

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Cuantificación de Enzimas Asociadas a la Tolerancia a Insecticidas en Tres
Polinizadores Entomofilos

Por:

ERVIN ORLANDO MORALES SANTIAGO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Cuantificación de Enzimas Asociadas a la Tolerancia a Insecticidas en Tres
Polinizadores Entomofilos

Por:

ERVIN ORLANDO MORALES SANTIAGO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

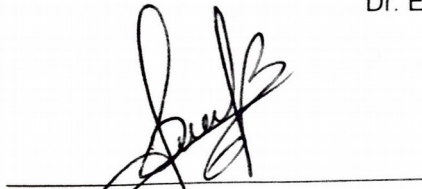
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



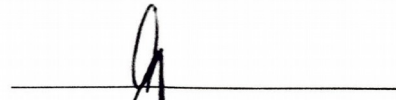
Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor Principal



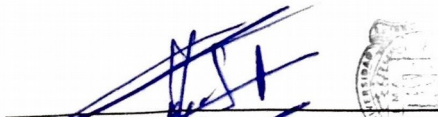
Dr. Omegar Hernández Bautista

Coasesor



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Coasesor

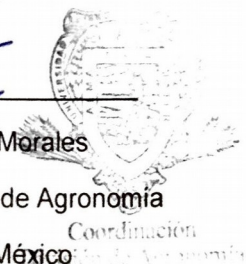


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinación de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2017



AGRADECIMIENTOS

A mi señor padre DIOS por avernos permitido tener salud junto con mi familia, y con eso a verme permito alcanzar la meta de terminar mi carrera profesional.

A mi “Alma Terra Mater” por brindarme todos los apoyos y materiales necesarios para poder terminar mis estudios y lograr mi carrera como ingeniero agrónomo.

Al Doctor Ernesto Cerna Chávez por haberme dedicado su tiempo instruyéndome en la prelación de mi profesión tanto en clase como en la elaboración de esta tesis y brindándome sus consejos como profesionista además de su confianza.

Al Mis Coasesores, el Dr. Omegar Hernández Bautista y la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, por el apoyo ofrecido en la realización de este proyecto.

A los profesores del Departamento de Parasitología y de otros departamentos por colaborar en la enseñanza de mi profesión.

DEDICATORIA

Con amor al ser más grande y poderoso del mundo a Dios, que me cuidó, me guardó y me protegió en los viajes de vacaciones, y de estudio que realizamos, de momentos difíciles, brindándome salud ya que sin la protección de él no hubiera logrado concluir mis estudios en esta universidad.

Con mucho amor y cariño a mis padres Francisco Morales López y Leticia Santiago Espinoza, por brindarme confianza, creer en mí, quienes respeto mucho porque me inculcaron la enseñanza de los valores como persona, estando siempre conmigo en los momentos más difíciles de la vida, que con sus consejos y sacrificios, sobre todo tener el apoyo incondicional para poder salir adelante con mi profesión además de los sabios consejos que me brindaron durante toda mi carrera.

Con cariño a mis hermanos: Roneli Morales y Francisco Morales, con el respeto que se merecen y por sus consejos sabios como personas que han enfrentado vida además de su cariño que me han brindado.

Con mucho Amor y Cariño a mi esposa Estrella Yaneth Maldonado Ramirez, por apoyarme, comprenderme y estar conmigo en los buenos y malos momentos, brindándome consejos y motivándome para seguir adelante en la conclusión de la carrera.

A mis amigos Sergio Enrique, Lizmark Morales, Víctor Manuel, José Luis, Rudi Alberto, Luis Rojas, Eduardo Daniel, por la amistad y del apoyo que me brindaron a lo largo de la carrera y por estar conmigo en los momentos difíciles a lo largo de la carrera, así como también en los momentos felices.

RESUMEN

La producción de cultivos hortícolas bajo invernadero es uno de los sistemas eficientes para obtener altos rendimientos, para ello hacen uso de la tecnología para acondicionar al área de producción a los requerimientos climáticos del cultivo, una de las actividades más demandadas es la polinización, esta puede ser por autopolinización, el uso de polinización mecánica, corrientes de aire o insectos polinizadores. Dentro de los insectos polinizadores más utilizados se encuentran la Abeja Europea (*Apis mellifera*) Abejorro (*Bombus* sp.) y abejas nativas (*Scaptotrigona mexicana*). Estas especies ocasionalmente tienen contacto con insecticidas convencionales utilizados para el control de insectos plaga, dicho contacto es mínimo de tal manera que no provoca mortalidad en las especies polinizadoras pero si pudiera afectar su fisiología, por lo que este trabajo de investigación tiene como objetivo cuantificar enzimas asociadas a la tolerancia a insecticidas en *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* y *Scaptotrigona mexicana*. Para ello se realizaron pruebas bioquímicas previamente estandarizadas y se obtuvo la actividad enzimática de 4 enzimas detoxificativas, los resultados muestran que las β -Esterasas son las enzimas que se expresaron en mayor proporción en las tres especies siendo la abeja sin aguijón la que presentó mayor valor de adsorción, las Glutathion S-Transferasas y Oxidasas no se presentaron significativamente en las tres especies evaluadas.

Palabras clave: Polinizadores, abeja, abejorro, abeja nativa, enzimas, tolerancia

correo electrónico: eoms_20@hotmail.com

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
Justificación.....	2
Objetivo.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Importancia de la polinización.....	3
Transporte de polen.....	3
Autopolinización.....	4
Polinización cruzada.....	4
Polinización anemófila.....	4
Polinización entomófila.....	5
Clasificación de los insectos polinizadores.....	6
Cualidades de un Insecto polinizador.....	7
Abeja europea (<i>Apis mellifera</i>).....	7
Alimentación.....	8
Anatomía de <i>Apis mellifera</i>	9
Ubicación taxonómica.....	11
Principales razas de <i>Apis mellifera</i>	12
Caucásica (<i>Apis mellifera caucásica</i>).....	12
Carniola (<i>Apis mellifera cárnica</i>).....	12
Europea o abeja negra (<i>Apis mellifera mellifera</i>).....	13
Italiana (<i>Apis mellifera ligustica</i>).....	13
Africana (<i>Apis mellifera scutellata</i>).....	13
Abejorro (<i>Bombus terrestris</i>).....	14
Clasificación taxonómica.....	14
Biología.....	14
Hábitos.....	15
Polinización con abejorros (<i>B. terrestris</i> y <i>B. ephippiatus</i>).....	15
Abejas sin aguijón (<i>Scaptotrigona mexicana</i>).....	16
Ubicación taxonómica.....	16

Biología y Hábitos.....	17
Polinización con abejas sin aguijón.....	18
Efectos negativos de los pesticidas sobre agentes polinizadores.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Ubicación del experimento.....	21
Material biológico.....	21
Cuantificación de proteína.....	21
Pruebas bioquímicas.....	23
Prueba de esterasas elevadas no específicas (β -Esterasas).....	23
Prueba de reacciones de oxidasa.....	24
Prueba Glutathion S-transferasa.....	25
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	26
CONCLUSIONES.....	30
LITERATURA CITADA.....	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Periodo de desarrollo de la <i>Apis Mellifera</i> en días.....	8
Cuadro 2. Medias de Absorbancias de la actividad enzimatica de <i>Apis mellifera</i>	26
Cuadro 3. Medias de Absorbancias de la actividad enzimatica de <i>Bombus terrestris</i>	27
Cuadro 4. Medias de Absorbancias de la actividad enzimatica de <i>Nannotrigona perilampoides</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Comparación de las medias de absorbancia en cada enzima por especie.....</i>	29
--	----

INTRODUCCIÓN

En el caso específico de la producción de cultivos fuera de temporada bajo invernadero, la plantación se realizan cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas, esto implica que los procesos de inducción floral, diferenciación floral, polinización, cuajado y desarrollo de frutos, se realicen en condiciones limitantes de temperatura e intensidad lumínica, conjuntamente con altas humedades relativas, por lo que, tales factores influyen directamente sobre la fecundación de las flores, produciendo un bajo número de frutos en ausencia de aplicaciones de reguladores de crecimiento o tratamientos que mejoren la autopolinización, como el uso de polinización mecánica, corrientes de aire o insectos polinizadores.

El encarecimiento de la mano de obra en las labores de polinización, y la fuerte tendencia de los consumidores de países europeos y norteamericanos a preferir productos sin aplicación de agroquímicos, ha obligado a los productores abastecedores de estos mercados a utilizar el abejorro y la abeja en el remplazo de hormonas. El uso de abejorros y abejas implica la utilización de pesticidas selectivos, que no presenten mortalidad para los polinizadores y los organismos benéficos frente a las plagas que se presenten en el cultivo.

Sin embargo, en la agricultura intensiva desarrollada en invernaderos, se caracteriza por una fuerte explotación de la tierra e incremento en la utilización de plaguicidas, el uso incorrecto de los mismos, puede plantear graves problemas para el medio ambiente y para el hombre, por lo que algunos insectos polinizadores pudieran generar tolerancia a insecticidas convencionales para realizar sus funciones de pecoreo y polinización.

Justificación

La agricultura intensiva se caracteriza por obtener mayor producción con el menor uso de los recursos, la polinización con insectos es indispensable para obtener altos rendimientos, el uso de plaguicidas para el control de insectos plaga son compatibles con los insectos polinizadores y beneficios, sin embargo al contacto con bajas concentraciones pudiera alterar la fisiología del insecto y promover la tolerancia a dichos insecticidas.

Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo cuantificar enzimas asociadas a la tolerancia a insecticidas en *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* y *Scaptotrigona mexicana*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de la polinización

La polinización se define como el proceso de transporte de polen desde las anteras de una flor hasta un estigma localizado en la misma flor, en la misma planta o en una planta diferente de la misma especie y que conduce a la fertilización del óvulo para el posterior desarrollo del fruto (Robacker et al. 1988). La polinización tiene una gran importancia en la mayoría de las especies de los frutales, la presencia de semillas es indispensable para que el fruto cuaje, crezca y llegue a madurar, de modo que si no se lleva a cabo la polinización y posterior fecundación de los óvulos, la flor o el frutito pequeño aborta y cae (Razeto, 1999).

De esta manera la reproducción sexual y el desarrollo de la semilla depende de la polinización y este es el requerimiento previo al cuajado en la mayoría de los frutos, lográndose además a través de estos procesos maximizar la producción (Mc Grogor, 1976). Cuando existe polen viable, si las condiciones climáticas permiten su dispersión y germinación, la agitación de las flores utilizando vibradores manuales o con pilas, o vibrando los alambres del entutorado, utilizando corriente de aire, o incluso, pulverizando agua en gotitas macroscópicas sobre la flor han dado buenos resultados para mejorar el cuajado de frutos (Geinsenberg y Stewart, 1886).

Transporte de polen

Existen dos vías principales de transporte de polen desde la antera hasta el estigma de la flor. Puede ser llevado por los insectos (polinización entomófila), o bien puede ser conducido por el viento (polinización anemófila) (Westwood, 1982).

Autopolinización

Es la transferencia de polen desde las anteras al estigma de la misma flor, o a estigmas de otras flores de la misma planta o flores de diferentes plantas del mismo genotipo (Hoopingarner y Waller, 1993). Es así como la polinización puede ser realizada sin la intervención de un agente externo, pero este sistema es generalmente deficiente y limitado (Mc Gregor, 1976).

Según Robbins et al. (1958), la autopolinización se produce en los siguientes casos: (a) transferencia de polen desde la antera al estigma de la misma flor. (b) transferencia de polen desde la antera al estigma de otra flor de la misma planta. (c) transferencia de polen desde una antera al estigma de una flor u otra planta. La autopolinización no promueve la variabilidad genética, por lo tanto, las plantas que utilizan este mecanismo generalmente presentan una disminución, tanto en rendimiento como en calidad (Free, 1993; Frankel y Galun, 1977).

Polinización cruzada

Hoopingarner y Waller (1993), la definen como la transferencia de polen entre plantas que no tienen características genéticas idénticas. Su importancia radica en la sobrevivencia de las especies a través de los años ya que proporciona diversidad al pool genético dentro de la población de las plantas.

Strasburger et al. (1994), añaden que el éxito de la polinización, la producción de semillas capaces de germinar y la prosperidad de la descendencia dentro de una misma especie, en general, son mayores cuando la polinización es cruzada que cuando es autógama, esto debido a que aumentan las posibilidades que se forman nuevas combinaciones de factores hereditarios.

Polinización anemófila

El transporte de polen se produce por medio del aire. Este tipo de polinización es poco segura y las plantas deben de producir grandes cantidades de polen para

tener posibilidades de que algún grano llegue hasta el estigma de otra flor de distinta planta (Rallo, 1986). Las flores de estas plantas en general carecen de medios de atracción, suelen ser unisexuales, las masculinas (estambres) son más abundantes que las femeninas, su polen es liso en su superficie y polvoriento (Ehrendorfer, 1986).

Polinización entomófila

El polen es transferido por los insectos, en especial por las abejas, aunque existen otros como los abejorros y moscas (Razeto, 1986). En este caso el transporte de polen alcanza un radio de acción más reducido, que dependerá de la conducta del insecto (Rallo, 1986).

Los insectos tienen gran importancia como agentes polinizadores, ellos visitan las flores de distintas plantas para extraer néctar y polen, los que constituyen una fuente nutricional importante (Free, 1993). Los insectos polinizadores más importantes son las abejas solitarias, abejorros y abejas melíferas. Otros insectos visitan igualmente flores de muchos cultivos y son polinizadores esenciales para muchos, sin embargo carecen de suficiente pilosidad en su cuerpo y los patrones necesarios de comportamiento, y probablemente pocos transfieren el polen desde las anteras al estigma de la flor (Free, 1993).

Clasificación de los insectos polinizadores

Debido a la gran cantidad de insectos que visitan las flores, diversos autores los clasifican y agrupan de acuerdo a las características, es así como Root (1976) los agrupa.

Grupo 1.- En este grupo se encuentran las especies menos importantes, con efecto polinizante muy limitado, ya que su acercamiento al polen o al néctar está determinado por la única y exclusiva necesidad de satisfacer requerimientos alimenticios, luego de ser satisfechos se alejan, en este grupo podemos encontrar escarabajos, polillas trips y mariposas.

Grupo 2.- Este grupo comprende abejas solitarias de muchas especies, ellas se aprovisionan de alimentos para su descendencia en desarrollo, la ventaja que estas presentan al grupo 1, es su abundante pilosidad y adaptaciones especiales para llevar el polen.

Grupo 3.- Este grupo corresponde a insectos más evolucionados este grupo lo representan los abejorros (*Bombus sp*), estos se caracterizan por acopiar alimentos, guardando los excedentes en su nido. Tienen una organización social en la cual la reina es protegida por las obreras para poder mantener la colonia. La intensidad de visitas de los abejorros a las plantas son muy pronunciadas, por su tamaño y características físicas pueden llevar unas grandes cantidades de polen y néctar, pero esto es una desventaja para ellas ya que las flores pequeñas no soportan su peso.

Grupo 4.- Este grupo corresponde a insectos altamente evolucionados, es representado por la abeja melífera (*Apis mellifera* L), la ventaja de esta es por su desarrollada vida social, que le permite perdurar a través del tiempo sobreviviendo el invierno como unidad social compactada. Son consideradas como principal insecto polinizador por su inclinación al acopio de polen y néctar.

Cualidades de un Insecto polinizador.

Un insecto polinizador debe de reunir una serie de condiciones, como ser una especie gregaria, preferir las flores de un cultivo intensivo concreto a otros, así como la flora espontanea, coincidir su actividad máxima con la plena floración de ese

cultivo, ser fácilmente manejables y ser resistentes a parásitos y enfermedades (Rallo, 1986).

Abeja europea (*Apis mellifera*)

La Reina, Hembra fértil, su función principal es producir los huevos. Alcanza su madurez sexual después de 5 días de vida, tiempo después del cual, la reina virgen sale de la colmena para realizar su vuelo de acoplamiento, apareándose con varios zánganos, para después regresar a su colonia; Zángano, Macho de la colmena. En la época de reproducción, (meses de floración) aumenta su número, ya que su tarea principal en la colmena es acoplarse con la reina virgen; Obreras, son hembras infértiles de la colmena que producen solo zánganos al no ser fecundadas; pero en casos especiales, como cuando falta la reina, son capaces de desarrollar ovarios y poner huevos. Esta abeja posee otros órganos que no presenta la reina o los zánganos, permitiéndole realizar tareas necesarias para la vida de la colonia, las cuales dependen de su edad y desarrollo físico (Schopflocher, 1996).

las actividades está en función a su edad: 1-3 días. Limpian los panales de la colmena dando calor a los huevos y las larvas; de 4-12 días, son llamadas nodrizas por cuidar y alimentar a las larvas, de 13-18 días, en este periodo producen cera y panales; de 19-20 días, en esta etapa defiende la colmena colocándose en la entrada de ella, evitando la entrada de abejas de otras colonias, de 21-38 hasta 42 días, recolectan néctar, polen, agua y propóleos para cubrir las necesidades de la colmena (SAGARPA, 2008).

Cuadro 1. Periodo de desarrollo de la *Apis Mellifera* en días.

Fase de desarrollo	Reina	Obrera	Zángano
Huevo	3	3	3

Larva	5 ½	6	5 ½
Pupa	7 ½	12	15 ½
Adulto	16	21	24

En una colonia se encuentra por lo general una sola reina, de 100 a 2000 zánganos lo que dependerá de la época del año, y varios miles de obreras, las cuales pueden llegar a 80 000 (Schopflocher, 1996). La duración de la vida de la abeja depende de la cantidad de trabajo que realice, pudiendo vivir 6 semanas con exceso de labores a 6 meses fuera de la época de floración. Cada casta de abejas tiene un periodo diferente de desarrollo y son criadas en diferentes celdas (SAGARPA, 2008).

Alimentación

Tanto las obreras como la abeja reina se alimentan de jalea real durante los primeros tres días del estado larval. Luego las obreras cambian por una dieta de polen y néctar o miel diluida, mientras que aquellas larvas elegidas para ser abejas reinas continúan recibiendo jalea real. Esto causa que la larva se convierta en pupa más rápidamente además de aumentar su tamaño y desarrollarla sexualmente. Los criadores de reinas consideran una buena nutrición durante el estado larvario es de crucial importancia para la calidad de reinas criadas, siendo otros factores importantes una buena genética y un número suficiente de apareamientos. Durante los estados larvales y pupa, varios parásitos pueden atacar la pupa o la larva y destruirla o matarla. (Burgett et. Al., 1993).

Anatomía de Apis mellifera

La abeja melífera es un organismo altamente especializado y por esta razón está provista de mecanismos y accesorios que le posibilitan la vida considerando como de especial importancia la estructura y las modificaciones de los órganos que adaptan a la abeja a su forma de vida y la diferencian de otros insectos, El cuerpo de

la abeja se encuentra dividido en cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza se encuentran los ojos, antenas y piezas bucales; en el tórax las alas y las patas; y en el abdomen las glándulas cereras y el aguijón (Root, 2002).

La cabeza es de forma triangular en la reina y en la obrera; mientras que en el zángano es redonda. Consta de 6 segmentos que primitivamente estuvieron separados pero que en la actualidad están fusionados. Cada una de las placas y escleritos que forman la cabeza tienen un nombre específico: la parte superior de la cara, entre los ojos compuestos, se llama frente y en ella se ubican los tres ojos simples u ocelos, la parte situada a ambos lados, por debajo y detrás de los ojos, es la gena; debajo de las antenas entre la frente y el labro, la parte bien delimitada por surcos en forma de "U", se llama cílopeo; de esta se encuentra suspendido el labro, y sirve también de sostén a importantes músculos de los órganos de la succión. El labro es como la tapa de la boca y forma parte del aparato bucal. La parte posterior de la cabeza se denomina occipucio; tiene una perforación llamada foramen y se comunica con la actividad torácica por intermedio de la nuca membranosa. La parte inferior del occipucio tiene la forma de la "U" invertida y se llama probóscide. Allí se sitúan las piezas bucales. La cabeza de la abeja es tipo hipognato, pues el eje cefálico forma un ángulo recto con el eje del cuerpo (Persano, 2002), siendo La probosis, aunque no es un órgano como tal, está formado por un grupo de estructuras que se unen y tiene una función particular, por esta estructura retráctil se ingiere y regurgita néctar, agua o miel (Pesante, 2003).

En el tórax encontramos las alas, las patas y las primeras conexiones externas del sistema respiratorio. El tórax se divide en cuatro diferentes segmentos; el protorax, el mesotorax, el metatórax y el propodeum estos escleritos están tan unidos, que cuesta distinguir sus límites. Los segmentos dorsales se conocen como notos, los ventrales esternos y las laterales pleuras; El protórax está conectado al cuello y da soporte a la cabeza, en este se encuentra el primer par de patas; el mesotórax es el

segmento más grande y contiene el primer par de alas, el segundo par de patas y el primer par de espiráculos (los cuales conectan la tráquea con el exterior); El metatórax contiene el segundo par de alas, el tercer par de patas y el segundo par de espiráculos, el propodeum se encuentra en la parte caudal del tórax y se considera parte de él, pero en realidad es el primer segmento del abdomen, contiene el tercer par de espiráculos (los otros 7 están en los primeros segmentos del abdomen), el propodeum se reduce abruptamente a formar el petiolo abdominal (Pesante, 2003).

Las Alas, estas se forman por la unión de dos capas del exoesqueleto, fortalecidas por estructuras tubulares conocidas como venas, a través de las cuales fluye la hemolinfa. Las alas son una anterior y una posterior las cuales se unen al vuelo por dos ganchos llamados amulos, lo que hace que ambas alas batan al mismo tiempo como una sola, cuando no están volando las alas se doblan sobre el tórax y el abdomen, gracias a sus estructuras quitinosas y membranosas que actúan como músculos (Pesante, 2003).

Ubicación taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hymenoptera

Suborden: Apocrita

Superfamilia: Apoidea

Subfamilia: Apinae

Tribu: Apini

Género: *Apis*

Especie: *A. mellifera*

Linnaeus, 1758.

Principales razas de *Apis mellifera*

Caucásica (*Apis mellifera caucásica*)

Esta abeja es originaria de los altos valles del Cáucaso central, su forma y tamaño es similar al de las Carniolas y su color tiende a ser marrón, en ocasiones con

manchas marrones sobre las primeras franjas del abdomen con pelos que cubren su cuerpo de color gris plomo. Es muy mansa y produce colonias potentes. Alcanza su pleno desarrollo en verano y se consideran enjambradoras. Sus defectos principales son la tendencia a propolizar en exceso los elementos de la colmena, la construcción de opérculos planos y oscuros, la tendencia a desorientarse y pillar, además de ser muy sensibles a Nosemiasis y no ser grandes productoras de miel (Root, 2002).

Carniola (*Apis mellífera cárnica*)

Esta raza proviene de los Alpes austriacos de Yugoslavia y del valle del Danubio (Hungría, Rumania y Bulgaria), es parecida a la italiana, ya que está cubierta de pelos cortos y abundantes, los zánganos tienden a ser gris o de un color gris amarronado. Es reconocida por su mansedumbre y se dice que es una de las abejas más dóciles que existen. Inverna bien, ya que su consumo de reservas en esta época es muy limitado, propóliza poco y no es propensa al pillaje. Es muy resistente a las enfermedades y tiene una lengua muy larga. Su principal defecto es la tendencia a enjambrar debido a su acelerado desarrollo en épocas de floración (Root, 2002).

Europea o abeja negra (*Apis mellífera mellifera*)

Fue la primera abeja que se introdujo en América, proviene de Inglaterra, Holanda, Alemania y Francia, se cree que las abejas holandesas no eran negras sino marrones. Esta abeja varía en aspecto y temperamento de acuerdo con el lugar de origen, tiene cuerpo grande, alas angostas, pelos largos y color uniforme (en algunas ocasiones manchado), casi nunca presentan franjas bien marcadas, es conocida por su laboriosidad y su temperamento nervioso (Root, 2002).

Italiana (*Apis mellifera ligustica*)

Procede del norte de Italia, se caracteriza porque los primeros anillos del abdomen son amarillos en las obreras. Es laboriosa, mansa y poco enjambradora, saca partido de las mieladas cortas, tiene tendencia a la deriva y construye pocas celdas reales. La reina es amarillo cobriza y se deja observar fácilmente (Asencio, 1998).

Africana (*Apis mellifera scutellata*)

Se origina de las regiones templadas semiáridas y sábana del África central, donde las condiciones ambientales poco estables y alta densidad de depredación, influyeron en el desarrollo de un comportamiento altamente defensivo con capacidad de reproducción en periodos cortos y emigración a lugares con más néctar, ocasionando decremento por africanización en cuanto a producción de 85% (Coronado, 1997). En 1956 la abeja africana fue llevada a Brasil, de donde escaparon 26 enjambres en 1957, llegando a Panamá en 1982 y a México por la frontera de Guatemala a Chiapas en 1985, cruzando los límites de Texas en 1991 (Otis et al., 2005).

Abejorro (*Bombus terrestris*)

El abejorro de tierra o *Bombus terrestris*, es uno de los tipos de abejorros más empleados en la agricultura intensiva, debido a su alto nivel de polinización. Su nombre hace alusión a una determinada fase de su vida en la naturaleza, la realiza curiosamente por debajo del nivel del suelo. El *Bombus terrestris* es negro, con una banda blanca al final del abdomen. El tórax y el abdomen están cruzados por una banda amarilla. El tórax es muy corto y está cubierto de pelo (Mata, 2009).

Clasificación taxonómica

Clase: insecta

Orden: Hymenoptera

Suborden: Apocrita

Familia: Apidae

Tribu: Bombini

Género: *Bombus*

Especie: *B. terrestris*

Biología

El género *Bombus* (*Bombus terrestris*, *Bombus ephippiatus*.) son de tamaño algo mayor que las abejas (19-38 m.m), de color negro, con mayor o menor cantidad de franjas amarillas, cubierto de pelo. *Bombus terrestris* es negro, con una banda blanca al final del abdomen. Todo el género se caracteriza por una cabeza estrecha y pequeña, con una lengua corta, además construyen nidos bajo tierra, entre la hojarasca y en los huecos de los árboles, siendo el ciclo natural es muy similar al de las avispas. (González, 2007).

Hábitos

Los abejorros (*Bombus terrestris*, *Bombus ephippiatus*.) dependen de dos tipos de alimento: del polen obtienen las proteínas y del néctar los azúcares necesarios para el aporte energético, Uno de ellos es el polen, de donde obtienen una cantidad de proteínas y es necesario para la construcción de la colonia. El polen es suministrado por las flores de tomate sin limitaciones. El segundo tipo de alimento es el néctar el cual contiene los azúcares necesarios que aportan la energía necesaria a los abejorros. Los abejorros son insectos sociales, aunque su instinto de cooperación

no está tan desarrollado como el de las abejas y no comunican el hallazgo de fuentes de alimento. Tienden a permanecer en áreas menos extensas, (Infoagro, 2005).

Polinización con abejorros (*B. terrestris* y *B. ephippiatus*)

Durante los primeros años el empleo de abejorros en el cultivo de tomate bajo plástico era de sólo un 5 - 10 %, empleándose fitohormonas en el 80 - 90 % de los casos. En la actualidad, y en tan sólo cinco años, estos porcentajes han cambiado siendo el 99 % de los agricultores los que emplean abejorros polinizadores en sus invernaderos (González, 2007).

Desde 1987, se observó que los abejorros eran la mejor alternativa para hacer más efectivas la polinización y la fructificación, pues efectúan la polinización vibratoria, única forma de polinizar el tomate y otras plantas. El empleo del abejorro *Bombus* sp, asegura una excelente producción de tomate en cultivos protegidos, y así, 99% de los productores de tomate emplean abejorros importados de Europa en sus invernaderos.

Otra ventaja de los abejorros es que son menos influenciados por el clima que las abejas. Se mantienen activos a temperaturas relativamente bajas consiguiéndose más eficacia en la polinización y en la fructificación (recolectan alimento a 5° C), con baja intensidad de luz, con lluvia, viento y nublados. Aunque el calor extremo reduce mucho su actividad; El empleo de *Bombus terrestris*, aporta una alternativa muy buena que asegura una producción de excelentes tomates bajo plástico; Una polinización adecuada es esencial para asegurar una formación correcta de los frutos y una producción óptima; Hoy en el cultivo del tomate en invernadero, la introducción de las colmenas de abejorros constituye una práctica más de su cultivo, substituyendo el método de jornales intensivos de vibración manual, convirtiéndolos en los

polinizadores para la industria del tomate de invernadero más importantes en los 30 años desde que se domesticaron (González, 2007).

Abejas sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*)

Las abejas sin aguijón o meliponas son un grupo de insectos sociales que habitan áreas tropicales y subtropicales. A diferencia de la abeja común, originaria del viejo mundo (África), las meliponas son nativas del continente americano donde se han identificado más de 350 especies. Algunas de estas especies producen una miel de alta calidad que es utilizada por los pobladores rurales como complemento de la dieta y para uso medicinal. Además, las abejas sin aguijón actúan como polinizadores para las flores de numerosas especies, tanto en los bosques nativos como en los campos de agricultura (Cabrera, 1999).

Ubicación taxonómica

Clase: Insecta

Orden: Hymenoptera

Suborden: Apocrita

Familia: Apidae

Tribu: Meliponini

Género: *Nanotrigona*

Especie: *S. mexicana*

Biología y Hábitos

Las abejas sin aguijón, a diferencia de las abejas melíferas, tienen un sistema de alimentación de las larvas que se conoce como alimentación de las larvas que se conoce como alimentación en masa. La división del trabajo en la colonias de meliponas se encuentra, al igual que en la abejas melíferas, relacionada con la edad de las obreras y también parece existir variación dentro de una misma especie debido a factores genéticos (Waldschmidt, 1997).

Los meliponinos acopian varios tipos de recursos, los más comunes son néctar y polen que son las fuentes básicas de carbohidratos y proteínas respectivamente Sin embargo, también existe acopio de agua, resinas, heces, lodo, sudor, savia de frutos, semillas, aceites, ligamasa (exudado de pulgones) e incluso sangre y carroña (Sommeijer, 1994).

Los meliponinos son abejas sociales viven en colonias perennes, encontradas típicamente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, desde los 30° longitud sur, también menciona que el tamaño de una melipona va desde 1.8 mm hasta 1.5 cm (Michener, 2000).

Las abejas sin aguijón no pican y muchas son mansas, tienen otras estrategias defensivas para evitar el ataque de posibles predadores. Los nidos son cubiertos, generalmente resguardados en cavidades y rodeados por batumen. La entrada a los nidos es estrecha y larga y está cubierta con resinas o semillas repelentes, con los cual evitan el acceso de intrusos, estas especies de abejas construyen sus nidos en troncos de árboles, y una manera tradicional de aprovechar los productos de sus nidos, es cortando la parte del árbol donde se aloja el nido. Enseguida, éste se traslada cerca del hogar, colocando esa parte del tronco en un lugar donde esté protegido del sol y de la lluvia, esta manera de aprovechar y criar las abejas tiene la

limitante de que es difícil la revisión interna del nido; por lo que se dificulta el manejo y multiplicación de la colonia. Para superar esta dificultad, el hombre ha transferido los nidos alojados en los troncos a cavidades artificiales (Piste, 2011).

Polinización con abejas sin aguijón

Existen, además, otras especies con actividad potencial de polinización de cultivos aún poco difundidas en nuestro país: las abejas sin aguijón y las abejas solitarias; en especial de cultivos de origen neotropical con los cuales evolucionaron como tomates, chiles, pimientos, aguacates y cucurbitáceas, entre otros. (Free 1993; Malagodi-Braga et al., 2000; Slaa et al., 2000; Macias- Macias et al., 2001; Cauich et al., 2003; Can-Alonzo et al., 2005; citados por Quezada-Euán et al., 2007).

Aunque los beneficios económicos del cultivo de las abejas nativas sin aguijón (meliponicultura) en México son potencialmente muchos, el ingreso económico de los campesinos por la venta de los productos obtenidos directamente de las colonias (miel, polen y propóleo) enfrenta obstáculos por la reducida comercialización de los mismos, (Vit and Tomas-Barberan, 1998; Grajales *et al.*, 2001; Miorin *et al.*, 2003).

Existe poco potencial aun difundido en nuestro país para las abejas sin aguijón, esta es la polinización de cultivos. Se puede considerar que las abejas sin aguijón serían buenos polinizadores en especial de cultivos de origen neotropical como tomates, chiles, pimientos, aguacates y cucurbitáceas, entre otros, debido a que estas plantas y abejas han compartido una historia evolutiva en los trópicos del nuevo mundo. Es evidente el importante papel que estas abejas desempeñan en la agricultura cuando comparamos la producción de frutos en cultivos de aguacate en Yucatán, que son intensamente visitados por abejas sin aguijón, y áreas del Bajío, los cuales tienen problemas de polinización, pues el extensivo uso de pesticidas ha

reducido las poblaciones naturales de estos polinizadores (Valdivinos-Nuñez *et al.*, 2003; Can-Alonzo *et al.*, 2005).

En este sentido, el uso de especies de abejas sin aguijón de fácil manejo y adaptabilidad ha demostrado ser una alternativa para la polinización de este tipo de cultivo, que también permitiría un ingreso económico adicional a los meliponicultores de la región; Un potencial muy importante de las abejas sin aguijón es su utilización en la polinización dirigida de cultivos. Algunos beneficios agronómicos de la polinización incluyen, entre otros, el mejoramiento en la calidad de los frutos e incrementos en la producción. Las abejas sin aguijón cuentan con diversas ventajas que las hacen deseables para su uso en polinización de algunos cultivos, dentro de las que se destacan: a) su capacidad de forrajear bajo condiciones de invernadero sin representar riesgos para los operarios; b) las reinas fecundadas no pueden volar, de modo que no se presenta la enjambrazón evasiva (estrategia que utiliza la abeja africanizada para abandonar el sitio donde tiene establecido su nido y migrar a otro lugar, en respuesta a condiciones ambientales adversas o a cualquier cosa que amenace la supervivencia de la colonia), y c) son resistentes a los parásitos y enfermedades que atacan a *Apis mellifera* (Quezada-Euán, 2005).

Efectos negativos de los pesticidas sobre agentes polinizadores

Sin embargo, que no quepa la más mínima duda de que la abeja melífera es el agente polinizador más cosmopolita y el más utilizado en aquellos cultivos que requieren o se benefician de insectos para el cuaje de semilla, vegetal o fruta. Por último, el número de polinizadores que se observan en un predio de siembra ha venido disminuyendo con los años como resultado del uso de plaguicidas y de la modificación y destrucción del hábitat natural (Kevan y Phillips, 2001).

Los recientes descensos en las poblaciones de abejas y la creciente demanda de los cultivos de insectos de polinización aumentan las preocupaciones sobre la

escasez de polinizadores. La exposición a pesticidas y patógenos interactúa para causar fuertes efectos negativos en las colonias manejadas de abejas, las colonias en las colmenas pueden ser afectadas directamente por los pesticidas, pero con mayor frecuencia sólo las abejas pecoreadoras mueren en campo o sus funciones fisiológicas se ven afectadas. Sin embargo, si las abejas pecoreadoras mueren, la colonia en su totalidad es afectada, ya que son las responsables de mantener el ingreso de alimento a la colmena (Kevan, 1999).

Investigaciones recientes están descubriendo diversos efectos subletales de los plaguicidas sobre las abejas, los insecticidas y fungicidas pueden alterar los insectos y la actividad enzimática, el desarrollo, el comportamiento de oviposición, las proporciones de sexos en la descendencia, la movilidad, el vuelo y la orientación, el comportamiento de alimentación, el aprendizaje y la función inmune; El funcionamiento de inmunidad es de particular interés debido a los recientes descensos de poblaciones relacionados con la enfermedad de las abejas (Pettis et al., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología de insectos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista Saltillo, Coahuila, México.

Material biológico

se utilizaron tres especies de insectos polinizadores: *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* y *Scaptotrigona mexicana*, dichos especímenes facilitados por el departamento de toxicología de la misma universidad.

Cuantificación de proteína

Para conocer la cantidad de proteína total se empleó la metodología descrita por Brogdon (1984). Dicho método consiste en cuantificar una proteína de referencia “Albumina sérica bovina” (BSA) para la obtención de una curva estándar, donde se consideraran los datos comprendidos entre 80 y 140 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

Preparación de reactivos.- Reagente: Se disolvió 20 mL de colorante (reagente) con 80 mL de H_2O esterilizada, se pasó por papel filtro para obtener una dilución, posteriormente la preparación de Buffer (KPO_4), se disolvió 6.6 g de fosfato dibásico con 1.7 g fosfato monobásico, aforando a 1000 mL de H_2O esterilizada.

Preparación de homogenatos.- En tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 4 muestras con diferente cantidad de insectos: 0.5, 1, 3 y 5, cada muestra con 10 repeticiones. Se agregó 500 μL de diluyente buffer KPO_4 (fosfato de potasio), se trituraron con un homogenizador de tejidos, se aforó a 1 mL adicionándole 900 μL de diluyente.

Lectura de absorbancias.- Se empleó una microplaca de 96 pozos, en cada cavidad se colocaron 20 μL de homogenato, se agregaron 80 μL de buffer (KPO_4) y 200 μL de colorante diluido, estos pasos se realizan por triplicado para cada repetición. Consecutivamente se colocaron en el lector de placas obteniendo los valores de absorbancia con un filtro de 630 nm, sin filtro diferencial.

Interpretación de resultados.- A los datos arrojados por el lector de placas, se les obtuvo la media de cada repetición (tres pozos), mediante la ecuación de la curva estándar de referencia del método de Brogdon (1984) dada por la interpolación de $\mu\text{g/mL}$ de proteína y la absorbancia, se obtuvieron analíticamente los valores comprendidos en un rango establecido por el autor. La ecuación de la recta fue: $y = -0.5033 + 0.7249 (x)$; donde se sustituyen los valores de las medias de las absorbancias, obteniendo los valores de $\mu\text{g/mL}$ de proteína, fueron tabuladas y se obtuvo la media del contenido de proteína, comparándolas para decidir la cantidad de insectos a emplear para la determinación de enzimas.

Pruebas bioquímicas

Prueba de esterasas elevadas no específicas (β -Esterasas)

Mide los niveles de β -Esterasas no específicas presentes.

Preparación de reactivos.- Acetato de β -naftil: se disolvió 56 mg de β -naphthyl acetate en 20 mL de acetona y se agregó 80 mL de buffer (KPO_4). Para preparar O-Dianisidina (fast-blue), se disolvió 50 mg de O-Dianisidine (fast-blue) en 50 mL De H_2O esterilizada. Este último reactivo se preparó inmediatamente antes de usarlo, ya que se degrada fácilmente, un indicador es su coloración, cuando adquiere una tonalidad ámbar se descarta y se prepara uno nuevo.

Lectura de absorbancias.- En cada pozo de la microplaca, se colocaron 100 μ L del homogenato de insectos, se agregó 100 μ L de acetato de β -naftil, se dejó incubar por 10 minutos, pasado el tiempo, agregando 100 μ L de Dianisidina, estos pasos se realizan por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se dejaron incubar durante 2 minutos y se corre en el lector de placas usando un filtro de 540 nM. Una vez arrojadas las lecturas de absorbancias, se promedian según su muestra y su repetición para el análisis de resultados. Se emplearon los pozos G10, G11, G12 como control positivo donde se agregó 300 μ L de β -naftil a cada uno y H10, H11, H12 para control negativo agregando 300 μ L de de buffer (KPO_4).

Prueba de reacciones de oxidasa

Mide los niveles de peroxidasa

Preparación de reactivos.- Buffer de Acetato de Na (0.25 M): se disolvió 16.6 mL de 3M Sodium Acetate en 180 mL de H_2O esterilizada, después se aforó a 200 mL, ajustando el pH 5.0 adicionándole ácido acético glacial. Para el TMBZ, se disolvió 50 mg de 3, 3', 5, 5'- Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride, en 25 mL de Metanol, agregando 75 mL de 0.25 M Na Acetate buffer, se dejó disolver durante varios minutos. Por último para el Cytochrome-C: se pesaron 10 mg de Cytochrome-C (de corazón de bovino) y fueron disueltos en 100 mL de Buffer de Acetato de Na (0.25 M) pH 5.

Lectura de absorbancias.- Se colocaron 100 μL del homogenato de insectos, se agregan 200 μL de TMBZ, agregado una gota (25 μL) de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3%, estos pasos se realizaron por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se dejó incubar por 5 minutos, pasado el tiempo se corrió en el lector de placas usando un filtro de 620 nm. Una vez arrojadas las lecturas de absorbancias, se promediaron según su muestra y repetición para el análisis de resultados. Se emplearon los pozos G10, G11, G12 como control positivo donde se agregó 300 μL de Cytochrome-C a cada uno y H10, H11, H12 para control negativo agregando 300 μL de buffer (KPO_4).

Prueba Glutathion S-transferasa

Mide los niveles de Glutathion S-transferasa presentes

Preparación de reactivos.- Reduced glutathione: se disolvieron 61 mg de reduced glutathione en 100 mL de buffer (KPO_4). Para cDNB, fueron disueltos 20 mg de 1-chloro-2,4'-dinitrobenzene en 10 mL de Acetona y se agregaron 90 mL de buffer (KPO_4); este reactivo es viable de 3 a 4 días a 4 °C.

Lectura de absorbancias.- se colocó 100 μL del homogenato de insectos, se agregaron 100 μL de Reduced glutathione, y 100 μL de cDNB, estos pasos se realizaron por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se corrió inmediatamente (T_0) en el lector de placas usando un filtro de 340 nm, se volvió a correr transcurridos 5 minutos (T_5). Las lecturas de absorbancias, se promediaron

según su muestra y su repetición en donde se tomaron en cuenta las diferencias de ambos tiempos ($T_5 - T_0$) para el análisis de resultados. En esta prueba en particular no se contemplan controles, tanto los positivo como los negativos por lo que se dejaron los espacios vacíos.

Análisis estadístico

los resultados arrojados por un espectrofotómetro, leídos con diferentes filtros según la enzima se analizaron estadísticamente mediante el Software R 3.3, se realizó un análisis de varianza con un 5 % de significancia, posteriormente se hicieron comparaciones de medias mediante "Tukey".

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se presentan los resultados del análisis estadístico de las absorbancias obtenidas por enzima en cada especie de insecto polinizador, en el cuadro 2, se registran las medias de dichas absorbancias, la enzima con mayor contenido son las β -Esterasas y α -Esterasas con 0.785 y 0.780 respectivamente, estos valores son estadísticamente iguales al encontrarse en la misma agrupación, estas enzimas mayormente son las responsables de altos registro de proporción de resistencia en varios insectos plaga (Hernandez et. al., 2011; Ponce et al. 2009).

Cuadro 2. Medias de Absorbancias de la actividad enzimática de *Apis mellifera*

Enzima	Media \pm SD	Agrupación*
---------------	----------------------------------	--------------------

β -Esterasas	0.785 \pm 0.106	a
α -Esterasas	0.780 \pm 0.146	a
GST	0.335 \pm 0.027	b
Oxidasas	0.128 \pm 0.040	c

SD: desviación estandar, GST: Glutathion S-Trasferasas, *: medias con diferente letra son estadísticamente significativas.

Las α y β -Esterasas son las responsables de resistencia, a través de la detoxificación de organofosforados y carbamatos (Pasteur y Raymond, 1996), esto pudiera deberse al contacto de las abejas con flores contaminadas con insecticida por la deriva en la aplicación de pesticidas en cultivos.

El mismo fenómeno de un incremento en las esterasas se observa para *Bombus terrestris* (cuadro 3), donde las β -Esterasas se encuentran en mayor proporción respecto a las demás enzimas, las α -Esterasas en menor proporción seguido de GST y Oxidasas, todas las enzimas están en diferente proporción.

Cuadro 3. Medias de Absorbancias de la actividad enzimática de *Bombus terrestris*

Enzima	Media \pm SD	Agrupación*
β -Esterasas	0.752 \pm 0.069	a
α -Esterasas	0.593 \pm 0.097	b
GST	0.351 \pm 0.065	c
Oxidasas	0.125 \pm 0.049	d

SD: desviación estandar, GST: Glutation S-Trasferasas, *: medias con diferente letra son estadísticamente significativas.

Algunos autores mencionan que su actividad enzimática mediada por las β -Esterasas también esta asociada con resistencia a piretroides (Flores *et al.*, 2006), sin embargo recientemente otros autores las asocian a los piretroides con las oxidasas (Citocromo P450) (Wondji *et al.*, 2009), siendo estas enzimas las que se presentaron en mayor proporción en las tres especies estudiadas, esto pudiera deberse al poco uso de los piretroides cuando se utilizan insectos polinizadores ya que la acción de derribo puede afectarles en la acción de pecoreo. En estudios de polinización, el genero *Bombus* es uno de los insectos con mayor facilidad de vuelo y cobertura comparado con abeja europea y abejas sin aguijón (Cerna *et al.*, 2015), por lo que la selección de un buen uso de insecticidas amigables con polinizadores entomofilos pudieran obtener buenos resultados en cuanto al rendimiento

Por ultimo, la abeja sin aguijón *Nannotrigona perilampoides*, registró los mayores valores de β -Esterasas y α -Esterasas en las tres especies estudiadas con 2.589 y 1.125 respectivamente (cuadro 4), siendo estos valores relativamente altos en comparación al tamaño de *Apis* y *Bombus*. Por otra parte el contenido de GST y Oxidasas son relativamente bajos en las tres especies polinizadoras, en particular las la Glutation S-transferasas y la cantidad de enzima individual presente en insectos susceptibles y resistentes han demostrado ser uno de los factores responsables de la resistencia a varios insecticidas (Paton *et al.*, 2000), sin embargo los niveles en los tres polinizadores son relativamente bajos y similares entre si.

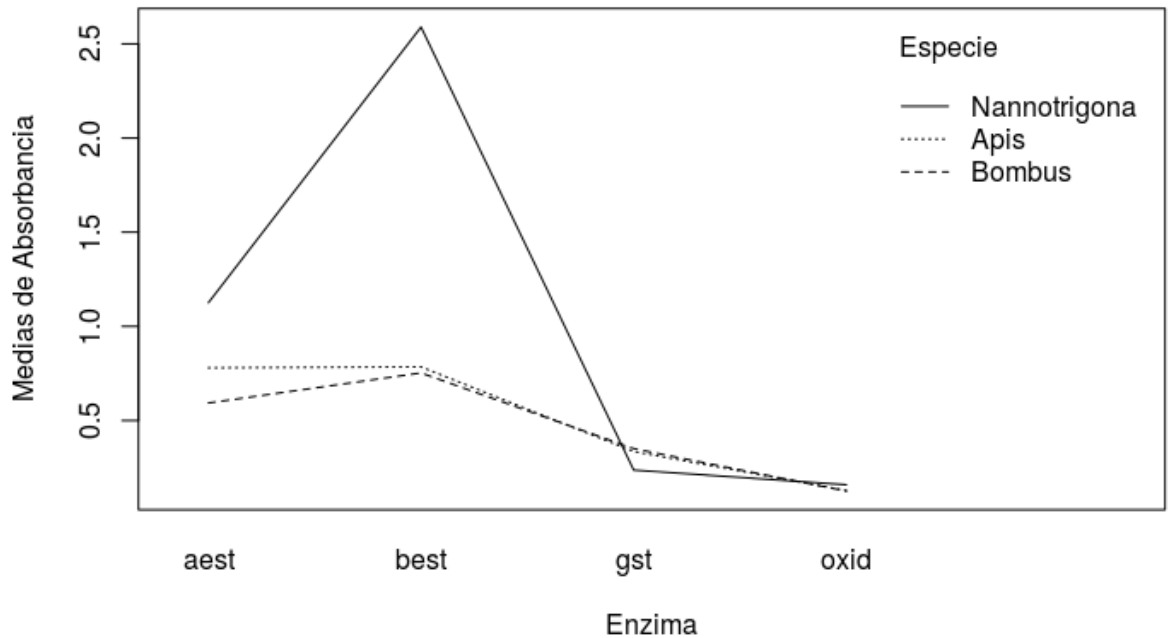
Cuadro 4. Medias de Absorbancias de la actividad enzimatica de *Nannotrigona perilampoides*

Enzima	Media \pm SD	Agrupación*
β -Esterasas	2.589 \pm 0.641	a
α -Esterasas	1.125 \pm 0.242	b
GST	0.237 \pm 0.046	c
Oxidasas	0.150 \pm 0.107	c

SD: desviación estandar, GST: Glutation S-Trasferasas, *: medias con diferente letra son estadísticamente significativas.

Las abejas sin aguijón pudieran ser una alternativa para la polinización en invernaderos por su capacidad de tolerar insecticidas debido a su elevada actividad enzimática, sin embargo debido a su menor tamaño la polinización se encuentra reducida afectando así los parámetros agronómicos de los frutos (Cerna *et al.* , 2015).

Figura 1. Comparación de las medias de absorbancia en cada enzima por especie.



En la figura 1, se presenta el gráfico de interacción entre especies y enzimas, las β -Esterasas en las tres especies fueron las de mayor media registrada, seguido de las α -Esterasas, donde *Nannotrigona* es la especie con las absorbancias mas altas para estas dos enzimas, solo en GST, donde sus registros son menores a *Apis* y *Bombus*, por ultimo, respecto a las Oxidasas, la actividad enzimática se encuentra en niveles similares.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados podemos concluir lo siguiente:

las β -Esterasas son las enzimas en mayor proporción en los tres insectos polinizadores, *Nannotrigona perilampoides* es la especie con mayor registro de estas enzimas.

En *Apis mellifera* las α y β -Esterasas se encuentran en la misma proporción.

La actividad enzimática mediada por Glutathion S-Tranferasas y Oxidasas de función múltiple se presentaron en proporciones bajas en cada especie polinizadora.

LITERATURA CITADA

Brogdon, W. G. and Dickinson, C. M. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography aluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.

Burgett, M. D. y Titavan, M. (1993) brood thermoregulation by the giant honey bee (*apis dorsata*) *nat. Hist. Bull. Siam. Soc.* 41:93-98, keywords: brood/dorsata/thermoregulation.

Cerna-Chávez E., Lara-Sánchez, D., Ochoa-Fuentes, Y., Hernández-Bautista, O., Aguirre-Urbe, L., Landeros-Flores, J. y Flores-Canales, R. Comparación de cuatro especies entomófilas sobre parámetros agronómicos del fruto de tomate de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Es p . N ú m.* 11 16 de mayo - 29 de junio, 2015 p. 2241-2246.

Coronado E. 1997. Historia de la apicultura en México (segunda parte). *Apitec.* (2): 4-6

Ehrenderfer, E. 1986. sinopsis del reino vegetal. in: strasburger, e. tratado de botánica. 7ª ed. barcelona. marín. 1098 p

Flores E. A.; Grajales, J. S.; Fernandez, I. S.; Ponce, G. G.; Loaiza, M. H. B.; Lozano, S.; Brogdon, W. G.; Black IV, W. C. and Beaty, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Souther Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 672-677.

Frankel, R. y Galum, C. 1977. Pollination mechanims reproduction and plant breeding. New York. Springer – verlag. 281 p.

Free, j. 1993. insect pollination of crops. 2nd ed. london. academic press. 684 p.

- Geisenberg, C. and Stewart, k. 1986. Field crop management. in: atherton, j.g. and rudich, j.g. and rudich, j (eds.),pp 511-557. the tomato crop. chapman y hall, london, uk.
- González, R. 2007. Polinización con abejas en invernaderos, www.noticiasapicolas.com/invernadero.htm.
- Hoopingarner, R. y Waller, G. 1993. Crop pollination. in: graham, j. e. (ed.) the hive and honeybee. michigan. u:s:a: brokgrafters. pp:1043-1082.
- Hernandez. B. O. 2011. Determinación de Enzimas de Resistencia en Poblaciones de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (HEMIPTERA: TRIOZIDAE) Procedentes de la Zona Papera de Coahuila y Nuevo León. Tesis de Licenciatura. UAAAN. 2011. 65 p.
- Infoagro, 2005. aspectos técnicos de la polinización con abejorros, www.infoagro.com/agricultura_ecologica/polinizacion_abejorros.asp
- Mata Espinoza, José, abejorros polinizadores, director de agricultura y sanidad, (agosto 2009).<http://www.sedarh.gob.mx/elcenzontle/a04n02ago09/abejorros.pdf>.
- Mc Gregor, S. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. Agriculture. agricultural research service. Washington. D. C. (USA). Department of Agriculture. handbook nº 496. 411 p.
- Paton, M. G.; Karunaratne, S. H. P. P.; Giakoumaki, E.; Roberts, N. and Hemingway, J. 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide resistant *Culex* mosquitoes. Biochem J. 346:17-24.

- Persano A., 2002. apicultura práctica, edit. agt editor. s.a. progreso no. 202- colonia escandón c.p. 11800 méxico d.f., 5 ta. reimpresión, págs.: 131, 142, 143, 144, 151, 152, 154, 156, 157, 167, 168, 170, 172.
- Pesante A. 2003. anatomía de la abeja. notas de las conferencias capítulo 3, anatomía universidad de puerto rico, recinto universitario de mayagüez
- Pisté, M. 2011. Caracterización y termorregulación del nido de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* alojado en cavidades artificiales. tesis de maestría en ciencias. colegio de postgraduados campus campeche. 65 p.
- Ponce, G. G.; Badii, M.; Mercado, R. y Flores, A. E. 2009. Esterases in *Aedes albopictus* (Skuse) from Northeastern Mexico. Soutwestern entomologist. Vol: 34 (4): 477-484.
- Quezada-Euán, J. 2009. Potencial de las abejas nativas en la polinización de cultivos. Acta biol. Colomb., Volumen 14, Número 2, p. 169-172, 2009. ISSN electrónico 1900-1649. ISSN impreso 0120-548X
- Rallo, J. 1986. Frutales y abejas. Madrid, Publicaciones de extensión agraria. 231 p.
- Razeto, B. 1986. Polinización y cuaja de frutos. revista del campo. el mercurio. Santiago (chile) 21: 26-31.
- Razeto, B. 1999. para entender la fruticultura. santiago, universidad de chile. 373p
- Robbins, W., Weier, t. y Stocking, C. 1958. Botany. an introduction to plant science. 2nd. ed. new york. wiley. 578 p.

- Root, A. 1976. ABC y XYZ de la apicultura. Enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas. 15a. ed. Buenos Aires, argentina, hachette. 670p.
- SAGARPA, 2008. manual de patología apícola. [en línea]. coordinación general de ganadería. programa nacional para el control de la abeja africana. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/publicaciones/lists/manuales%20apcolas/attachments/3/manbasic.pdf> [consulta: 23 noviembre 2013].
- Schopflocher, R. 1996, Apicultura lucrativa. (10º edición). ed. albatros. buenos aires, republica argentina. p. 9-12, 182-183.
- Sommeijer, M.J. 1994. Pollen foraging strategies of two domesticated stingless bee species in costa rica. en proceedings of the fifth international conference in Apiculture in tropical climates, Trinidad and Tobago, 7-12. September 1992. cardiff, uk; ibra (1994)214-220.
- Strasburger, E, Noll, F, Schenk, H.. y Schimper, A. 1994. Tratado de botánica. 8ª ed. Barcelona. Omega. 1068 p.
- Waldschmidt, A. M., Fernandez, M., Goncalves E., Campos, A. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* [online]. 1997, vol.20, n.3, pp.-. ISSN 0100-8455. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84551997000300011>.
- Westwood, M. 1982. Fruticultura de las zonas templadas. Madrid. España. Mundiprensa. 461 p.
- Wondji, C.S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N.F. y Collins, F. H. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res.* 19:452-459

