serna por aceptarme en su laboratorio, por ser guía franco-simplista y por enseñarme a escudriñar y encontrar valor en las pequeñas cosas. Al Dr. Luis Carlos Zapata por sus observaciones siempre intensas, oportunas y precisas cargadas del mayor interés por orientarme en la investigación. A la Dra. Azucena Canto por su acompañamiento objetivo y por esa calidez humana admirable y A mi Maestra Karla Cantarero por sus exigencias y consejos acertados siempre, a TODOS gracias.

Al Dr. Hernán Villanueva-UADY por sus comentarios puntuales y apoyo para culminar mi proceso de revisión de tesis.

A mis amigos:

De la vida...Erick gracias por tu ingenio y apoyarme a concretar mis ideas siempre.

De pregrado...Mario gracias por transmitirme esa pasión por escudriñar el mundo de las ANSA.

Del posgrado...Francisco gracias por su paciencia y por estar al pendiente de mis productos aún sin pedirle ayuda y ser parte de esto. Samuel gracias por su ayuda incondicional y por echarme porras motivándome siempre a seguir hasta el final.

Del grupo de Meliponicultores y Apicultores de Honduras a TODOS las gracias y en especial a los primos Jaime Moreno y Enrique por su bonita disposición en acompañarme en mi trabajo de campo.

## **LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS**

1 Revisión internacional

1 Capitulo de libro

## DEDICATORIAS

Para quienes me enseñaron a andar, a amar y a disfrutar del aprender y quienes dan TODO por mí.

Teresa Calix y Marco Moreno *MIS PADRES*.

Y para quienes he enseñado a andar, a quienes tienen mi corazón completo y amo de aquí al infinito, mis motivos en la búsqueda de respuestas y por quienes doy TODO.

Ian y Ethan *MIS HIJOS*.

*“La buena vida es una vida inspirada por el amor y guiada por el conocimiento”.-*

Bertrand Russell

## INDICE

---

CAPITULO I. ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	10
OBJETIVOS .....	12
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	13
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
2.1 DISPONIBILIDAD DE GENOTIPOS.....	14
2.2. ESTABLECIMIENTO DEL MELIPONARIO EXPERIMENTAL.....	14
2.3. TECNIFICADO .....	14
2.4. TRASIEGO.....	15
2.5. CRIANZA <i>IN VIVO</i> Y MANEJO DE COLMENAS .....	15
CONTROL DE PARÁSITOS .....	15
ALIMENTACIÓN.....	15
COLECTA DE ALIMENTO LARVAL .....	16
COLECTA DE LARVAS .....	16
2.7. CONTROL DE VARIABLES AMBIENTALES.....	16
TAMAÑO DE LA MUESTRA .....	17
PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA .....	17
2.8. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> .....	17
OBTENCIÓN DE SECUENCIAS .....	17
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE MIRNAS .....	17
ANÁLISIS DE CONSERVACIÓN DE HOMOLOGÍAS DE SECUENCIA .....	18
REPRESENTACIÓN GRÁFICA .....	18
CAPÍTULO III. RESULTADOS .....	19
CAPITULO IV. DISCUSIÓN GENERAL .....	45
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	49
CAPÍTULO VI. PUBLICACIONES .....	50
REVISIÓN INTERNACIONAL .....	50
CAPÍTULO DE LIBRO.....	61
BIBLIOGRAFÍA .....	73

---

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Movimiento nocturno de troncos .....	19
Figura 2. a) Tronco en estado natural y b) Tronco colocado en el meliponario .....	20
Figura 3. Descripción del Nido de manera natural. ....	21
Figura 4. Caja armada tipo Portugal Araujo modificada. ....	24
Figura 5. Alimento introducido en colmenas. ....	25
Figura 6. Meliponario con sus 8 cajas tecnificadas. ....	26
Figura 7. Extracción de panal para la obtención de miel para cría in vitro .....	27
Figura 8. Proceso de obtención de alimento larval .....	28
Figura 9. Proceso de traslarve. ....	29
Figura 10. Termohigrómetro digital. ....	30
Figura 11. Estabilizado de la Temperatura y humedad dentro de la cámara de crecimiento. .....	31
Figura 12. Grafica de Individuos vivos según edad de desarrollo durante el estadio larval 1. ....	32
Figura 13. Grafica de probabilidades expresadas en proporción de sobrevivir a esa edad en específico. ....	32
Figura 14. Gráfico de tasas de mortalidad expresadas en porcentaje según edad en días del desarrollo larvario 1. ....	33
Figura 15. Filogenia que muestra la homología de miR-14-13p en especies de la clase insecta y representando en azul al Orden Himenóptera en específico. ....	43
Figura 16. Filogenia que muestra la homología de miR-6001-5p con otros insectos y en su gran mayoría del Orden Himenóptera. ....	44
Figura 17. Filogenia que muestra la homología de miR-6001-3P con otras especies del orden Himenóptera.	

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Modelo de caja tipo Portugal Araujo modificada para *S. pectoralis*..... 22  
Tabla 2. Tabla de Vida larvas destinadas a obreras ..... 31  
Tabla 3. Datos larvas destinadas a Reinas (controles) ..... 33  
Tabla 4. Secuencias documentadas. .... 34

---

## **ABREVIATURAS**

ANSA: abejas nativas sin aguijón

miARN: micro ARN

mRNA: ARN mensajero

ncRNA: ARN no codificante

RNA: ácido ribonucleico

POP: proceso de aprovisionamiento y ovoposición

(ARNi): ARN interferente

dsARN: ARN de cadena doble

---

## RESUMEN

El desarrollo de castas en insectos sociales representa una importante transición de organización y evolución. Estas transiciones son críticas para el éxito ecológico de los insectos sociales. Durante las últimas décadas se ha documentado que los microARN (miARN) de las secreciones de las abejas nodrizas en el alimento de las larvas constituyen un elemento adicional en el control regulatorio de la determinación de castas. Además, esta diferenciación de castas es un proceso de desarrollo complejo que está influenciado por factores genéticos, epigenéticos y ambientales. La evolución y los elementos genéticos para el desarrollo de castas son actualmente un rompecabezas en las abejas sin aguijón, al igual que el impacto total que los elementos genéticos proporcionados en el alimento de las larvas tienen en el desarrollo de las abejas. En este artículo examinamos un protocolo para la obtención de material reproductivo biológico in vivo e in vitro y resumimos los miARN como componente regulador del alimento larvario y su efecto sobre el desarrollo de castas en abejas eusociales sin aguijón.

---

---

## ABSTRAC

The development of castes in social insects represents an important transition of organization and evolution. These transitions are critical to the ecological success of social insects. During the last decades it has been documented that micro RNA (miRNA) from the secretions of nurse bees in the food of the larvae constitute an additional element in the regulatory control of caste determination. Furthermore, this caste differentiation is a complex developmental process that is influenced by genetic, epigenetic, and environmental factors. Evolution and genetic elements for caste development are currently a puzzle in stingless bees, as is the full impact that genetic elements provided in larval food have on bee development. In this article we examine a protocol for obtaining biological reproductive material *in vivo* and *in vitro* and summarize miRNAs as a regulatory component of larval food and their effect on caste development in eusocial stingless bees.

---

## INTRODUCCION

Los insectos eusociales muestran un patrón de jerarquías y una distribución ordenada del trabajo, por lo que el éxito se refleja en sus comunidades donde la sociabilidad es la clave para mejorar la actitud inclusiva de un individuo. En las colonias de insectos sociales es clara la organización en la distribución del trabajo, así como fenotipos característicos y distintivos dentro del mismo sexo según el rol desempeñado. Las especies altamente eusociales (sociedad verdadera) ocurren y han evolucionado varias veces en insectos himenópteros. Los análisis genéticos proporcionan una nueva línea de base empírica para comprender esta evolución y la definición de castas de una manera más compleja que la que se maneja hoy al referirse a la casta de insectos sociales simplemente como "la división reproductiva del trabajo" y como "la división del trabajo entre hembras en función de la especialización reproductiva" (Hughes *et al.*, 2003; Michener, 1974; Sumner *et al.*, 2018).

Los mecanismos epigenéticos que afectan a la expresión génica y, por tanto, a la función biológica ya han sido documentados en abejas eusociales, concretamente a través del silenciamiento génico mediado por moléculas de ARN no codificante de cadena corta (miARN) (Søvik *et al.*, 2015; Villagra; Ashby *et al.*, 2016; y Frías-Lasserre, 2020; Yan *et al.*, 2014). Los microRNAs (miRNAs) pertenecen al grupo de los ncRNAs cuya función documentada es la de regular la expresión génica (Djuranovic *et al.*, 2011) miRNAs de 19-24 nucleótidos de longitud, restringiendo la producción de proteínas al degradar el mRNA y por tanto inhibiendo la traducción (Huntzinger and Izaurralde, 2011) y afectando múltiples características fenotípicas y de desarrollo (Selbach *et al.*, 2008). Se ha estudiado el papel potencial de los miARN en el desarrollo de castas y se ha demostrado que los miARN se expresan diferencialmente en diferentes etapas de desarrollo, la tribu meliponini no registra hasta la fecha ningún estudio de este tipo, la diferenciación morfológica de castas es un proceso diferente influenciado por el alimento provisto bajo un proceso altamente organizado de abastecimiento de alimentos en células de cría y que da como resultado diferentes fenotipos morfológicos, fisiológicos y de comportamiento en las castas.

Los componentes activos que determinan el destino del desarrollo de las abejas siguen siendo esquivos e incluso controvertidos (Buttstedt *et al.*, 2016). Según (Solemn *et al.*, 2015; Sumner *et al.*, 2006) la capacidad de un genotipo para alterar su ontogenia en respuesta a un cambio ambiental se debe a su plasticidad fenotípica durante el desarrollo.

El presente trabajo tiene como objetivo presentar un protocolo para la crianza *in vivo* y obtención de castas *in vitro* de un genotipo modelo de abeja sin aguijón (Hymenoptera:

Apidae:Meliponini) que permita generar la línea base para el estudio de mecanismos de regulación transcripcional que influyen en la morfogénesis y la determinación de las castas en éste grupo en particular de organismos.

Demostrar estos procesos que regulan la plasticidad fenotípica en insectos eusociales será relevante para comprender la manera en que la dieta y nutrición regulan la programación, la enfermedad fetal, el desarrollo y comportamiento en otros organismos, incluidos los seres humanos.

**CAPITULO I. Antecedentes:**

Según Michener (2007), las abejas constituyen un grupo monofilético de Aculeata Hymenoptera (Abejas, hormigas y avispas). Estas a la vez forman parte de la superfamilia Apoidea antes llamada Sphecoidea, la cual incluye a las abejas y avispas esfeciformes.

Actualmente se reconocen siete familias de abejas en el mundo: cinco de lengua corta (Stenotritidae, Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Melittidae) y dos de lengua larga (Megachilidae y Apidae) (Michener, 2000), de las cuales cinco están presentes en Honduras: (Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Megachilidae y Apidae). El comportamiento social, primitivo o avanzado, se presenta en menos del 10% de las especies, originado independientemente en dos familias: Halictidae y Apidae (Snelling, 1986).

Dentro de la familia Apidae, se encuentran cuatro tribus de abejas sociales con; dos altamente sociales (eusociales: tribu Apini, que incluye a la abeja melífera el género *Apis* y a la tribu Meliponini llamadas “abejas sin aguijón”, que incluye el género *Melipona*), y otras dos tribus: Bombini (abejorros, primitivamente sociales, género *Bombus*) y Euglossini (abejas de las orquídeas, solitarias y con algunas especies cuasisociales (Nates-Parra 2005). Las abejas eusociales se caracterizan: [viven en colonias permanentes (400-60,000 individuos por colonia); traslape de generaciones; sistema social de castas (una reina, por colonia y el resto de las hembras obreras); construcción de un nido muy complejo, con panales de cría y celdas o potes para almacenamiento de reservas alimenticias; división marcada de las labores en la colmena].

Los meliponinos se distribuyen principalmente en las regiones tropicales del mundo, teniendo su centro de diversificación en el Neotrópico Americano, distribuyéndose desde México hasta Argentina (Roubik, 1989; Ayala, 1999), donde se encuentran 300 de las 400 especies identificadas, estas se destacan por ser excelentes polinizadores de la flora nativa y cultivada en los ecosistemas donde habitan (Roubik, 1989; Bawa, 1990).

La mayoría de las abejas sin aguijón visitan las flores para obtener néctar y polen para su subsistencia; algunas especies colectan resinas, lodo o excremento que usan en la construcción de los nidos, estableciendo de esta forma una interacción positiva entre insectos y vegetación (Nogueira-Neto 1997; Biesmeijer, 1997).

Entre los habitantes de la colmena se observa una división según la función reproductiva que desempeñan, cada uno de los individuos de la colonia presenta diferencias anatómicas: reina, obreras y machos. La determinación del sexo en la tribu *Meliponini*, al igual que los demás Himenópteros es causada por un sistema de haplodiploidia, donde normalmente las

---

hembras son diploides, al contrario de los machos que normalmente apenas tienen un juego de cromosomas, por lo tanto, son haploides y cuya única serie de cromosomas proviene de la madre, por esta razón los machos de los Himenópteros no tienen padre, ya que ese juego de cromosomas es recibido de su madre diploide. Este grupo también presenta diferentes mecanismos como auto esterilidad y maduración sexual diferenciada, que en muchos casos impiden o dificultan la autofecundación (Nogueira-Neto 1997).

El desarrollo de castas en los insectos sociales se cree que es fundamental para el éxito ecológico. Las abejas eusociales tienen un sistema social de castas, es decir, que individuos del mismo sexo generan fenotipos alternativos. Por lo tanto cada una de las castas desempeña una función diferente. La abeja *Apis mellifera* representa el modelo principal de desarrollo de castas. Las abejas hembras se desarrollan en dos castas, reinas y obreras (Snodgrass, 1956; Grüter, 2020).

Las reinas no poseen estructuras para la colecta y manipulación de polen, ni comportamiento de forrajero. Son incapaces de sobrevivir por un largo periodo fuera de la colonia y tampoco presentan comportamiento de defensa contra los enemigos, pero sí presentan ovarios desarrollados que les confiere la fertilidad. Este dimorfismo está determinado principalmente por la alimentación de las larvas, donde las larvas destinadas a reinas reciben una dieta rica en jalea real, mientras que las obreras se alimentan de "pan de abeja" (Fo, 1821; Haydack, 1970).

Las obreras de la tribu *Apini* pueden desarrollar sus ovarios en una colmena huérfana (ausencia de reina) o cuando la población está muy grande (Groot & Voogd, 1954). En *Meliponini*, varias especies presentan ovarios desarrollados, al mismo tiempo en la colmena con la reina (Sakagami *et al.*, 1963).

En algunas especies, las obreras producen dos tipos de huevos (Staurengo da Cunha, 1978). Huevos que dan origen a machos, como es el caso de *Friesella schrottkyi* (Camillo-Atique, 1977). Mientras que las obreras de algunas especies (aparentemente todas las especies del género *Frieseomelitta* y *Duckeolaghiliani*) nunca desarrollan ovarios para la ovoposición (Sakagami *et al.*, 1963).

En *Apini*, el control del desarrollo de los ovarios está determinado por la cantidad y calidad del alimento, siendo las obreras las que sufren una castración mediante el alimento (Michener, 1974). Por otro lado, en los *Meliponini* el mecanismo para la determinación de las castas parece ser una inducción del desarrollo de los ovarios en las larvas que reciben

una cantidad extra de alimento, principalmente en las especies con determinación de las castas por vía trófica (Cruz- Landim, 1998).

La determinación de la casta en la mayoría de las abejas es causada por distintos estímulos en la cantidad y calidad del alimento larval (jalea real) (*Apis mellifera*, *Apini*, Apidae), mientras que en (Meliponini, Apidae, excepto en el género *Melipona*), la casta está determinada por la cantidad de alimento larval, mientras en *Melipona* este estímulo está dado por genes y la cantidad de alimento larval. Casi todas las abejas de las tribus *Meliponini* y *Apini* construyen sus celdas reales de un mayor tamaño, por lo que reciben una mayor cantidad de alimento, con respecto a las celdas de las obreras y los machos. Mientras en *Melipona* no existen celdas reales, por lo que las reinas son criadas en las mismas celdas de obreras y machos (Nogueira-Neto 1997).

Para el desarrollo de larvas obreras de *Apis mellifera*, el alimento es una mezcla de polen y miel, para larvas reinas es una secreción glandular de las abejas nodrizas conformando lo que se conoce como jalea real (Bolognesi *et al.*, 2012). Ya es sabido que los nutrientes de esta jalea real (principalmente proteínas, azúcares y ácidos grasos) impulsan el desarrollo de la reina (Maori *et al.*, 2019). En comparación con éstas, en las abejas sin aguijón, los componentes principales del alimento larval son el polen y el néctar / miel; mientras que las secreciones glandulares *no se consideran* que hacen una contribución significativa (Roulston y Cane, 2000; Velthuis *et al.*, 2003).

Además, las abejas sin aguijón abastecen masivamente las celdas de cría, por lo que el tamaño de las obreras adultas puede verse afectado directamente por la cantidad y composición de los recursos alimenticios en comparación con la situación de las abejas melíferas.

Según Kerr (1946, 1948), la determinación de la casta en *Melipona* sería genética, derivada de un triple heterocigoto. Pero más tarde Kerr *et al.*, (1966) afirman que una dupla heterocigoto asociado a un factor trófico (alimento), sería responsable de la determinación de las castas.

Según Nogueira-Neto (1997) la producción de reinas en *Melipona*, depende de una acción compleja de genes y de una situación fisiológica-ambiental de la colonia, inclusive se puede ver influenciado por la presencia o ausencia de un estrés continuo.

A partir de los trabajos de Kerr, *et al.*, (1966), se corroboró que, en condiciones óptimas, cerca del 25% de los individuos diploides que nacen en una colonia normal son reinas y los otros 75% son obreras. Las abejas pasan por una metamorfosis completa: huevo, larva,

---

pupa y adulto. Este proceso de desarrollo hasta el nacimiento de la abeja, puede variar entre 30 y 50 días, dependiendo de la casta y especie (Biesmeijer, 1997).

Los meliponinos tienen una forma especial de criar sus huevos, que requiere de un ritual especial en cada celda, este comportamiento se conoce como Proceso de Aprovechamiento y Oviposición (POP por sus siglas en inglés); las obreras construyen primero las celdas de cría y después las abastecen con alimento larval a través de su aparato bucal y por regurgitado. La reina oviposita sobre el alimento larval, posterior a esto las obreras cierran (operculan) la celda para iniciar el proceso de metamorfosis (Aguilera, 2004).

La especie *Scaptotrigona pectoralis* (Dalla Torre, 1896)(Meliponini, Apidae), se distribuye desde la *Región Neártica* de las provincias de México ( Campeche, Chiapas, Distrito Federal, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Tabasco , Veracruz-Llave, Yucatán), hasta la *Región Neotropical* que abarcan desde Belize(Corozal), Guatemala ( Baja Verapaz, Escuintla), Honduras( Cortés, Olancho), El Salvador, Nicaragua(Carazo) y Panamá( Coclé) y Zona del Canal de Panamá(Camargo, 2013).

Según Ayala (1999) en su última revisión taxonómica de las abejas sin aguijón de México, sólo se reconocen tres especies de *Scaptotrigona*; *Scaptotrigona mexicana*, *Scaptotrigona hellwegeri* y *Scaptotrigona pectoralis*. Esta última no muestra una estructura genética entre las poblaciones de la Península de Yucatán, el Pacífico y las costas del Golfo y aparentemente, la constituye una sola población homogénea en todo México (Hurtado-Burillo *et al.*, 2017)

Según Michener (2000) Contiene alrededor de 24 especies distribuidas desde México hasta Argentina. *S. pectoralis* tiene una distribución solapada con *S. mexicana* a lo largo de Centroamérica, pero también se ha encontrado en Honduras, Nicaragua y Panamá, desde el nivel del mar hasta los 1200 m (Ayala, 1999).

*Scaptotrigona* es uno de los géneros más robustos de la tribu Meliponini, la longitud de su cuerpo es de 5 a 7 mm. Este grupo de abejas son agresivas y defienden su nido mordiendo a los intrusos y soltando una feromona (Hurtado, 2015). Sus nidos se encuentran en cavidades de troncos grandes y sus panales los conforman las celdas de Cría. La determinación de las castas es trófica y el tiempo de desarrollo de las reinas es más largo; al momento de emerger son de mayor tamaño que las obreras y los machos (Morales, 2018).

Según Roubik., (2005) en especies con determinación de castas trófica, las reinas se crían en celdas reales (de mayor tamaño) y reciben mayor cantidad de alimento larval que machos y obreras. En esta especie se ha documentado que el tamaño del abdomen probablemente se encuentra asociado a la síntesis y secreción de vitelogenina en la hemolinfa por un incremento en el tamaño de los cuerpos grasos y/o de los ovarios. Se ha observado en otras abejas, que el desarrollo ovárico depende de la síntesis y absorción de proteínas vitelogénicas que se sintetizan en los cuerpos grasos (Wasielewski *et al.*, 2011). Morales (2015) concluyó después de criar in vitro reinas de *S. pectoralis*; que la cantidad de alimento larval ocasiona diferencias en el tamaño corporal y en el tiempo de desarrollo de reinas.

El potencial reproductivo de las castas parece estar determinados tanto por factores genéticos como tróficos, pero el mecanismo que desencadena el desarrollo de las reina aún no se ha resuelto en los géneros de Meliponini, excepto para *Melipona*. ( Harfelder *et al.*,2006)

La integración de señales ambientales y genómicas dan forma a fenotipos condicionales y comportamientos flexibles. El conocimiento sobre la plasticidad de diferentes tipos de células y sus firmas epigenéticas son necesarios para lograr una comprensión profunda de los nuevos resultados del desarrollo. La plasticidad fenotípica impulsada por el medio ambiente en insectos sociales ayuda a comprender los aspectos nutricionales, base de la reprogramación epigenética en otros grupos sociales incluyendo humanos (Maleszka, 2008).

En eucariotas, las rutas de silenciamiento de genes denominadas ARN de interferencia (ARNi), son inducidas y mantenidas por la presencia de dsARN (Fire *et al.*, 1998). Estos mecanismos regulan la expresión génica tanto en los niveles cotranscripcional como postranscripcional (Bernstein *et al.*, 2001).

En 1998, Timmons y Fire fueron los primeros en informar sobre el silenciamiento génico desencadenado por dsRNA adquirido ambientalmente, a través de una vía de transferencia de ARN horizontal. Además, la transmisión de ARNi de plantas transgénicas que expresan dsARN a herbívoros invertebrados (Mao *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que la regulación epigenética juega un papel en la diferenciación de castas de las abejas melíferas (Kucharski *et al.*, 2008). Hartfelder y Engels, (1992) sugieren que las diferencias en el tamaño abdominal entre reinas y obreras, podrían estar indicando rasgos funcionales de castas, como el estado de desarrollo de los órganos reproductores.

---

En algunos insectos se ha demostrado que la fecundidad aumenta con respecto a la masa corporal (Leather, 1988).

Los microARN (miARN) pertenecen al grupo de los ncRNA cuya función documentada es regular la expresión génica (Djuranovic *et al.*, 2011), los miARN de 19-24 nucleótidos de longitud se encuentran coartando la producción de proteínas al degradar al ARNm y de esta manera inhibiendo la traducción (Huntzinger & Izaurralde, 2011). Los miARN pueden inhibir la traducción de muchos ARNm y afectar a múltiples características del desarrollo y del fenotipo (Selbach *et al.*, 2008).

La plasticidad fenotípica durante el desarrollo es definida por Zappala *et al.*, (2017) como la capacidad de un genotipo de alterar su ontogenia en respuesta a un cambio ambiental, permitiéndole lidiar con condiciones variables o heterogéneas.

Las funciones de los miARN en la plasticidad fenotípica morfológica están bien establecidas, sin embargo, hay poca información de cómo los miARN influyen en la plasticidad fenotípica conductual, se requiere además de evidenciar su influencia en el desarrollo de órganos sexuales y controlar la fertilidad, conocer además cómo esta diferenciación sexual de “castas” en abejas influirá en su comportamiento y roles dentro de una verdadera organización social “la colmena”. La plasticidad fenotípica del comportamiento natural, debido a la división del trabajo (DOL) está bien caracterizada en *Apis mellifera* (modelo para comprender los mecanismos genéticos que afectan los diferentes fenotipos conductuales). Los miARN funcionan como interruptores del desarrollo (Stefani y Slack, 2008), regulan la expresión génica en el sistema nervioso y genera fenotipos conductuales característicos (Perkins *et al.*, 2007).

Zhang *et al.*, (2012), informaron que los miARN de plantas ingeridos por abejas y de fuentes alimenticias vegetales, pueden atravesar el tracto gastrointestinal, ingresar a la sangre, acumularse sistémicamente y regular la expresión génica en animales. Evidenciando que la regulación génica puede cruzarse entre reinos y ser mediada por miARN exógenos. Una vez que un nuevo miARN se integra a la red de regulación génica de un animal, generalmente se retiene y se vuelve difícil de perder durante la evolución (Heimberg *et al.*, 2008).

Datos de secuencias de miARN tienen ventajas para la estimación de relaciones filogenéticas. Además de que rara vez se pierden en el curso de la evolución, sus tasas de mutación son lentas en comparación con muchos genes codificadores de proteínas por lo

---

que Tarver *et al.*, (2013) sugieren que podrían ser útiles para recuperar las filogenias de grupos problemáticos de taxones, como las radiaciones de rápida evolución, de igual manera que las homologías se pueden identificar en conjuntos de datos de secuenciación de bibliotecas de ARN tanto genómicos como pequeños.

En *Apis mellifera*, se ha estudiado la función potencial de los miARN en el desarrollo de castas, y se ha demostrado que los miARN se expresan diferencialmente en las diferentes etapas del desarrollo, la tribu *meliponini* no registra a la fecha ningún estudio de este tipo, la diferenciación morfológica de las castas es considerado como un proceso diferente e influenciado por el alimento proporcionado bajo un proceso altamente organizado de aprovisionamiento de alimento en celdas de cría y que resultan en diferentes fenotipos morfológicos, fisiológicos y conductuales de castas.

## Justificación

El desarrollo de castas en insectos sociales representa una transición importante de un nivel de organización a otro en la evolución y se cree que es fundamental para el éxito ecológico de los insectos sociales (Almeida y Allshire, 2005). Además ésta diferenciación de casta es un proceso de desarrollo complejo influenciado por variaciones genéticas, epigenéticas y ambientales. (Zhu, *et al.*, 2017)

El potencial reproductivo de las castas parecen estar determinados tanto por factores genéticos como tróficos, pero el mecanismo que desencadena el desarrollo de las reina aún no se ha resuelto en los géneros de Meliponini, excepto para *Melipona*. (Harfelder *et al.* 2006). Debido a la importancia ecológica de las abejas sin aguijón, y a los grandes vacíos sobre procesos de desarrollo y diferenciación, es necesario plantear técnicas que faciliten el manejo y la disponibilidad de genotipos; ya sea para el que aumento en el número de colonias; necesarios para preservar la especie, para preservar la biodiversidad asociada y principalmente para la comprensión de mecanismos epigenéticos que puedan estar influenciando en sus procesos de biológicos y fisiológicos.

El desarrollo de la Meliponicultura como práctica y alternativa para conservar las especies (Cortopasi-Laurino *et al.* 2006), para la obtención de productos de la colmena (miel, polen, propóleos), y la necesidad de polinizadores efectivos para los cultivos está exigiendo una mayor demanda de genotipos que aumenten la disponibilidad de recursos y que faciliten procesos ecológicos. Plantear una técnica de crianza *in vitro* ayudará a la obtención de reinas y permitirá responder incógnicas sobre la determinación de la casta en las abejas sin aguijón, y al a vez realizar la división artificial de colonias como un esfuerzo aunado en la conservación de este grupo.

Las principales fuentes de alimento de las larvas destinadas a obreras y reinas son, de origen vegetal (néctar y polen) y animal (secreciones de glándulas hipofaringeas). Por esta dualidad se podría suponer que diferentes miARN en alimentos larvarios pueden tener influencia en el desarrollo de castas en abejas de la tribu Meliponini. De acuerdo con esta hipótesis, está bien establecido en la literatura que los insectos, incluidas las abejas melíferas, pueden ingerir miARN y que éstos pueden regular la expresión de genes de insectos, modificando así los fenotipos de estos (José, *et al.*, 2007).

Estos mecanismos no han sido estudiados en abejas de la tribu Meliponini, comprobar que en el alimento larval de las *Abejas sin aguijón* hay miARNs exógenos y que estos afectan la fertilidad de la reina, contribuirá al establecimiento de estrategias de conservación planta-abeja (especies sombrilla), ya que existe una relación íntima entre ambos grupos que se ha generado a través de miles de años de coevolución, estableciéndose una relación muy fuerte de interdependencia entre ambos en el ecosistema (Sánchez, 2001), de igual manera comprobar que en el alimento larval hay miARNs de origen endógeno permitirá comprobar que además de la cantidad del alimento larval como determinante de las castas en abejas tróficas “la calidad” de este, también ayuda a regular los fenotipos de castas.

La presente investigación es de tipo proyectiva; tiene como objetivo presentar un protocolo para la crianza *in vivo* y obtención de castas *in vitro* de un genotipo modelo de abeja sin aguijón (Hymenoptera: Apidae:Meliponini) que permita generar las bases experimentales para el estudio de la determinación de las castas y conforme a ello verificar aquellas relaciones de causa-efecto, particularmente el efecto de los miARN sobre el desarrollo de las castas. Demostrar estos procesos que regulan la plasticidad fenotípica en insectos eusociales será relevante para comprender la manera en que la dieta y nutrición regulan la programación, la enfermedad fetal, el desarrollo y comportamiento en otros organismos, incluidos los seres humanos.

## Objetivos

### Objetivo general

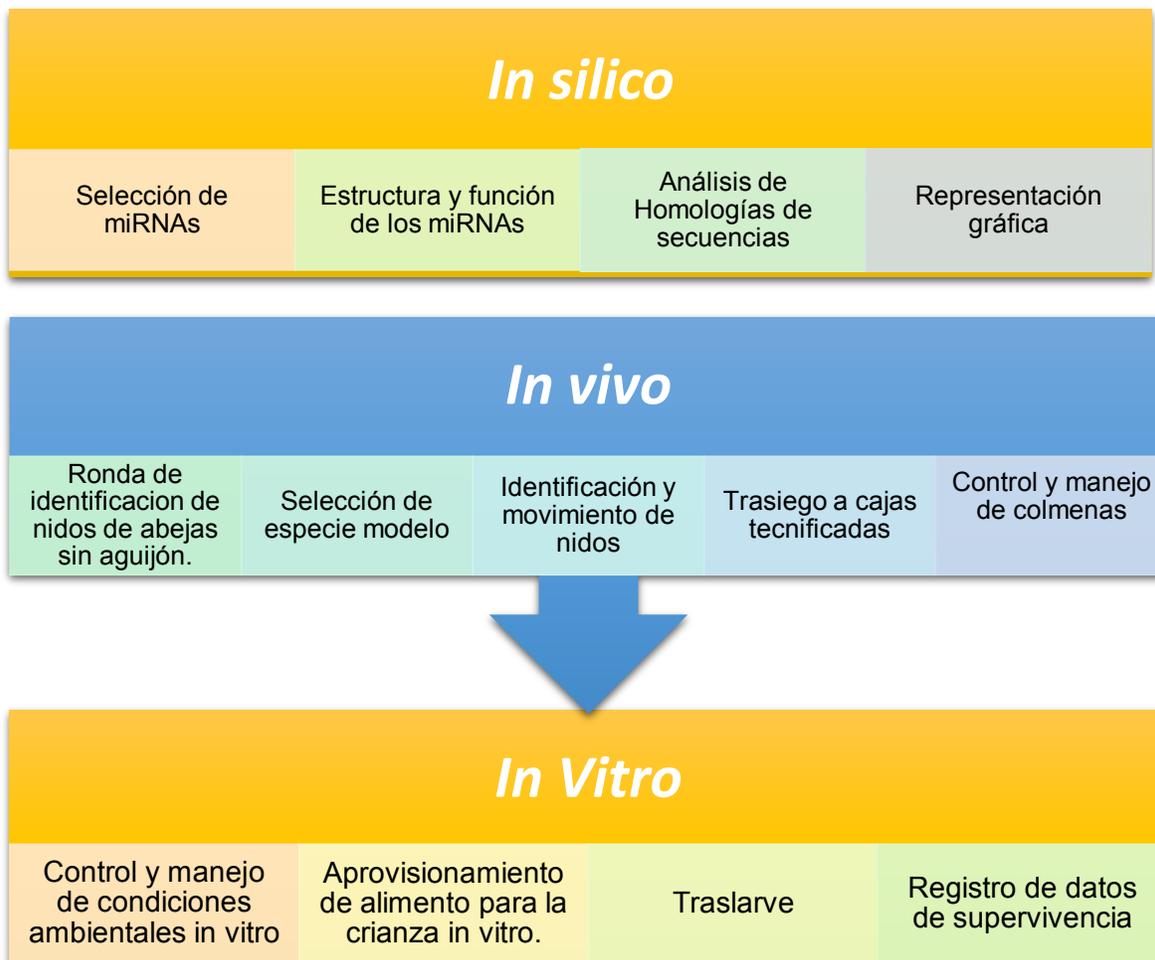
Generar las condiciones de referencia para la obtención de castas de una especie de abeja sin aguijón (*Hymenoptera: Apidae: Meliponini*)

### Objetivos específicos

1. Proponer un genotipo que sirva como modelo experimental en Honduras para realizar estudios futuros de Regulación de la Transcripción y Morfogénesis de abejas de la tribu Meliponini.
2. Adaptar los parámetros requeridos para el desarrollo de colonias experimentales *in vivo* del genotipo modelo.
3. Propiciar condiciones de crianza *in vivo* para la obtención de crías mediante su manejo en un Meliponario experimental del genotipo modelo.
4. Adaptar los parámetros ambientales requeridos para el desarrollo de castas *in vitro* del genotipo modelo.
5. Desarrollar un proceso experimental piloto que permita evidenciar el desarrollo *in vitro* de castas del genotipo modelo.
6. Proponer según revisión de literatura y análisis *in silico* miRNA's reguladores de la transcripción involucrados en la morfogénesis y determinación de las castas en abejas eusociales.

## Estrategia Experimental

Se muestra a continuación el diagrama general del proceso.



## **CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Disponibilidad de Genotipos**

Se realizó una ronda de identificación de abejas nativas a 500-800 metros respetando el rango de forrajeo o de vuelo de la especie para asegurar su alimentación y adaptación (Nieuwstadt y Ruano-Iraheta, 1996). Se estableció un meliponario con la especie más abundante evidenciada, éste fue ubicado en un predio del Municipio de Santa María del Real que se localiza en la región oriental de Honduras, en el departamento de Olancho, colindante al norte con el municipio de Gualaco y San Francisco de la Paz, al sur los municipios de Catacamas, San Francisco de Becerra y Juticalpa, al este con el municipio de Catacamas y al oeste con los municipios de San Francisco de la Paz, San Francisco de Becerra y Juticalpa. El meliponario se instalará en 14° 7' 00" a 14° 45' 0" de latitud norte y entre los 85° 03" a 86° 03" de longitud oeste, a una altitud de 843 metros sobre el nivel del mar (UDEM, 2013), con el fin de tener accesible material biológico suficiente para la crianza de castas *in vitro*.

#### **1.1. Identificación y Movimiento de Nidos**

De acuerdo con la especie seleccionada se procedió a la identificación de nidos en troncos caídos y en cercas de madreado (*Gliricidia sepium*), éstos fueron removidos del área natural durante la noche para asegurar el movimiento de la colonia completa. Para realizar el movimiento se requirió uso de luz roja y sello de la entrada de la colmena, de manera que ninguna abeja se pudiera salir del tronco durante el movimiento hacia el meliponario.

#### **1.2. Establecimiento del Meliponario Experimental**

Una vez movidos al meliponario, estos fueron colocados en la misma posición en que se encontró en estado silvestre, esto con el fin de no afectar la ecolocalización de las abejas. Las colmenas se conservaron de manera rustica "en tronco" durante 2 meses para facilitar la adaptación de la colmena al nuevo ambiente. El espacio destinado al meliponario fue un sitio sombreado con acceso a luz solar pero no de manera directa (simulando la manera natural en que establecen sus nidos en la naturaleza).

#### **1.3. Tecnificado**

Se elaboraron 8 cajas tecnificadas para los 8 nidos, el tipo de caja utilizada fue tipo "Portugal Araujo" modificada para *S. pectoralis*, este modelo presenta una estructura adaptada para simular de la mejor manera el nido en estado silvestre.

---

Después de los 2 meses se realizaron los trasiegos de las colmenas desde los troncos a cajas tecnificadas, esto con el fin manejar lo más uniforme posible las condiciones dentro de la colmena y tener disponible el material biológico y alimenticio requerido para la crianza *in vitro*.

El número de colmenas que se ajustó, según lo requerido para la obtención de larvas y alimento para el establecimiento del sistema de crianza *in vitro*.

#### **1.4. Trasiego**

Después de los 2 meses (período de adaptación), los troncos fueron abiertos durante las primeras horas del día de acuerdo con la posición de la entrada de la colmena y haciendo uso de motosierra y barra de uña. Una vez abiertos se procedió a trasladar de manera manual las celdas de cría junto con la reina a la caja tecnificada, así como la colecta de abejas jóvenes (recién emergidas), haciendo uso de succionador entomológico. El resto de los materiales del nido fueron guardados para la posterior alimentación de las abejas (potes de reserva de alimento y polen, involucros y ceras).

#### **1.5. Crianza *in Vivo* y Manejo de Colmenas**

##### **Control de Parásitos**

Inmediatamente después de realizar el trasiego, se limpió el área de trabajo, evitando queden restos de miel para evitar atraer a otras abejas y/o moscas de la familia *Phoridae*. (Las cajas fueron selladas con maskin tape para evitar cualquier ataque).

##### **Alimentación**

Las colmenas fueron alimentadas con sus propias reservas de miel y polen (anteriormente guardadas) pasados 30 días después del trasiego. Y para aquellas colmenas con baja población en sus colonias, se procedió a alimentar mensualmente, para ello se introdujo un bebedero plástico con orificios para asegurar la salida constante de miel (miel de pots de reserva de alimento).

## **1.6. Crianza *in vitro***

### **Colecta de alimento larval**

El alimento para la crianza *in vitro* será retirado de 2 colmenas con panales recientemente construidos y con alrededor de 50 – 100 celdas de cría. Se extrajo el alimento de aquellas celdas que contenía huevos y aquellas que contenían larvas fueron introducidas de nuevo a las colmenas, para ello será necesario el marcaje de la posición en que se encuentre el panal. Se abrió las celdas haciendo uso de agujas entomológicas, para la extracción del alimento larvario se hizo uso de micropipetas y se agregó después en un tubo eppendorf estéril, este fue homogeneizado por pipeteo para distribuirlo entre las células artificiales de las placas de Elisa en volúmenes requeridos para cada casta.

### **Colecta de larvas**

Se estableció un sistema de crianza *in vitro* de abejas obreras y reinas, estas con su régimen alimenticio “normal de crianza *in vitro*”. Se realizó mediante la técnica de traslarve, utilizando larvas de 0 a 1 días de edad, se seleccionaron por su tamaño y posición en el panal de cría ya que estas larvas recién eclosionadas están cerca de las celdas que contienen huevos, éstas fueron coladas en placas acrílicas tipo Elisa (cada placa con 96 pocillos de 1.08 cm de diámetro y 0.7 cm de profundidad).

Las larvas que criadas *in vitro* se extrajeron de la manera siguiente: 1 panal joven por colmena (de 2 colmenas) que contenían alrededor de 50-100 celdas de cría. El traslarve consistió en mover las larvas haciendo uso de agujas de traslarve y colocarlas flotando sobre la superficie del alimento larval dispuesto sobre las placas de Elisa en la misma posición como se encontraron en las celdas de cría y en los volúmenes requeridos para criar obreras y reinas (33 uL y 99 uL respectivamente).

Posteriormente, estas placas se colocaron sobre placas de Petri (150 × 30 mm) con 70ml de agua pura para mantener la humedad requerida. Cada colmena fue utilizada de manera rotativa para evitar dañarlas.

## **1.7. Control de variables ambientales**

Las placas se colocaron en una cámara de crecimiento a 28 ° C, temperatura recomendada por Engels *et al.*, (1995); éstas se observaron durante su estadio Larval 1 (6 días). Todos los materiales fueron esterilizados para evitar la contaminación con organismos externos.

---

La humedad se ajustó de acuerdo con 3 períodos críticos del desarrollo de la siguiente manera:

- Estadio Larval 1: a partir del día 1 al día 6 / Humedad 90% (Morales, 2018)
- Estadio Larval 2: a partir del día 7 al día 12 / Humedad 85% (Menezes, 2013)
- Prepupa-Adulto: a partir del día 13 hasta la emergencia/ Humedad 75% (Menezes, 2013)

Se registró el porcentaje de humedad con un higrómetro, para asegurar la supervivencia.

### **Tamaño de la Muestra**

Se destinó a crianza a 44 abejas (reinas y obreras) en placas para Elisa. El tamaño de la muestra se definió de acuerdo con la población de abejas en la colmena y a la disponibilidad de panales. Todos los materiales fueron esterilizados para evitar la contaminación con organismos externos.

### **Porcentaje de Supervivencia**

Pasados los 6 días del desarrollo larvario 1 de abejas destinadas a reinas y obreras criadas *in vitro*, se prosiguió a contar el número de larvas sobrevivientes y a calcular el % de supervivencia y mortalidad.

### **1.8. Análisis *in Silico***

Se realizó además un análisis de bibliografía sobre reportes de miRNAs Endógenos y Exógenos expresados en abejas eusociales. Se seleccionó aquellos con influencia en la determinación de la casta y en consecuencia en la fertilidad.

### **Obtención de secuencias**

Se obtuvo las secuencias de los miRNAs seleccionados haciendo uso de la base de datos de miRBase.org, esta es una base de datos de búsqueda de secuencias y anotaciones de miARNs publicadas.

### **Estructura y función de miRNAs**

Se visualizó y documentó la estructura de los miRNAs usando la herramienta RNAstructure, es un paquete completo para la predicción y el análisis de estructuras secundarias de ARN.

Las funciones de cada uno fueron analizados según registros publicados en literatura, en específico de aquellos organismos modelos de miRNAs Exógeno (*A. thaliana*) y Endógenos (*D. melanogaster* y *A. mellifera*).

### **Análisis de conservación de homologías de secuencia**

Para la búsqueda de homologías de secuencia se utilizaró el BLAST de la plataforma de miRBase, los alineamientos se realizaron usando el programa MUSCLE V.3 y las correcciones de los alineamientos mediante Fast.Dist

### **Representación gráfica**

La representación gráfica y edición de los árboles filogenéticos se realizó con la herramienta TreeDyn. Los programas utilizados fueron de libre acceso, la selección de estos es porque permitieron visualizar de mejor manera las similitudes en las secuencias e indagar en las funciones.

---

## CAPÍTULO III. RESULTADOS

### Resultados

#### 3.1 Disponibilidad de Genotipos (Establecimiento de meliponario experimental)

##### Área de estudio e identificación de nidos

Se trabajó con la especie *Scaptotrigona pectoralis*, ésta se escogió por la abundancia de nidos identificados en la localidad donde se realizó el estudio. Este estudio se realizó en el municipio de Santa María del Real, localizado en la región oriental de Honduras, en el departamento de Olancho.

##### Movimiento de Nidos

De acuerdo con la especie seleccionada se procedió al movimiento de nidos ubicados en troncos caídos y en cercas de madreado (*Gliricidia sepium*), éstos fueron removidos durante la noche para asegurar que todos los individuos estén dentro de la colmena. Para realizar el movimiento se requirió uso de luz roja para evitar alterar la colmena; mientras se selló la entrada de la colmena haciendo uso de engrapadora de pared y de tela de punto fino, de manera que ninguna abeja pudiera salirse del tronco durante el movimiento hacia el meliponario experimental (Fig.1).



**Figura 15.** Movimiento nocturno de troncos

### Establecimiento del Meliponario

Se estableció un meliponario en los  $14^{\circ} 7' 00''$  a  $14^{\circ} 45' 0''$  de latitud norte y entre los  $85^{\circ} 03''$  a  $86^{\circ} 03''$  de longitud oeste, a una altitud de 843 metros sobre el nivel del mar (UDEM, 2013), con el fin de tener accesible material biológico suficiente para la crianza de abejas obreras y reinas *in vitro*.

Los troncos movidos desde su estado silvestre hacia el meliponario fueron, colocados en la misma posición en que se encontró en estado natural, esto con el fin de no afectar la ecolocalización de las abejas. Las colmenas se conservaron de manera rustica en tronco en el predio del meliponario durante 2 meses para facilitar la adaptación de la colmena al nuevo ambiente. (Fig.2)

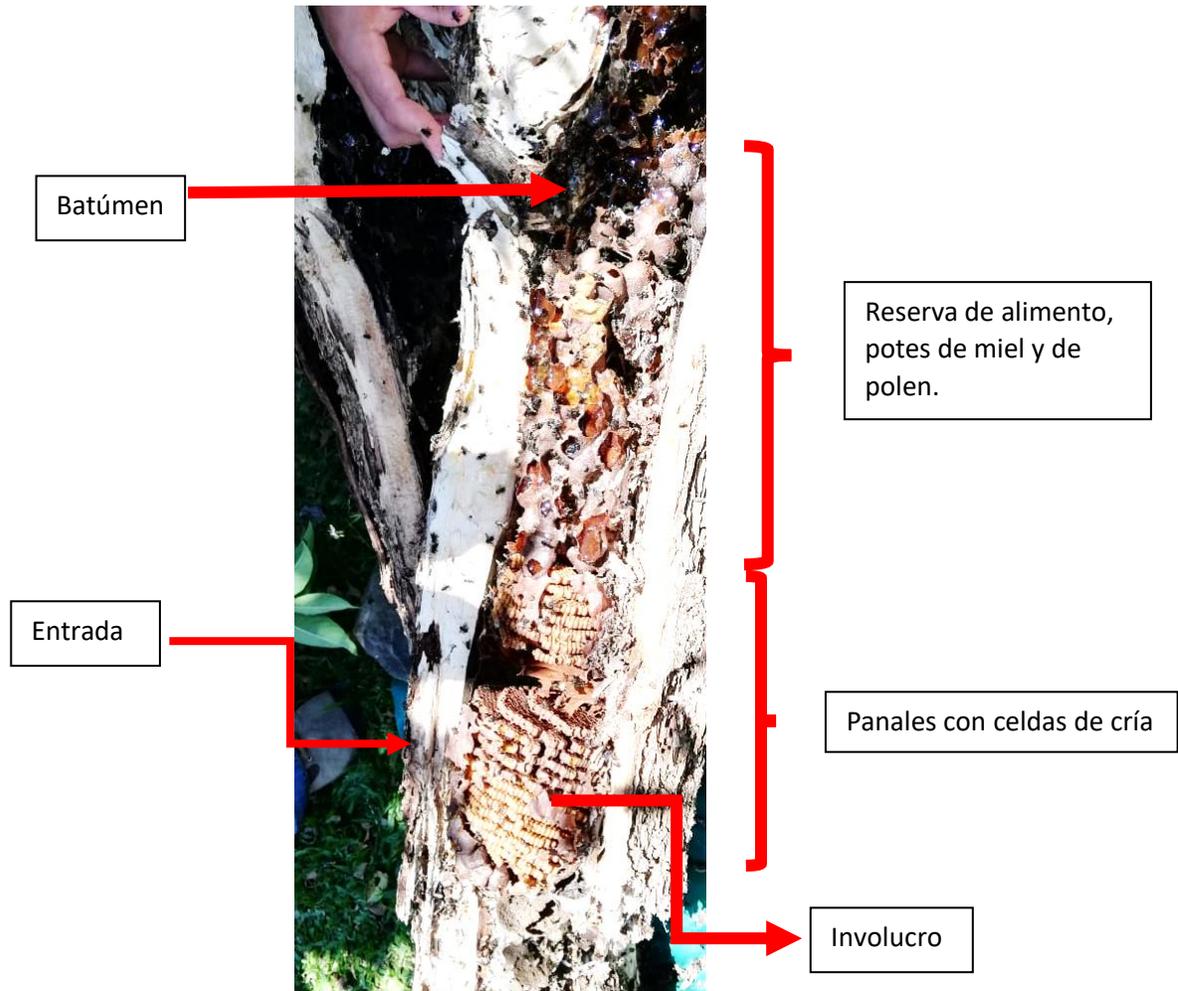


**Figura 16. a)** Tronco en estado natural y **b)** Tronco colocado en el meliponario.

Se consideró colocar los troncos en un sitio sombreado con acceso a luz solar pero no de manera directa (simulando la manera natural en que establecen sus nidos en la naturaleza).

### 3.2 Tecnificado y trasiego

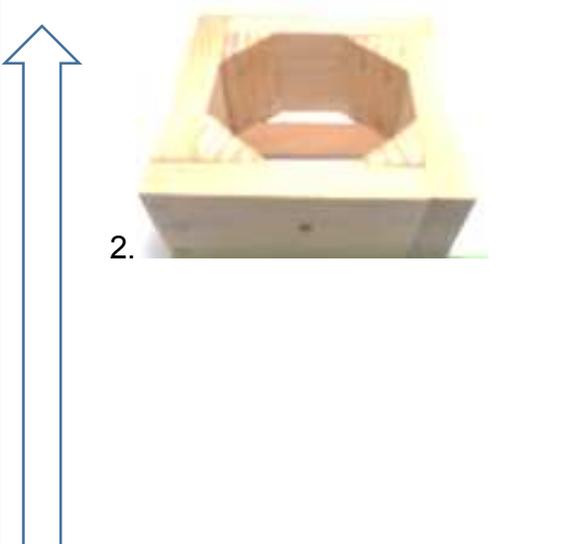
Se elaboró 8 cajas tecnificadas (Tabla 1) para los 8 nidos, el modelo de caja utilizada fue “tipo Portugal Araujo” modificada para *S. pectoralis* (éste modelo presenta una estructura adaptada para simular de la mejor manera el nido en estado silvestre).(Fig.3)



**Figura 17.** Descripción del Nido de manera natural. M. Gallardo (2020)

**Tabla 1.** Modelo de caja tipo Portugal Araujo modificada para *S. pectoralis*.

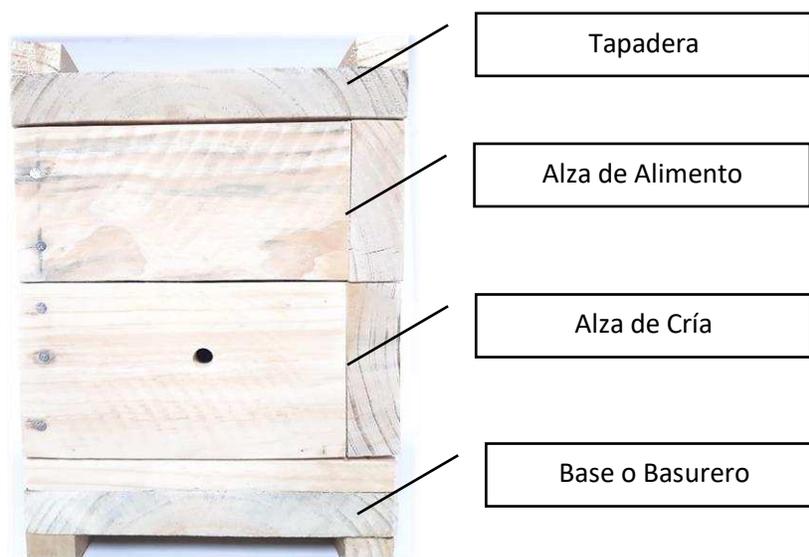
Orden y disposición de las alzas en la caja	Descripción
<p>5.</p> 	<p>Tapadera: estructura utilizada para proteger la colmena, con 2 sujetadores para facilitar el agarre. Medidas de la base 19 cm x 19 cm, altura de 2.5 cm. Medidas de los sujetadores 2.5 cm x 2.5 cm x 19 cm</p>
<p>4.</p> 	<p>Alza de alimento: espacio utilizado para incorporar potes de miel y de polen, con 3 reglas superiores espaciadoras que evitan que se selle por completo la tapadera y 2 reglas inferiores para facilitar la comunicación entre alzas. Medidas de la base 19 cm x 19 cm, altura de 9 cm. Medidas de las reglas superiores 3 cm x 16 cm.( Se elabora un borde donde acostar las reglas para que engasen perfecto con la tapadera. Medidas de las reglas inferiores 5.5 cm x 16 cm, dejando un espacio de comunicación.</p>
<p>3.</p> 	<p>Alza secundaria de Crías: espacio utilizado para incorporar panales cuando la colmena es muy grande. Medidas de tabla con circunferencia 12 cm x 16 cm, diámetro de la circunferencia 9 cm. Espacio de la tabla con circunferencia con los bordes de la caja 1cm para asegurar la comunicación de las abejas entre las alzas.</p>

 <p>2.</p>	<p>Alza primaria de Crías: espacio utilizado para colocar los panales, en caso de panales poco numerosos se utiliza únicamente 1 alza, mientras crece la colmena. Se incorporan reglas en la base, para facilitar la comunicación con la base (basurero). Medidas de las reglas 5.5 cm x 16 cm, dejando espacios de 1 cm. Se perfora en el centro de la pared frontal del alza un agujero de 1 cm de diámetro( espacio donde se colocará la entrada)</p>
 <p>1.</p>	<p>Base o basurero: espacio utilizado para incorporar productos de desecho de la colmena. La altura de las reglas de los bordes es de 1 cm y las dos bases al pie del basurero de 2 cm x 2 cm x 19 cm.</p>

Pasados los 2 meses de adaptación de los nidos en su tronco rústico y en el predio del meliponario, se procedió a realizar los trasiegos de las colmenas desde los troncos a las cajas tecnificadas, esto con el fin manejar lo más uniforme posible las condiciones dentro de la colmena y evitar sesgos en el estudio.

El número de colmenas utilizadas para alimento y para obtención de larvas se planificó de acuerdo al tamaño de la muestra.

Los troncos fueron abiertos durante las primeras horas del día de acuerdo a la posición de la entrada de la colmena y haciendo uso de motosierra y barra de uña. El trabajo se realizó en el piso colocando el tronco sobre un manto plástico para facilitar la limpieza del área de trabajo después de realizar el trasiego. Una vez abiertos se procedió a trasladar de manera manual las celdas de cría junto con la reina a la caja tecnificada, así como la colecta de abejas jóvenes (recién emergidas), haciendo uso de succionador. El resto de materiales del nido fueron guardados como recursos de alimentación y materia prima de las abejas para desarrollar estructuras dentro de la colmena (potes de reserva de alimento y polen e involucros y ceras), los cuales fueron introducidos luego del control de parásitos.(Fig. 4)



**Figura 18.** Caja armada tipo Portugal Araujo modificada.

### 3.3 Cría *in vivo* y Manejo de Colmenas

#### Control de Parásitos

Inmediatamente después de realizar el trasiego, se limpió completamente el área de trabajo (guardando el manto plástico y lavando con abundante agua los restos de miel en el área, para evitar atraer a otras abejas y/o moscas de la familia Phoridae, además las cajas fueron selladas con maskin tape para evitar cualquier ataque. Las cajas fueron supervisadas cada 24 horas y limpiadas ante la presencia de moscas, se utilizó una trampa de sebo con una solución de vinagre de manzana como atrayente.

#### Alimentación

Las colmenas fueron alimentadas con sus propias reservas de miel y polen, pasados 30 días después del trasiego. A aquellas colmenas con baja población en sus colonias, se procedió a alimentar mensualmente, introduciendo en la cavidad destinada a reserva alimenticia, un bebedero plástico con orificios para asegurar la salida constante de miel (miel de potes de reserva de alimento) ( Fig.5).



**Figura 19.** Alimento introducido en colmenas.

Para la disponibilidad de material biológico para la crianza de abejas in vitro, se cuenta con un Meliponario con 7 colmenas, el estado de éstas es el siguiente (Fig.6):

Colmena 1. Cuenta con una entrada prominente, con 3 alzas destinadas para celdas de crías, de las cuales, acomodaron reservas de alimento en la primera alza y los panales en las 2 alzas superiores, con aproximadamente 12 panales en los diferentes estadios de formación, su alza de reserva alimenticia con suficientes potes de miel y polen.

Colmena 2. Cuenta con una entrada prominente, con 2 alzas destinadas para celdas de crías y reservas de alimento (potes de miel), con aproximadamente 15 panales en los diferentes estadios de formación. Su alza de reserva alimenticia con suficientes potes de miel y polen.

Colmena 3. Cuenta con una entrada de mediano tamaño, con dos alzas destinadas únicamente para celdas de crías, con aproximadamente 5 panales en estadios de formación avanzado, su alza de reserva alimenticia con suficientes potes de miel y polen.

Colmena 4. Cuenta con una entrada de mediano tamaño, con 1 alza destinada únicamente para celdas de cría, con aproximadamente 5 panales en diferentes estadios del desarrollo, su alza de reserva alimenticia cuenta con suficientes potes de miel y polen.

Colmena 5. Cuenta con una entrada de tamaño mediano, con 2 alzas destinadas únicamente para celdas de cría, con aproximadamente 5 panales en estadios de formación avanzado, su alza de reserva alimenticia cuenta con suficientes potes de miel y polen.

Colmena 6. Cuenta con una entrada de tamaño mediano, con 2 alzas destinadas únicamente para celdas de cría, con aproximadamente 5 panales en estadios de formación avanzado, su alza de reserva alimenticia cuenta con suficientes potes de miel y polen.

Colmena 7. Cuenta con una entrada de tamaño pequeño, con 1 alzas destinadas únicamente para celdas de cría, con aproximadamente 5 panales en estadios de formación avanzado, su alza de reserva alimenticia cuenta con pocos potes de miel y polen ( Requiere introducción de alimento).

Colmena 8. Pérdida (posible pérdida de la reina durante el trasiego)

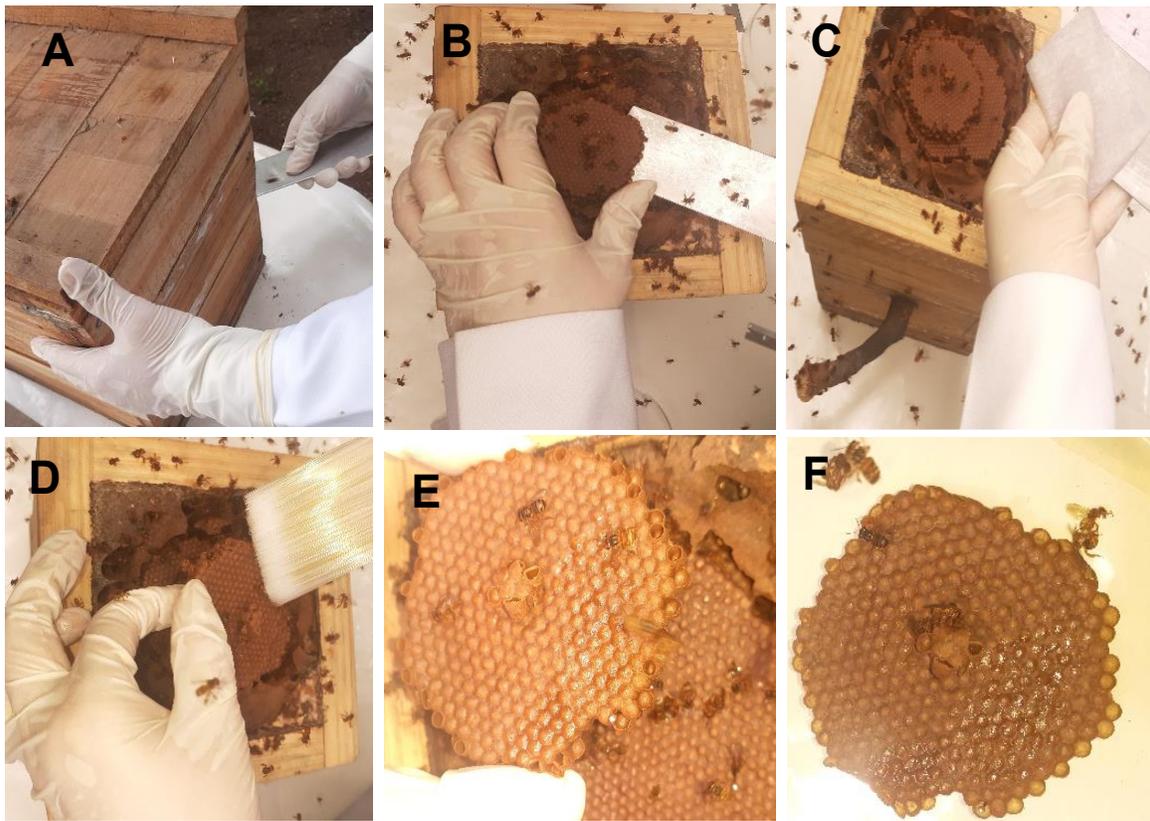


Figura 20. Meliponario con sus 8 cajas tecnificadas.

### 3.4 Crianza *in vitro*

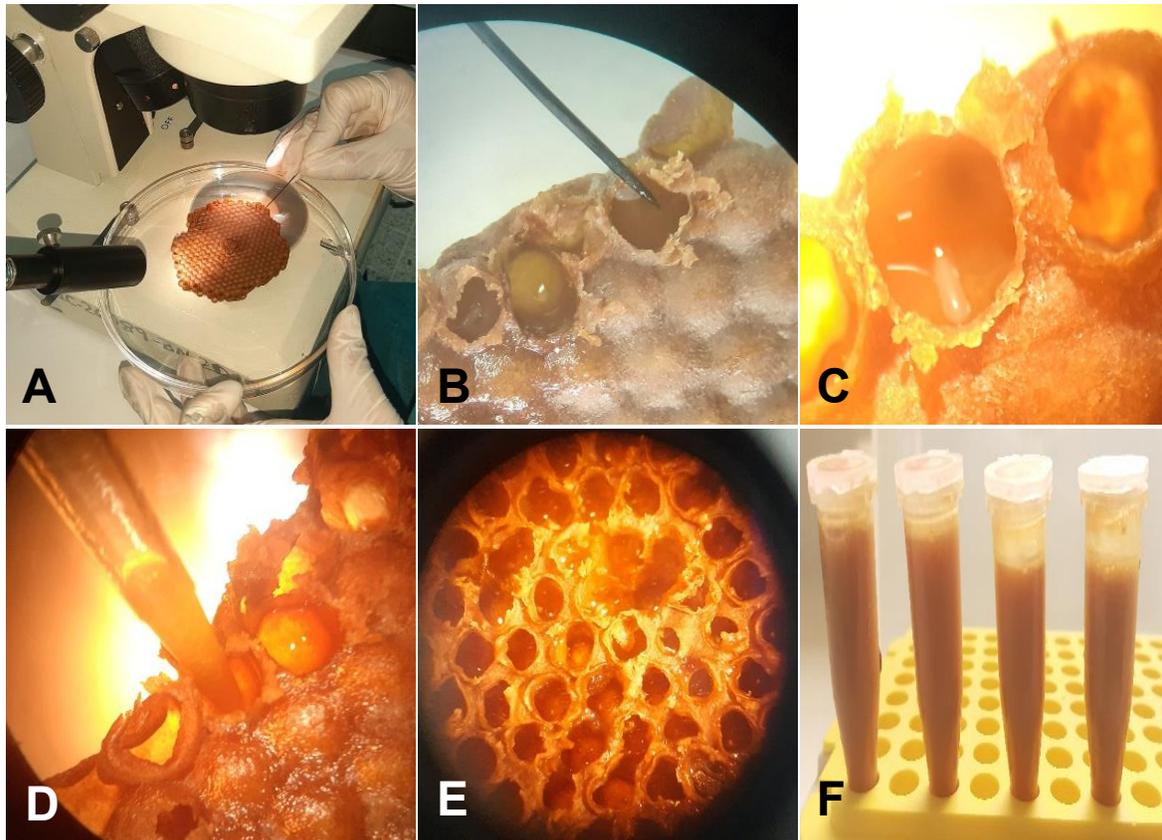
#### Colecta de alimento larval

Se estandarizó la cría de abejas obreras y reinas controles mediante una prueba experimental piloto *in vitro*. Para ello se seleccionó 2 colmenas con panales recientemente construidos (en estadio de huevo) con alrededor de 50 – 100 celdas de cría. Se extrajo el alimento de aquellas celdas que contenía huevos y aquellas que contenían larvas (24 horas de emergidas del huevo), estas fueron identificadas previamente al abrir el opérculo de la celda y evidenciar la presencia de huevos en los bordes del panal y larvas de aproximadamente 3mm de longitud identificadas además por su tamaño; por la presencia de la vena roja a lo largo del cuerpo y pequeños bordes dorados brillantes. Los panales que contenían larvas recién emergidas fueron introducidos de nuevo a las colmenas, según el marcaje de la posición previa (Fig.7).



**Figura 21.** Extracción de panal para la obtención de miel para cría in vitro. a) Apertura de alza de cría, b) Sellado de espátula con aceite vegetal sin olor, c) Extracción de panal con huevos en sus celdas, d) Limpieza de panal para incorporar las abejas dentro del alza, e) Marcaje de panal extraído y posición sobre el panal del alza, f) panal extraído colocado en placa de Petri.

Las celdas de cría se abrieron, haciendo uso de agujas entomológicas, y para la extracción del alimento larvario se hizo uso de micropipeta (graduadas de 20uL-100uL) y de tubos eppendorf estéril(1.5ml), este fue refrigerado para su posterior uso. (Fig.8)



**Figura 22.** Proceso de obtención de alimento larval. a y b) Se retira el opérculo, c) Se evidencia la presencia de huevo para hacer la extracción de la miel, d) extracción de miel por micro succión, e) vista del panel vacío, f) alimento larval obtenido de 2 panales.

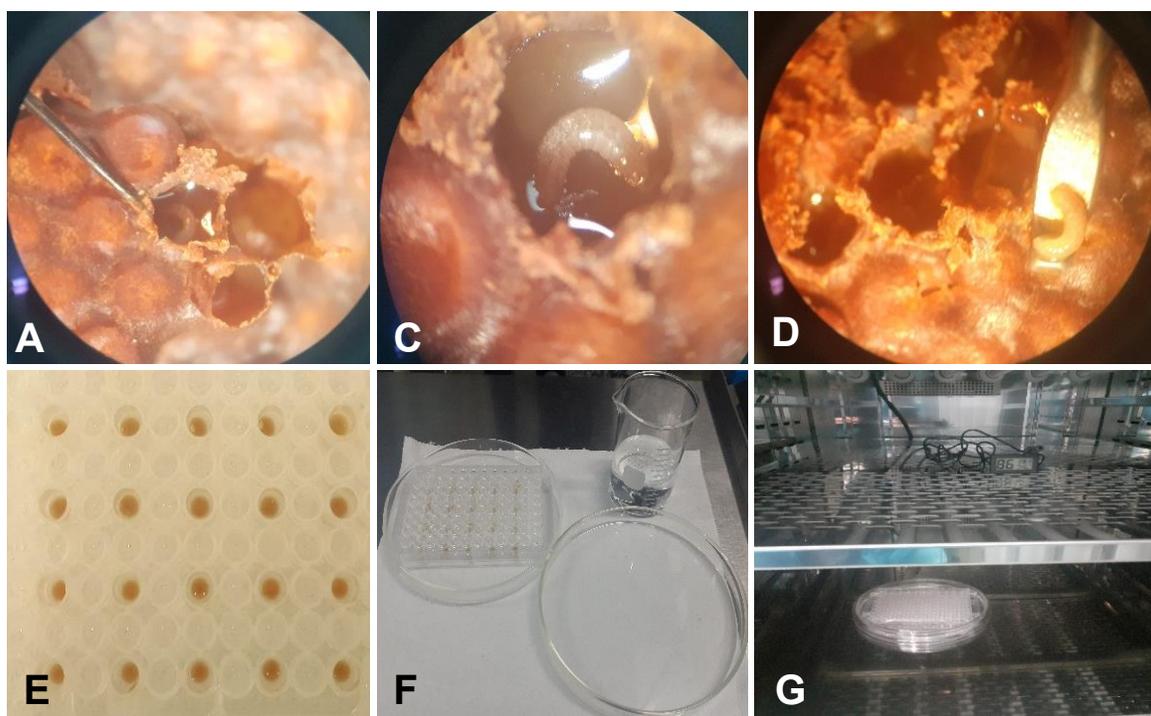
### Colecta de larvas

Para obtener el genotipo a criar *in vitro*, se seleccionó 1 colmena con panales recientemente contruidos (en estadio de huevo). Se dejó incubar 24 horas a 28°C y al 90% de Humedad para propiciar el desarrollo de larvas en estadio 1.

La colecta de las larvas se realizó, mediante la técnica de traslarve, utilizando larvas de 0 a 1 días de edad, éstas fueron colocadas sobre el alimento larval destinado a la crianza de reinas y obreras (99 uL y 33 uL respectivamente) en placas acrílicas tipo Elisa (cada placa con 96 pocillos de 1.08 cm de diámetro y 0.7 cm de profundidad con fondo redondo).

El traslarve consistió en mover las larvas haciendo uso de agujas de traslarve y colocarlas flotando sobre la superficie del alimento larval dispuesto sobre las placas de Elisa en la misma posición como se encuentran en las celdas de cría y en los volúmenes requeridos para criar obreras y reinas.

Posteriormente, estas placas de ELISA fueron colocadas sobre placas de Petri (150 × 30 mm) con 70ml de agua pura para mantener la humedad requerida. Cada colmena será utilizada rotándola para evitar dañarlas. (Fig.9)



**Figura 23.** Proceso de traslarve. a) Se quita el opérculo, b) se evidencia la presencia de larva en estadio 1, c) Se extrae la larva con una aguja de traslarve, d) se prepara la provisión de alimento para desarrollarse como obrera, e) se incorpora dentro de una placa de Petri con 70 ml de agua, f) se introduce en la cámara de crecimiento a la temperatura y humedad requerida

### 3.5 Control de variables ambientales

Las placas se colocaron en una cámara de crecimiento a 28 ° C, temperatura recomendada por Engels *et al.*, (1995); éstas se observaron diariamente hasta la emergencia como adulto. Todos los materiales fueron esterilizados para evitar la contaminación con organismos externos.

La humedad fue ajustada de acuerdo con lo reportado por Morales (2018) para el Primer estadio:

- Estadio Larval 1: a partir del día 1 al día 6 / Humedad 90% (Morales, 2018)

Se registró el porcentaje de humedad con un termohigrómetro portátil (Fig.10) para asegurar la supervivencia.



**Figura 24.** Termohigrómetro digital.

### Tamaño de la Muestra

Se criaron *In vitro* 44 larvas (reinas y obreras). Se definió esta cantidad por las condiciones de las colmenas (Se preparó los controles en época lluviosa, período de baja postura).

Se obtuvo un total de 6 ml de alimento larval de 2 celdas de cría (50-100 panales de obreras en estadio de huevo) proveniente de 2 colmenas del meliponario experimental.

Se sometieron a crianza en una cámara de crecimiento, la cual fue estabilizada para mantener la humedad requerida, del proceso de estabilización se determinó lo siguiente:

Para mantener la humedad al 90% durante los primeros 6 días del desarrollo larval (Larva 1), es requerido incorporar a la cámara de crecimiento 850ml de agua pura (además del volumen proporcionado de manera automatizada) y distribuida en bandejas con suficiente diámetro para propiciar los procesos de evaporación dentro de la cámara. Se calculó el volumen evaporado a las 24 horas después de estabilizada la temperatura y humedad requerida, para incorporar y mantener a diario el agua necesaria para mantener dicha humedad (aforar a 850ml). El volumen incorporado durante 6 días fue de 295ml. Se registró la temperatura y humedad en el interior de la cámara y se programó la cámara de crecimiento a una humedad del 78% (requerida para aumentar a 90% la humedad en el interior) (Fig.11).



**Figura 25.** Estabilizado de la Temperatura y humedad dentro de la cámara de crecimiento.

### Porcentaje de Supervivencia

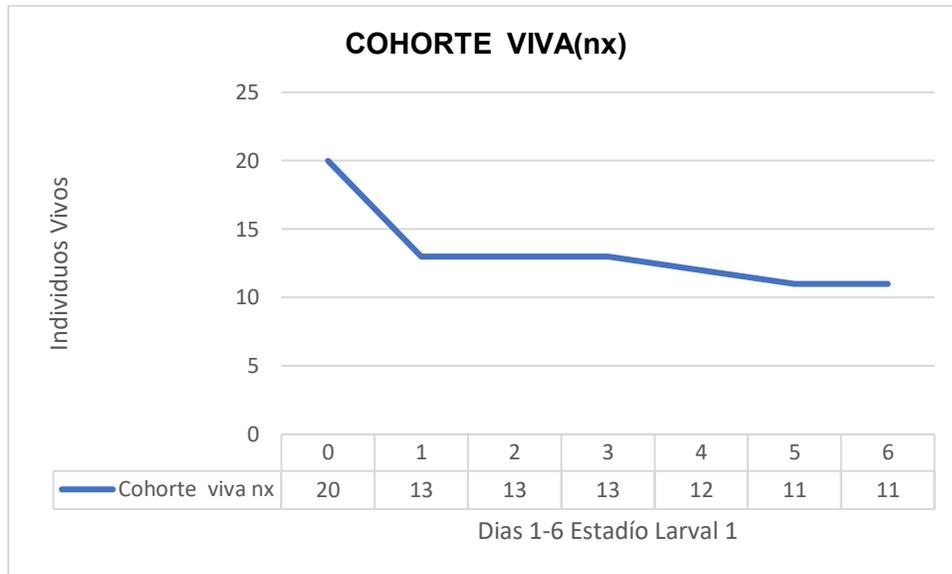
Se crió un total de 20 larvas obreras y 24 larvas reinas, de las cuales se registró la supervivencia cada 24 horas. Después de monitorear su desarrollo durante su estadio larval I, se evidenció según la construcción de tablas de vida de cohortes (con datos de sobrevivencia y mortalidad con grupos de individuos que comparten un mismo suceso dentro de un período temporal), utilizada para comprender factores que causen cambios en poblaciones con estructuras de edades, e información precisa sobre la estructura poblacional, sobrevivencia, mortalidad, entre otros. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Tabla de Vida larvas destinadas a obreras

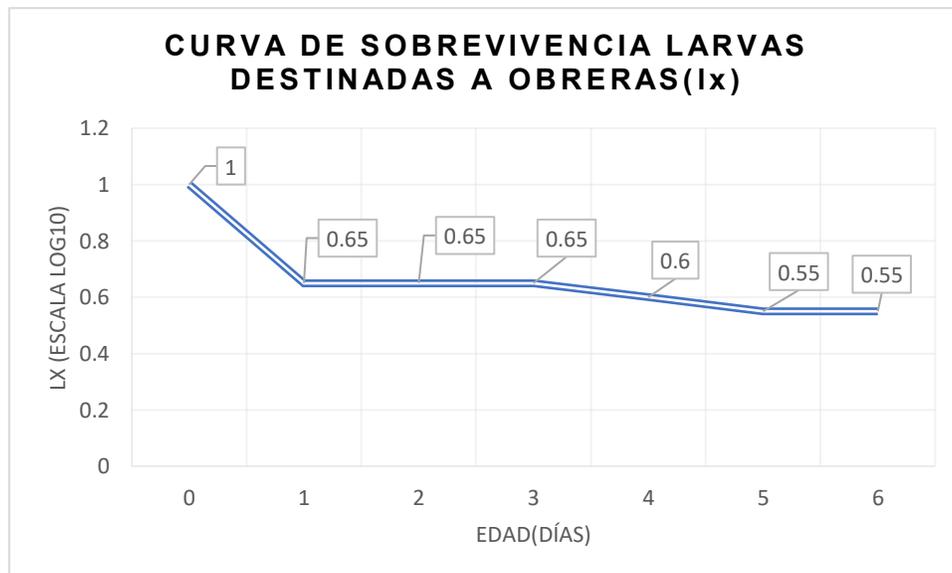
Estadio Larval/Días	Cohorte viva	Sobrevivencia en la cohorte	Muertes en la cohorte	Mortalidad específica de la edad
x	$n_x$	$l_x$	$d_x$	$q_x$
0	20	1	0.35	0.35
1	13	0.65	0	0
2	13	0.65	0	0
3	13	0.65	0.05	0.07692308
4	12	0.60	0.05	0.08333333
5	11	0.55	0	0
6	11	0.55	0.05	0.09090909

Se calculó según la variable independiente “edad” (x), los números de larvas que fueron sobreviviendo a cada edad de desarrollo “cohorte viva” ( $n_x$ ) del estadio larval 1, y se pudo obtener a partir del registro de datos la probabilidad que tiene un individuo al nacer de sobrevivir hasta una edad concreta ( $l_x$ ) y la tasa de Mortalidad específica de cualquier edad ( $q_x$ ).

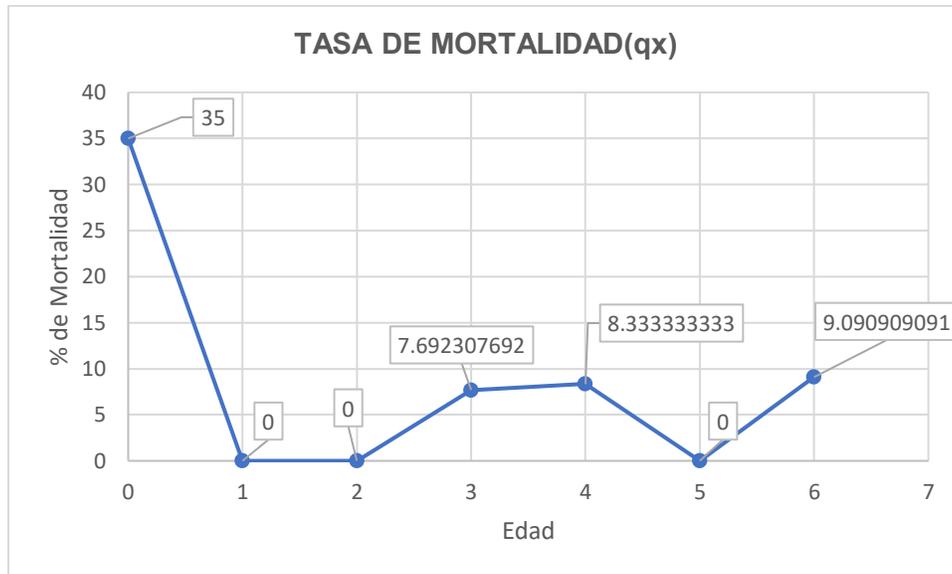
De acuerdo a ello se pudo evidenciar que la sobrevivencia en las diferentes edades (días de desarrollo), se mantiene con las condiciones de temperatura y humedad previamente acondicionadas. En contraste se evidencia además una alta mortandad, correspondiente a un 35% en el día (0) del estadio larval 1, un 0% durante los días (1), (2) y (5) y un promedio de 8.4% durante (3), (4) y (6) (Ver grafica 1-3).



**Figura 26.** Grafica de Individuos vivos según edad de desarrollo durante el estadio larval 1.



**Figura 27.** Grafica de probabilidades expresadas en proporción de sobrevivir a esa edad en específico.



**Figura 28.** Gráfico de tasas de mortalidad expresadas en porcentaje según edad en días del desarrollo larvario 1.

En el caso de los controles (larvas alimentadas para ser reinas), se evidencia una sobrevivencia del 100% durante los 6 días de su estadio larval, por consiguiente, una tasa de mortalidad del 0% (Ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Datos larvas destinadas a Reinas (controles)

Estadío Larval/Días	Cohorte viva	Sobrevivencia en la cohorte	Muertes en la cohorte	Mortalidad específica de la edad
x	$n_x$	$l_x$	$d_x$	$q_x$
0	24	1	0	0
1	24	1	0	0
2	24	1	0	0
3	24	1	0	0
4	24	1	0	0
5	24	1	0	0
6	24	1	0	0

### 3.6 Análisis de miRNAs

#### 3.6.1 Revisión Bibliográfica y Obtención de secuencias

Para seleccionar los miRNAs se realizó un análisis de bibliografía sobre reportes de miRNAs Endógenos y Exógenos expresados en abejas eusociales. Se seleccionó aquellos con influencia en la determinación de la casta y en consecuencia en la fertilidad.

Las secuencias de los miRNAs seleccionados se obtuvieron de la base de datos de miRBase.org, esta es una base de datos de búsqueda de secuencias y anotaciones de miARN publicadas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Secuencias documentadas.

<b>miARN</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Reporte</b>
ath-miR166a-5p	>ath-miR166a-5p MIMAT0031880 GGACUGUUGUCUGGCUCGAGG	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)
ath-miR162a-5p	>ath-miR162a-5p MIMAT0031876 UGGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC	
ath-miR168a-5p	>ath-miR168a-5p MIMAT0000198 UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA	
ame-miR-14-3p	>ame-miR-14-3p MIMAT0004423 UCAGUCUUUUUCUCUCUCCUA	(Ashby <i>et al.</i> , 2016)
ame-miR-6001-5p	>ame-miR-6001-5p MIMAT0023541 GUAGGUAACGACUGAUGGGAAC	(Collins <i>et al.</i> , 2017)
ame-miR-6001-3p	>ame-miR-6001-3p MIMAT0023542 UUCUCUUUGGUUGUUACCACUA	

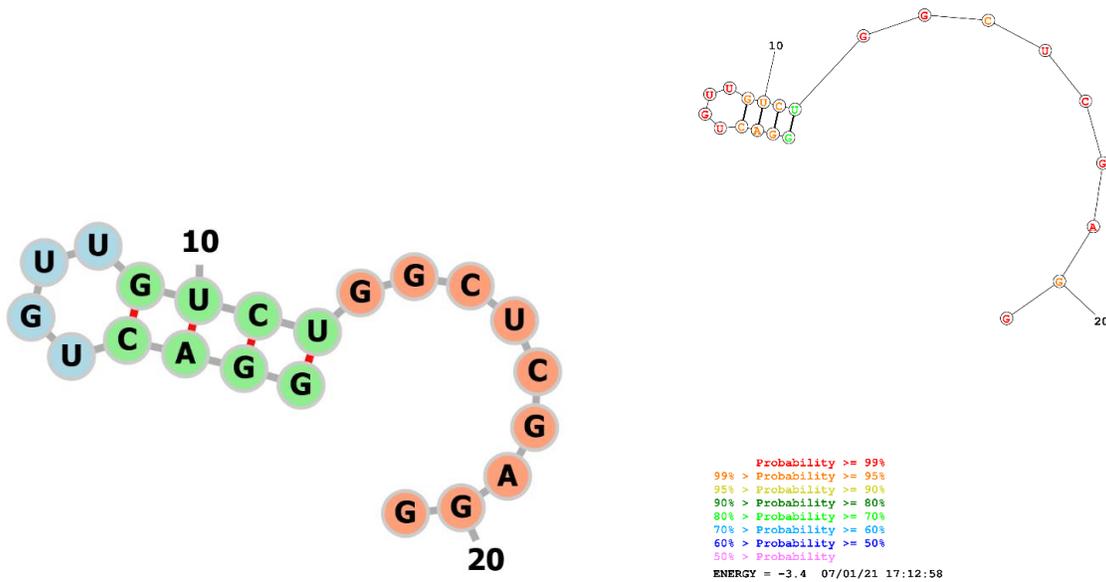
### **3.6.2 Revisión *In silicio***

#### **3.6.2.a Estructura y función de miRNAs**

Se obtuvo la estructura de los miRNAs usando la herramienta RNAstructure, es un paquete completo para la predicción y el análisis de estructuras secundarias de ARN. Las funciones de cada uno fueron tomadas según reporte bibliográfico de organismos modelos de miRNAs Exógeno (*A. thaliana*) y Endógenos (*D. melanogaster* , *A. mellifera* y *Bombus terrestris*). Se presenta a continuación un resumen de las Funciones biológicas, moleculares y estructura de los miRNAs propuestos.

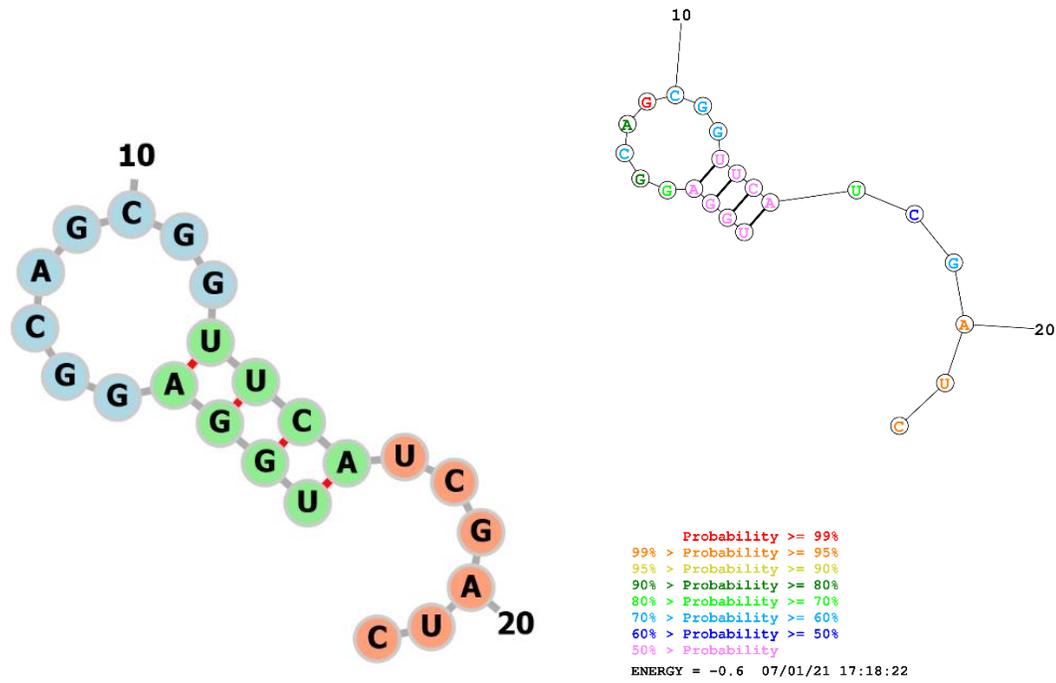
## miRNAs Exógenos:

## Ath-miR-166a-5p



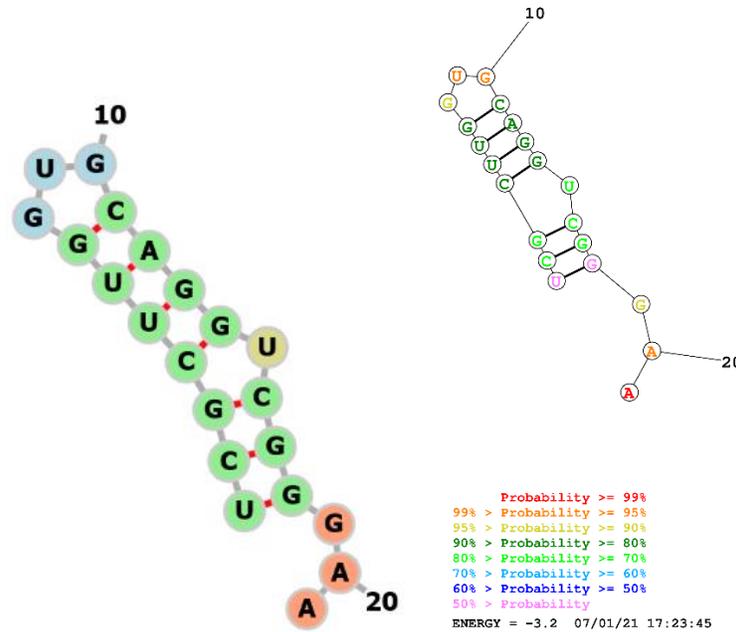
<b>Nombre:</b>	Ath-miR-166a-5p
<b>Acceso :</b>	MIMAT0031880
<b>Secuencia:</b>	GGACUGUUGUCUGGCUCGAGG
<b>No. Nucleótidos:</b>	21
<b>Organismo:</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Función Biológica:</b>	Embriogénesis, inhibe la fertilidad en larvas obreras de <i>A. Mellifera</i>
<b>Función Molecular:</b>	Regulación transcripcional

## Ath-miR-162a-5p



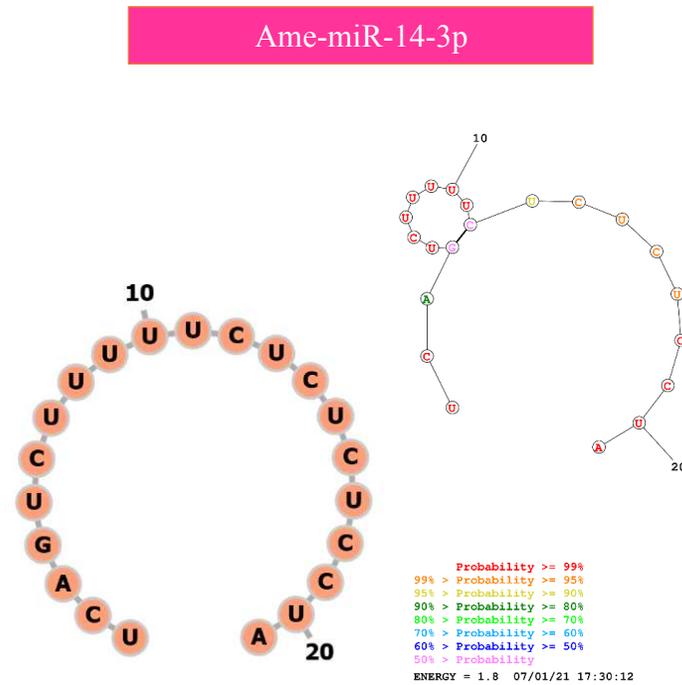
<b>Nombre:</b>	Ath-miR-162a-5p
<b>Acceso :</b>	MIMAT0031876
<b>Secuencia:</b>	UGGAGGCAGCGGUUCAUCGAUC
<b>No. Nucleótidos:</b>	22
<b>Organismo:</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Función Biológica:</b>	Embriogénesis y desarrollo, Induce fenotipos de larvas obreras de <i>A. Mellifera</i>
<b>Función Molecular:</b>	Inhibidor postranscripcional

## Ath-miR-168a-5p



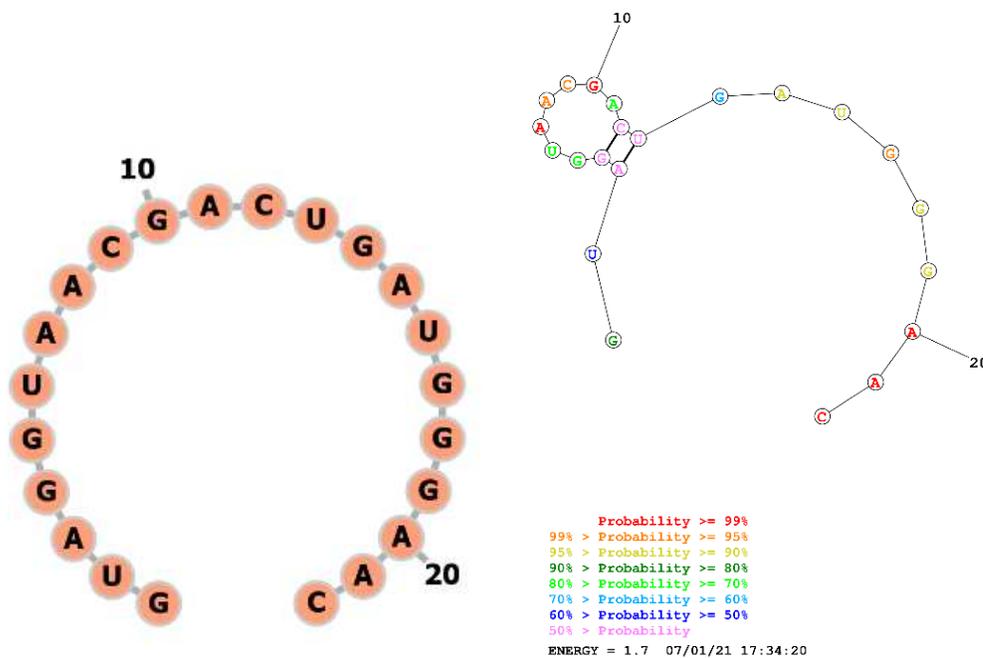
<b>Nombre:</b>	Ath-miR-168a-5p
<b>Acceso:</b>	MIMAT0000198
<b>Secuencia:</b>	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA
<b>No. Nucleótidos:</b>	22
<b>Organismo:</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Función Biológica:</b>	Producción de polen, fertilidad en obreras de <i>A. mellifera</i> .
<b>Función Molecular:</b>	Regulación transcripcional

## miRNAs Endógenos:



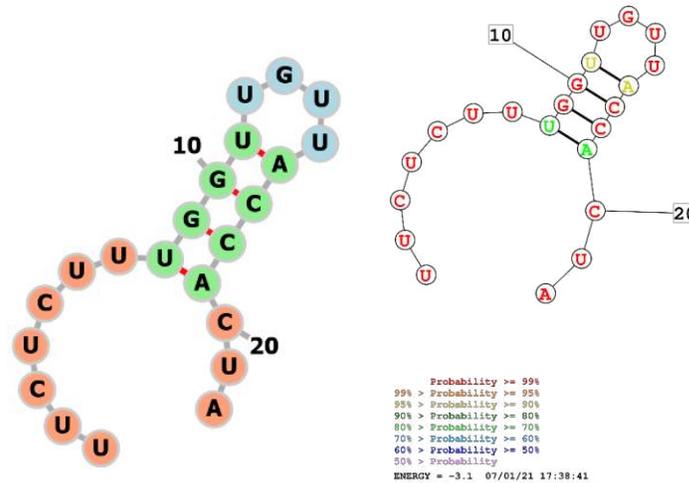
<b>Nombre:</b>	Ame-miR-14-3p
<b>Acceso:</b>	MIMAT0004423
<b>Secuencia:</b>	UCAGUCUUUUUCUCUCUCCUA
<b>No. Nucleótidos:</b>	21
<b>Organismo:</b>	<i>Apis mellifera</i>
<b>Función Biológica:</b>	Actividad hormona esteroide, Morfogénesis, embriogénesis, determinación materna( eje anterior y posterior), expresado en abejas reinas de <i>A. mellifera</i> .
<b>Función Molecular:</b>	Represor transcripcional

## Ame-MiR-6001-5p



<b>Nombre:</b>	ame-miR-6001-5p
<b>Acceso:</b>	MIMAT0023541
<b>Secuencia:</b>	GUAGGUAACGACUGAUGGGAAC
<b>No. Nucleótidos:</b>	22
<b>Organismo:</b>	<i>Apis mellifera</i>
<b>Función Biológica:</b>	Desarrollo y la diferenciación reproductiva en <i>Apis mellifera</i> y <i>Drosophila sp.</i> , desarrollo de ovocitos y ovarios, neurodesarrollo, desarrollo larvario y muda larvaria( expresado en abejas reinas de <i>A. mellifera</i> ) y en larvas tardías y pupa primaria de reina de <i>B. terrestris</i>
<b>Función Molecular:</b>	Síntesis de Vitelogenina, Ecdisona y Ferredoxina.Reemplaza la escisión de Drosha con splicing para generar pre-miRNA

## Ame-MiR-6001-3p



<b>Nombre:</b>	ame-miR-6001-3p
<b>Acceso:</b>	MIMAT0023542
<b>Secuencia:</b>	UUCUCUUUGGUUGUUACCACUA
<b>No. Nucleótidos:</b>	22
<b>Organismo:</b>	<i>Apis mellifera</i>
<b>Función Biológica:</b>	Desarrollo y la diferenciación reproductiva en <i>Apis mellifera</i> y <i>Drosophila sp.</i> , desarrollo de ovocitos y ovarios, neurodesarrollo, desarrollo larvario y muda larvaria( expresado en abejas reinas).
<b>Función Molecular:</b>	Síntesis de Vitelogenina, Ecdisona y Ferredoxina. Reemplaza la escisión de Drosha con splicing para generar pre-miRNA

### 3.6.2. b Análisis de conservación de homologías de secuencia

Para la búsqueda de homologías de secuencia se utilizó el BLAST de la plataforma de miRBase, los alineamientos se realizaron usando el programa MUSCLE V.3 y las correcciones del alineamiento mediante Fast.Dist.

### 3.6.2. c Representación gráfica

La representación gráfica y edición de los árboles filogenéticos se realizaron con la herramienta TreeDyn.

Los programas a utilizados son de libre acceso, la selección de estos es porque permitieron visualizar de mejor manera las similitudes en las secuencias e indagar en las funciones.

De acuerdo con los análisis bioinformáticos se muestran las homologías de secuencia de los miRNAs endógenos seleccionados para este estudio. En la clase insecta y en el Orden Himenóptera, se evidencia que los miRNAs reportados en estos insectos miR-14-3P, miR-6001-5p y miR-6001-3p se conservan completamente en diferentes especies del mismo orden.

De acuerdo con la filogenia, de la avispa *N. vitripennis* se obtuvo la secuencia de abeja reina (Kent *et al.*, 2015), estos resultados sugieren que durante la evolución de la socialidad los genes sometidos a selección en antepasados solitarios fueron cooptados para su uso en funciones específicas de castas. (Fig.15)

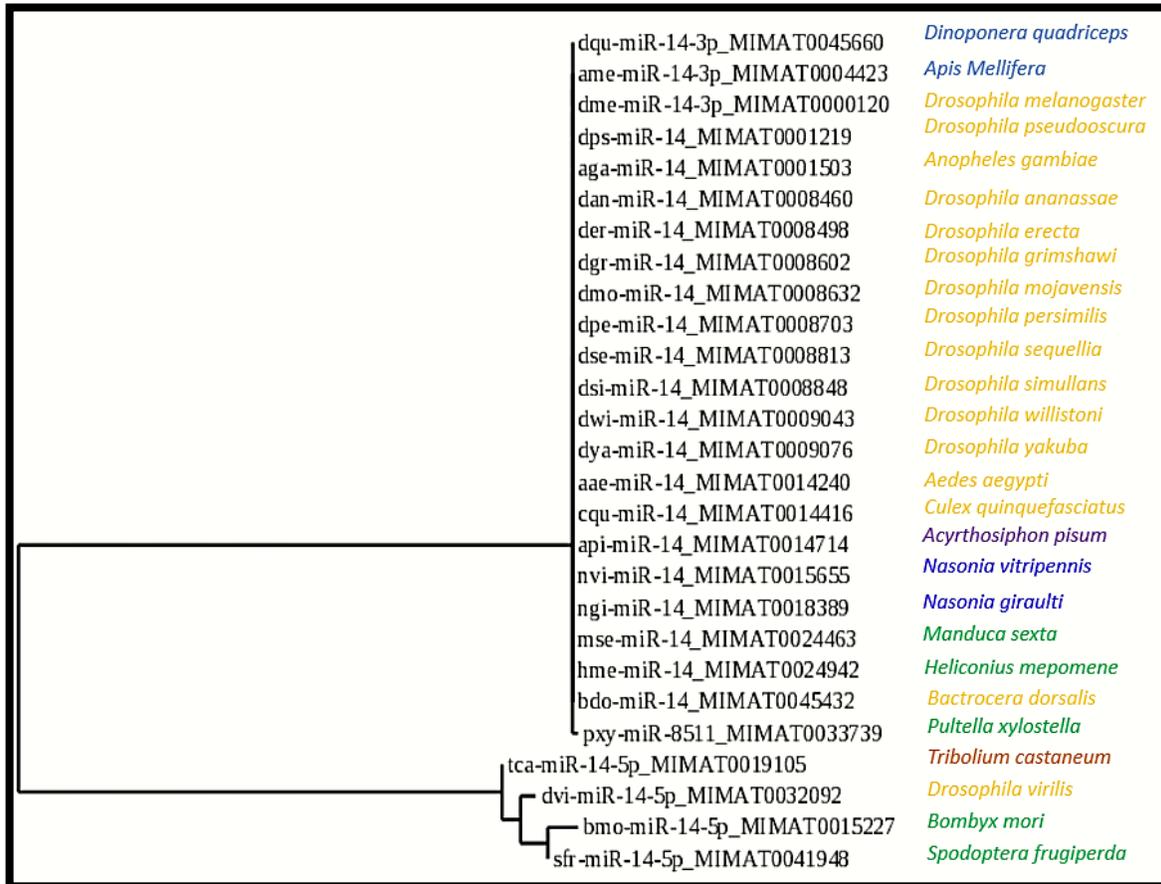
Estos resultados indican que esta similitud entre especies ortólogas, está asociada probablemente a funciones específicas de castas, en lugar de grados de socialidad. Para el caso de la hormiga *D. cuádriceps*, esta presenta una sociedad simple donde los individuos conservan la capacidad de cambiar fenotipos; sin embargo, Patalano *et al.*, 2015 evidenciaron en hormigas reproductoras y trabajadoras la homología de secuencia.

Para el caso de los miR-6001-5p y miR-6001-3p, ambos comparten las mismas funciones en *A. mellifera*, regulando procesos de diferenciación reproductiva en abejas reinas; sin embargo, en *B. Terrestris* el miR-6001-3p se diferencia por su expresión únicamente en cutícula de larvas destinadas a reinas (Collins *et al.*, 2017)

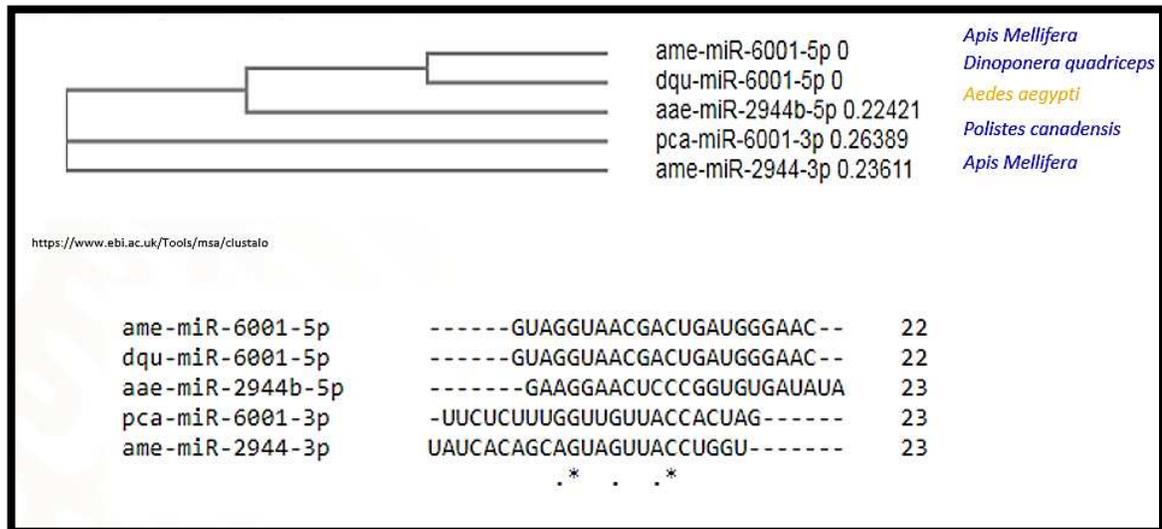
De acuerdo a los análisis filogenéticos para miR-6001-5p, se evidencia que sus secuencias se conservan en 4 especies de Himenópteros y en 1 especie de Díptero. Muestra mayor similitud entre las secuencias de *A. mellifera* con *D. cuádriceps*. Esta similitud de secuencia

y puntos en común en la evolución; posiblemente mantengan de manera compartida la función de sus miRNAs. (Fig.16)

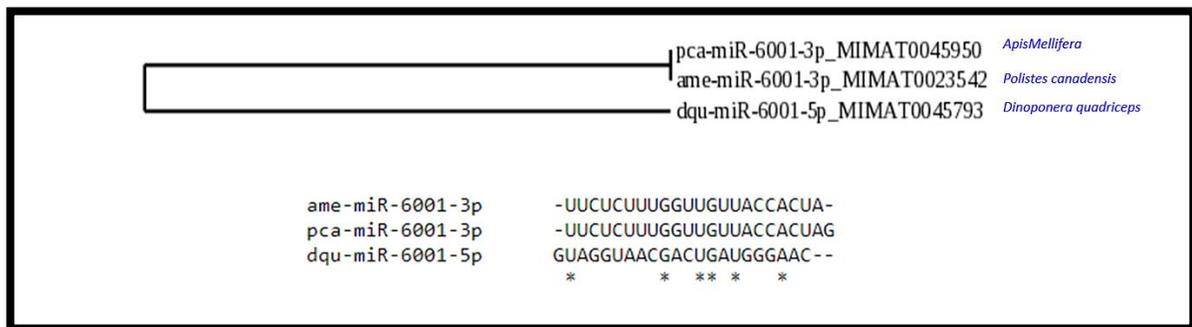
En cuanto a la homología de miR-6001-3p con otros organismos de la clase insecta, éste no muestra ninguna homología, pero sí con la avispa primitivamente eusocial *P. Canadensis*, posiblemente compartiendo funciones en la diferenciación de castas. (Fig. 17)



**Figura 15.** Filogenia que muestra la homología de miR-14-13p en especies de la clase insecta y representando en azul al Orden Himenóptera en específico.



**Figura 16.** Filogenia que muestra la homología de miR-6001-5p con otros insectos y en su gran mayoría del Orden Himenóptera.



**Figura 17.** Filogenia que muestra la homología de miR-6001-3P con otras especies del orden Himenóptera.

**Capítulo IV. Discusión General**

El conocimiento de los principios que rigen la eusocialidad en colonias de insectos ha impactado profundamente en las actividades comerciales, sanitarias y productivas de varias civilizaciones humanas. Pero, aun así, existe una falta de comprensión completa de cómo se pueden reproducir *in vivo* e *in vitro* a ciertas especies de abejas nativas, con el propósito de mantener una comunidad saludable y en la que cada individuo y su función respectiva mantengan el equilibrio y las condiciones dentro de la colmena para poder salir y continuar sus roles ecológicos y sobre todo prestando sus servicios eco sistémicos y proveyendo de recursos sanitarios y alimenticios a los humanos.

La eusocialidad ha sido descrita como un evento evolutivo que impacta a varias comunidades de insectos, y su adopción generalmente se traduce en la segmentación de roles específicos en la colonia, además, estos organismos tienden a cambiar también su morfología para mantener un control estricto de cada tarea en la colonia.

Los cambios en la morfología adoptada por los insectos eusociales se han asociado a varios factores influyentes, entre ellos; la alimentación, la secreción hormonal y también sus asociaciones simbióticas con otros grupos de organismos. De hecho, la alimentación particular en algunas castas de abejas eusociales está fuertemente asociada a la diferenciación morfológica, por ejemplo, en la tribu Meliponini. Las bases moleculares de cómo la alimentación y el crecimiento modulan la diferenciación de castas para cumplir los diferentes roles dentro de la colmena; aún son oscuras, pero se han planteado algunas claves y se ha señalado que los miARN son actores cruciales de la diferenciación, modulando no solo los cambios físicos sino también el comportamiento.

Aquí, describimos y empleamos un método mejorado para impulsar la crianza y el manejo de colmenas experimentales, del insecto eusocial *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera:Apidae Meliponini), y también analizamos las relaciones evolutivas entre miARNs clave asociados con la diferenciación morfológica de castas en insectos eusociales.

Nuestro enfoque fue emplear colonias obtenidas de la vida silvestre, viviendo en árboles alrededor de la ubicación experimental en el Oriente de Honduras y manteniéndolas y adaptándolas en un meliponario experimental haciendo uso del tecnificado de las colmenas en cajas de tipo Portugal Araujo, un contenedor bien caracterizado para especies nativas de talla media. También aprovechamos este enfoque para monitorear las posturas y el crecimiento de la colmena como patrón para identificar colonias exitosas proveedoras de

---

recursos para la experimentación. Se trabajó *in vitro* teniendo control sobre dos parámetros específicos: a) temperatura y b) humedad. y obtener y registrar de manera dependiente a dichos parámetros: a) desarrollo larvario, b) tasa de supervivencia, c) tasa de mortalidad y d) mortalidad por edad. Con este enfoque, pudimos informar una estrategia exitosa para administrar, mantener y desarrollar abejas eusociales; además, nuestros datos sugirieron que esta estrategia se puede adaptar fácilmente a otras regiones de América, variando los parámetros de humedad y temperatura para desarrollo larvario de castas.

La humedad fue ajustada de acuerdo a 3 períodos críticos del desarrollo Adaptando el protocolo sugerido por Morales (2018) para la cría de reinas de *S. pectoralis* de manera *in vitro* y aclimatando entonces el desarrollo del Estadio Larval 1 a partir del día 1 al día 6 con una Humedad al 90%. Independientemente la prueba piloto fue desarrollada hasta el estadio larval 1; Se realizó los ajustes para la estudios posteriores donde se evidencie el desarrollo completo de las diferentes castas siguiendo lo reportado por Menezes, (2013). Para Aclimatar el desarrollo en Estadio Larval 2 a partir del día 7 al día 12 ajustando la Humedad al 85% y para el desarrollo de Prepupa-Adulto a partir del día 13 hasta la emergencia una Humedad al 75%.

Para este estudio no se incorporaron sales como reguladores de la Humedad, ya que bastó con la incorporación de humedad diaria según aforos de evaporación y de la manera siguiente: Para mantener la humedad al 85% durante los 5 días posteriores (Larva 2), se programó la humedad de la cámara de crecimiento a 76%, y se incorporó 325ml de agua pura de acuerdo a registros de evaporación luego de estabilizarse la humedad. El resto del tiempo del desarrollo larval (prepupa-adulto) se programó la humedad de la cámara de crecimiento a 67% de humedad para mantener una humedad interior del 75%, se incorporó a diario un volumen de 450ml de acuerdo a los registros de evaporación.

La alta mortandad de larvas destinadas a obreras durante el día (0) del desarrollo Larval 1, es correspondida a la fase crítica del desarrollo de la larva, a las 48 horas después de haber emergido del huevo, ya que esta depende completamente del alimento suministrado y de la superficie de aire sobre su cuerpo que le permita recibir el oxígeno para su correcta respiración por sus espiráculos, durante el proceso de traslarve la manipulación posiblemente bañó por completo el cuerpo de la larva cubriendo por completo sus espiráculos y por consiguiente evitando su respiración. Se recomienda hacer pruebas preliminares de traslarve. En contraste con las larvas controles destinadas a reinas su mortandad de 0% evidencia así que las condiciones ambientales y la técnica se ajusta mejor

---

a los controles ya que el protocolo utilizado usa volúmenes para la crianza de reinas , facilitando la superficie donde se posan las larvas para alimentarse y continuar su desarrollo. Se inició el traslarve de las larvas destinadas a obreras haciendo uso del tamaño estándar de agujas de traslarve (*para Apis mellifera*), en el proceso se adaptó una aguja según el tamaño de la especie modelo en este estudio lo que facilitó la técnica de traslarve y disminuyó de manera considerable la mortandad en el día (0)

Por otro lado, también aprovechamos las bases de datos que recopilan información bibliográfica y herramientas para el análisis *in silico* de miARN para impulsar un análisis filogenético y la predicción de la estructura secundaria de miARN asociados con el desarrollo y la diferenciación de insectos eusociales. Encontramos estructuras de bucle de conservación en todas las secuencias analizadas. Con esto, todavía tenemos que impulsar la experimentación *a futuro* que permita evidenciar los efectos influyentes de miRNA en la morfogénesis de castas. Estudios recientes publicados por Rolle et al., (2016) plantean que los miRNAs se conservan evolutivamente con las características específicas de las secuencia y que estas revelan la complejidad de su estructura molecular; determinando procesos celulares específicos (Proliferación, diferenciación, regulación) y trastornos neurodegenerativos. Sugiriendo además que conociendo las características de la secuencia es posible mapear las vías y la identificación teórica de objetivos genéticos para crear un marco biológico que permita explicar la relevancia de los miRNAs en la regulación de sus genes blanco ya que la complejidad de los procesos de regulación se deden a que 1 sólo miRNA maduro controla miles de mRNAs, y 1 solo Mrna es objetivo de múltiples miRNAs.

Collins *et al.*, (2017) validaron dos miARN (Bte-miR-6001-5p y Bte-miR-6001-3p) que se expresan más en larvas de estadio tardío destinadas a reinas que a obreras en *Bombus terrestris*( *Meliponini*, Apidae) estos miARN están asociados con la determinación y / o diferenciación de la casta, demostrando diferencias de expresión en estos miARN que ocurren en larvas y en diferentes estadíos larvales . Además, el papel en la determinación de casta para miR-6001-5p y miR-6001-3p regulando a Bte-miR-6001-5p ya que incluye a la proteína inducida por ecdisona y ferredoxina, ambas asociadas con respuestas a la ecdisona en *Drosophila* (Palandri, 2015). La ecdisona es un ecdiesterioide, que media muchos procesos, incluida la determinación de castas en abejas verdaderamente

---

eusociales-*A. mellifera*(Rachinsky et *et al.*, 1990) y primitivamente eusociales- *B. terrestris* (Hartfelder *et al.*, 2000).

De acuerdo a lo reportado por Collins *et al.*, (2017), los miARN están asociados con la determinación y diferenciación de castas en un proceso relativamente temprano en la evolución eusocial, y el papel de los miARN individuales generalmente no se conserva a medida que avanza la evolución eusocial. Por lo anterior, se requiere hacer estudios adicionales, que además de centrarse en como los miARN endógenos afectan a la casta, es de considerar también ¿cómo se ha conservado su secuencia en los mecanismos que explican la eusocialidad en las abejas? También Greenberg *et al.*, (2012), encontraron que ciertos loci de miARN son específicos de los himenópteros aculeatos, pero están presentes solo en los taxones eusociales, o al menos ausentes en las avispas no eusociales. *Nasonia longicornis* y *Nasonia vitripenni* y plantean la posibilidad de que algunos de estos miARN hayan estado involucrados en las múltiples evoluciones de la eusocialidad en los himenópteros al igual que lo plantean Bonasio *et al.*, (2010) mostrando diferencias en la expresión de miARN entre diferentes especies de hormigas eusociales.

Finalmente, proponemos aquí un método bien descrito para obtener y mantener colonias de una abeja modelo sin aguijón común y abundante en la Región del Neo trópico, y planteamos la hipótesis de que la aclimatación y el intento de mantener las condiciones naturales en las colonias *in vivo* e *in vitro* son clave para la crianza de la especie.

## Capítulo V. Conclusiones y perspectivas

La especie para seleccionar como modelo experimental debe ser abundante y común en la zona donde se establecerá el meliponario experimental, y a consideración deberá ser seleccionada por el rango de forrajeo o de vuelo de la especie y para asegurar su alimentación y adaptación con la flora circundante (Nieuwstadt y Ruano-Iraheta, 1996).

Mediante el establecimiento y aplicación de un protocolo y bajo las condiciones descritas para la crianza *in vivo* de abejas de la especie *S. pectoralis* es posible la obtención de recursos alimenticios y biológicos para la crianza *in vitro* de larvas destinadas a obreras y reinas.

La crianza *in vitro* de abejas reinas de la especie *S. depilis* según el protocolo descrito por Menezes C, en 2019 es aplicable para la crianza *in vitro* de castas de abejas de la especie *S. pectoralis* con algunas modificaciones en las cantidades de alimento para las diferentes castas y para las variables ambientales con un espacio no tan limitado de +/-5 °C de Temperatura y Humedad sin repercutir en la tasa de supervivencia.

Según la identificación y caracterización de los miRNAs exógenos provenientes de los recursos vegetales que utilizan las abejas para alimentar a las obreras, estos estarían causando la esterilización por vía trófica. Y análogamente los miRNAs endógenos provenientes de secreciones hipofaríngeas de las abejas nodrizas, estarían propiciando la fertilidad en abejas destinadas a reinas en abejas eusociales.

Según la revisión de bibliografía de los miRNAs propuestos y sus secuencias fue posible sentar las bases teóricas que permitan desarrollar otros análisis *in silico* a futuro haciendo uso de herramientas bioinformáticas que generen información más robusta y profunda concerniente a características específicas de la secuencia y por consiguiente de su estructura molecular para el mapeo de los genes objetivo y evidenciar la función reguladora en particular del miRNA en referencia.

## Capítulo VI. Publicaciones

### Revisión internacional

**Caste development in Hymenoptera, a molecular view for farming improvement of stingless bees**

**D. M. Moreno-Cálix<sup>1,5</sup>, F. Guillén-Chable<sup>2</sup>, M.A. Gallardo-Flores<sup>3</sup>, K. J. Cantarero<sup>4</sup> L.C. Rodríguez-Zapata<sup>6</sup> and E. Castaño<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34. Col. Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, Yucatán, México.

<sup>2</sup>UMDI-Sisal, Faculty of Sciences, National Autonomous University of Mexico, Puerto de Abrigo s/n, Sisal, Yucatán CP 97355, Mexico.

<sup>3</sup>Tropical Beekeeping Research Center (CINAT), National University, PO Box 475-3000 Heredia, Costa Rica.

<sup>4</sup>National Autonomous University of Honduras - School of Biology, Floor 3, Building J1, Tegucigalpa University City, MDC, Honduras,

<sup>5</sup>National Autonomous University of Honduras - Department of Biology, Floor 3, Building 3, Valle de Sula UNAH-VS, Cortés, Honduras.

<sup>6</sup>Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34. Col. Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, Yucatán, México

\*Corresponding author: enriquec@cicy.mx

#### Abstract

Caste development in social insects represents an essential transition of organization and evolution. These transitions are critical for the ecological success of social insects. During the last few decades, micro RNAs (miRNAs) from nurse bee secretions in larval food constitute an additional element in the regulatory control of caste determination. Furthermore, this caste differentiation is a complex developmental process influenced by genetic, epigenetic, and environmental factors. The evolution and genetic elements for caste development are an enigma in Hymenoptera, as well as the full impact the genetic elements given in larval food have on the development of the bees. In this review, we examine and summarize miRNAs as a regulatory component of larval food and their effect on caste development in eusocial hymenoptera.

**Keywords:** eusociality, caste determination, microRNA, epigenetic regulation

## Introduction

Organized insect societies show a pattern of hierarchies and orderly distribution of work. Therefore, success is reflected in their communities where sociability is key to improving the inclusive attitude of an individual. In colonies of social insects, the organization in the distribution of work is clear, as well as characteristic and distinctive phenotypes within the same sex according to the role played. Highly eusocial (actual society) occurs and has evolved several times in Hymenoptera insects. Genetic analyzes provide a new empirical baseline for understanding this evolution and the definition of castes in a more complex way than is handled today by referring to the caste of social insects merely as "the reproductive division of labor" and as "the division of labor among females based on reproductive specialization" (Hughes et al., 2003; Michener, 1974; Sumner et al., 2018).

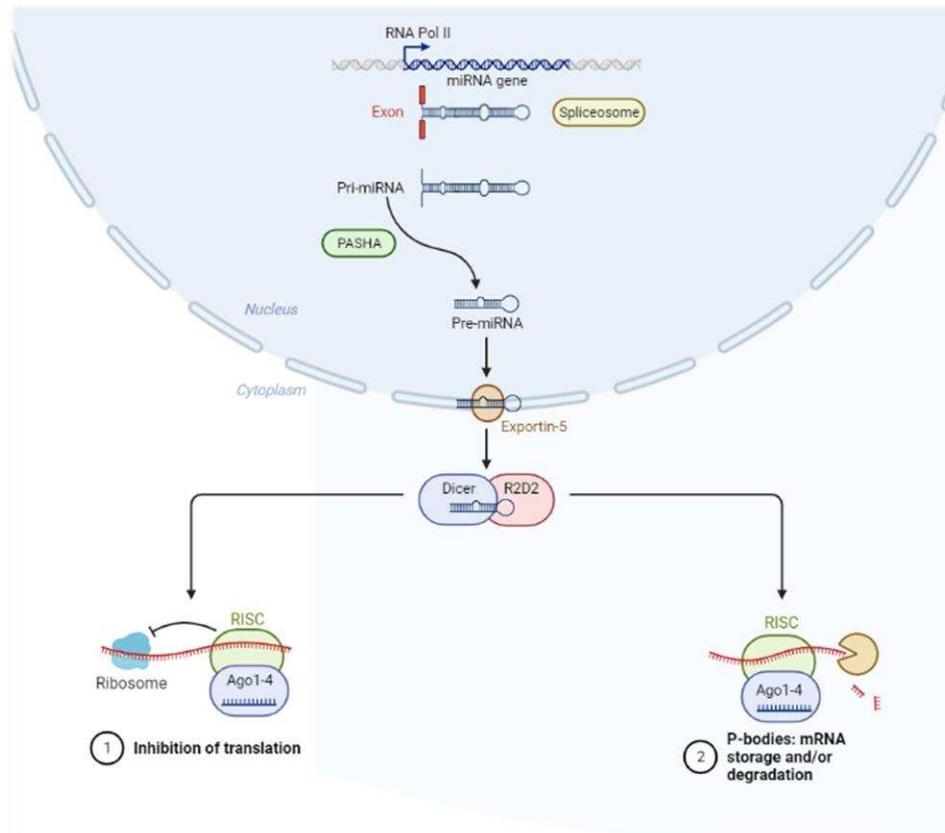
Epigenetic mechanisms that affect gene expression and biological function have already been documented in eusocial bees, specifically through gene silencing mediated by short-chain non-coding RNA (Ashby et al., 2016; Søvik et al., 2015; Villagra and Frías-Lasserre, 2020; Yan et al., 2014). MicroRNAs (miRNAs) are ncRNAs whose documented function is to regulate gene expression (Djuranovic et al., 2011). miRNAs of 19-24 nucleotides in length, restricting protein production by degrading mRNA and inhibiting translation (Huntzinger and Izaurralde, 2011) and affecting multiple developmental and phenotype characteristics (Selbach et al. 2008). The potential role of miRNAs in caste development has been studied, and shown that miRNAs are expressed differentially during development. The meliponini tribe does not record to date any such study. The morphological differentiation of castes is a different process influenced by the food provided under a highly organized process of sourcing food in brood cells, resulting in different morphological, physiological, and behavioral phenotypes in the castes.

The active components that determine the fate of bee development remain elusive and even controversial (Buttstedt et al., 2016). According to (Solenn et al., 2015; Sumner et al., 2006), the ability of a genotype to alter its ontogeny in response to an environmental change is due to its phenotypic plasticity during development. The roles of miRNAs in morphological and phenotypic plasticity are now a focus of study. However, there needs to be more information on how this influences behavioral phenotypic plasticity. The phenotypic plasticity of natural behavior due to the division of labor (DOL) characterized in *Apis mellifera* has been the model for understanding the genetic mechanisms that affect different behavioral phenotypes. Caste determination in most bees is caused by different stimuli in the quantity and quality of larval food (royal jelly) (*Apis mellifera*, Apini, Apidae).

In contrast, in (Meliponini, Apidae, except in the genus *Melipona*), the caste is determined by the amount of larval food (Nogueira-Neto 1997). For this reason, it is important to show the regulatory mechanisms of environmentally mediated gene expression in the development of the caste in stingless bees, which is mainly attributed to the amount of food and not the components. Here we reviewed the literature comprising the role of microRNAs on caste differentiation and regulation of development in eusocial bees. The production of honey from stingless bees has been carried out since ancient times. Maya used *Melipona beecheii* to obtain several products that have gained acceptance in current times, therefore the production of queens to increase productions would welcome more information for this process.

### Biogenesis of microRNA

miRNAs are small molecules of non-coding RNA (ncRNA), consisting of around 20-24 nucleotides and with a characteristic hairpin-shaped structure (Lee et al., 2004; Mohr & Mott, 2015; O'Brien et al., 2018). With a phosphate group at the 5' end and a hydroxyl group at the 3' end, these are derived from a process that arises in the nucleus and ends in the cytoplasm. Then ncRNA carries out their function (Mohr and Mott, 2015); either in the development, apoptosis, cell differentiation, reproduction, behavior, and physiology in eukaryotes, including plants and animals (Ledda et al., 2020). They play a significant regulatory role in animals and plants by binding to messenger RNAs (mRNA) and inhibiting their translation into protein.



**Figure 1.**  
**Biogenesis**  
**of miRNAs**  
**in *D.***

*melanogaster*. The microRNAs are transcribed by RNA Pol II first, and then a serial passage from the nucleolus to the cytoplasm confers a mature set of microRNAs that, mediated by the RISC complex and guided by AGO, inhibit gene expression either by repressing transcription or by degradation of the transcript. (Created with BioRender.com)

### 1.1 MicroRNA gene transcription

The initial step in microRNA biogenesis is the transcription of miRNA genes. For example, in *Drosophila melanogaster*, these are transcribed in the nucleus by RNA polymerase II, thus facilitating the transcription of miRNA loci in these related species. RNA polymerase II produces a long chain of RNA due to the transcript known as primary microRNA (pri-miRNA), which is several kb long (Lucas & Raikhel, 2013; Schanen & Li, 2011; Ylla et al., 2016). MicroRNA loci organization can be a single transcript unit containing a single miRNA gene or, in some cases, organized as a polycistronic transcript unit containing more than one miRNA. Though originally as RNA Pol III transcripts, miRNAs are loaded with the canonical 5' 7-methyl guanosine caps and 3' polyadenylation, showing clear evidence of RNA Pol II-mediated transcription (Lee et al., 2002; Lucas and Raikhel, 2013b; Rodriguez et al., 2004).

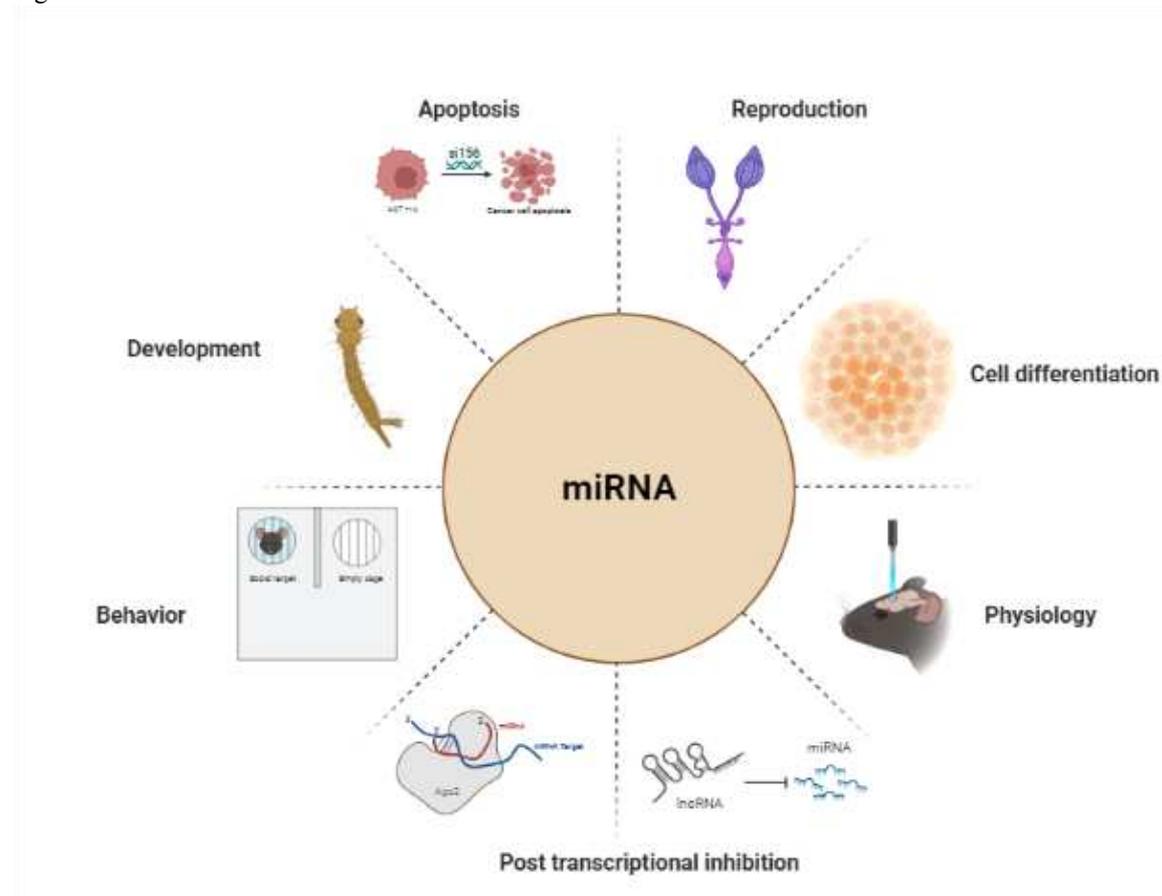
### 1.2 Processing of pri-miRNAs

The pri-miRNAs form hairpin-shaped structures with a double-stranded stem and a terminal loop that must subsequently be processed to obtain the mature miRNA molecule. In *D. melanogaster*, pri-miRNAs undergo site-specific processing mediated by the Microprocessor complex, a multi-protein complex composed of an RNase III family and a double-strand RNA binding protein, Drosha, and Pasha, respectively (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). The miRNA, after transcription, is end methylated before being exported from the nucleus to the cytoplasm. This first step yields a 70 nt long microRNA. After their export to the cytoplasm, the second processing step is mediated by another protein complex related to an RNase III, Dicer. Dicer requires another RNA binding protein in order to mediate the final processing step

yielding a mature 22 nt long microRNA (György et al., 2001; Ketting et al., 2001; W and L, 2001) (Figure 1).

### 1.3 microRISC Components

In order to be fully functional, mature microRNAs form part of the RNA-induced silencing complex (RISC). In the cytoplasm, the miRNA-RISC (miRISC) protein Argonaute (AGO) selects one of the miRNA strands to complete the gene silencing and degradation process. miRISC is a well-conserved complex ranging between 200 and 400 kDa depending on the organism (Lucas and Raikhel, 2013b; Santhekadur and Kumar, 2019). Argonaute proteins are a well-documented family of RNA-binding proteins mediating the RNA silencing process, widely disseminated to almost all organisms (Hutvagner and Simard, 2008). The miRISC acts recognizing and by a complementary binding with the microRNA, an mRNA is degraded, or their protein translation is limited by this process (Gu and Knipple, 2013; Santhekadur and Kumar, 2019; Tomoyasu et al., 2008). These processes in which all these factors are affected by miRNA can be seen in figure 2, these factors affect in general in all multicellular organisms.



**Figure 2. Functions of miRNAs in eukaryotes.** The general aspects of microRNA regulation and their implications on different developmental processes. (Created with BioRender.com )

### Regulation of functions by microRNA in Hymenoptera

miRNAs function as developmental switches (Stefani and Slack, 2008), that regulate gene expression in the nervous system and give rise to behavioral characteristic and phenotypes (Greenberg et al., 2012; Perkins et al., 2007). One of the most exciting aspects of miRNA affecting phenotypes are plant miRNAs. There are reports of plant miRNAs ingested from plant food sources that can pass through the gastrointestinal tract, enter the blood, accumulate systemically, and regulate gene expression in animals. The data shows gene regulation can be crossed between kingdoms and mediated by exogenous miRNAs. Once a new microRNA integrates into an animal's genetic regulatory network, it is usually retained and becomes challenging to lose during evolution (Heimberg et al., 2008).

As reported by (Collins et al., 2017) miRNAs are associated with caste determination and differentiation in a relatively early process in eusocial evolution, and the role of individual miRNAs

is generally not preserved as eusocial evolution progresses. They validated two miRNAs (Bte-miR-6001-5p and Bte-miR-6001-3p) expressed more in late-stage larvae intended for queens than in workers. In addition, the role in caste determination for miR-6001-5p and miR-6001-3p plays a regulatory role of Bte-miR-6001-5p as it includes the ecdysone-induced protein and ferredoxin. These proteins are associated with ecdysone responses in *Drosophila* (Palandri et al., 2015). In *Apis mellifera* the ecdysone is an ecdysteroid, that mediates several processes, including caste determination in eusocial *bees* (Rachinsky et al., 1990) and primitively eusocial *Bombus terrestris* (Hartfelder et al., 2000a). Therefore, it is necessary to do additional studies. To show how endogenous miRNAs affect caste, it is also necessary to consider what mechanisms are conserved that explain eusociality in some Hymenoptera.

Greenberg and collaborators found that certain miRNA loci are specific to Hymenoptera, but are present only in eusocial taxa, or at least absent in non-eusocial wasps *Niphona longicornis* and *Nasonia vitripennis* (Greenberg et al., 2012). Therefore, it raises the possibility that some of these miRNAs are involved in the eusociality in Hymenoptera, as raised by (Bonasio et al., 2010), where they show differences in the expression of miRNA between different species of eusocial ants.

miRNA sequence data have advantages for estimating phylogenetic relationships.

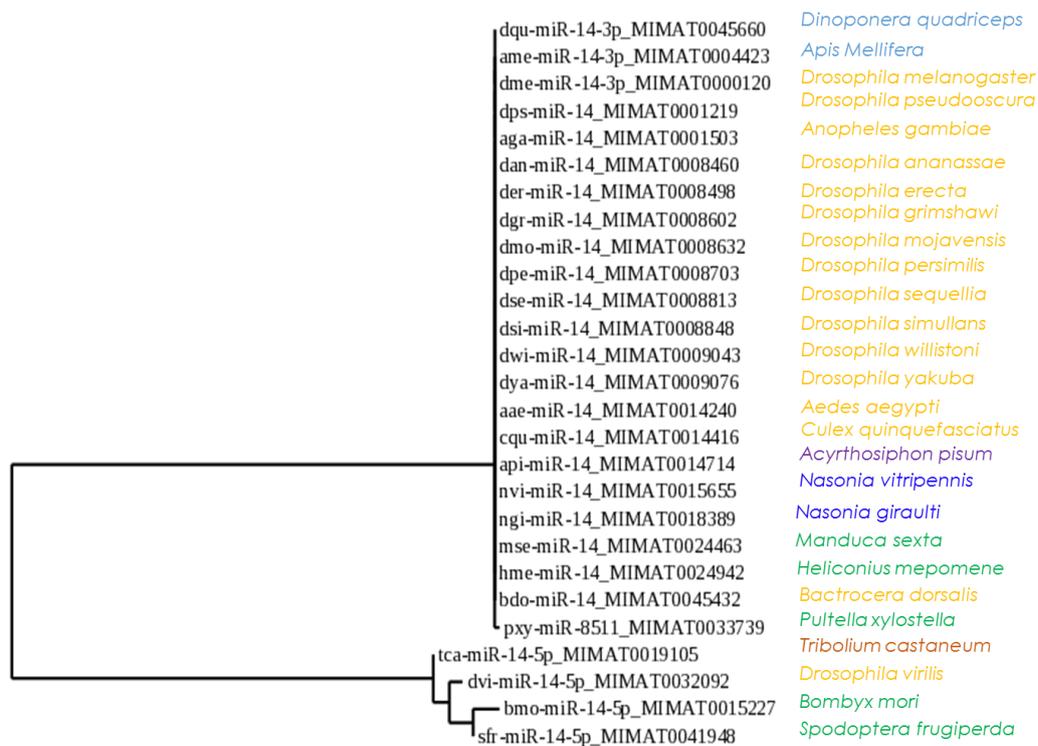
In the Insecta class and the Order Hymenoptera specifically, it is evident that miRNAs miR-14-3P, miR-6001-5p and miR-6001-3p are conserved.

The genome sequence of the wasp *N. vitripennis* (Kent et al., 2015), shows that during the evolution of sociality, the genes that were subject to selection in solitary ancestors co-opted to its use in caste-specific functions Figure 3. In the case of the ant *D. quadricaps*, it presents a simple society where individuals retain the ability to change phenotypes; however, as reported by (Patalano et al., 2015) evidenced sequence homology in reproductive and worker ants.

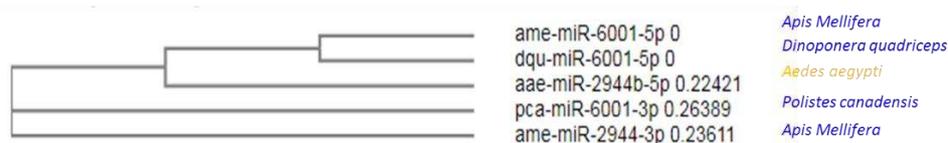
In the case of miR-6001-5p and miR-6001-3p, both share the same functions in *A. mellifera*, regulating reproductive differentiation processes in queen bees; however, in *B. Terrestris*, miR-6001-3p differs by its expression only in the cuticle of larvae destined for queens (Collins et al., 2017).

According to the phylogeny evidenced from miR-6001-5p, the sequences are conserved in 4 species of Hymenoptera and one species of Diptera. It shows a more significant similarity between the sequences of *A. mellifera* with *Dinoponera quadricaps*. This similarity of sequence and common points in evolution may share their miRNAs' function Figure 4 and 5.

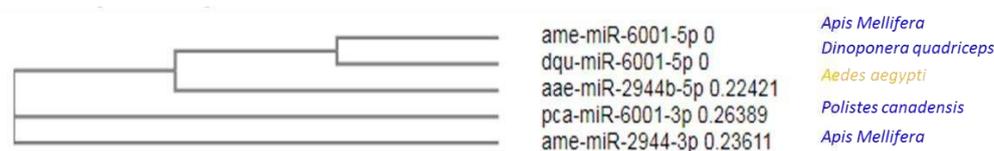
Regarding the homology of miR-6001-3p with other organisms of the Insecta class, it does not show any homology. However, it does show homology with the primitively eusocial wasp *Polistes Canadensis*, possibly sharing functions in caste differentiation (Figure 5).



**Figure 3. Phylogeny.** Showing the homology of miR-14-13p in species of the Insecta class and represented in blue of the specific Order Hymenoptera. (Created with <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)



**Figure 4. Phylogeny.** Showing the homology of miR-6001-5p with other insects and the vast majority of the Order Hymenoptera. (Created with <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)



**Figure 5. Phylogeny.** Showing the homology of miR-6001-3P with other species of the order Hymenoptera. (Created with <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

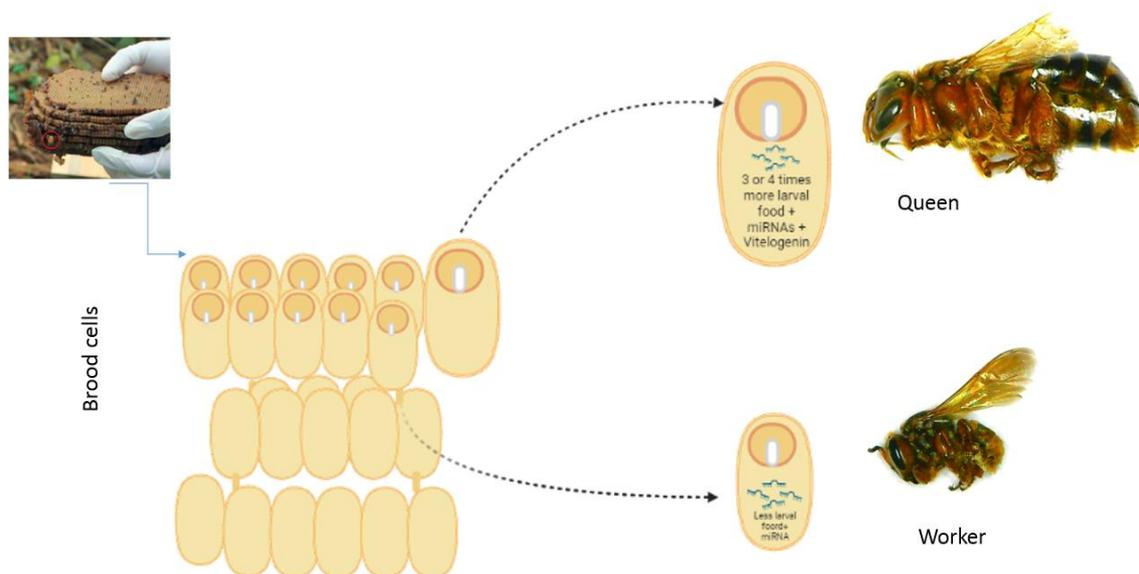
### Differentiation of castes in stingless bees: microRNAs and eusocial evolution

Insects provide an ideal model system to study the role of epigenetics in environmentally induced phenotypic evolution, as they have conserved chromatin, a human-like modification system, and most respond to environmental cues. The environment regulates epigenetic mechanisms and affects gene expression, acting as a mediator of changes in the phenotype induced by diet, which in larval stages changes gene expression, which in turn influences castes (Cridge et al., 2015). According to (Barchuk et al., 2007; Collins et al., 2017; Hartfelder et al., 2000b; Sumner et al., 2006), in a colony of *A. mellifera* caste determination is a decisive factor in the regulation of social behavior, it was closely related to the quality of honey. The food source thus affects gene expression together with epigenetic factors. (Figure 2).

Nectar and pollen phytochemicals on honeybees may be widespread among social Hymenoptera or may be unique to the highly eusocial honeybee (Mao et al., 2015). Further increasing the controversy over the impact of diet on the evolution of eusociality. Caste development in social insects represents the most important evolutionary transition from one level of organization to another and is believed to be critical to the ecological success of social insects (Zhu et al., 2017).

In highly eusocial bee colonies, there are two sexes (males and females) and two castes (workers and queens). In social insects, the term caste is used more frequently to refer to the division of labor between females, based on reproductive specialization (Michener, 2007, 1974). Reproductive specialization is reflected in workers and queens being morphologically and physiologically different. The queens are dedicated to reproduction, so they have lost all the structures for food gathering and nest building. The workers dedicate themselves to collecting food and different activities within the nest. In some species, the workers are capable of reproduction, but since they are unable to mate, they are only capable of producing unfertilized (male) eggs.

Stingless bees present different mechanisms for caste determination; one of these is trophic determination, which can be found in almost all genera except *Melipona* (Sakagami 1982). In this type of determination, the fate of the larva depends on nutritional differentiation; the larva that becomes the queen is placed in cells with more food than the workers. There are also two other variants of the caste-determining trophic system. The first consists of the construction of queen cells in advance. That is, the constructed cells are made exclusively to raise a queen. In these species, the queen cells are normally located on the periphery (Smith et al., 2008; Smith and Suarez, 2010). In the second variant of trophic determination, queens are created in worker cells through emergency queen rearing; in this variant, enlarged queen cells are produced by the fusion of two adjoining worker cells (Wei et al., 2019)). While in the *Melipona* genus, caste determination depends on the individual's genotype, the effect of food is essential for its expression, defined as *trophogenetics* (Lisboa et al., 2005; Lu et al., 2021) depicted in Figure 6.



1. **Figure 6. Determination of trophic caste is present in the Meliponini tribe, except *Melipona*.** In this type of differentiation, the fate of the larva depends on conditional nutritional feeding; the larva that becomes a queen is raised in cells with more food than the workers—building queen cells and supplying them with the food necessary for their development. In these species, the queen cells are normally located on the periphery (Smith et al., 2008; Smith and Suarez, 2010). (Created with BioRender.com)

(Kerr, 1950) proposed the *Melipona* model of caste determination, in which two unrelated *loci*, each with a pair of alleles, interact to produce the specific genotype of a queen. Only when both *loci* are in a heterozygous condition can the individual become a queen. But the expression of the queen phenotype will require an adequate quantity and/or quality of food (Quezada-Euán, 2018). Due to the evolutionary complexity of eusociality in insects, it is relevant to consider for its understanding in addition to a consideration of caste determination by the amount of food ingested; the modification

of molecular pathways related to development, behavior, neurobiology, physiology, and morphology as well as those external routes that may affect (Figure 3) (Easter, 1978)

**Conclusions** microRNA biogenesis, regulation, and functions on Eukarya are still obscure. However, some light has been shed on the molecular basis of caste differentiation in honeybees. The role of feeding and the relationship with microRNAs caste differentiation and regulation can be part of a general mechanism that involves selective plant genetic information needed for insect development.

**No Funding was used**

**Here we declare that there is no conflict of interest between all the authors of this manuscript. The nature of this work did not required the approval of a bio ethical commite.**

**-Data availability: Author should declare any of the following: ) All data is presented in the present paper.**

**Author contribution statement (CRedit)**

**C.A. Santos-Perez – Conceptualization, Funding acquisition, Methodology., T. Kumar – Data curation, Supervision.**

**The journal do not use nor endorse the use of CRedit as a tool to qualify authorship.**

**D. M. Wrote and help define the manuscript F. G carried out the phylogenetic trees, M.A. reviewed the work, K. J. help with the editing and data analysis, LC helped with the conception and editing and E. C overviewed the manuscript, revised and help writing the manuscript**

## References

- Ashby, R., Forêt, S., Searle, I., Maleszka, R., 2016. MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. *Scientific Reports* 6, 18794. <https://doi.org/10.1038/srep18794>
- Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simões, Z.L.P., Maleszka, R., 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Developmental Biology* 7, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-70>
- Bonasio, R., Zhang, G., Ye, C., Mutti, N.S., Fang, X., Qin, N., Donahue, G., Yang, P., Li, Q., Li, C., Zhang, P., Huang, Z., Berger, S.L., Reinberg, D., Wang, J., Liebig, J., 2010. Genomic Comparison of the Ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* (1979) 329, 1068–1071. <https://doi.org/10.1126/science.1192428>
- Buttstedt, A., Ihling, C.H., Pietzsch, M., Moritz, R.F.A., 2016. Royalactin is not a royal making of a queen. *Nature* 537, E10–E12. <https://doi.org/10.1038/nature19349>
- Collins, D.H., Mohorianu, I., Beckers, M., Moulton, V., Dalmay, T., Bourke, A.F.G., 2017. MicroRNAs Associated with Caste Determination and Differentiation in a Primitively Eusocial Insect. *Scientific Reports* 7, 45674. <https://doi.org/10.1038/srep45674>
- Cridge, A., Leask, M., Duncan, E., Dearden, P., 2015. What Do Studies of Insect Polyphenisms Tell Us about Nutritionally-Triggered Epigenomic Changes and Their Consequences? *Nutrients* 7, 1787–1797. <https://doi.org/10.3390/nu7031787>
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Djuranovic, S., Nahvi, A., Green, R., 2011. A Parsimonious Model for Gene Regulation by miRNAs. *Science* (1979) 331, 550–553. <https://doi.org/10.1126/science.1191138>
- Greenberg, J.K., Xia, J., Zhou, X., Thatcher, S.R., Gu, X., Ament, S.A., Newman, T.C., Green, P.J., Zhang, W., Robinson, G.E., Ben-Shahar, Y., 2012. Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes, Brain and Behavior* 11, 660–670. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00782.x>
- Gregory, R.I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>
- Gu, L., Knipple, D.C., 2013. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection* 45, 36–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.004>
- György, H., Juanita, M., E, P.A., Eva, B., Thomas, T., D, Z.P., 2001. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* (1979) 293, 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Hartfelder, K., Cnaani, J., Hefetz, A., 2000a. Caste-specific differences in ecdysteroid titers in early larval stages of the bumblebee *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology* 46, 1433–1439. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00067-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00067-6)
- Hartfelder, K., Cnaani, J., Hefetz, A., 2000b. Caste-specific differences in ecdysteroid titers in early larval stages of the bumblebee *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology* 46, 1433–1439. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00067-6)
- Heimberg, A.M., Sempere, L.F., Moy, V.N., Donoghue, P.C.J., Peterson, K.J., 2008. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 2946–2950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712259105>
- Hughes, W.O.H., Sumner, S., van Borm, S., Boomsma, J.J., 2003. Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 9394–9397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633701100>
- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 12, 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>

- Hutvagner, G., Simard, M.J., 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 22–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2321>
- Kerr, W.E., 1950. GENETIC DETERMINATION OF CASTES IN THE GENUS MELIPONA. *Genetics* 35, 143–152. <https://doi.org/10.1093/genetics/35.2.143>
- Ketting, R.F., Fischer, S.E.J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H.A., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development* 15, 2654–2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>
- Ledda, B., Ottaggio, L., Izzotti, A., Sukkar, S.G., Miele, M., 2020. Small RNAs in eucaryotes: new clues for amplifying microRNA benefits. *Cell & Bioscience* 10, 1. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0370-3>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., Kim, V.N., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23, 4051–4060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lisboa, L.C.O., Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., Campos, L.A.O., 2005. Effect of Larval Food Amount on Ovariole Development in Queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 34, 179–184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00591.x>
- Lu, C.-Y., Weng, Y.-T., Tan, B., Hsu, C.-Y., 2021. The trophocytes and oenocytes of worker and queen honey bees (*Apis mellifera*) exhibit distinct age-associated transcriptome profiles. *Geroscience* 43, 1863–1875. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00360-y>
- Lucas, K., Raikhel, A.S., 2013a. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem Mol Biol* 43, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.009>
- Lucas, K., Raikhel, A.S., 2013b. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem Mol Biol* 43, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.009>
- Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2015. A dietary phytochemical alters caste-associated gene expression in honey bees. *Science Advances* 1, e1500795. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500795>
- Michener, C.D., 2007. *The bees of the world*, 2nd ed. ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Michener, C.D., 1974. *The social behavior of the bees: a comparative study*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Mohr, A.M., Mott, J.L., 2015. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 35, 3–11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 9.
- Palandri, A., L'hôte, D., Cohen-Tannoudji, J., Tricoire, H., Monnier, V., 2015. Frataxin inactivation leads to steroid deficiency in flies and human ovarian cells. *Human Molecular Genetics* 24, 2615–2626. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv024>
- Perkins, D.O., Jeffries, C.D., Jarskog, L.F., Thomson, J.M., Woods, K., Newman, M.A., Parker, J.S., Jin, J., Hammond, S.M., 2007. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biology* 8, R27. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r27>
- Quezada-Euán, J.J.G., 2018. *Stingless Bees of Mexico: The Biology, Management and Conservation of an Ancient Heritage*. Springer International Publishing, Cham.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K., 1990. Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology* 79, 31–38. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90085-Z)
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Santhekadur, P.K., Kumar, D.P., 2019. RISC assembly and post-transcriptional gene regulation in Hepatocellular Carcinoma. *Genes Dis* 7, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.09.009>

- Schanen, B.C., Li, X., 2011. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics* 97, 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.10.005>
- Smith, C.R., Anderson, K.E., Tillberg, C.V., Gadau, J., Suarez, A.V., 2008. Caste Determination in a Polymorphic Social Insect: Nutritional, Social, and Genetic Factors. *The American Naturalist* 172, 497–507. <https://doi.org/10.1086/590961>
- Smith, C.R., Suarez, A. v, 2010. The Trophic Ecology of Castes in Harvester Ant Colonies. *Functional Ecology* 24, 122–130.
- Solenn, P., Anna, V., Chris, W., Philip, E., Francisco, C., G, F.P., L, A.C., P, J.T., Anne, S.-P., Martin, B., Irene, G.-N., E, M.A., Felix, K., Ernesto, L., Marina, M.-H., Luis, R.-A.J., S, N.F., Shankar, B., Toni, G., E, T.J., Simon, A., Heinz, H., H, H.W.O., Roderic, G., Wolf, R., Seirian, S., 2015. Molecular signatures of plastic phenotypes in two eusocial insect species with simple societies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 13970–13975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515937112>
- Søvik, E., Bloch, G., Ben-Shahar, Y., 2015. Function and evolution of microRNAs in eusocial Hymenoptera. *Frontiers in Genetics* 6.
- Sumner, S., Bell, E., Taylor, D., 2018. A molecular concept of caste in insect societies. *Current Opinion in Insect Science* 25, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.11.010>
- Sumner, S., Pereboom, J.J.M., Jordan, W.C., 2006. Differential gene expression and phenotypic plasticity in behavioural castes of the primitively eusocial wasp, *Polistes canadensis*. *Proc Biol Sci* 273, 19–26. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3291>
- Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., Bucher, G., 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology* 9, R10. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r10>
- Villagra, C., Frias-Lasserre, D., 2020. Epigenetic Molecular Mechanisms in Insects. *Neotropical Entomology* 49, 615–642. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00777-8>
- W, K.S., L, B.B., 2001. A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (1979) 293, 2269–2271. <https://doi.org/10.1126/science.1062039>
- Wei, H., He, X.J., Liao, C.H., Wu, X.B., Jiang, W.J., Zhang, B., Zhou, L. bin, Zhang, L.Z., Barron, A.B., Zeng, Z.J., 2019. A Maternal Effect on Queen Production in Honeybees. *Current Biology* 29, 2208–2213.e3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.059>
- Yan, H., Simola, D.F., Bonasio, R., Liebig, J., Berger, S.L., Reinberg, D., 2014. Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. *Nature Reviews Genetics* 15, 677–688. <https://doi.org/10.1038/nrg3787>
- Ylla, G., Fromm, B., Piulachs, M.-D., Belles, X., 2016. The microRNA toolkit of insects. *Scientific Reports* 6, 37736. <https://doi.org/10.1038/srep37736>
- Zhu, K., Liu, M., Fu, Z., Zhou, Z., Kong, Y., Liang, H., Lin, Z., Luo, J., Zheng, H., Wan, P., Zhang, J., Zen, K., Chen, J., Hu, F., Zhang, C.-Y., Ren, J., Chen, X., 2017. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLOS Genetics* 13, e1006946. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006946>

**CAPÍTULO DE LIBRO**

DIRECCIÓN DE PLANEACIÓN Y GESTIÓN  
 DEPARTAMENTO DE DIVULGACIÓN  
 «Talento CICY 2022»

<b>Título del proyecto:</b>	“Las abejas meliponas: de los saberes tradicionales a su anatomía interna”
<b>Autor(a)(es):</b>	Br. Rodrigo Carrillo Solís Br. Citlalli Salcedo Jiménez Dra. Alma Laura Rodríguez Piña Biol. Delia Mariela Moreno Dra. Ileana Echevarría Machado Dr. Enrique Castaño de la Serna Dra. Angela Ku González
<b>Unidad Académica:</b>	Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas Laboratorio de Microscopía e histología vegetal
<b>Descripción:</b>	Los participantes conocerán la importancia de las abejas y en particular las abejas meliponas en el planeta y en la cultura maya. Desarrollarán actividades experimentales de técnicas de microscopía, a distancia, enfocadas en observar las características principales de algunas especies. Así como su uso en la medicina tradicional.
<b>Objetivo:</b>	Describir a nivel microscópico la anatomía de las abejas meliponas y las abejas europeas, mediante la implementación de técnicas histológicas y la observación al microscopio. Se impartirán charlas acerca de las abejas mieleras, donde se explicarán las bondades y propiedades de la miel producida por la abeja melipona, así como datos relevantes de su apreciación e importancia en la cultura maya. Aunado a esto se incentivará el interés y la curiosidad por la ciencia en los estudiantes utilizando el método científico para la generación conocimiento.
<b>Grado escolar</b>	Educación secundaria, primer año
<b>Materia afín (con la que se compagina)</b>	Biología Estructura curricular SEP secundaria <a href="https://www.planyprogramasdestudio.sep.gob.mx/index-mapa-curricular2019.html">https://www.planyprogramasdestudio.sep.gob.mx/index-mapa-curricular2019.html</a>
<b>¿Qué vas a aprender?</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El método científico: observación, hipótesis, experimentación y análisis.</li> <li>• Trabajo grupal a distancia.</li> <li>• Lenguaje académico-técnico.</li> <li>• Papel de las abejas en la polinización y su importancia en el ecosistema.</li> <li>• Características de las abejas meliponas y su importancia en la medicina tradicional maya.</li> <li>• Este trabajo pretende ayudar a los alumnos a identificar las diferentes estructuras internas de las abejas mediante la utilización de técnicas de histología y microscopía</li> </ul>
<b>Pregunta inicial</b>	¿Se pueden identificar mediante la observación al microscopio de las estructuras de los tejidos a las abejas europeas, meliponas de México y de Honduras?

## 1. PANORAMA GENERAL DEL TEMA

La abeja melipona es una especie sin aguijón que cultivan los pueblos mayas desde hace cientos de años y la denominan “abeja sagrada maya”, por la propiedad curativa que tiene su miel. Tal es la importancia de las abejas que los mayas, en la época prehispánica, realizaban en su honor entre cuatro y seis ceremonias al año. La principal característica de la abeja melipona es que no tiene aguijón, pero para defender su colonia “muere” todo aquello que represente una amenaza, se aferran de tal manera que mueren durante el combate.

Dentro de los productos que esta abejita produce se encuentran la miel, polen cera, propóleo, además de su valioso servicio como polinizadoras. Una colmena de melipona produce litro y medio de miel al año, su proceso de producción es más tardado en comparación con el de las abejas europeas que producen hasta 30 litros de miel en un año.

Diferentes reportes han evidenciado la riqueza nutricional de la miel melipona, la cual presenta altos contenidos de potasio, así como la presencia de los aminoácidos prolina y serina. Además de propiedades anti bacterianas (Grajales, C. J. *et al.*, 2018).

### *Melipona beecheii* en el ecosistema

Estas abejas son muy importantes culturalmente pero también ecológicamente, al ser polinizadores de muchas especies de plantas nativas. En realidad, son especializadas en visitar y polinizar árboles y arbustos, como el chile habanero y el achiote, observándoseles muy poco forrajeando en hierbas.

En este sentido, al depender de los árboles para sus sitios de anidación y para alimentarse, las hace muy susceptibles a la deforestación. De hecho, se ha documentado el declive de estas abejas debido a la deforestación, así como por intoxicaciones causadas por plaguicidas que las intoxican (Cortopassi-Laurino, M. *et al.*, 2006)

En la actualidad se encuentra muy desarrollada la meliponicultura, la cual es la crianza de las abejas meliponas, por lo que se han implantado programas de investigación sobre meliponicultura en centros especializados: las particularidades genéticas de los melipónidos permitirían adaptar la producción de miel ante posibles cambios climáticos.

## 2. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto te dará un panorama general en la búsqueda de conocimiento científico sobre las características y la importancia de las abejas meliponas y su uso en la medicina tradicional. Para lograrlo, harás uso de diversos materiales que tenemos en casa o que les enseñaremos de manera virtual y te adentrarás en el mundo de los microscopios y de las abejas. Durante el desarrollo de este proyecto conocerás aspectos relacionados con las abejas y su importancia en la vida y por qué se utilizan en la medicina tradicional. Así como, qué es un microscopio, una lupa, una tinción y la anatomía general de las abejas; de igual manera, descubrirás características importantes sobre los partes y comprenderás la diferencia entre abeja mielera y abeja melipona, entre muchos otros aspectos interesantes de las abejas en general. Además de ello, podrás desarrollar actividades experimentales basadas en el método científico que te permitirán preparar muestras de laboratorio como si estuvieran estudiando las abejas y sus características, a la vez que refuerzas tus habilidades en la búsqueda de información, para finalmente poder responder a la pregunta: ¿Se pueden identificar mediante la observación al microscopio de las estructuras o partes, a las abejas europeas, meliponas de México y de Honduras? Este manual ha sido redactado por académicos y estudiantes de los laboratorios de regulación génica, de histología y de microscopía de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del CICY, y se desarrollará aplicando el método científico, implementando prácticas simples con utensilios e insumos de fácil acceso. Con todo lo anterior, las y los jóvenes podrán desarrollar, a través de actividades sencillas, un proyecto que les permitirá ampliar sus conocimientos en el campo de la microscopía.

## 3. DESARROLLO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

- **Título de la actividad:** “Las abejas meliponas: de los saberes tradicionales a su anatomía interna”.
- **Pregunta de investigación:**  
¿Se pueden identificar mediante la observación al microscopio de las estructuras celulares a las abejas europeas, meliponas de México y de Honduras?

- **Objetivo:**  
Identificar las diferentes estructuras internas de las abejas *Melipona beecheii* mediante la utilización de técnicas de histología y microscopía.
- **Materiales:**
  - 2 abejas *Melipona beecheii*.
  - Un insecto del jardín o casa
  - 5 hojas de plantas
  - Gradiente de 30 ml de sacarosa de 10, 20 y 30%.
  - Gel de congelación.
  - Hematoxilina de Harris.
  - Eosina.
  - Azul de metileno
  - Alcohol etílico comercial
  - Agua destilada.
  - Esmalte transparente de uñas.
  - Tubos Falcón de 50 ml.
  - Tubos eppendoff de 1 ml
  - Portaobjetos con Poli-L-Lisina.
  - Cubreobjetos.
  - Pinzas histológicas.
  - Pinzas de depilación
  - Molcajete de la cocina
  - Colador
  - Cutter
  - Vaso de vidrio
  - Paquetes de chicles o pastillas de medicamentos vacíos.
  - Equipos: microscopio, criostato.
- **Desarrollo:**
  1. Decantar el líquido de la muestra pasar la muestra a una solución de sacarosa 10% por 10 min.
  2. Preparar la cama del gel de congelación para poner la muestra en el criostato (dejarlo congelar en el blíster).
  3. Decantar la sacarosa al 10% y pasar la muestra a una solución de sacarosa al 20% junto con 1 gota de Tissue Freezing Medium Leica por 10 minutos.
  4. Decantar y pasar la muestra a una solución de sacarosa al 30 % junto con 2 gotas de Tissue Freezing Medium Leica por 10 minutos.
  5. Colocar la muestra tratada encima de la cama de gel y rellenar el blíster con Tissue Freezing Medium. Luego, Colocar el blíster dentro del criostato para su congelación.
  6. Una vez encapsuladas las muestras de forma individual se procede a cortar con el criostato.
  7. Los cortes se adhieren a la superficie del portaobjetos con poli-L-lisina.
- **Tinción de Hematoxilina y eosina:**
  1. Lavado con agua destilada
  2. Hematoxilina de Harris (1 min).
  3. Lavado con agua destilada.
  4. Eosina (30 segundos)
  5. Lavado con agua destilada.
  6. Observación en el microscopio.

### Saberes de *Melipona Beecheii*: abeja sagrada maya o Xunán kab

En la actualidad, se han reportado que existen aproximadamente 20, 000 especies de abejas en todo el mundo. Las diferentes especies de abejas varían en tamaño, forma, ubicación geográfica y en la forma de vida, sin embargo, la característica común entre todas ellas es que dependen de las flores para abastecerse de energía (néctar) y proteína (polen). Los meliponinos son abejas que, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina y varias docenas o miles de obreras (varía entre especies). Son las únicas abejas, junto con las abejas melíferas, que son altamente sociales (Escalante, 2011). La principal característica de la abeja *Melipona Beecheii* en comparación a la abeja *Apis Mellifera* o mejor conocida como abeja española es la carencia de un aguijón funcional, pero tienen otros métodos efectivos para defenderse de sus enemigos como lo es el morder.



Figura 1. Abejas *Melipona beecheii* (Canto y Pérez, 2021).

#### **Melipona beecheii en la cultura maya**

La *Melipona beecheii* la cultivan los pueblos mayas desde hace cientos de años y la denominan “abeja sagrada maya”, por las propiedades curativas que tiene su miel. Tal es la importancia de las abejas que los mayas, en la época prehispánica, realizaban en su honor entre cuatro y seis ceremonias al año. Los productos de las abejas sin aguijón han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional maya. La miel se ha empleado para tratar afecciones de los ojos, oídos, problemas respiratorios, digestivos y de la piel; y las mujeres reciben este tipo de miel después del parto. Sin embargo, estas propiedades curativas y antibióticas de las mieles y resinas colectadas por las abejas sin aguijón sólo recientemente se han comenzado a estudiar y a valorar fuera de las comunidades campesinas, de manera que existe un potencial económico importante en esta área (Escalante, 2011).

#### **Alimentación**

En Yucatán, se ha reportado que la familia de flores que más frecuentemente visitan estas abejas es *Fabaceae* mientras que, las especies en común son: *Gymnopodium floribundum* Rolfe (Tsi'tsi'lche), *Mimosa bahamensis* Benth. (Sak katsin), *Piscidia piscipula* (L.) Sarg. (Ja'bin), *Senna racemosa* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby (X-k'anlol che) y *Viguiera dentata* (Cav.) Spreng. (Tah) (Canto y Pérez, 2021).

#### **Hábitat y distribución**

La distribución de *Melipona beecheii* va desde La península de Yucatán en México, hasta Cuba y

Jamaica, y partes de Centroamérica, pero no existe presencia *Melipona* fuera de América (Canto y Pérez, 2021). Se pueden distribuir en ambientes

con climas templados, tropicales y subtropicales (Hammond y Blakenship, 2009).

### **Peculiaridades de las abejas**

Su comportamiento es más dócil en comparación a *Apis Mellifera*, facilitando su cultivo y manejo sin necesidad de equipo de protección, no tienen aguijón funcional y son abejas resistentes a los parásitos y enfermedades que atacan a *Apis Mellifera* (Escalante, 2011) Figura 2.



**Figura 2. Abejas mexicanas  
información tomada de Universum,  
UNAM**

### La Microscopia y las proteínas fluorescentes

Desde el inicio de nuestra existencia, la humanidad nos hemos preguntado acerca de los organismos y fenómenos que nos rodean. Esto nos ha llevado a imaginar, inventar, diseñar y construir instrumentos que nos ayuden a contestar nuestras preguntas. En 1653 el biólogo y también conocido como el “padre de la microbiología”, Anton Van Leeuwenhoek, diseñó el primer microscopio simple con el que descubrió por primera vez a los glóbulos de la sangre (1673), los protozoos (1675), las bacterias (1676), los espermatozoides (1677) y la circulación de la sangre a través de los capilares de la cola de un renacuajo (1688).

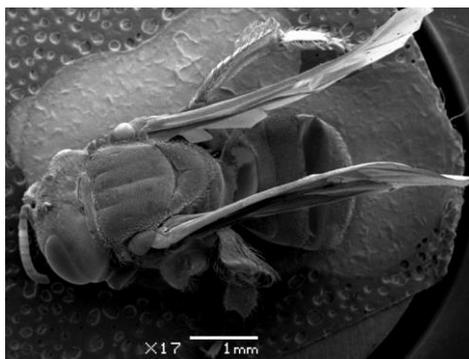
Los microscopios (del griego mikrós, «pequeño», y skopéin, «observar») son instrumentos de óptica que nos permiten ver objetos muy pequeños o detalles estructurales imposibles de distinguir a simple vista porque están por debajo del límite de resolución del ojo humano.

Actualmente ha sido posible fabricar diferentes tipos de microscopios los cuales nos ayudan a ver una gran infinidad de microorganismos. Existen Microscopio Óptico, Microscopio de campo oscuro, Microscopios invertidos, Estereoscopio, Microscopio electrónico, Microscopio electrónico de barrido, Microscopio de fluorescencia y confocal.

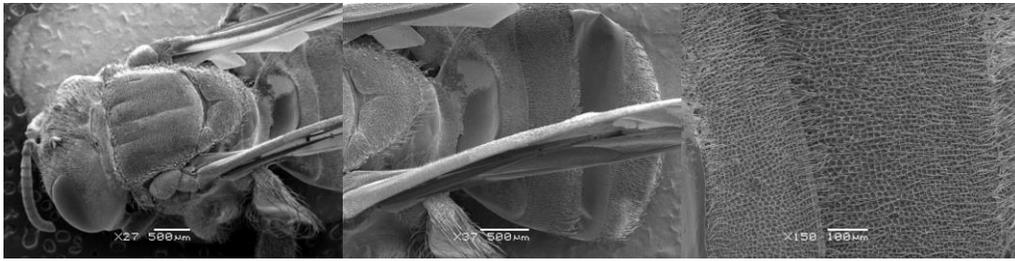
Es muy común ver en nuestras escuelas para la clase de biología y microbiología el Microscopio óptico en cual funciona mediante la iluminación de la muestra con luz visible. Esto significa que existe un foco de luz apuntando hacia la muestra. Esa misma luz es conducida a través del objetivo y del ocular hasta llegar a formar la imagen en el ojo del observador.

El microscopio de fluorescencia es aquel que utiliza las propiedades de la luz para generar una imagen de la muestra con diferentes longitudes de onda. Este microscopio permite observar moléculas que emiten luz propia cuando son excitadas con una longitud de onda determinada. Este tipo de microscopios utilizan la luz UV-Vis (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm). La absorción de la radiación emitida en una muestra causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Además, estos microscopios incorporan filtros de luz para aislar la luz correspondiente a la muestra.

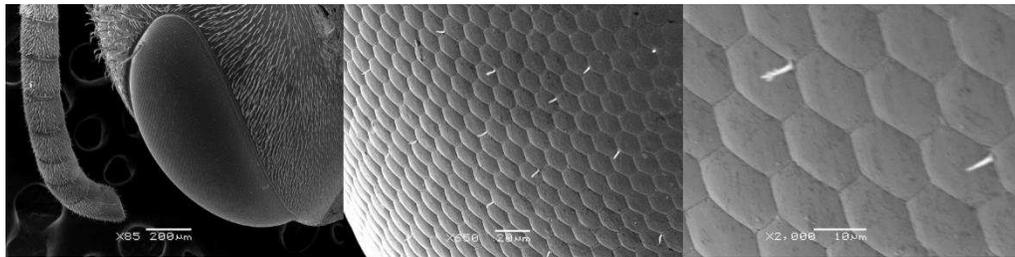
Por otro lado, el microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope en inglés) es un tipo de microscopio electrónico capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Aplica un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Cuando se utilizan plantas y animales pequeños como muestras, las imágenes que este microscopio nos proporciona son un espectáculo visual debido a que agranda las estructuras. Con este microscopio nosotros pudimos observar características específicas de las abejas meliponas.



**Figura 3. Abeja melipona vista en Microscopio electrónico de barrido (MEB)**



**Figura 4. Detalle del tórax de la abeja melipona vista en el (MEB)**

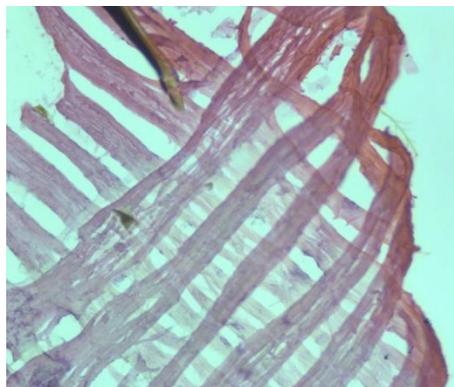


**Figura 5. Ojo de abeja melipona y detalles en varias magnificaciones (MEB).  
CORTES HISTOLÓGICOS DE ABEJA VISTO EN MICROSCOPIO ÓPTICO**



**Figura 6. Ojo de abeja, visto en campo claro con tinción de hematoxilina-cosina.**

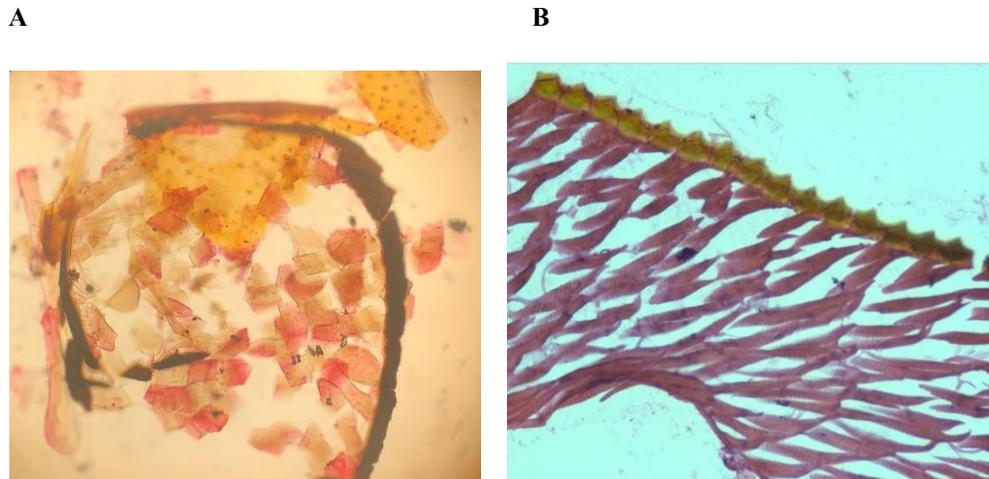
**A**



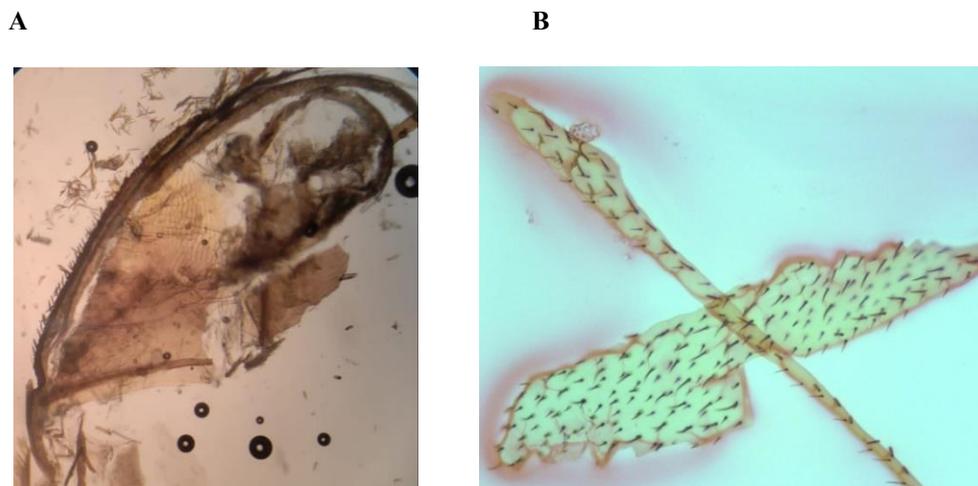
**B**



**Figura 7. Ovario de abeja melipona**



**Figura 8. Lamelas y fibras musculares de abeja melipona.**



**Figura 9. Cuerpo y ala de abeja melipona.**

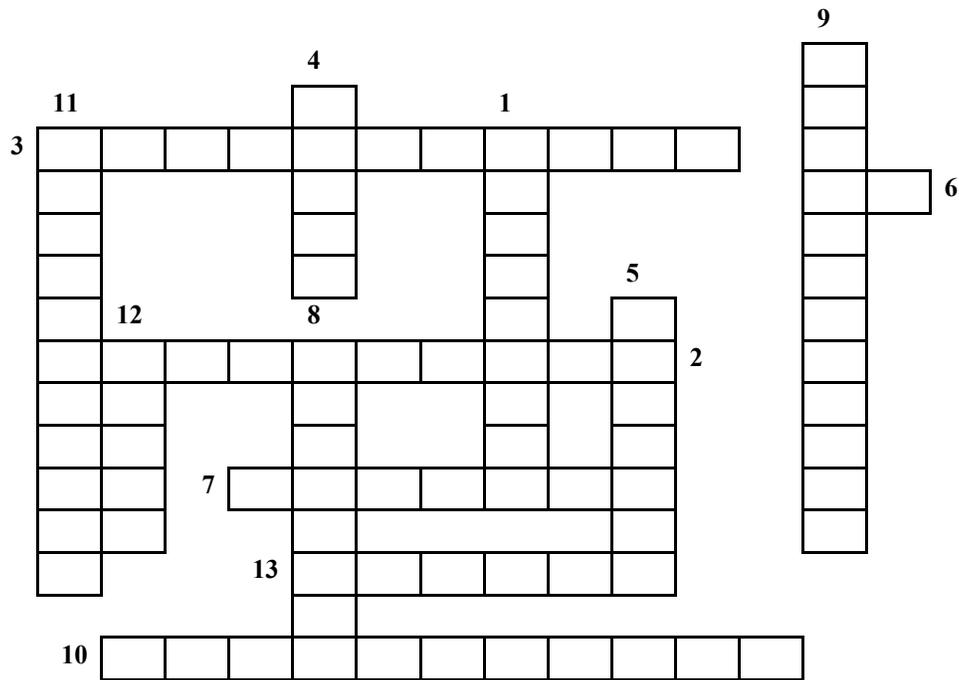
**Actividad 1: Ahora tú, con la ayuda del internet investiga las características de cada microscopio y descubre cómo están compuestos y para que se utilizan.**

Alguna vez escuchaste la frase “Al final del túnel siempre hay una luz” así le paso a los científicos, los cuales durante mucho tiempo buscaron la forma de ver procesos celulares que antes eran invisibles a nuestros ojos, como era el desarrollo de neuronas, cómo se diseminan las células cancerosas, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, el crecimiento de bacterias patogénicas, la proliferación del virus, localización de un gen en el núcleo o citoplasma de una célula vegetal o animal, entre otros. Al final del túnel los científicos encontraron a la proteína fluorescente GFP (por sus siglas en inglés, "green fluorescent protein"), la cual es producida por la medusa *Aequorea victoria*. El gen que codifica esta proteína, que ya ha sido clonado, se utiliza como marcador en biología molecular. El descubrimiento y desarrollo de esta proteína les dio en el 2008 el Premio Nobel de Química al japonés Osamu Shimomura y a los estadounidenses Martin Chalfie y Roger Y. Tsien.

**Actividad 2: ¿Sabes cuantas categorías tiene el Premio Nobel y porque se llama Nobel? Te toca investigar y conocer más acerca de este premio**

Hoy en día la curiosidad de Leeuwenhoek y la pericia de Shimomura y colaboradores ha dado a la ciencia y a nosotros los científicos dos herramientas extremadamente importantes para el estudio y conocimiento de diversos procesos celulares no solo en humanos, sino también en animales como abejas, plantas y hongos.

Actividad 3. Con la información que has aprendido resuelve el siguiente crucigrama, ¡Éxito!



**PREGUNTAS**

- 1 y 2.- Especie marina de la cual se aisló el compuesto fluorescente?
- 3.- ¿Cómo le llamo al compuesto fluorescente?
- 4.- ¿Qué color emite la proteína GFP?
- 5.- ¿Uno de los organismos que fueron observados al microscopio por primera vez?
- 6.- ¿Luz que utilizan el microscopio de fluorescencia?
- 7.- ¿Sitio donde se puede localizar un gen en la célula?
- 8.- ¿Componente básico de todos los seres vivos?
- 9.- ¿El padre de la microbiología?
- 10.- ¿Invento que ayudo a observar organismos muy pequeños?
- 11.- ¿Galardón que le dieron a los científicos que descubrieron la proteína GFP?
- 12.- ¿Organismo en cual se puede usar la proteína GFP?
- 13.- Es el insecto polinizador y productor de miel.

#### 4. CONCLUSIÓN GENERAL

Las diferentes disciplinas científicas que abordamos durante el desarrollo de este proyecto, nos ayudan a hacer una investigación más a fondo y nos dan una visión más amplia del tema. Es así como se realizan las grandes investigaciones en este fascinante mundo de la investigación para tener resultados importantes. El trabajo en equipo es mucho mejor, y es algo que promovemos en estos eventos de divulgación.

La microcopia es una herramienta importante para muchas disciplinas científicas, por no decir todas. Nos permite observar con detalle lo que nuestros ojos muchas veces no alcanzan a ver.

Y el cuidado de las abejas por el gran aporte al ecosistema del planeta es el mensaje que dejamos para este proyecto.

#### 5. SOBRE LOS AUTORES

##### **Dra. Angela Kú González**

Soy Química Industrial egresada de la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán. Tengo una maestría en Energías Renovables y un doctorado en ciencias de la Educación. Desde la secundaria supe que quería ser química. Actualmente, soy responsable de los laboratorios de microscopía y de histología en CICY, donde tomo fotografías con los diferentes microscopios con varias técnicas de iluminación y también asesoro a los estudiantes para la preparación y desarrollo de sus experimentos.

##### **Dr. Enrique Castaño de la Serna**

Estudí la carrera de Biología en la Universidad autónoma de Baja California y me especialicé como Doctor en Bioquímica y Biofísica en la Universidad de Rochester. Actualmente soy Investigador de la Unida de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY. Mi trabajo de investigación se centra el estudio de la estructura nuclear y su función en la regulación genética.

##### **Dra. Heana Echeverría Machado**

Estudí la licenciatura en Bioquímica en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. Me especialice como Doctor en Biotecnología Vegetal en el CICY. Actualmente mi trabajo de investigación se centra en la interacción que existe entre las Planta y el ambiente que les rodea.

##### **Dra. Alma Laura Rodríguez Piña**

Estudí la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo en la Universidad Autónoma de Zacatecas. Me especialice como Doctor en Biología Molecular de Plantas y Hongos en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Actualmente trabajo con el Hongo *Ustilago maydis* el cual produce el muy conocido y delicioso “Huitlacoche”.

##### **Biol. Delia Mariela Moreno**

Trabajo como Docente investigador en el Departamento de Biología de la Universidad Nacional autónoma de Honduras en el Valle de Sula UNAH-VS. Estudié la Licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Autónoma de Honduras-UNAH. Actualmente estudio la maestría en Ciencias Biológicas Opción Bioquímica y Biología Molecular en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mi tesis de maestría se centra en evidenciar como influye la alimentación sobre la fertilidad de abejas sin aguijón(meliponas).

##### **Br. Rodrigo Carrillo Solís**

Soy de Mérida, Yucatán. Estoy estudiando el décimo semestre de la carrera de ingeniería en biotecnología en la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Desde pequeño me ha gustado la biología y la medicina. Cuando era niño me encantaba ver Discovery Chanel y mi padre me regalaba libros de dinosaurios. Cuando inicié la universidad me encantaba mucho la biología y biología celular, mis maestros me enseñaron las bases de todo. En mi servicio social me dedique a la extracción de aceites esenciales con propiedades antidiabéticas, utilizando métodos de laboratorio para su obtención. Para mí fue muy importante esto debido a que pude aportar a la búsqueda de un tratamiento alternativos para tratar esta enfermedad. Actualmente me encuentro realizando mi trabajo de tesis, el cual está enfocado a la transformación de las especies *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* en el Centro de

Investigación Científica de Yucatán. Siempre me han gustado las plantas y me gustaría siempre saber un poco más de ellas. Nunca se termina de aprender.

**Br. Citlalli Salcedo Jiménez**

Soy del estado de Tabasco y actualmente me encuentro estudiando el noveno semestre de la carrera de Ingeniería en Biotecnología en la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). La Ingeniería en Biotecnología es una disciplina que combina los conocimientos desarrollados por ciencias como la física, la química, la biología, la bioquímica, la microbiología, la genética, la bioinformática. Su principal enfoque es utilizar seres vivos para crear nuevos productos (medicinas, cosméticos, alimentos, etc.) o mejorar procesos ya sean naturales o industriales. Desde muy pequeña me interesé mucho en la ciencia, especialmente en el área de la biología y química. Siempre me ha gustado conocer acerca de los seres vivos, así como procesos relacionados con la vida. Ahora, me encuentro tomando un entrenamiento en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Estoy aprendiendo sobre técnicas de microscopía y tinciones de tejidos vegetales y animales, de forma específica, me encuentro trabajando con abejas de las especies Mellífera y Melipona.

## 6. GLOSARIO

- **Abeja:** Insecto de unos 15 mm de largo, de color pardo oscuro y con vello rojizo, con dos pares de alas transparentes cruzadas de nervios; vive en colonias. Produce la cera y la miel.
- **Apis mellifera:** Especie de abeja melífera originaria de África, Europa y del Medio Oriente. Las razas europeas han sido ampliamente introducidas en las Américas, Asia, Australasia y el Pacífico. Las razas africanas han sido introducidas en Sudamérica y se han expandido en toda Centroamérica y en los Estados Unidos.
- **Cera:** Sustancia que segregan las obreras por unas de sus glándulas; la recogen, y las abejas cereras la moldean con sus mandíbulas y van construyendo el panal.
- **Criostato:** también conocido como criotomo, es un microtomo de congelación que se utiliza para cortar rebanadas de material congelado, se encuentra en el interior de una cámara fría.
- **Fluorescencia:** La fluorescencia es el fenómeno donde la absorción de luz de una longitud de onda dada por una molécula es seguida por la emisión a longitudes de onda más largas (visible).
- **GFP:** Green fluorescent Protein.
- **Haz de electrones:** Corriente de electrones (partículas pequeñas con carga negativa que se encuentran en los átomos).
- **Hematoxilina y eosina:** Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina).
- **Lamelas:** Es una capa muy delgada de la cutícula la cual tiene una forma parabólica, esta forma parte del integumento el cuál es el límite protectora.
- **MEB:** Microscopio Electrónico de Barrido.
- **Melipona Beecheii:** llamada en maya xunán kab (la señora abeja), también llamada jicote o jicota en otras partes de Mesoamérica, es un insecto himenóptero, de la tribu Meliponini de abejas sin aguijón. Esta especie fue cultivada en la península de Yucatán desde la época precolombina por los mayas.
- **Microscopio:** Instrumento que permite observar objetos demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista.
- **Miel:** Es definida por el código alimentario como la sustancia dulce, no fermentada, producida por las abejas del néctar de las flores o de las secreciones sobre o de las plantas vivas; que ellas recolectan, transforman y combinan con sustancias específicas y que finalmente almacenan y maduran en los panales.
- **Polen:** Sustancia delicado en polvo que producen las células masculinas de las plantas en flor. Es recogido por las abejas como fuente de alimento.
- **Polinización:** El traslado del polen de las anteras de una flor al estigma de la misma flor o de otras.
- **Propóleo:** Resina de la planta recogida por las abejas melíferas y usada para sellar las hendiduras y brechas de sus colmenas.
- **SEM:** Scanning Electron Microscope.
- **TFML:** Tissue Freezing Medium Leica.

- **UV-vis:** Ultra violeta visible.
- **Xunán kab:** Abeja Melipona beecheii.

## 7. REFERENCIAS

- Canto Aguilar A. y Pérez Morfi A. (2021). ¿Dónde desayuna Xunan kaab en la península de Yucatán?. Desde el herbario, CICY, 13:45-52. Recuperado el 12 de agosto del 2022 de: [https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde\\_Herbario/2021/2021-02-25-Perez-Morfi-y-Canto-Aguilar-Donde-desayuna-Xunan-Kaab.pdf](https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2021/2021-02-25-Perez-Morfi-y-Canto-Aguilar-Donde-desayuna-Xunan-Kaab.pdf)
- Escalante Semerena E. (2011). Melipona Beecheii, una abeja sin agujón en la península de Yucatán. ASERCA. Recuperado el 12 de agosto del 2022 de: [https://web.archive.org/web/20121125035008/http://www.aserca.gob.mx/artman/uploads/BOL\\_ETIN\\_ABRIL\\_2011.pdf#page=2&zoom=auto,0,341](https://web.archive.org/web/20121125035008/http://www.aserca.gob.mx/artman/uploads/BOL_ETIN_ABRIL_2011.pdf#page=2&zoom=auto,0,341)
- Hammond, G. y Blankenship M. (2009). Apis mellifera, Animal Diversity Web. Recuperado el 26 de junio del 2022 de: [https://animaldiversity.org/accounts/Apis\\_mellifera/](https://animaldiversity.org/accounts/Apis_mellifera/)
- Welter, K. (2008). La proteína verde fluorescente: una herramienta valiosa en la biomedicina. Avances en Química, 3(3), 99-103.
- Al ver lo invisible: Leeuwenhoek y el descubrimiento de un mundo microscópico. Youtube-VIDEO <https://www.youtube.com/watch?v=57SZHltgSJc>
- <https://www.mundomicroscopio.com/tipos-de-microscopios/>
- REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA Volumen XXV Número 1 Enero-Abril (2012). <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num1/articulos/historia/>

---

## Bibliografía

Aguilera, F. (2004). Cómo criar abejas melíferas sin aguijón (Meliponicultura). Santa Cruz de la Sierra. 140 p.

Almeida R. y Allshire R.C.( 2005) RNA silencing and genome regulation.

Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106: 1-123.

Bawa, K. (1990). Plant pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 399-422.

Biesmeijer, J. (1997). Abejas sin aguijón. Elinkwijk BV, Holanda. 77p.

Bonasio, R., Zhang, G., Ye, C., Mutti, N.S., Fang, X., Qin, N., Donahue, G., Yang, P., Li, Q., Li, C., Zhang, P., Huang, Z., Berger, S.L., Reinberg, D., Wang, J. & Liebig, J. (2010). Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* 329, 1068–1071.

Borsuk G, Ptaszyńska A, Olszewski K, Domaciuk M, Krutmuang P, Paleolog J. (2007) A New Method for Quick and Easy Hemolymph Collection from Apidae Adults. *PloS one* 12:2-9

Bullock SH (1999) Relationships among body size, wing size and mass in bees from a tropical dry forest in Mexico. *J Kans Entomol. Soc* 72:426-439. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0554-y>

Buttstedt A, Ihling CH, Pietzsch M, Moritz RFA. (2016). Royalactin is not a royal making of a queen. *Nature*;537(7621):E10E2. . pmid:27652566

Camillo-Atique. (1977). Estudo da variabilidade etológica de *Friesella* incluindo a caracterização de espécies crípticas. FMRP-USP. 203p. Tesis de doctorado.

Collins, D., Mohorianu, I., Beckers, M. et al. (2017). MicroRNAs Associated with Caste

---

Cortopassi-Laurino, M., VL Imperatriz-Fonseca, D. Roubik, A. Dollin, T. Heard, I. Aguilar, G. Venturieri, C. Eardley & P. Nogueira-Neto. 2006. Global meliponiculture: Challenges and opportunities. *Apidologie*. 37:275-292

Determination and Differentiation in a Primitively Eusocial Insect. *Sci Rep* 7, 45674, <https://doi.org/10.1038/srep4567>

Cruz-Landim, C., Reginato, R. & Imperatriz-Fonseca, V. (1998). Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queen's ovaries, with comments on ovary development and caste differentiation. *Pap. Avul. Zool*, 40:289-296.

Djuranovic, S., Nahvi, A. y Green, R. (2011) Un modelo parsimonioso para la regulación de genes por miARN. *Ciencias* 331, 550–553.

Engels, W., Rosenkranz, P., Engels, E. (1995) Termorregulación en el nido de la abeja sin aguijón neotropical *Scaptotrigona postica* y una hipótesis sobre la evolución de la homeostasis de la temperatura en abejas altamente eusociales. *Seminal. Neotrop. Fauna Aprox.* 30, 193 – 205

Feinberg E.H. y Hunter C.P. (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*. ; 301: 1545-1547

Fire A. et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. ; 391: 806-811

Fo H. 1821. Nuevas observaciones sobre la historia natural de las abejas. 3d ed. Edimburgo: Impreso para W. & C. Tait, y Longman, Hurst, Rees, Orme y Brown, Londres; 2 pl, vii -xv, 440 págs.

Greenberg, J. K., Xia, J., Zhou, X., Thatcher, S. R., Gu, X., Ament, S. A., Newman, T. C., Green, P. J., Zhang, W., Robinson, G. E., & Ben-Shahar, Y. (2012). Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes, brain, and behavior*, 11(6), 660–670. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00782.x>

---

Grüter, C, (2020) Stingless Bees. **Their Behaviour, Ecology and Evolution**. Fascinating Life Sciences Series. Springer. (1 ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-60090-7>

Hartfelder, K., Engels, W. (1992) Alométrico y análisis multivariado del polimorfismo de sexo y casta en la abeja sin aguijón neotropical, *Scaptotrigona postica*. *Insectos Soc.* 39, 251-266

Hartfelder K, Makert G, Judice C, Pereira G, Santana W, Dallacqua R, Bitondi M (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37:144-163.

Haydak M. 1970. Nutrición de la abeja de la miel. *Annu Rev Entomol*; 15: 143– y. [annurev.en.15.010170.001043](https://doi.org/10.1017/0010170.001043)

Huntzinger, E. & Izaurralde, E. (2011) Silenciamiento de genes por microARN: contribuciones de la represión traslacional y la desintegración del ARNm. *Nat Rev Genet* 12, 99-110.

Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PCJ, Peterson KJ. 2008 MicroARN y el advenimiento de la complejidad morfológica de los vertebrados. *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU* 105, 2946–2950. (doi: 10.1073 / pnas. 0712259105)

Hurtado, M. (2015). Caracterización molecular y morfométrica del género *Scaptotrigona*(Apidae; Meliponini). Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.

Hurtado-Burillo M, May-Itzá W d J, Quezada-Euán JJG, De la Rúa P, Ruiz C (2017) Multilocus species delimitation in Mesoamerican *Scaptotrigona* stingless bees (Apidae: Meliponini) supports the existence of cryptic species. *Syst Entomol* 42:171–181

J. M. F. Camargo, S. R. M. Pedro & G. A. R. Melo, 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea)*

---

in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Oct/07/2022

Kenny NJ, Sin YW, Hayward A, Paps J, Chu KH, Hui JHL. 2015 La utilidad filogenética y la restricción funcional de las secuencias flanqueantes de microARN. *Proc. R. Soc. B* 282: 20142983. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2983>

KERR, WARWICK ESTEVAM 1946 Formação de castas no gênero *Melipona*. Nota Prévia. *Anais da Esc. Sup. Agric. Luis de Queiroz* v.2 p.299-313.

KERR, WARWICK ESTEVAM; SAKAGAMI, SOICHI F; ZUCCHI, RONALDO; ARAÚJO, VIRGÍLIO P. & CAMARGO, JOÃO M. F. (1966). Observações sobre a arquitetura dos ninhos e comportamento de algumas espécies de abelhas das vizinhanças de Manaus, Amazonas (Hymenoptera, Apoidea). *Ciência e Cultura* v.18 n.2 p.105. (Nota prévia).

Jose A.M. y Hunter C.P. (2007) Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annu. Rev. Genet.* ; 41: 305-330

Leather SR (1988) Size, Reproductive Potential and Fecundity in Insects: Things Aren't as Simple as They Seem *Oikos* 51:386–389. <http://doi.org/10.2307/3565323>

Maleszka., R. (2008). Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks, *Epigenetics*, 3:4, 188-192, <https://doi.org/>

Maori E, Garbian Y, Kunik V, Mozes-Koch R, Malka O, Kalev H, Sabath N, Sela I, Shafir S. A (2019) Transmissible RNA Pathway in Honey Bees. *Cell Rep.* 2019 May 14;27(7):1949-1959.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.073 . Epub 2019 May 2. PMID: 31056439 .

Menezes, C., Ayrton Vollet-Neto, Vera Fonseca. (2013) An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie*, Springer Verlag, 44 (5), pp.491-500

M. G.L. van Nieuwstadt and C. E. Ruano Iraheta. 1996. Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae) *Apidologie*, 27 4 (1996) 219-228

---

DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19960404>

Michener C.D. (1974). *The Social Behavior of the Bees*, Harvard Univ. Press, Cambridge.

Michener C.D (2000) *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, Baltimore

Morales, A. (2018). Efecto del alimento larval sobre el tiempo de desarrollo, tamaño corporal y potencial reproductivo en reinas de *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini) criadas in vitro. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán.

Nates-Parra. (2005). Abejas silvestres y polinización. *Manejó Integrado de Plagas y Agroecológica (Costa Rica)*. No 75. 7-20p.

Nogueira, N. (1997). *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. Editorial nogueirapis. Brasil. 446 p.

Palandri, A., L'hote, D., Cohen-Tannoudji, J., Tricoire, H. y Monnier, V. (2015). La inactivación de frataxina conduce a la deficiencia de esteroides en moscas y células ováricas humanas. *Tararear. Mol. Gineta*. 24, 2615–2626

Petino Zappala, María Alejandra. (2017). Estudio de la variabilidad genética y fenotípica de caracteres adaptativos en poblaciones naturales de *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6306\\_PetinoZappala](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6306_PetinoZappala)

Perkins, DO, Jeffries, CD, Jarskog, LF, Thomson, JM, Woods, K., Newman, MA, Parker, JS, Jin, J. y Hammond, SM (2007) Expresión de microARN en la corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia y trastorno esquizoafectivo. *Biol del genoma* 8, R27.

Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A. y Hartfelder, K. (1990). Casta y metamorfosis: títulos de hemolinfa de hormona juvenil y ecdisteroides en larvas de abejas en el último estadio. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 31-38

Rolle K, Piwecka M, Belter A, Wawrzyniak D, Jeleniewicz J, Barciszewska MZ, Barciszewski J. The Sequence and Structure Determine the Function of Mature Human miRNAs. *PLoS*

---

One. 2016 Mar 31;11(3):e0151246. doi: 10.1371/journal.pone.0151246. PMID: 27031951; PMCID: PMC4816427.

Roubik, D. (1989). Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press. Estados Unidos. 514 p.

Sakagami, S., Beig, D., Zucchi, R. & Akahira, Y. (1963). Occurrence of ovary- developed workers in queenright colonies of stingless bees. Rev. Bras. Biol. 23: 115-192.

Sánchez, L. 2001. Importancia de la polinización para el ecosistema y para los agroecosistemas. Tercer Taller Regional de Apicultura y Meliponicultura. PRAM-CINAT, PROMABOS. El Salvador.

Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. & Rajewsky, N. (2008) Cambios generalizados en la síntesis de proteínas inducida por microARN. *Naturaleza* 455, 58–63.

Snelling, R.R. (1986). Contributions toward a revision of the New World nomadine bees. Apportioning of the genus *Nomada* (Hymenoptera: Anthophoridae). Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County 376: 1-32. Trends Cell Biol. ; 15: 251-258

Snodgrass RE. 1956. Anatomía de la abeja melífera. Ithaca, Nueva York: Comstock Pub. Asociados; xiv, 334 págs.

Stefani, G. y Slack, FJ (2008) Pequeños ARN no codificantes en animales desarrollo. Nat Rev Mol Cell Biol 9, 219-230.

Tarver JE, Sperling EA, Nailor A, Heimberg AM, Robinson JM, King BL, Pisani D, Donoghue PCJ, Peterson KJ. 2013 miARN: pequeños genes con gran potencial en la filogenética de los metazoos. Mol. Biol. Evol. 30, 2369–2382. (doi: 10.1093 / molbev / mst133)

Unidad de Desarrollo Económico Municipal (UDEM), 2011. Informe de indicadores socioeconómicos de línea base, Santa María del Real.

---

<https://www.hondurasensusmanos.com/wp-content/uploads/2018/04/aprod-sta-maria-real-mamsa.pdf>

Wasielewski O, Giejdasz K, Wojciechwichz M. (2011). Ovary growth and protein levels in ovary and fat body during adult-wintering period in the red mason bee, *Osmia rufa*. *Apidologie* 42:749-758. <http://doi.org/10.1007%2Fs13592-011-0084-y>

Zhu K, Liu M, Fu Z, Zhou Z, Kong Y, Liang H, et al. (2017) Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genet* 13(8): e1006946.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006946>