

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA  
SEDE MEDELLÍN

**Microorganismos cultivables asociados a los  
estadios y edades de *Trigona (Tetragonisca)*  
*angustula* Latreille (Hymenoptera: Meliponini)**

**Miller Aly Vallejo Ortiz**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019



# **Microorganismos cultivables asociados a los estadios y edades de *Trigona (Tetragonisca) angustula* Latreille (Hymenoptera: Meliponini)**

**Miller Aly Vallejo Ortiz**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Entomología

Director:

**Ph.D. Allan H. Smith Pardo**

Codirectora:

**D. Sc. Adriana Ortiz Reyes**

Línea de Investigación:

Ecología de las interacciones

Grupo de Investigación:

Sustancias activas y Biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019



(Dedicatoria)

*“Lo importante es no dejar nunca de hacer preguntas.*

*No perder jamás la bendita curiosidad”*

***Abert Einstein***



## Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido a la etapa de desarrollo y conclusión del siguiente trabajo. En primer lugar, quiero agradecerle infinitamente a Dios, por haberme dado la fortaleza para continuar luchando por este sueño.

A mis padres, Amparo Ortiz y Miller Vallejo, por ser siempre mi motivación, por estar en todos los momentos buenos y no tan buenos de la vida; gracias por ser ese apoyo incondicional y por confiar en mí. A mi hermana Mónica y toda su familia, gracias por darnos siempre tantas alegrías.

Agradecer siempre a la familia que ha estado presente brindándome su apoyo y su atención. A mi tía Olga y Alberto Ortega su esposo, gracias por estar pendientes de mí durante todo mi proceso. A mis tías Gladis y Ayda por todo el cariño. Siempre estaré inmensamente agradecido con mi abuela, mi mamá Eva, a quien le debo mucho de lo que soy ahora, a ella todo el cariño, el respeto y el amor.

A mis primos Jairo, Angie, Iván Darío, Luz Marina, Juancho, Miguel, David Mauricio (q.e.p.d), Ángela, Mauricio Cerón, y a toda mi familia, gracias por el apoyo y el cariño a pesar de la distancia.

A Eliana gracias por su incondicionalidad, por estar siempre conmigo en todos los momentos. Por convertirse en el apoyo que siempre necesite para seguir adelante. Y sobre todo por su amor y su paciencia.

A mis amigos de toda la vida, David y Jacobo, gracias por tantos años de amistad y sobre todo por el apoyo con el que siempre contaré.

A María Fernanda, Camila, Karen, Miguel, Diana y Lilibeth, por la amistad y el apoyo durante toda la maestría y por brindarme todas sus enseñanzas.

Quiero agradecer de manera muy afectuosa a mi director Allan Smith, por su esfuerzo, conocimiento y orientación durante el desarrollo del trabajo. De igual manera a la profesora Adriana Ortiz, por su paciencia y su tiempo en la realización de la tesis.

Al grupo de investigación SaBio, de manera muy especial a Leidy, Manuel, Gisel por todo el apoyo en el laboratorio.

Al profesor Guillermo Correa, por su importante ayuda en la parte estadística del trabajo, por su esfuerzo y su dedicación, mil gracias.

A los profesores Daniel Barragán, Sandra Uribe, Gonzalo y Magally, por generar espacios académicos muy importantes y de gran ayuda para la culminación de la maestría.

A Juan Manuel Rosso gracias por su importante conocimiento y colaboración durante este estudio.

A Pablo Ochoa, por su ayuda durante el diseño de la colmena de observación.

A los compañeros del Laboratorio de Fabricación (FABLAB) de la Universidad, por su importante ayuda en la construcción de la colmena de observación.

A la Hacienda Agroecológica El Paraíso, por prestar los medios que permitieron facilitar el desarrollo del trabajo.

A todos y cada uno de ustedes, simplemente gracias.



## Resumen

La presencia de microorganismos intestinales simbiotes en sus hospederos es fundamental, porque facilitan la adquisición de nutrientes a huéspedes con dietas deficientes y porque afectan la diversidad fenotípica entre individuos. Sin embargo, a pesar de conocerse la complejidad de dichas interacciones y fisiología de sus huéspedes, el papel de los microorganismos en el comportamiento de insectos sociales es poco conocido. Algunos autores sugieren que las variaciones presentes entre los individuos de una misma colonia de abejas y que pertenecen a castas diferentes, pueden también estar influenciadas por la composición de la comunidad de microorganismos intestinales.

Este estudio pretendía identificar los microorganismos cultivables asociados a diferentes estados de desarrollo y edades de *Trigona (Tetragonisca) angustula*. Por medio de técnicas de observación se estableció la división de castas dentro de la especie, y de cada una de ellas se aislaron e identificaron microorganismos intestinales cultivables utilizando métodos independientes de cultivo y técnicas moleculares. Se encontró que las comunidades microbianas intestinales entre los estadios de desarrollo y edades dentro de obreras difieren tanto en composición como en estructura, pues bacterias comunes en adultos estaban ausentes en las larvas. Así mismo, se observó que la diversidad de microorganismos intestinales cultivables de *T. (T.) angustula* está dominada por géneros de bacterias como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* y *Leuconostoc*. Estos resultados pueden ser la base para trabajos posteriores cuyo objetivo sea comprender interacciones entre los microorganismos intestinales y su papel en los procesos nutricionales y la influencia que estos pueden tener en el comportamiento social de sus hospederos.

**Palabras clave:** Angelitas, abejas sociales, comportamiento, tracto intestinal, bacterias.

## **Abstract**

### **Cultivable microorganisms associated with the stages and ages of *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula* Latreille (Hymenoptera: Meliponini)**

The presence of symbiont intestinal microorganisms in their hosts is fundamental, because they facilitate the acquisition of nutrients to hosts with poor diets and because they affect phenotypic diversity among individuals. However, despite knowing the complexity of these interactions and physiology of their hosts, the role of microorganisms in the behavior of social insects is little known. Some authors suggest that the variations present among individuals of the same bee colony and that belong to different castes, may also be influenced by the composition of the intestinal microorganism community.

This study aimed to identify the cultivable microorganisms associated with different stages of development and ages of *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula*. Using observation techniques, the division of castes into the species was established, and from each of them, cultivable intestinal microorganisms were isolated and identified using independent culture methods and molecular techniques. It was found that the intestinal microbial communities between the stages of development and ages within workers differ in composition as well as in structure, since common bacteria in adults were absent in the larvae. Likewise, it was observed that the diversity of cultivable intestinal microorganisms of *T. (T.) angustula* is dominated by genera of bacteria such as *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* and *Leuconostoc*. These results may be the basis for further work whose objective is to understand interactions between intestinal microorganisms and their role in nutritional processes and the influence they can have on the social behavior of their hosts.

**Key words:** Angelitas, social bees, behavior, intestinal tract, bacteria.

## Tabla de Contenido

<b>1. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
1.1    Objetivos.....	18
1.1.1    General.....	18
1.1.2    Específicos.....	18
<b>2. ESTADOS DEL ARTE .....</b>	<b>19</b>
2.1    Niveles de comportamiento social en abejas.....	19
2.2    Evolución del comportamiento social en abejas corbiculadas (Apidae: Apinae: Apini, Bombini, Euglossini y Meliponini).....	22
2.3    Diferenciación de castas en abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini).....	23
2.4    Microorganismos asociados con abejas corbiculadas (Apidae: Apinae: Apini, Bombini, Euglossini y Meliponini).....	27
2.4.1    Microorganismos asociados con abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini).....	29
2.4.2    Microorganismos asociados con abejas del género <i>Trigona</i> sensu lato (Apidae: Meliponini).....	30
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1    Descripción del área de estudio.....	32
3.2    Colmena de observación.....	33
3.3    Marcaje de las abejas para las observaciones de comportamiento.....	34
3.4    Estudio del comportamiento de las diferentes castas de <i>Trigona</i> ( <i>Tetragonisca</i> ) <i>angustula</i> .....	35
Tomado de, (Carvalho-Zilse, 2005; Hammel et al., 2016; Lopera, & Briceño, 1989; Scheiner et al., 2013).....	37
3.5    Microorganismos asociados a las diferentes castas y edades de <i>Trigona</i> ( <i>Tetragonisca</i> ) <i>angustula</i> .....	38
3.5.1    Aislamiento de microorganismos intestinales de <i>Trigona</i> ( <i>Tetragonisca</i> ) <i>angustula</i> .....	39
Con el objetivo de evaluar la carga microbiana de las muestras, se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) de cada uno de los aislados bacterianos. Para obtener el valor final, se utilizó la siguiente fórmula:.....	40
UFC/ml = (no. de colonias/volumen inoculado) * Inverso del factor de dilución.....	40
3.6    Identificación bacteriana.....	40
3.7    Análisis de la información.....	41

---

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
4.1 Colmena de observación.....	42
4.2 Técnica de marcaje para <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> .....	47
4.3 Estudio de comportamiento de las castas de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> .....	48
4.4 Identificación bacteriana.....	54
4.5 Riqueza y abundancia de bacterias intestinales asociadas a diferentes edades y casta de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> .....	57

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ubicación espacial y satelital de Medellín y la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Google (s.f.). [Mapa de la Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín en Google maps].....	33
<b>Figura 2.</b> Dispositivo para el marcaje y marca de pintura en el mesonoto en la especie <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> .....	35
<b>Figura 3.</b> Adecuación del cuarto oscuro para que las observaciones del comportamiento al interior de la colmena de observación.....	36
<b>Figura 4.</b> Extracción del intestino de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> .....	39
<b>Figura 5.</b> Diseño digital de cada una de las piezas de la colmena de observación, utilizado para el corte de las piezas y su posterior construcción (diseño digital Pablo Ochoa). ....	43
<b>Figura 6.</b> Corte de las partes de la colmena de observación en el Laboratorio de Fabricación (FabLab) de la Universidad Nacional de Colombia sede – Medellín.....	44
<b>Figura 7.</b> Ensamblaje de la colmena de observación terminada, las partes de la colmena son desmontables permitiendo una buena inspección y manipulación del nido de las abejas .....	44
<b>Figura 8.</b> Colonia de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> establecida en la colmena de observación terminada. ....	45
<b>Figura 9.</b> Promedio de Temperatura y Humedad durante el tiempo que permaneció la colonia en la colmena de observación.....	46
<b>Figura 10.</b> Promedio de mortalidad causado por los tipos de pinturas en el estudio de comportamiento de las castas de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> .....	48
<b>Figura 11.</b> Tareas realizadas por <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> , la gráfica muestra la frecuencia de cada tarea realizada en el nido por las abejas según la edad. Se presentan 13 comportamientos. <b>almp</b> : almacenamiento en los potes, <b>afpc</b> : actividad fuera de los panales de cría, <b>tr</b> : trabajar en la pila de residuos, <b>cp</b> : construir potes <b>t</b> : trofalaxis <b>ep</b> : entrar	

---

en los potes, **dap**: depositar alimento en los potes, **rr**: remover residuos **idc**: inspección de celdas, **cc**: construir celdas, **c**: caminar, **ci**: construir involucro, **mr**: masticar resina. .... 51

**Figura 12.** Análisis de correspondencias de las actividades según las edades de *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula*. Se observan 5 grupos de edades muy bien definidos, de 2 a 9 días, de 10 a 13 días, de 14 a 22 días, de 23 a 31 días y de 33 a 35 días de edad. Los triángulos azules representan las actividades realizadas por las abejas y los puntos azules representan a cada grupo de edad encontrado. **almp**: almacenamiento en los potes, **afpc**: actividad fuera de los panales de cría, **tr**: trabajar en la pila de residuos, **cp**: construir potes **t**: trofalaxis **ep**: entrar en los potes, **dap**: depositar alimento en los potes, **rr**: remover residuos **idc**: inspección de celdas, **cc**: construir celdas, **c**: caminar, **ci**: construir involucro, **mr**: masticar resina. .... 53

**Figura 13.** Riqueza y abundancia de microorganismos asociados a los estadios de desarrollo y edades de obreras de *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula*. .... 62

**Figura 14.** Análisis de correspondencia entre las muestras que se aislaron en el laboratorio, correspondientes a los estadios (A) de *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula* y los morfotipos encontrados. .... 67

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Comportamientos generales de abejas obreras de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> en el nido. ....	37
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia de los comportamientos registrados durante las observaciones en la colmena de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> . <b>almp:</b> almacenamiento en los potes, <b>afpc:</b> actividad fuera de los panales de cría, <b>tr:</b> trabajar en la pila de residuos, <b>cp:</b> construir potes <b>t:</b> trofalaxis <b>ep:</b> entrar en los potes, <b>dap:</b> depositar alimento en los potes, <b>rr:</b> remover residuos <b>idc:</b> inspección de celdas, <b>cc:</b> construir celdas, <b>c:</b> caminar, <b>ci:</b> construir involucro, <b>mr:</b> masticar resina. ....	38
<b>Tabla 3.</b> Muestras (intestinos) aisladas en el laboratorio para los cultivos, con su respectivo código. ....	40
<b>Tabla 4.</b> Análisis de varianza entre los tipos de pintura utilizados en la técnica de marcaje de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> . ....	47
<b>Tabla 3.</b> Caracterización morfológica e identificación de las cepas bacterianas aisladas del tracto intestinal de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> . ....	57
<b>Tabla 4.</b> Características morfológicas de las bacterias aisladas de estadios de desarrollo y edades de obreras <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> . ....	59
<b>Tabla 6.</b> Riqueza y abundancia de morfotipos asociados a los estadios y edades de <i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i> . Int_Rei: Intestino Reina, Int_I0-2-9: Intestino obrera de 2 a 9 días, Int_10-13: Intestino obrera de 10 a 13 días, Int_14-22: Intestino obrera de 14 a 22 días, Int_23-31: Intestino obrera de 23 a 31 días, Int_for: Intestino forrajera, Int_gua: Intestino guardiana. ....	64

## INTRODUCCIÓN

La relación que existe entre los microorganismos intestinales simbiotes y sus huéspedes surgió como un proceso adaptativo y como una fuente de diversidad fenotípica entre individuos, de hecho, distintos microorganismos intestinales cumplen un papel importante en la adquisición de nutrientes a huéspedes con dietas deficientes (Kapheim et al., 2015; Moran, 2007). De igual manera las comunidades de microorganismos intestinales son el reflejo de las variaciones en el fenotipo y la fisiología de sus huéspedes (Chandler, Lang, Bhatnagar & Eisen, 2011; Santo Domingo et al., 1998).

Aunque la relación entre los microorganismos intestinales simbiotes y sus hospederos es aún tema de estudio; los insectos han sido modelos que han permitido conocer y comprender este tipo de relaciones entre otras razones porque el metabolismo microbiano es importante para su nutrición, presentan un sistema de flujo continuo que se espera que responda rápidamente al cambio de sustrato, a menudo su biomasa es densa y fácilmente recuperable y normalmente el estudio con insectos es relativamente económico y se adapta fácilmente a condiciones de laboratorio y tratamientos experimentales (Breznak & Brune, 1994; Santo Domingo et al., 1998).

Los microorganismos presentes en el intestino de las abejas han recibido considerable atención debido a las innumerables funciones y beneficios que aportan a sus hospederos. Diversos estudios han reportado la existencia de una microbiota distintiva que probablemente contribuye a la nutrición, la defensa contra enemigos naturales y la adquisición de nutrientes (Dillon & Dillon, 2004; Moran & Baumann, 1994). Sumado a esto, las interacciones físicas en este grupo de insectos sociales, brindan oportunidades óptimas para la transferencia de los microorganismos en toda la colonia (Engel & Moran, 2013), permitiendo que se mantenga una uniformidad microbiana con pocas variaciones entre cada miembro la misma colonia (Martinson et al., 2010). De igual manera, la microbiota presenta similitudes notables en obreras de diferentes edades (nodrizas y recolectoras)



(Martinson, Moy & Moran, 2012). En *Apis mellifera* (Apinae: Apini) por ejemplo, se ha logrado identificar que el intestino hospeda una comunidad bacteriana particular y se caracteriza por la presencia de géneros como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Carina Audisio, Torres, Sabaté, Iburguren & Apella, 2011). En abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) se han adelantado estudios en los nidos de las abejas del género *Trigona* en donde se ha reportado una alta diversidad de microorganismos asociados a la cutícula de las abejas, las reservas alimenticias y su entorno (Menezes, Vollet-Neto, Contrera, Venturieri & Imperatriz-Fonseca, 2013; Teixeira et al., 2003). En *Trigona (Tetragonisca) angustula*, Rosa et al. (2003) reportan la existencia de cepas de levaduras como *Starmerella meliponinorum* en polen, miel y propóleo de esta especie. Estos autores señalan que la presencia de esta levadura en el intestino y en los recursos alimenticios de *T. (T.) angustula* podría jugar un papel importante en la nutrición de estas abejas. Sin embargo, según Menezes et al., (2013) la biología y el papel de los microorganismos asociados con abejas diferentes a las melíferas son poco conocidos.

En este trabajo se estudió la relación entre el comportamiento social de abejas angelitas *T. (T.) angustula*, una de las especies más comunes de abejas sin aguijón en Colombia y el papel que cumplen los microorganismos intestinales presentes en las diferentes castas y edades dentro de sus colonias. Para esto, se estudió el comportamiento de los diferentes grupos etarios de abejas en una colonia de *T. (T.) angustula* y se buscó determinar si existen diferencias entre los microorganismos intestinales y las diferentes castas y edades en una misma colonia de estas abejas.

## 1. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

### 1.1 Objetivos

#### 1.1.1 General

- Identificar la diversidad de microorganismos cultivables asociados a los diferentes estadios de desarrollo, y edades de obreras de *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Hymenoptera: Apidae – Meliponini).

#### 1.1.2 Específicos

- Establecer la diversidad de bacterias cultivables asociadas a los diferentes estadios (inmaduros, pupa y adultos) de *T. (T.) angustula*.
- Establecer la diversidad de bacterias cultivables asociadas a las castas (obreras y reina) de *T. (T.) angustula*.
- Establecer la diversidad de bacterias cultivables asociadas a diferentes edades de obreras adultas de *T. (T.) angustula*.
- Establecer si las bacterias cultivables aisladas del tracto digestivo de diferentes estadios de desarrollo y edades de obreras *T. (T.) angustula* están relacionadas con el comportamiento observado en obreras al interior de la colonia.

## 2. ESTADOS DEL ARTE

### **2.1 Niveles de comportamiento social en abejas**

La superfamilia Apoidea es un grupo monofilético (Ascher & Pickering, 2016), en el cual se encuentran agrupado individuos que exhiben diferentes grados de sociabilidad durante la ontogenia, incluyendo desde especies solitarias hasta eusociales (Kocher & Paxton, 2014; Rodríguez-Serrano, Inostroza-Michael, Avaria-Llautureo & Hernandez, 2012). En diferentes aspectos difieren las abejas solitarias de las eusociales y semisociales, por ejemplo el tipo de nidificación, la alimentación y el tipo de forrajeo, la defensa contra depredadores y la ubicación de la pareja (Flores-Prado, Chiappa & Mante, 2012; Amaya-Márquez & Wells, 2008). Es por esto, que individuos con comportamiento social tienen capacidades cognitivas más desarrolladas que las especies solitarias (Kamil, 2004). Básicamente, las abejas solitarias son el subgrupo más grande de abejas silvestres con alrededor de 14,000 especies en todo el mundo (Neff, 2008), se caracterizan por construir su propio nido sin la presencia de otras hembras, ovipositan, lo aprovisionan y cada individuo se desarrolla dentro de celdas aislado de sus hermanos y de su madre (Flores-Prado et al., 2012). Además, se alimentan solas y, por lo tanto, tienen un conocimiento limitado de las ubicaciones de los recursos y su calidad (Everaars & Dormann, 2014). Un ejemplo de este tipo de sociabilidad lo constituyen las especies de la familia Xylocopinae (Dukas & Real, 1991). Sin embargo, el comportamiento social varía tanto dentro como entre las especies, y el grupo *Exoneura* de alodapinas incluye ejemplos de especies solitarias, predominantemente semisociales y eusociales, y sistemas complejos con morfología (Cronin, 2001).

En las abejas se han reportado comportamientos intermedios como subsocial, comunal y semisocial. La subsocialidad es la forma más simple de comportamiento social y se define como el cuidado prolongado de los padres y la interacción entre padres e hijos (Rehan & Richards, 2010). Este grupo de abejas, se caracterizan por la lealtad a los nidos, la

longevidad de los adultos y la convivencia prolongada (Rehan, Glastad, Lawson & Hunt, 2016). La especie *Ceratina calcarata* Robertson, 1900, exhibe este tipo de comportamiento donde las madres son longevas (12–16 meses) y brindan cuidados maternos prolongados a las crías adultas, no solo forrajeando y alimentándose, sino también cuidando y acicalando a las crías durante el desarrollo (Rehan, Berens & Toth, 2014). Cabe destacar que hay factores como la estación del año, que son claves durante ciclo de vida de esta especie y pueden incidir en el paso de una vida solitaria a una subsocial o eusocial. Por ejemplo, la madre forrajea y se reproduce solitariamente durante la mayor parte de su ciclo de vida, pero tienen una fase subsocial con cuidado materno prolongado y convivencia de madres e hijos a fines del verano a través de la hibernación (Rehan & Richards, 2010; Rehan & Richards, 2013; Rehan, Berens & Toth, 2014).

El comportamiento comunal en abejas, es visto como una forma menos compleja de organización social, en algunos casos ha sido considerado como un "escalón" evolutivo hacia formas más complejas de socialidad que involucran castas, así como una forma social derivada del comportamiento solitario sin una evolución adicional hacia la eusocialidad (da Silva, Stevens & Schwarz, 2015). La comunalidad, se da cuando dos o más hembras de la misma generación comparten un nido común pero en las que no hay una superposición de generaciones ni una división reproductiva del trabajo (Keller, 2003; Michener, 1974; Paxton, Kukuk & Tengö, 1999). En estas especies, es frecuente el contacto entre las hembras adultas que construyen y aprovisionan sus nidos, pues en el sistema de nidificación existen accesos comunes que luego se diferencian en galerías o celdas particulares de cada hembra (Flores-Prado, 2012). El comportamiento comunal se ha reportado en una amplia variedad de clados como Halictidae (Halictinae, Rophitinae y Nominae), Andrenidae (*Andrena Jacobi*) y Apidae (Apinae: Euglossini) (da Silva et al., 2015).

La semisocialidad en abejas, ocurre cuando dos o más hembras de la misma generación comparten el nido y además existe división de trabajo reproductivo y cooperación en el aprovisionamiento (Flores-Prado, 2012). En este tipo de comportamiento, una hembra potencialmente reproductiva renuncia a su propia reproducción a favor de la de una hembra dominante (Stark, Hefetz, Gerling & Velthuis, 1990). Las hembras subordinadas suministran y ovipositan las células, mientras que la hembra dominante actúa como una guardia, rara vez deja el nido y los ovipositos en las células aprovisionadas y ovipositadas por las hembras subordinadas (Augusto & Garofalo, 2009). Dentro de las abejas

corbiculadas, solo las abejas orquídeas (*Euglossini*) exhiben varios niveles de sociabilidad, incluyendo comunales, semisociales y primitivamente sociales, además de las especies solitarias (Carvalho-Filho & De Oliveira, 2017). Se han documentado asociaciones semisociales en varias especies, como *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) y *Euglossa atrovirens* Dressler, 1978, las cuales pueden presentar pequeñas colonias con organización semi-social (Augusto & Garofalo, 2009).

La eusocialidad es posiblemente la forma más derivada de comportamiento social, Danforth (2007), sostiene solo el 6% de las abejas son eusociales con división de la labor reproductiva, la superposición de generaciones, el cuidado cooperativo de las crías y la presencia de una casta de trabajadores estériles, estos parámetros son considerados como una de las principales transiciones en la evolución de la eusocialidad. Se pueden diferenciar dos categorías de eusocialidad: la eusocialidad primitiva y la eusocialidad avanzada (Libbrecht & Keller, 2015). La primera es características de algunas especies de la tribu Bombini, donde reinas y trabajadores que difieren solo en tamaño, con nuevos nidos establecidos por una sola fundadora (Cardinal & Danforth, 2011). Mientras que la eusocialidad avanzada se observa en las tribus Apini y Meliponini, donde reinas y trabajadoras morfológicamente distintas con nuevos nidos fundados por enjambres (Michener, 1974; Kocher & Paxton, 2014). La eusocialidad está taxonómicamente extendida, y ha sido documentada en *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, las abejas obreras involucradas en la construcción del nido, mientras que otras se encargan exclusivamente de la alimentación de larvas jóvenes, el procesamiento de la miel o la protección de la entrada del nido cuando intrusos amenazan la entrada de la colmena, (Amdam et al., 2011; Page & Erber, 2002). A pesar de esto, las abejas sin aguijón (Meliponini) son el grupo más grande de abejas altamente eusociales con colonias perennes, una sola reina y aproximadamente 100.000 trabajadores (Michener, 2007). Dentro de este grupo, *Tetragonisca angustula* es una especie altamente eusociales que muestran un comportamiento complejo (Dohanik, Souza, Lisboa, Zanuncio & Serrão, 2016) y un sistema de defensa que involucra a dos grupos de guardias (Gruter, Menezes, Imperatriz-Fonseca & Ratnieks, 2012).

## **2.2 Evolución del comportamiento social en abejas corbiculadas (Apidae: Apinae: Apini, Bombini, Euglossini y Meliponini)**

Durante muchos años, la comprensión de los orígenes evolutivos de la eusocialidad ha sido un foco de la investigación evolutiva y etológica (Danforth, 2001), por lo cual numerosas hipótesis se han planteado para proporcionar información detallada sobre las etapas tempranas de la evolución eusocial y las transiciones evolutivas que ocurren en la transformación de la vida solitaria a la eusocialidad (Danforth, 2001; Kocher & Paxton, 2014). Según Cardinal & Danforth (2011), la eusocialidad ha surgido al menos ocho veces en insectos himenópteros, y cinco de esos orígenes se encuentran en las abejas. Este hallazgo concuerda con los de otros estudios, que indican que en las abejas se habrían producido cinco orígenes independientes de eusociabilidad en taxones que se diferenciaron en el Cretácico Tardío, o mucho más tarde en el Paleógeno (Almeida & Porto, 2014; Cardinal & Danforth, 2011; Gibbs, Brady, Kanda & Danforth, 2012), tres de ellos ocurrieron en la familia Halictidae y los restantes orígenes corresponden a los ocurridos en especies de la familia Apidae (Flores-Prado, 2012, Hughes, Oldroyd, Beekman & Ratnieks, 2008).

En la subfamilia Halictinae se ha descrito mejor la eusociabilidad, ya que se han producido múltiples orígenes de eusocialidad de forma independiente tanto comunales como eusociales, e incluso más numerosas reversiones a la existencia solitaria (Danforth, 2001; Gibbs, Brady, Kanda & Danforth, 2012); además algunas especies exhiben variaciones intraespecífica en el comportamiento social de varias abejas asociada con cambios en la altitud o latitud (Gibbs et al., 2012). La evolución del comportamiento eusocial avanzado ocurrió dos veces en los corbiculados y quizás en el Allodapini, donde al menos una especie muestra firmas de especialización de castas morfológicas (Kocher & Paxton, 2014). Según, Tierney, Smith, Chenoweth & Schwarz (2008), las abejas de la tribu Allodapini (Xylocopinae: Apidae) representan etapas tempranas en la evolución del comportamiento social, debido a que sus especies presentan niveles sociales variables y especies solitarias basales filogenéticamente (Michener 1969, 1974, 2007). Estas hipótesis se han vuelto más estables a lo largo de los, mientras que las relaciones entre las abejas

corbiculadas han permanecido en gran medida inciertas en base a investigaciones filogenéticas y discusiones publicadas desde la década de 1970 (Almeida & Porto, 2014).

Las abejas corbiculadas, comprende cuatro linajes que contienen especies o poblaciones que varían desde solitarias a eusociales, por ejemplo, los integrantes de la tribu Apini y Meliponini presentan un comportamiento altamente eusociales, mientras que la mayoría de los individuos de la tribu Bombini tienen un comportamiento “primitivamente” eusocial. Por el contrario, la tribu Euglossini no tienen taxones eusociales y las hembras son solitarias o comunitarias, dependiendo de la especie (Thompson & Oldroyd, 2004). Cardinal & Danforth (2011), realizaron reconstrucciones de estados ancestrales para dilucidar la historia evolutiva del comportamiento eusocial en abejas utilizando datos moleculares de Cardinal, Straka & Danforth (2010). Sus resultados demostraron que el estado ancestral de las abejas corbiculadas parece ser una eusocialidad primitiva, en donde las abejas sin aguijón y las abejas de miel desarrollaron de manera independiente un comportamiento eusocial avanzado, y se perdió en las abejas orquídeas. Por su parte, Peters et al. (2019) y Romiguier et al. (2015) encontraron un grupo monofilético de los tres linajes con un estilo de vida eusocial (Apini, Meliponini y Bombini), sugieren fuertemente un solo origen de eusocialidad en las abejas corbiculadas, sin reversión a la vida solitaria en este grupo. Por otro lado, los datos moleculares sugieren un origen dual para la evolución de un comportamiento altamente eusocial en las abejas corbiculadas (Thompson & Oldroyd, 2004).

### **2.3 Diferenciación de castas en abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini)**

Las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) son abejas altamente eusociales distribuidas en áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo y la mayoría de las especie se encuentran en la región neotropical (Michener, 2007). Nidifican en casi cualquier cavidad que encuentren disponible, desde agujeros en árboles, pisos o paredes, o incluso tumbas en los cementerios como la especie *T. (T.) angustula* (Parra, 1990). Son capaces de hacer nidos completamente subterráneos, hasta cuatro metros bajo tierra (*Geotrigona*) o completamente expuestos, pendientes de ramas de árboles (*Paratrigona*) o sobre paredes de edificaciones (*Partamona*) (Nates-Parra, 2001). Los nidos los construyen con una

mezcla de cera y resinas vegetales también llamada cerumen, y con batumen, que es un material duro compuesto por barro, resinas vegetales y eventualmente semillas.

Todas las especies de abejas sin aguijón tienen la característica de provisionar celdas de cría antes de la oviposición (Wille, 1983). De hecho para las abejas eusociales, el aprovisionamiento de alimento es un factor que determina no solo la supervivencia sino que también las estructuras sociales de la colonia, el tamaño, la diferenciación de las castas y la producción sexual. Por lo que para la mayoría de los géneros de abejas sin aguijón la cantidad de alimento es el único factor responsable en la diferenciación de las castas (Prato & Soares, 2013). En el género *Melipona* por ejemplo, las reinas emergen de celdas de cría que tienen el mismo tamaño que las celdas de cría de obreras y machos. Por lo tanto, la reina y las obreras presentan el mismo tamaño (Ratnieks, 2001). Mientras que en todos los demás géneros de abejas sin aguijón, excepto *Frieseomelitta* y *Leurotrigona*, las reinas se crían en celdas reales más grandes, y su tamaño es mayor que el de las obreras. Las celdas están provisionadas del mismo alimento, solo que en las celdas reales la cantidad es mayor (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). Aunque en el género *Melipona* el 25% de las hembras puede convertirse en reinas, en los demás géneros de abejas sin aguijón solo se convierten en reinas el 1 o 2% (Kerr, Stort & Montenegro, 1966).

La determinación de las castas en abejas sociales puede ser trofógena o trofogenética. Cuando la determinación es trofógena la reina y las obreras surgen de huevos genéticamente idénticos, las diferencias son causadas por la cantidad y/o calidad del alimento que consumen las larvas (Camargo, 1972). Mientras que en el mecanismo trofogenético los huevos destinados a hembras pueden diferir genéticamente, y las celdas de cría donde se mantienen los huevos son del mismo tamaño, pero las reinas surgen de larvas que reciben una mayor cantidad de alimento, mientras que las obreras surgen de larvas con pequeños suministros de alimento (Kerr et al., 1966). En las especies con el mecanismo trofogénico, como las abejas melíferas y las abejas sin aguijón las celdas de cría son más grandes (celdas reales) que las de las obreras. En las abejas melíferas, la determinación de las castas resulta de la cantidad y la calidad del alimento (Beetsma, 1979). En abejorros y en abejas sin aguijón (excepto *Melipona*) la determinación de las castas se debe a la cantidad de alimento, en ambos grupos de abejas, las dietas especifican las castas (Lisboa, Serrão, Cruz-Landim & Campos, 2005; Winston, Michener & Canada, 1977). Todas las abejas sin aguijón siguen una estrategia de aprovisionamiento



masivo en el cuidado de las crías, es decir, las celdas de cría construidas con una mezcla de cera y resina, se llenan con una cantidad determinada de alimento larval (Sakagami, Beig, Zucchi & Akahira, 1963). En varias especies hay obreras que ponen huevos en las celdas recién provistas de alimento (Klaus et al., 2006; Silva-Matos, Noll & Zucchi, 2000). Estos huevos son comidos por la reina. Posteriormente la reina pone un huevo reproductivo y la celda de cría es sellada inmediatamente. La secuencia de comportamientos como la construcción de la celda, el aprovisionamiento de alimento larval, la oviposición por parte de la reina y ocasionalmente por obreras, y el sellamiento de las celdas son específicas de las especies de abejas sin agujón (Klaus et al., 2006; Sakagami & Zucchi, 1974). Por otro lado, en este grupo de abejas no existe evidencia de danzas ejecutadas por pecoreadoras, como ocurre en *Apis*, su comunicación es por las glándulas hormonales ubicadas en las patas (Baquero & Stamatti, 2007).

En los nidos de las abejas sin agujón se encuentran tres tipos de individuos o castas: la reina, obreras los machos, cada uno tiene diferente anatomía y cumplen funciones diferentes. La estratificación social de las abejas sin agujón consiste en una reina, que es la abeja reproductiva de la colonia con una marcada diferencia morfológica, su tamaño es mayor al de las demás abejas de la colonia y su función principal es producir más individuos tanto hembras como machos, de igual manera otras reinas (Kwapong, Aidoo, Combey & Karikari, 2010). Todas las reinas de meliponinos se aparean con un solo macho es decir que son monoándricas, de esta forma las obreras son hermanas y no existen subfamilias (Nogueira-neto, 1997; Wille, 1983). La reina es la madre de todos los miembros de la colonia y controla la organización y las actividades diarias del nido (Kwapong et al., 2010). Su función principal es la postura de huevos fértiles que darán origen a las castas siguientes, de ese modo mantienen vivas las colonias (Nogueira-neto, 1997). Tienen el abdomen muy desarrollado puesto que la postura de huevos es muy intensa, esto permite que puedan ser identificadas a simple vista, generalmente se ubican en el área de cría del nido. Todas las reinas de las especie se desarrollan en celdas reales, mucho más grandes que las demás celdas. Algunas reinas vírgenes pueden sustituir a la reina de la colonia en caso de muerte de la reina actual, o enjambra para formar un nuevo nido (Wille, 1983).

Las obreras miden aproximadamente 4 mm de longitud, tienen el abdomen amarillo y el tórax negro, las patas posteriores poseen tibias con corbícula para la recolecta del polen (Veen & Sommeijer, 2000). Viven en promedio entre 30 y 40 días (Nates-parra, Lopera & Briceño, 1989). Durante la vida adulta realizan diversas funciones dentro de la colmena

siguiendo el siguiente orden de funciones: nodrizas, constructoras, guardianas y pecoreadoras (Morales, Botero & García, 1999). El porcentaje mayor de individuos en colmena lo constituyen las obreras quienes se encargan básicamente de las labores de construcción, alimentación de reina y larvas defensa y acopio de los recursos producidos (Nogueira-neto, 1997). Inicialmente realizan tareas de enfermería antes de dirigir su atención a deberes generales del hogar, luego realizan las tareas externas de vigilancia y alimentación (Hammel et al., 2016). Los machos son muy importantes en la parte reproductiva de la colonia. Se desarrollan a partir de huevos no fertilizados. Las larvas se alimentan con el mismo alimento larval que consumen las obreras (Kwapong et al., 2010).

A pesar de esto, la división del trabajo no está bien estudiada en Meliponini, en solo algunas especies como *T. (T.) angustula* se ha logrado observar la diferenciación de castas. Esta especie se caracteriza por presentar un amplio rango de distribución, que va desde México hasta Argentina, se adapta muy bien a ambientes naturales, urbanos y deforestados. En Colombia se han registrado principalmente en los departamentos de Amazonas, Antioquia, Boyacá, Caldas y Cundinamarca (Martínez, 2015; Nates-parra et al., 1989). Sin embargo, se encuentran en un proceso acelerado de desaparición provocado principalmente por la destrucción masiva de bosques y hábitats naturales lo que conlleva de igual manera a un desequilibrio en el ecosistema (Silva & Paz, 2012). Como se mencionó anteriormente, esta especie tiene un comportamiento eusocial con colonias de cientos de individuos, guiadas por una reina y con un sistema de castas bien diferenciado, así como la división del trabajo dentro de las obreras (Nates-parra et al., 1989; Wille, 1983). Las actividades principales desarrolladas por los trabajadores de *T. (T.) angustula* en la colonia abarca la siguiente sucesión: cerumen dentro y fuera del panal de cría, limpieza de la colonia (manipulación de desechos y eliminación de desechos), corte que rodea a la reina durante el período de interoviposición, visitas a los potes de almacenamiento, aseo, manipulación de resinas, trofallaxis y forrajeo (Grosso & Bego, 2002).

## **2.4 Microorganismos asociados con abejas corbiculadas (Apidae: Apinae: Apini, Bombini, Euglossini y Meliponini)**

Las abejas corbiculadas visitan diferentes ambientes por lo cual pueden adquirir una amplia comunidad de microorganismos que probablemente contribuyen con la nutrición, la defensa contra enemigos naturales y la adquisición de nutrientes (Dillon & Dillon, 2004; Moran & Baumann, 1994). Diversas investigaciones han demostrado que existen comunidades especializadas de bacterias que residen en el intestino de este grupo de abejas (Babendreier, Joller, Romeis, Bigler & Widmer, 2007; Cox-Foster et al., 2007; Martinson et al., 2010; Mohr & Tebbe, 2006; Olofsson & Vásquez, 2008). Por ejemplo, se ha indicado que el intestino de *A. mellifera* (Apinae: Apini) hospeda una comunidad bacteriana particular y se caracteriza por la presencia de géneros como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Carina Audisio et al., 2011). Otros estudios en cambio incluyen que especies como *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* y *Frischella perrara* hacen parte de la comunidad microbiana de esta especie de abeja (Powell, Martinson, Urban-Mead & Moran, 2014). Ahn et al. (2012) determinaron las comunidades bacterianas en el intestino de *A. mellifera* y *Apis cerana* Fabricius, 1793, mediante la secuenciación de sus genes 16S rRNA; Este estudio evidenció que el intestino de estas especies estaba representado principalmente por bacterias facultativamente aeróbicas como *Lactococcus*, *Bartonella*, *Spiroplasma*, Enterobacteriaceae y Flavobacteriaceae en el caso de *A. cerana*, mientras que para *A. mellifera* fueron frecuentes especies pertenecientes a Lachnospiraceae y *Bifidobacterium*. También se demostró que la diversidad bacteriana puede variar dependiendo de la etapa de desarrollo en que se encuentre la abeja. En 2017, Khan y colaboradores reportaron que *A. mellifera jemenitica*, pueden albergar en su tracto digestivo bacterias pertenecientes a los filotipos Actinobacteria, Firmicutes y Gammaproteobacteria, consideradas como habitantes intestinales beneficiosos. Por otro lado, Engel, Martinson & Moran (2012) y vanEngelsdorp et al. (2009) sugieren que dicha microbiota presente en las abejas cuenta con genes que pueden contribuir con la defensa de patógenos, la desintoxicación de contaminantes ambientales y la digestión de las paredes celulares del polen. Estudios previos han indicado que especies de la tribu Bombini exhiben una microbiota intestinal

característica que en algunos casos es similar a la reportada para las especies de la tribu Apini, tales como Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Lactobacillales; las cuales podrían estar participando en la defensa contra patógenos (Martinson et al., 2010; Koch, Cisarovsky & Schmid-Hempel, 2012). Lim, Chu, Seufferheld y Cameron (2015) identificaron que la microbiota intestinal de *Bombus atratus* Franklin, 1913, *Bombus bohemicus* Seidl, 1837, *Bombus convexus* Wang, 1979, *Bombus fraternus* (Smith, 1854), *Bombus impatiens* Cresson, 1863, *Bombus pensylvanicus* (De Geer, 1773), *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), *Bombus terricola* Kirby, 1837 y *Bombus ussurensis* Radoszkowski, 1877 estaba conformada por especies de *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacillales*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria* y *Gammaproteobacteria*, las cuales estarían desempeñando importantes efectos en la salud individual y roles en la defensa contra enemigos naturales. De igual forma, se demostró la presencia de las familias Neisseriaceae, Orbaceae, Lactobacillaceae y Bifidobacteriaceae en el estómago de *B. terrestris* cuando los nidos fueron mantenidos en condiciones de laboratorio, mientras que cuando los nidos fueron sometidos a condiciones naturales se observó la predominancia de la familia Enterobacteriaceae (Parmentier, Meeus, Mosallanejad, de Graaf & Smagge, 2015).

En el tracto gastrointestinal de abejas se ha reportado la presencia de múltiples bacterias de tipo ácido láctico, las cuales muestran un efecto beneficioso sobre la sanidad de las abejas (Killer, Dubna, Sedlacek & Svec, 2013) y contribuyen a la fermentación del polen dentro de los nidos (Vásquez & Olofsson, 2009). Diversos estudios han indicado que la microbiota asociadas a la abeja destacan a *Lactobacillus kunkeei* como el miembro dominante de LAB. En *A. mellifera* se han reportado siete especies de *Lactobacillus* aisladas del tracto gastrointestinal, tales como *Lactobacillus apinorum*, *Lactobacillus mellifer*, *Lactobacillus mellis*, *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus helsingborgensis* y *Lactobacillus kullabergensis* (Olofsson, Alsterfjord, Nilson, Butler & Vásquez, 2014). Así mismo, un estudio realizado por Olofsson y Vásquez (2009) se demostró que en *Bombus* spp. fue observada la presencia de una sola especie de *Lactobacillus*.

## 2.4.1 Microorganismos asociados con abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini)

Los microorganismos presentes en colmenas de abejas han recibido considerable atención, estudios previos han reportado la existencia de una microbiota distintiva asociada a las abejas de la tribu Meliponini. Varias especies de levaduras están asociadas con abejas sin aguijón, por ejemplo, Rosa et al. (2003) demostraron que existe una relación entre *Starmerella meliponinorum* con *T. angustula* y *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836), mientras que *Candida apicola* fue abundante en adultos de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836. Del mismo modo, otras investigaciones han identificado la presencia de hongos productores de compuestos que pertenecen a la familia biosintética de la geodina (*Monascus flavipigmentosus*, *Monascus mellicola*, *Monascus recifensis* y *Monascus ruber*) en la miel, el polen y el interior del nido de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Barbosa et al., 2017). Menezes et al. (2015) sugirió que el hongo *Monascus* sp., que crece dentro de las células de cría de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, podría ser importante para la salud larvaria.

Las abejas sin aguijón también pueden formar interesantes asociaciones con bacterias, como muestra el trabajo de Gilliam, Roubik y Lorenz (1990), quienes aislaron diferente especies de *Bacillus* del polen, la miel y las provisiones de la cría de *Melipona fasciata* Latreille, 1811, especies como *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* y *Bacillus alvei* predominaron en estas muestras. En la investigación de Vásquez et al. (2012), *Lactobacillus kunkeei* fue identificada en muestras de miel de *Melipona beecheii* Bennett, 1831 y *Meliponula bocandei* (Spinola, 1853), posiblemente esta bacteria puede estar contribuyendo en la sanidad de la colmena ya que es capaz de producir antibióticos que inhiben el crecimiento de patógenos. Otro trabajo relacionado fue el de Leonhardt y Kaltenpoth (2014), quienes describieron la relación simbiótica entre *Tetragonula carbonaria* (Smith, 1854), *Austroplebeia australis* (Friese, 1898) y *Tetragonula hockingsii* (Cockerell, 1929) con Lactobacillales (Firmicutes), Beta-, Gamma-, y Alpha-Proteobacteria. Un estudio más reciente soporta la hipótesis de que las abejas sin aguijón mantienen una estrecha asociación con bacterias del filo Firmicutes, Díaz et al. (2017) indicaron la presencia de *L. kunkeei* en individuos adultos de *M. quadrifasciata*. Así mismo, reportaron la presencia de Proteobacteria pertenecientes a la familia Acetobacteriaceae.

Bacterias de la familia Acetobacteraceae mostraron una fuerte interacción con *Melipona panamica*, *M. bocandei*, ya que fue encontrada en el intestino de estas abejas (Koch, Abrol, Li & Schmid-Hempel, 2013). Según estos autores, la predominancia de estas bacterias puede estar relacionada con el transporte de los recursos alimenticios al nido (transmisión horizontal).

Si bien varios estudios han explorado la microbiota asociada a las abejas Meliponini, se sabe poco de las comunidades microbianas asociadas al intestino debido a esto nuestra investigación pretende identificar la diversidad de microorganismos cultivables asociados a los diferentes estadios de desarrollo, y edades de obreras de la abeja sin aguijón *T. (T.) angustula* (Hymenoptera: Apidae - Meliponini).

## **2.4.2 Microorganismos asociados con abejas del género *Trigona* senso lato (Apidae: Meliponini)**

Los nidos de las abejas del género *Trigona* cuentan con una alta diversidad de microorganismos asociados a la cutícula de las abejas, las reservas alimenticias y su entorno (Menezes, Vollet-Neto, Contrera, Venturieri & Imperatriz-Fonseca, 2013; Teixeira et al., 2003). Varias especies de levadura están asociadas con *Trigona (Tetragonisca) angustula*, Rosa et al. (2003) reportan la existencia de cepas de levaduras como *Starmerella meliponinorum* en polen, miel y propóleo de esta especie. Estos autores señalan que la presencia de esta levadura en el intestino y en los recursos alimenticios de *T. angustula* podrían jugar un papel importante en la nutrición de las abejas. Estudios previos aislaron a *Zygosaccharomyces machadoi* sp. en el pellet de basura de *T. (T.) angustula* (Rosa & Lachance, 2005). Se cree que la presencia de esta levadura es esencial para las larvas ya que proporciona ergosterol, componente esencial en el desarrollo de estas abejas (Paludo et al., 2018).

Este grupo de abejas también viven en estrecha asociación con especies de *Bacillus* (Cruz-Landim, 1996), estas bacterias constituyen un elemento clave en la secreción de enzimas causando la fermentación y conversión de los componentes del polen (Cano et al., 1994; Gilliam, Prest & Lorenz, 1989; Menezes et al., 2013). Barbosa et al. (2017), indicaron la presencia de bacterias tales como *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* y *Bacillus licheniformis* presentes comúnmente en *Trigona hipogea*. Recientemente, un

---

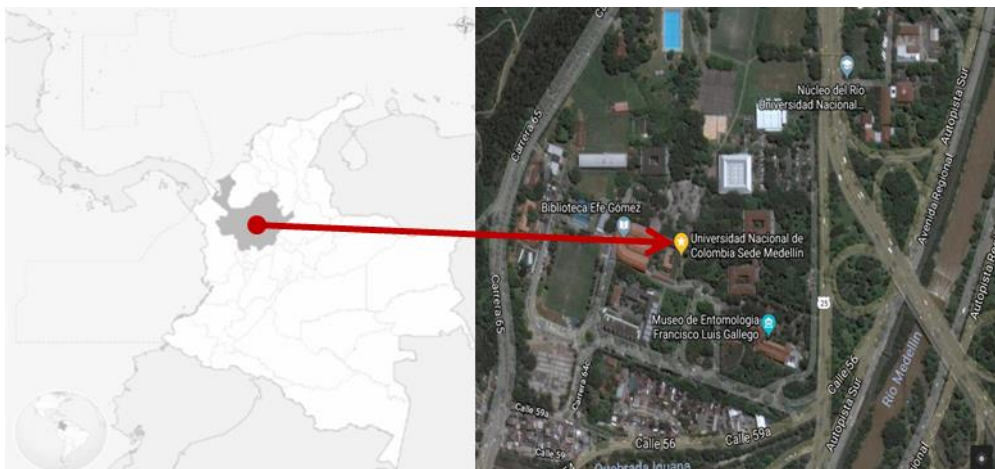
estudio describió una simbiosis entre las abejas *T. (T.) angustula* y una bacteria. *Streptomyces* fue uno de los géneros predominantes asociados a las celdas de cría de *Trigona (Tetragonula) laeviceps* (Smith, 1857) y *Trigona fuscobalteata* (Cameron, 1908). Del mismo modo, Promnuan, Kudo, Ohkuma y Chantawannakul (2012) detectaron la presencia de dos especies de actinomicetos, tales como *Streptomyces chromofuscus* y *Streptomyces Chiangmaiensis* sp. asociados a los nidos de *Trigona collina* Smith, 1857. La función de estas bacterias en los nidos de *T. (T.) angustula* no ha sido estudiado, sin embargo, algunas investigaciones con hormigas y termitas plantean que dichas bacterias asociadas son capaces de producir metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de entomopatógenos (Chouvenc, Efstathion, Elliott & Su, 2013; Poulsen et al., 2009).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Descripción del área de estudio**

El trabajo se desarrolló en el campus El Volador de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, el cual está localizado a 6° 15' 44"N, 75° 34'37"O y a una altitud de 1496 m.s.n.m. Cuenta con un área de 272982 m<sup>2</sup>. Esta área está ubicada en una zona de vida de bosque húmedo montano (bh-M), con una altura de 1479 m.s.n.m., una temperatura promedio de 23 °C y una humedad relativa de 68.2 %. El campus el Volador cuenta con una importante colección de árboles y palmas (Arboretum y Palmetum) de diferentes procedencias reunidas en el campus universitario (Teresita & Morales, 2012), aportando una importante fuente de recursos de néctar y polen, vitales para el mantenimiento de especies de abejas (Figura 1).





**Figura 1.** Ubicación espacial y satelital de Medellín y la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Google (s.f.). [Mapa de la Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín en Google maps]

### **3.2 Colmena de observación**

Aunque se han diseñado técnicas de cría de abejas sin aguijón en colmenas racionales especializadas para diferentes especies. Es importante que para estudios más detallados como el de su comportamiento y actividades sociales se diseñen colmenas especiales para estos fines que permitan la observación y manipulación de las colmenas. Diseños de colmenas de observación realizados por Sakagami, (1966) para el estudio de comportamiento de abejas sin aguijón entre ellas *Trigona (Tetragonisca) angustula*, en donde se usa un única caja plana cubierta en varios lugares por vidrio transparente, protegida por un paño negro que se fijaba cuando no se hacía observaciones y con una única comunicación al exterior a través de un tubo sin afectar el comportamiento normal de las especies estudiadas, y técnicas para el estudio del comportamiento en *Apis mellifera* realizados por Scheiner et al., 2013 en donde propone un diseño, fueron fundamentales para diseñar y mejorar nuestra colmena de observación, permitiendo estudiar el comportamiento de *T. (T.) angustula* sin afectar el desarrollo normal de la colonia.

Con el objetivo de mejorar el diseño propuesto por Sakagami, (1966), se diseñó una colmena que cumpliera con los requerimientos de espacio, temperatura y humedad apropiados para la especie, teniendo en cuenta lo reportado en la literatura por Hammel et al, 2016; Torres, Hoffmann & Lamprecht, 2007.

### **3.3 Marcaje de las abejas para las observaciones de comportamiento**

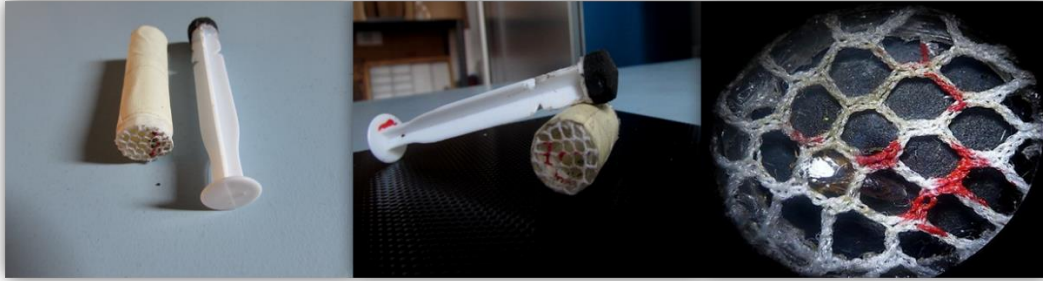
Para facilitar la observación de los diferentes tipos de actividades realizadas por las abejas, se marcaron las abejas en el mesonoto. Para desarrollar esta actividad, previamente se evaluaron dos tipos diferentes de pintura (pintura para tela marca Acritela Roseta y pintura acrílica al frío para aerografía marca Fine Art) y ocho colores (amarillo, rojo, verde, azul, gris, blanco, púrpura y naranja) para un total de 16 tratamientos.

Se marcaron 10 abejas obreras forrajeras por unidad experimental, enseguida se confinaron en envases plásticos de cría. Durante los bioensayos se tuvieron dos controles: el primero consistió en marcar con agua un grupo de 10 abejas y al segundo control no se le aplicó ningún tipo de tratamiento. Consecuentemente se necesitaron 180 abejas distribuidas en 18 envases plásticos de cría con 10 abejas cada uno. Todas las abejas dentro de los envases recibieron el mismo tratamiento, es decir, el mismo tipo de pintura y el mismo color. En cada recipiente se evaluaron las mortalidades cada 24 horas a término de 8 días (acumulando la mortalidad).

Todas las abejas fueron confinadas en envases plásticos de transporte ventana lateral marca Biologika® y alimentadas artificialmente con agua azucarada en una proporción 1:1. Para el marcaje de las abejas se utilizó un dispositivo de marcaje modificado de Scheiner et al. (2013) y que consta de una jeringa de plástico de 5 ml, a cuyo cilindro se le eliminó el extremo inferior y se le adaptó una malla con orificios de 0,3 mm de diámetro. La longitud total del dispositivo fue de 4,8 cm (Figura 2). Las abejas marcadas durante el bioensayo se colectaron con un aspirador para coleccionar insectos cerca a la entrada de un nido de una colonia silvestre de *Trigona (Tetragonisca) angustula* ubicado en el campus de la Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín. Durante este proceso se utilizaron además un estereoscopio marca Leica y un pincel de punta delgada para realizar la marca de pintura en la abeja.

En total se marcaron 540 abejas individualmente, de las cuales 240 fueron marcadas con pintura para aerografía marca Fine Art y 240 con pintura para tela marca Acritela Roseta para un total de 480 abejas pintadas. Para los controles se necesitaron 60 abejas 30 marcadas con agua y 30 abejas sin ningún tipo de tratamiento, únicamente se ubicaron en los recipientes de cría. El bioensayo se realizó con base en un diseño de bloques

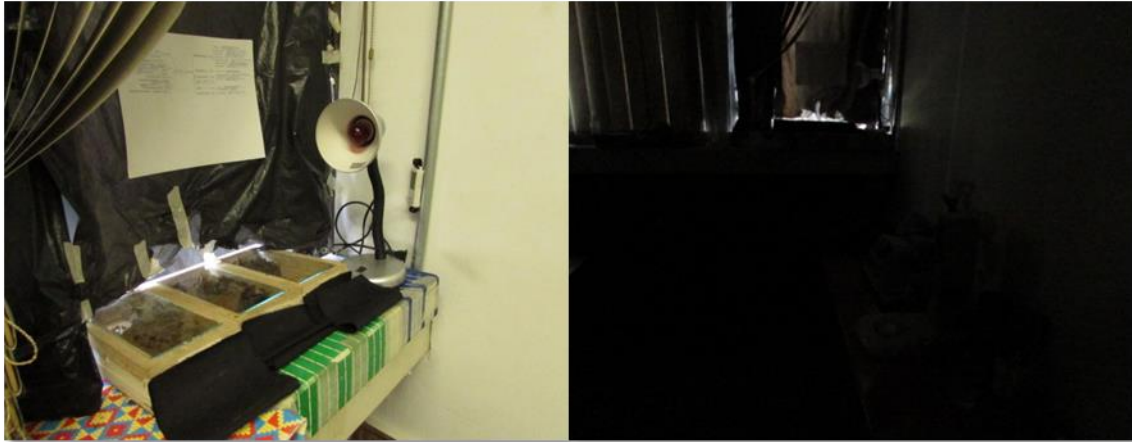
completos al azar con tres repeticiones. Se evaluaron las mortalidades acumuladas durante 8 días.



**Figura 2.** Dispositivo para el marcaje y marca de pintura en el mesonoto en la especie *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

### **3.4 Estudio del comportamiento de las diferentes castas de *Trigona (Tetragonisca) angustula***

El estudio de comportamiento se realizó teniendo en cuenta los trabajos realizados por Carvalho-Zilse (2005); Hammel et al. (2016); Nates-parra et al. (1989) y Scheiner et al., (2013) en donde describen actividades generales asociados a estas abejas. A partir de la información suministrada por los autores anteriormente mencionados se produjo una tabla de comportamientos generales para la toma de las observaciones en el campo (Tabla 1). Se realizaron observaciones diarias, 8 horas por día, entre las 8 de la mañana y las 4 de la tarde con intervalos de descanso de 10 minutos por cada 20 minutos de registro, para un total de 288 horas. Debido a que las abejas sin aguijón nidifican en cavidades oscuras (Nates-Parra y Rosso-Londoño, 2013), fue necesario ubicar la colmena en un cuarto oscuro que se ilumina con luz roja, para poder llevar a cabo las observaciones sin alterar el comportamiento normal de las abejas según lo descrito por Sakagami (1966) (Figura 3). Los datos de cada registro se tabularon en la tabla 1 y además se incluyó información con respecto al color del integumento de la abeja observada, su edad en días, la fecha de la observación y el tiempo utilizado por la abeja en cada actividad.



**Figura 3.** Adecuación del cuarto oscuro para que las observaciones del comportamiento al interior de la colmena de observación.

**Tabla 1.** Comportamientos generales de abejas obreras de *Trigona (Tetragonisca) angustula* en el nido.

Caminar	C
Construir celdas	CC
Actividad en los panales de cría	Apc
Almacenamiento en los potes	Almp
Actividad fuera de los panales de cría	Afpc
Construcción de involucro	Ci
Entrar y salir del nido	e+sn
Trofalaxis	T
Auto aseo	Aa
Construcción	Cst
Ventilación	V
Inspección de celdas	Idc
Construcción de potes	Cp
Entrar en los potes	Ep
Trabajar en la pila de residuos	Tr
Remover los residuos	Rr
Manipulación de resinas	Mrs
Vigilancia	Vgl
Remover celdas	Rcds
Construir la entrada	Ce
Atacar enemigos naturales	Ae
Abrir celdas	Acds
Corte real	CrI
Cerrar celdas	Ccds
Asear a otras abejas	Aoa
Depositar alimento en las celdas de cría	dacds+c
Siendo atacada	Sa
Proceso de provisionamiento y oviposición de las celdas de cría	Ppo
Depositar alimento en los potes	Dap
Masticar resina	Mr

Tomado de, (Carvalho-Zilse, 2005; Hammel et al., 2016; Lopera, & Briceño, 1989; Scheiner et al., 2013).

Con los datos obtenidos en las observaciones se realizó un análisis de correspondencias, este análisis es una técnica que se usa para representar gráficamente tablas de contingencia. Esto quiere decir que el insumo para este análisis es la construcción de la tabla en cuestión. Una tabla de contingencia es la que cruza dos variables categóricas, presentando la frecuencia de aparición de las diferentes categorías.

Puesto que los comportamientos son niveles de una variable categórica, no quedaba más que categorizar también las edades para elaborar un Análisis de Correspondencias.

Para la construcción de la tabla en cuestión (Tabla 2), se parte de la información registrada luego se construye una tabla de contingencia en la que se cruza cada una de las edades con los comportamientos registrados. Para la construcción de la tabla 2, se utilizó la funcionalidad de tablas dinámicas en Excel.

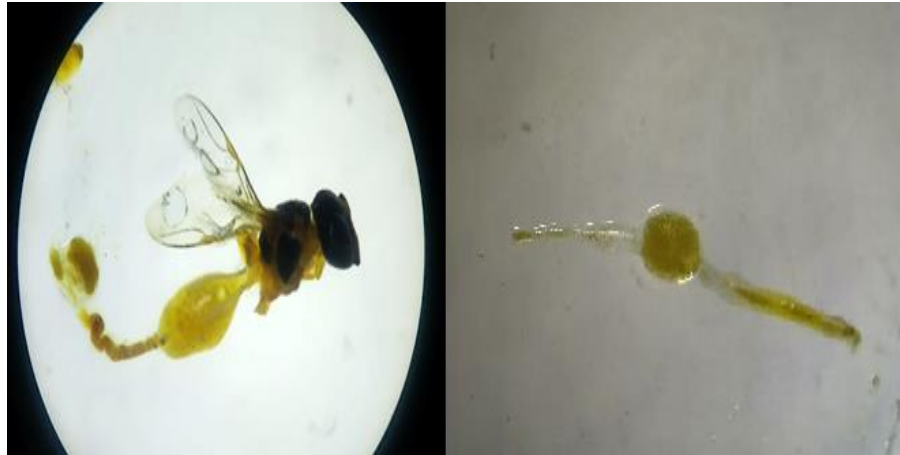
**Tabla 2.** Frecuencia de los comportamientos registrados durante las observaciones en la colmena de *Trigona (Tetragonisca) angustula*. **almp**: almacenamiento en los potes, **afpc**: actividad fuera de los panales de cría, **tr**: trabajar en la pila de residuos, **cp**: construir potes **t**: trofalaxis **ep**: entrar en los potes, **dap**: depositar alimento en los potes, **rr**: remover residuos **idc**: inspección de celdas, **cc**: construir celdas, **c**: caminar, **ci**: construir involucro, **mr**: masticar resina.

Edad	afpc	almp	c	cc	ci	cp	dap	ep	idc	mr	rr	t	tr
10 a 13	6	3	3	1	1	0	0	0	0	0	5	0	5
14 a 22	1	0	2	0	1	11	0	7	1	0	7	2	0
2 a 9	0	0	9	0	9	0	0	0	0	5	0	0	0
23 a 31	0	0	3	8	3	1	0	4	3	3	9	1	0
33 a 35	0	0	2	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0

### **3.5 Microorganismos asociados a las diferentes castas y edades de *Trigona (Tetragonisca) angustula***

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de comportamiento, se seleccionaron cinco abejas representativas de cada casta, se colectaron 46 individuos en total, los cuales fueron llevados al laboratorio para la extracción del intestino, se colectaban en tubos de microcentrífuga tipo eppendorf que contenían 1ml de medio líquido (80% caldo y 20% glicerol) para luego ser llevadas al laboratorio de Insectos y Biotecnología de la Universidad

Nacional de Colombia sede Medellín. La extracción del intestino se realizó usando un estereoscopio y ubicando al lado de un mechero para evitar la contaminación por bacterias aerobias, posteriormente el intestino se separó con la ayuda de dos pinzas entomológicas de punta dura marca Enthos las cuales fueron esterilizadas previamente. Finalmente las muestras fueron almacenadas en tubos de microcentrífuga con su respectiva etiqueta y se preservaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior tratamiento (Figura 4).



**Figura 4.** Extracción del intestino de *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

### **3.5.1 Aislamiento de microorganismos intestinales de *Trigona (Tetragonisca) angustula***

El aislamiento de las bacterias cultivables obtenidas del intestino se realizó en el Laboratorio de Insectos y Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Los aislamientos se realizaron en medio sólido (agar y caldo nutritivo) con un pH ajustado a 9.0 usando hidróxido de sodio-NaOH, con la finalidad de adecuar un medio que presente características similares a las del pH básico del intestino de estos insectos. Luego de realizada la extracción del intestino, cada una de las muestras fueron maceradas mediante el uso de un micropistilo con la finalidad de aislar las comunidades bacterianas presentes en esta estructura. Posteriormente con cada una de las muestras se realizaron diluciones seriadas, para realizar este procedimiento fue necesario tomar  $100\ \mu\text{l}$  y se inocularon en agar nutritivo (medio sólido). Finalmente las cajas fueron incubadas a  $29^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 24 horas.

Cada colonia con características morfológicas diferentes fue separada en medio sólido y sembrada por agotamiento. Las cajas Petri se incubaron bajo las mismas condiciones establecidas anteriormente, posteriormente cada colonia purificada se almacenó a -20°C en tubos de microcentrifuga con caldo nutritivo y glicerol (80/20%). Al mismo tiempo estas cepas se caracterizaron macroscópicamente teniendo en cuenta caracteres como forma, superficie, borde, elevación y textura. En total se procesaron y aislaron los microorganismos de nueve grupos que incluían las diferentes edades y castas de *T. (T.) angustula* tales como intestino de la reina, larva, pupa, entre otros (tabla 3).

**Tabla 3.** Muestras (intestinos) aisladas en el laboratorio para los cultivos, con su respectivo código.

Grupos	Código
Reina	I_Rei
Larva	Lar
Pupa	Pup
Intestino obrera de 2 a 9 días	I_ 2–9
Intestino obrera de 10 a 13 días	I_ 10–13
Intestino obrera de 14 a 22 días	I_ 14–22
Intestino obrera de 23 a 31 días	I_ 23 – 31
Intestino forrajera de 32 a 35 días	IF_32 – 35
Intestino guardiana de 32 a 35 días	IG_ 32 – 35

Con el objetivo de evaluar la carga microbiana de las muestras, se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) de cada uno de los aislados bacterianos. Para obtener el valor final, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = (\text{no. de colonias/volumen inoculado}) * \text{Inverso del factor de dilución}$$

### **3.6 Identificación bacteriana**

Para realizar la identificación de las bacterias asociadas a los diferentes grupos etarios de *T. (T.) angustula*, se realizaron pruebas moleculares mediante la secuenciación del ADNr 16S en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Antioquia (PECET). La amplificación del gen 16S rRNA se realizó utilizando los primers bacterianos universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 ') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTG-TTACGAC3'). El cóctel de amplificación por PCR consta de 1 µL de



plantilla de ADN, 0.5  $\mu$ L de 10 pmol cada primer, 12.5  $\mu$ L GoTaq Green Master Mix 2X y 10.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La PCR se realizó en el termociclador Arktik utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación (20 s a 95 ° C, 45 s a 50 ° C, 1,5 min a 72 ° C) y 10 min a 72 ° C Para la extensión final.

### **3.7 Análisis de la información**

Una vez obtenidas las secuencias se aplicó un análisis de correspondencia canónica (ACC) para determinar las relaciones entre las microbiota intestinal identificada por secuenciación y los grupos etarios dentro de las obreras (determinados según comportamiento: obreras entre 2 a 9 días, obrera entre 10 a 13 días, obreras entre 14 a 22 días, obreras entre 23 a 31 días, obreras (forrajeras) entre 32 a 35 días, obreras (guardianas) entre 32 a 35 días, intestino de la reina, larvas y pupas. Para realizar este análisis se usó el programa R versión 3.1.1. Así mismo, se realizó un análisis de similitud teniendo en cuenta los valores de presencia ausencia de los morfotipos por estadios y edades. A partir de la matriz de similitud realizada, se obtuvo un dendograma de similitud elaborado por medio de un análisis de agrupamiento por pares mediante el método de promedios no ponderados (UPGMA). Para este análisis se empleó el índice de Jaccard, utilizando para su construcción el programa PAST 1.63 (Hammer, Harper & Ryan. 2001). Este análisis se realizó con la finalidad de establecer la similitud en la composición de morfotipos entre el intestino de los diferentes estadios y edades *T. (T.) angustula*.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

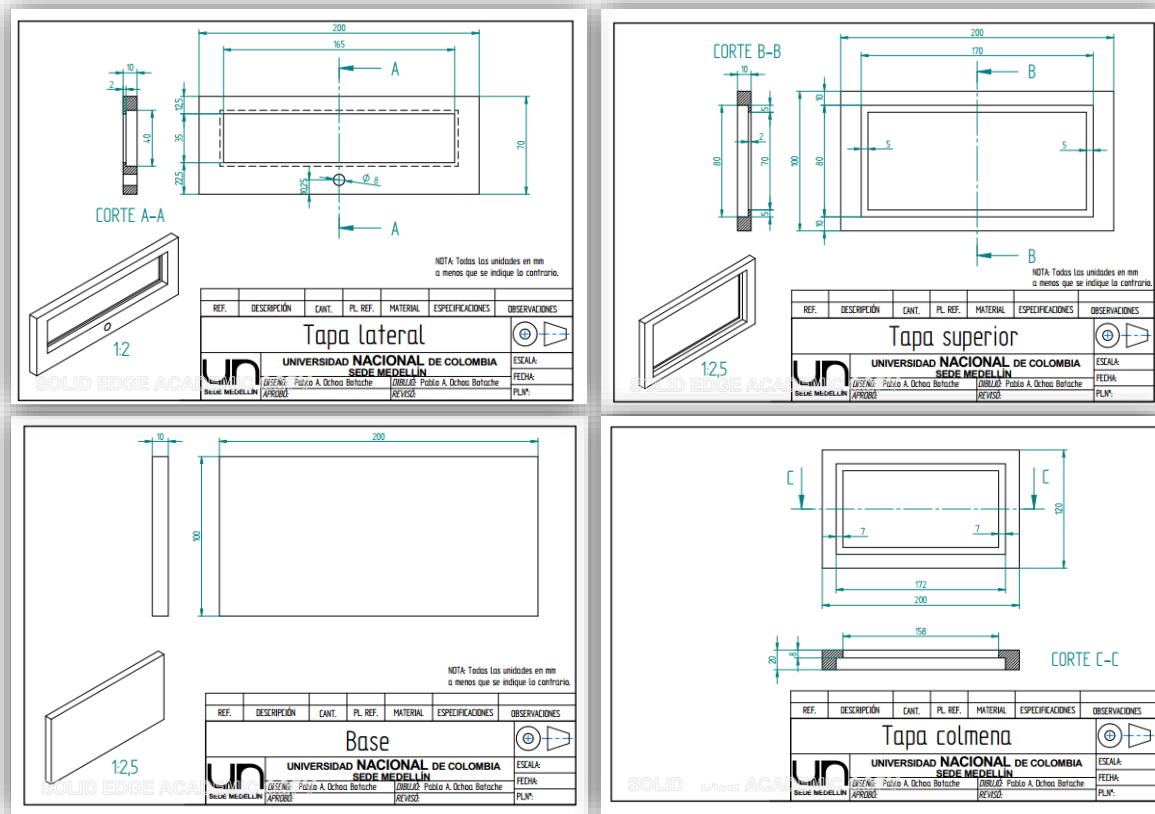
### 4.1 Colmena de observación

Se realizó un diseño digital de la colmena de observación (Figura 5), el cual consta de tres módulos, el de cría, el de observación y el de producción (Figura 8). Cada módulo tiene una entretapa de vidrio y una tapa o techo. Así mismo se creó un área horizontal que permitiera mejorar la observación y manipulación de las abejas.

Cada módulo tiene en sus laterales tres orificios de 2 cm de diámetro a fin de permitir el paso de abejas entre las áreas, del mismo modo, en el área de producción se ubicó un orificio que sirve para que las abejas tengan acceso al exterior y en donde puedan construir su tubo de entrada.

El módulo de cría presenta un tamaño de 11,2 cm de alto, 13,7 cm de ancho y 23,5 cm de largo, se ubica al lado de los módulos de observación. Tiene una base o piso de 23,5 cm de largo y 13,7 cm de ancho. Durante el desarrollo de la investigación se realizaron modificaciones que permitieron mejorar el espacio donde se ubicó la colonia, las modificaciones se hicieron en este módulo puesto que presenta un tamaño mayor al resto de los módulos debido a que en este lugar permanece la reina depositando los huevos y desarrollándose nuevas abejas.

Los módulos de observación y producción tienen cada uno el mismo tamaño, 7,5 cm de alto, 13,7 cm de ancho y 23,5 cm de largo. En el módulo de observación se dejaron discos de cría con el fin de hacer seguimiento a la emergencia de los individuos inmaduros, y en el módulo de producción se ubicaron potes de almacenamiento de miel y polen.



**Figura 5.** Diseño digital de cada una de las piezas de la colmena de observación, utilizado para el corte de las piezas y su posterior construcción (diseño digital Pablo Ochoa).

Posteriormente, en el Laboratorio de Fabricación (FabLab) de la Universidad Nacional de Colombia sede – Medellín se desarrolló el proyecto de elaboración, de la colmena de observación basado en el diseño digital. Se utilizó una Cortadora de Corte Numérico (CNC) con una fresa de punta redonda de ¼” para fabricar la colmena de observación (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Cada módulo de la colmena es desmontable, lo que permite hacer una mejor inspección y manipulación de la colonia (

**Figura 7.** Ensamblaje de la colmena de observación terminada, las partes de la colmena son desmontables permitiendo una buena inspección y manipulación del nido de las abejas

).



**Figura 6.** Corte de las partes de la colmena de observación en el Laboratorio de Fabricación (FabLab) de la Universidad Nacional de Colombia sede – Medellín.

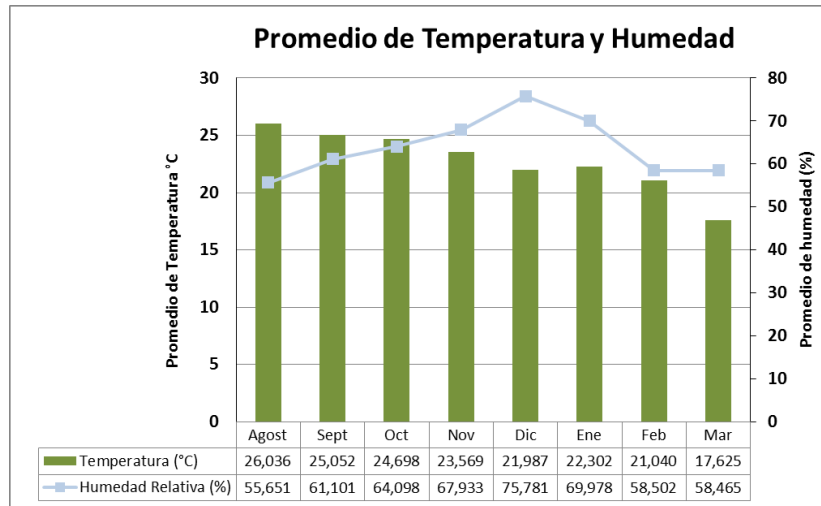


**Figura 7.** Ensamblaje de la colmena de observación terminada, las partes de la colmena son desmontables permitiendo una buena inspección y manipulación del nido de las abejas



**Figura 8.** Colonia de *Trigona (Tetragonisca) angustula* establecida en la colmena de observación.

Para el traspaso de la colonia de abejas a la colmena de observación, se retiró una de las tapas de una colmena racional, luego se removieron los potes de miel y de polen, después se transfirió completamente la cría envuelta en su involucro junto con los potes de comida. El procedimiento se realizó de una manera rápida y limpia, todos los instrumentos y herramientas utilizados fueron previamente esterilizados. Una vez realizado el traspaso, se dejó a la colonia en un periodo de adaptación a la colmena de observación por un periodo de 3 meses, durante este tiempo se hicieron monitoreos constantes con el fin de detectar la presencia de enemigos naturales o algún tipo de alteración en la población de la colonia. De igual manera se tomaron registros de temperatura y humedad (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) en donde se encontró una temperatura media de 22,78°C y una humedad relativa promedio de 63,93%. La época en donde se registró el valor más alto de temperatura fue en agosto del año 2017 con 26,0 °C y una humedad de 55,6% mientras que en marzo del mismo año fue el periodo en donde el registro de temperatura fue el más bajo con 17,6 °C y una humedad relativa de 58,4%. Durante la época en la que se realizó la investigación predominaron lluvias con temperaturas bajas, afectando la tarea de forrajeo y la disponibilidad del recurso alimenticio en el campus universitario.



**Figura 9.** Promedio de Temperatura y Humedad durante el tiempo que permaneció la colonia en la colmena de observación.

El desarrollo de la colonia en la colmena de observación fue bueno, se observó actividad en el nido en su gran mayoría en horas de la mañana entre las 9:00 am finalizando en la tarde entre las 3:00 pm y 4:00pm. Estos registros de actividad coinciden con estudios realizados por Morales Soto, Botero Garces, & García Mejía, 1999, en *T. (T.) angustula*, en donde reportan una alta actividad entre las 9 a.m. y las 3 p.m. registrando la mayor actividad durante las 10 y 11 a.m. con un promedio de 300 abejas activas. Las actividades disminuían constantemente de 3 p.m. en adelante, hasta finalizar a las 7 p.m. Con días claros y temperaturas favorables al vuelo, cerca al anochecer registraron el cese de actividades. Aunque la temperatura en nuestra colmena de observación fue variable, la actividad en la colonia fue contante, permitiendo el registro de su comportamiento social. El mantenimiento de la temperatura es fundamental para el buen desarrollo de la colonia puesto que las abejas sin aguijón tienen poca tolerancia a temperaturas bajas y esto podría alterar su normal desarrollo (Torres et al., 2007).

Las técnicas para la cría de abejas sin aguijón en colmenas racionales para diferentes especies fueron desarrolladas por Nogueira-Neto (1997). Sin embargo para conocer más de cerca su comportamiento y actividad social, se necesita de un tipo especial de colmena.

La colmena de observación presenta características similares en diseño, respecto a las usadas en diferentes estudios de comportamiento (Hebling, 2015; Costa & Venturieri, 2007; Sakagami, 1966; Torres et al., 2007), no obstante, este modelo permite una mejor manipulación del nido y no afecta el comportamiento normal de la colonia. Adicionalmente, el diseño de módulos permite ampliar el espacio de la colmena sin afectar directamente la colonia.

Colmenas diseñadas por Sakagami (1966) adaptan a las colmenas un termostato que permita regular la temperatura, esto mejora las condiciones de cría y observación al mantener regulada la temperatura dentro de la colonia (Costa & Venturieri, 2007). Sin embargo, dadas las condiciones climáticas en el área de trabajo, no fue necesario implementar un termostato y su desarrollo fue normal sin afectar su comportamiento.

## **4.2 Técnica de marcaje para *Trigona (Tetragonisca) angustula***

Diferentes autores han desarrollado técnicas de marcaje en abejas que han permitido realizar estudios de comportamiento describiendo una serie de labores realizadas por las abejas y categorizándolas por castas. Algunas de las técnicas consisten en utilizar diferentes tipos de pintura, puntos plásticos e incluso etiquetas que no influyen en el comportamiento y la viabilidad de las abejas (Hammel et al., 2016; Piper, 2003; Scheiner et al., 2013). En este estudio se utilizó una técnica de marcaje propuesta por Scheiner et al. (2013) para el estudio de comportamiento de *A. mellifera* y se adaptó para marcar *T. (T.) angustula* utilizando los dos tipos de pintura antes descritos. Se encontró que la técnica facilita el marcaje y las pinturas que se evaluaron fueron permanentes y duraderas. Sin embargo se encontraron diferencias entre el tipo de pintura, y se determinó que la pintura para aerografía influyó más en la mortalidad de los individuos.

En el análisis de varianza que se realizó entre los tratamientos evaluados se encontró que el valor P en las pinturas es menor a 0,05 estableciendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos que se utilizaron con los dos tipos de pintura ( $p < 0.0103$ ) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.4.**

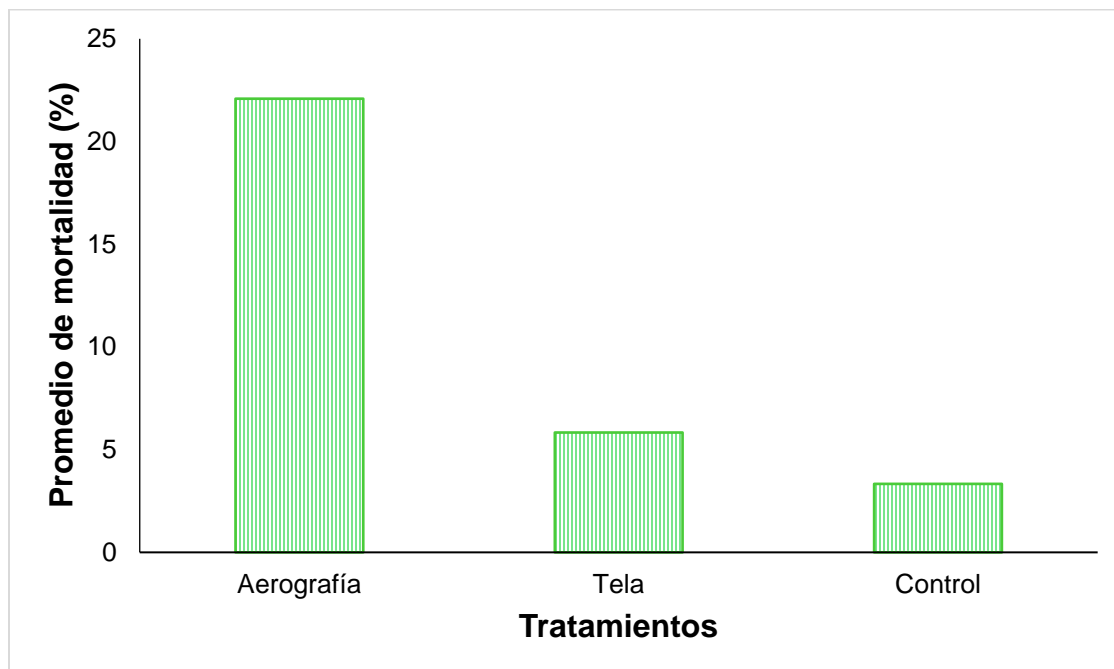
**Tabla 4.** Análisis de varianza entre los tipos de pintura utilizados en la técnica de marcaje de *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

Origen de las variaciones	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Pintura	1	9.33	93.31	7.497	<b>0.0103*</b>
Color	7	6	0.857	0.689	0.6806
Error	30	37.34	12.45		
Total	37	52.67			

Aunque los tipos de pinturas que se utilizaron en el bioensayo se han usado en técnicas de marcaje de abejas melíferas, nuestros resultados se diferencian con los de Scheiner et al. (2013),

ya que el autor propone el uso de pinturas acrílicas para marcaje, sin embargo este tipo de pintura produjo mayor mortalidad a las abejas (Figura 10).

La pintura para tela ha sido poco usada en técnicas de marcaje, no obstante, resultó óptima en las abejas sin afectar su viabilidad, y la durabilidad de la pintura fue constante durante todo el ensayo siendo este tipo de pintura la que acumuló la menor mortalidad, por lo que podemos inferir que este tipo de pintura sirve como marca duradera sin que se vean afectadas las abejas de la especie *T. (T.) angustula*.



**Figura 10.** Promedio de mortalidad causado por los tipos de pinturas en el estudio de comportamiento de las castas de *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

### **4.3 Estudio de comportamiento de las castas de *Trigona (Tetragonisca) angustula***

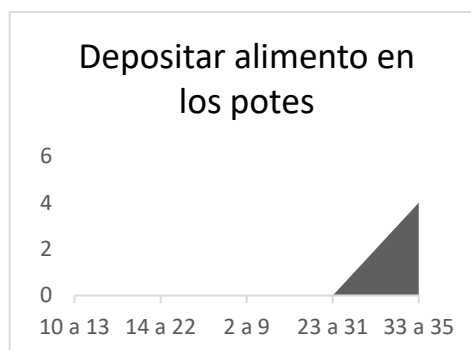
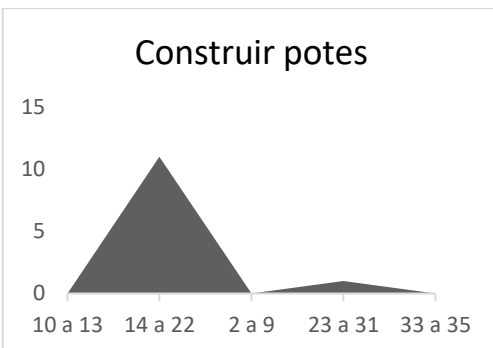
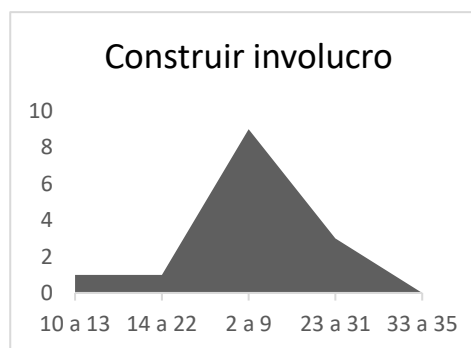
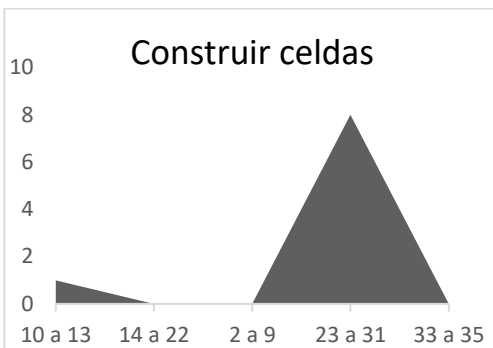
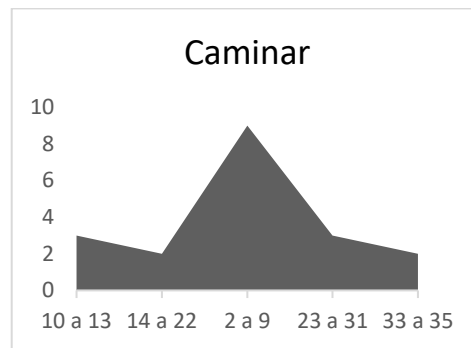
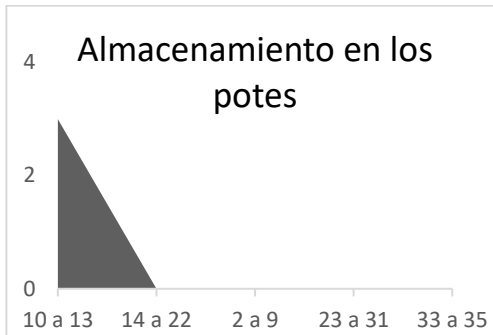
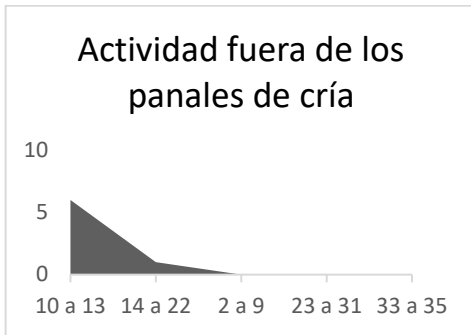
El estudio de la división del trabajo en insectos sociales, específicamente del orden Hymenoptera ha sido abordado por diferentes autores (Camargo, 1972; Grosso Ferreira & Bego Rolandi, 2002; Kerr et al., 1966; Seid & Traniello, 2006), encontrando que existe un patrón de correlación entre la edad y las tareas ejecutadas por las obreras, lo que se ha nombrado como polietismo temporal. A pesar de existir diferencias entre las diferentes especies estudiadas (Hammel et al., 2016;



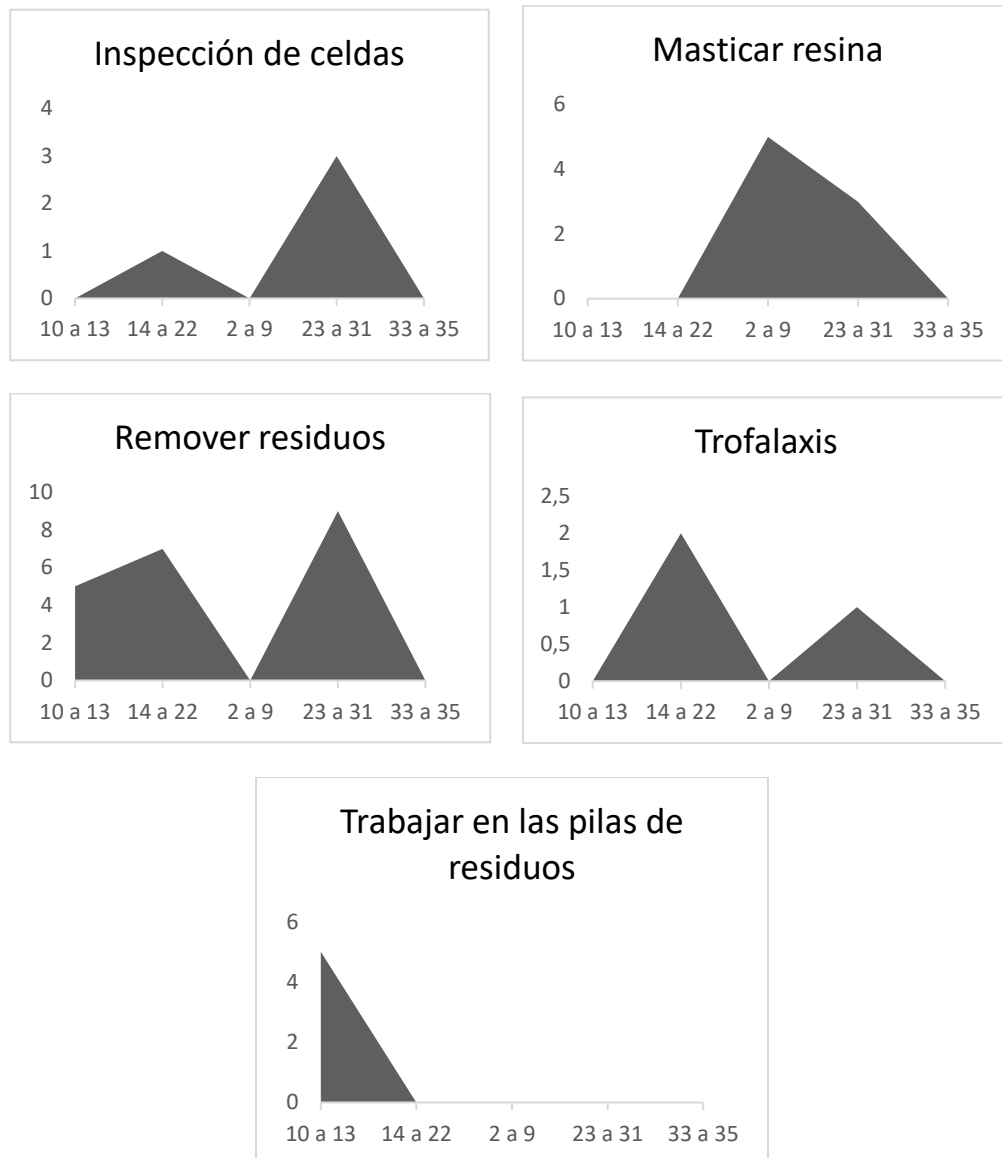
Mateus, 2019) se ha detectado un patrón para todas el cual consiste en cuatro tareas comunes, las cuales son: (1). Incubación y reparación para la cámara de cría; (2) construcción y provisión de las celdas, limpieza del nido y alimentación de adultos jóvenes y reina; (3) limpieza del nido, reconstrucción del involucro, recepción, almacenamiento del néctar y polen, y presencia de abejas guardianas que se encuentran en la entrada del nido; (4) forrajeras de néctar, polen y otros materiales (Wille, 1983). Trabajos realizados con *T. (T.) angustula* han reportado flexibilidad en la respuesta de las obreras de diferentes edades en el momento de ejecutar una tarea, las obreras jóvenes producen cera y trabajan en las celdas de cría y en la medida que van envejeciendo las actividades que ejecutan van cambiando hasta realizar la última labor que es forrajeo fuera de la colmena (Cepeda, 2006). A pesar, de los estudios realizados con diferentes especies de la tribu Meliponini son pocos los trabajos reportados para *T. (T.) angustula*, cabe destacar el trabajo de Hammel et al. (2016). Los resultados obtenidos en el trabajo coinciden en varios aspectos con el trabajo citado.

Las diferentes actividades registradas y consignadas en el etograma, fueron sometidas a un análisis de correspondencias en donde se establecieron rangos de edades en los que las abejas realizan actividades específicas o típicas. El análisis muestra la distancia entre las edades y la actividad realizada en la colonia, es decir, a mayor distancia en el plano la actividad o función en la colonia se vuelve específica para una edad y a distancias menores las actividades se vuelven generales entre edades (Figura 12). En el análisis de correspondencias la edad está representada por puntos azules y la actividad con puntos de color rojo. En este análisis se identificaron 5 grupos (círculos negros en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.12**) de edades con funciones específicas en la colonia.

Frecuencia en que las abejas realizaban las tareas



Frecuencia en que las abejas realizaban las tareas

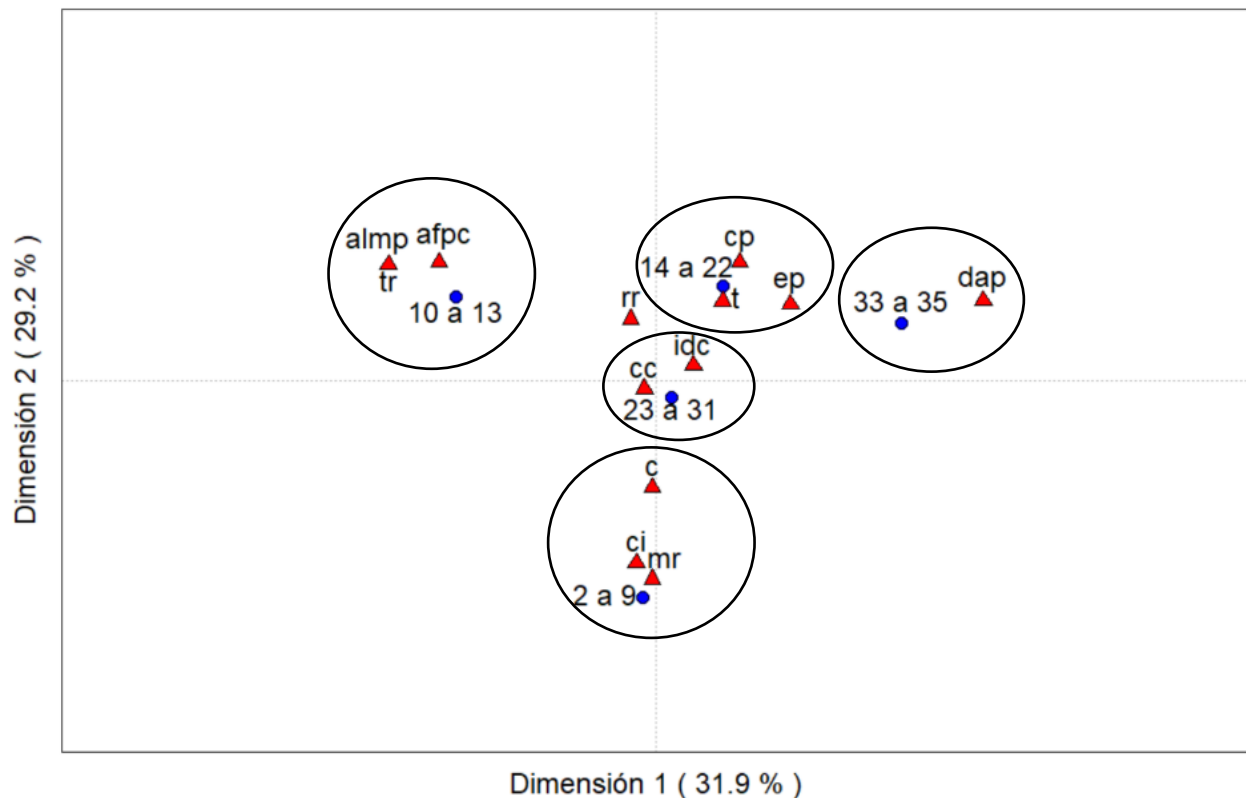


**Edad de las abejas de *T. (T.) angustula* en días**

**Figura 11.** Tareas realizadas por *Trigona (Tetragonisca) angustula*, la gráfica muestra la frecuencia de cada tarea realizada en el nido por las abejas según la edad. Se presentan 13 comportamientos. **almp:** almacenamiento en los potes, **afpc:** actividad fuera de los panales de cría, **tr:** trabajar en la pila de residuos, **cp:** construir potes **t:** trofalaxis **ep:** entrar en los potes, **dap:** depositar alimento en los potes, **rr:** remover residuos **idc:** inspección de celdas, **cc:** construir celdas, **c:** caminar, **ci:** construir involucro, **mr:** masticar resina.

En general se encontro que las obreras de *T. (T.) angustula* durante los primeros 2 a 9 días las abejas dedican el mayor tiempo del día a construir involucro, masticar resinas y caminar en el nido; cabe mencionar que estas actividades también la realizan abejas con otros rangos de

edades, solo que para las abejas que están en el rango de 2 a 9 días estas actividades son frecuentes (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y por esta razón se ubican en la parte central (entre los ejes) del plano del análisis de componentes, este resultado coincide en algunas labores con el trabajo de Hammen et al. (2016) en el cual dos actividades coinciden como tarea principal masticar resina y construir involucro, igualmente Mateus et al. (2019) reporta para *Melipona marginata* un comportamiento semejante. Cuando las abejas se encuentran en un rango de edad entre 10 a 13 días se observó que empiezan a desarrollar actividades por fuera de los panales de cría, y se observó a las obreras realizando almacenamiento de alimento en los potes, actividad que se considera parte del proceso de producción de crías conocido como aprovisionamiento y proceso de oviposición (POP) en inglés (Provisioning and Oviposition Process), contrario a lo reportado por Hammel et al. (2016), los autores encontraron que esta casta realiza un mayor número de actividades como construcción del involucro e inspección de las celdas. Las abejas entre 14 a 22 días en su mayoría se encargan de la construcción de los potes de almacenamiento de comida (miel – polen), trofalaxis con obreras más jóvenes e inspección de los potes de alimentación, para esta edad, la única labor que claramente coincide con Hammel et al. (2016) es la de trofalaxis. Las obreras con edades de 23 a 31 se concentraban en la construcción de las celdas y en su inspección, esta actividad difiere totalmente del trabajo de Hammel et al. (2016) en la cual las obreras cumplen la actividad de guardianas. Finalmente las obreras de mayor edad 33 a 35 sólo se les observó depositando alimento en los potes y actividades de forrajeo (Figura 12), esta edad no fue tomada en cuenta en el trabajo citado. Cuando terminaron las observaciones entre los días 36 y 37 las obreras marcadas se observaban muy raramente, lo que sugiere que la mayoría había muerto.



**Figura 12.** Análisis de correspondencias de las actividades según las edades de *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula*. Se observan 5 grupos de edades muy bien definidos, de 2 a 9 días, de 10 a 13 días, de 14 a 22 días, de 23 a 31 días y de 33 a 35 días de edad. Los triángulos azules representan las actividades realizadas por las abejas y los puntos azules representan a cada grupo de edad encontrado. **almp**: almacenamiento en los potes, **afpc**: actividad fuera de los panales de cría, **tr**: trabajar en la pila de residuos, **cp**: construir potes **t**: trofalaxis **ep**: entrar en los potes, **dap**: depositar alimento en los potes, **rr**: remover residuos **idc**: inspección de celdas, **cc**: construir celdas, **c**: caminar, **ci**: construir involucro, **mr**: masticar resina.

Los resultados muestran que las obreras de *T. (T.) angustula* realizan actividades claramente asociadas a la edad de las obreras, en las primeras semanas las actividades están asociadas a tareas cerca de las celdas de cría, posteriormente se trasladan a realizar actividades mas cerca a los potes de alimentación y construcción del nidos y finalmente las obreras adultas realizan actividades de forrajeo. Esta secuencia temporal mejor conocida como polietismo temporal ha sido reportada para varias especies de abejas sin aguijón e insectos sociales en general (Robinson, 1992; Cepeda, 2016). En el trabajo se pueden observar claramente cinco grupos lo que coincide con el trabajo de Hammel et al. (2016), aunque no necesariamente coincide las

tareas ejecutadas por las obreras y la misma edad como es el caso de el comportamiento de las guardianas (23 a 31 días). Esto podría deberse a que el comportamiento de las abejas sin aguijón puede ajustarse dependiendo de las necesidades de la colonia como ya ha sido reportado por autores como Sakagami (1982), Cepeda (2016). Se podría sugerir que la “especialización” o “elitismo” como lo reportan algunos autores también es un proceso temporal que estaría sujeto a las condiciones de la colonia, teniendo en cuenta que la mayoría de estudios realizados están delimitados en el tiempo y espacio y es difícil realizar una predicción más amplia.

#### **4.4 Identificación bacteriana**

Se aislaron un total de 2653 colonias bacterianas asociadas al tracto digestivo de diferentes estadios y edades de obreras de *Trigona (Tetragonisca) angustula* (tabla 6). Teniendo en cuenta color, el tamaño y las diferencias morfológicas de las colonias, se registraron 34 aislamientos bacterianos agrupados en 14 morfotipos, de estos, se seleccionaron diez cepas bacterianas (ocho aisladas en agar nutritivo y dos en MRS) para la caracterización molecular (secuenciación de 16S rDNA). Es importante mencionar que estas cepas bacterianas fueron seleccionadas debido a la alta predominancia entre los estadios y edades de las muestras de *T. (T.) angustula*; además de que se sabe muy poco acerca de las comunidades que colonizan el intestino de las reinas. Otro factor que incidió en la selección de las cepas bacterianas de la reina estuvo relacionado con la presencia de morfotipos exclusivos, los cuales reflejan que en esta casta los individuos cuentan con una microbiota central característica que puede estar cumpliendo una función en la productividad (reproducción, oviposición o en la fertilidad de los huevos colocados) de la colonia.

La caracterización de las bacterias intestinales de obreras de *T. (T.) angustula* condujo a la identificación de dos filos, 4 géneros y 8 especies. En la Tabla 3, se muestran las especies bacterianas aisladas del intestino de las abejas sin aguijón, y su porcentaje de similitud. De las especies identificadas, el 75% pertenecían al filo Firmicutes (6 especies), mientras que el 25% restante hacían parte del filo Proteobacteria (2 especies); cabe mencionar que la mayoría de los aislamientos pertenecían al género *Bacillus* (tabla 3). Estudios realizados con métodos dependientes e independientes del cultivo, han demostrado que el intestino de larvas y adultos está dominado por tres grandes filotipos bacterianos como Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias (Jeyaprakash, Hoy & Allsopp, 2003; Vojvodic, Rehan & Anderson, 2013; Meeus et al., 2015). Estos filotipos están compuesto por un pequeño número de clados bacterianos, como Firm-4, Firm-5 (Firmicutes), Bifido (Actinobacterias) y Alpha-2.1, Alpha-2.2, Alpha-1, Beta,

Gamma-1 y Gamma- 2 (Proteobacterias) (Tarpy, Mattila & Newton, 2015). En el 2012, Moran, Hansen, Powell & Sabree reportaron la presencia de un conjunto distintivo de bacterias en el tracto intestinal de obreras adultas de *A. mellifera* pertenecientes principalmente a los filos Proteobacterias (Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria) y Firmicutes. Por su parte Vojvodic et al., (2013), aislaron Firmicutes del canal alimentario de las larvas de abejas melíferas africanas y europeas, que es consistente con nuestros hallazgos. Sin embargo, en dicho trabajo, no se observó la presencia de las especies *Enterobacter cowanii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* que fueron las más comunes en nuestro estudio. Parmentier et al. (2016) reportaron en *Bombus pascuorum*, que las comunidades bacterianas intestinales de la larva estaban dominadas por filotipos de bacterias Enterobacteriaceae y Lactobacillaceae.

Como se mencionó anteriormente, la comunidad bacteriana estaba representada principalmente por especies del género *Bacillus* en todas las muestras del intestino. Este género ha sido aislado comúnmente en diferentes estadios, por ejemplo del intestino de larvas y adultos de *A. mellifera* (Al-Ghamdi, Ali Khan, Javed Ansari, Almasaudi & Al-Kahtani, 2018), así como también de sus colmenas y de los recursos florales circundantes (néctar floral) (Wang, Zhao, Xu, Wang & He, 2015); por lo tanto, las abejas sin aguijón y las melíferas, pueden ser una fuente de inóculo y posibles transmisores de su microbiota de una generación a otra o través del contacto social horizontal (i.e. trofalaxis) y la interacción con otros congéneres dentro del nido. Por otra parte, es importante mencionar que los miembros del género *Bacillus* se les ha atribuido diferentes funciones dentro de estos reservorios, en algunos casos pueden estar cumpliendo un papel benéfico en el intestino de abejas melíferas, debido a que mostraron acción inhibitoria contra *Paenibacillus larvae* agente causal de la enfermedad denominada Loque americana, que afecta a los estadios de larva y de pupa de la abeja (*Apis mellifera*). (Gilliam 1990; Evans & Armstrong 2006; Sabaté, Carrillo & Audisio, 2009) causando pérdidas económicas sustanciales a los apicultores. Esto concuerda con el trabajo realizado por Alippi & Reynaldi (2006), quienes reportaron que los metabolitos secundarios producidos por *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus* y *B. megaterium* inhiben el crecimiento de 17 cepas de *P. larvae*. En el 2015, Tarpy, Mattila & Newton indicaron que la presencia de *Bacillus* en el intestino de las abejas estaba directamente asociada con el aumento de la amilasa que ocurre en el néctar ella interior del intestino anterior de las abejas.

Curiosamente, ninguna de las etapas de la vida de *T. (T.) angustula* contenía microorganismos pertenecientes al filo Actinobacterias, como los miembros de *Corynebacterium* que se han encontrado comúnmente en el intestino de otras abejas como *A. mellifera* (Mohr & Tebbe, 2006;

Anjum et al., 2018). Esto podría deberse a que la población era relativamente baja en nuestras muestras, o que no pudo ser detectado por la metodología utilizada. Disayathanoowat, Young, Helgason & Chantawannakul (2011), manifestaron que los grupos más comunes en el intestino de las abejas son las Proteobacterias y los Firmicutes, lo cual concuerda con nuestros resultados.



**Tabla 5.** Caracterización morfológica e identificación de las cepas bacterianas aisladas del tracto intestinal de *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

Cepa	Origen de la muestra para aislamiento	Morfología de colonias		Método de identificación
		Descripción macroscópica	Descripción microscópica	ADNr 16 S
		Forma, Borde, Elevación, Superficie, Consistencia, Color	Morfología bacteriana	Especie
UNCSAB09-01	Intestino Reina	Redonda, Regular, Plana, Lisa, Cremosa, Marrón	Bacilos Gram positivos	<i>Bacillus megaterium</i>
UNCSAB09-02	Intestino Reina	Redonda, Regular, Elevada, Lisa, Cremosa, Crema	Bacteria anaeróbica facultativa formadora de endosporas	<i>Paenibacillus provencensis</i>
UNCSAB09-03, UNCSAB09-14	Intestino Reina, Int_14-22	Puntiforme, Regular, Elevada, Lisa, Cremosa, Crema	Bacilos Gram positivos	<i>Bacillus licheniformis</i>
UNCSAB09-04	Intestino Reina	Irregular, Irregular, Plana, Lisa, Cremosa, Crema	Bacilos Gram positivos	<i>Bacillus cereus</i>
UNCSAB09-05, UNCSAB08-20	Intestino Reina, Int_gua	Redonda, Regular, Elevada, Viscosa, Cremosa, Crema	Bacilos Gram positivos	<i>Bacillus subtilis</i>
UNCSAB09-12	Int_10-13	Irregular, Irregular, Plana, Rugosa, Cremosa, Crema	Bacteria aeróbica, gram-variable, formadora de endosporas, oxidasa positiva	<i>Bacillus flexus</i>
UNCSAB09-21	Intestino Reina	Redonda, Regular, Elevada, Lisa, Cremosa, Blanco	Bacteria gramnegativa, Anaerobio facultativo	<i>Enterobacter cowanii</i>
UNCSAB09-22	Intestino Reina	Redonda, Regular, Elevada, Lisa, Cremosa, Blanco	Bacteria grampositiva catalasa negativa	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>

#### **4.5 Riqueza y abundancia de bacterias intestinales asociadas a diferentes edades y casta de *Trigona (Tetragonisca) angustula***

A partir de las 46 muestras de los diferentes estadios y edades de *Trigona (Tetragonisca) angustula* se registraron 34 aislamientos bacterianos agrupados en 14 morfotipos, de los cuales el 85.7% de ellos se aislaron en medio agar nutritivo y el 14.2% restante en el medio M.R.S (tabla

4). La mayoría de los aislamientos estuvieron asociados a *Enterobacter cowanii* y a *Leuconostoc pseudomesenteroides* con siete aislamientos cada uno. Por su parte el 78.5% de los morfotipos presentaron abundancias relativas menores al 1.5%, mientras que *Leuconostoc pseudomesenteroides* representó el 67% de la abundancia total registrada. La Tabla 6 muestra la frecuencia de morfotipos encontrados en cada uno de los estados de desarrollo y castas evaluados en este estudio.

**Tabla 6.** Características morfológicas de las bacterias aisladas de estadios de desarrollo y edades de obreras *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

Aspecto	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Paenibacillus provencensis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Morfotipo 6	<i>Bacillus flexus</i>	Morfotipo 8
Forma	Redonda	Redonda	Puntiforme	Irregular	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda
Borde	Regular	Regular	Regular	Irregular	Regular	Regular	Regular	Regular
Elevación	Plana	Elevada	Elevada	Plana	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada (pulvinada)
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Viscosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Color	Marron claro	Crema claro	Crema claro	Crema claro	Crema claro	Blanco	Amarillo	Crema
Figura								
Aspecto	Morfotipo 9	Morfotipo 10	Morfotipo 11	Morfotipo 12	<i>Enterobacter cowanii</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>		
Forma	Irregular	Irregular	Redonda	Puntiforme	Redonda	Redonda		
Borde	Irregular	Irregular	Regular	Regular	Regular	Regular		
Elevación	Plana	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada		
Superficie	Lisa	Rugosa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa		
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa		
Color	Crema oscuro	Crema claro	Crema claro	Crema claro	Blanco	Amarillo oscuro		
Figura								

Con respecto a la riqueza por estadios de desarrollo y edades de obreras, siete bacterias se encontraron en el intestino de la reina (*Bacillus megaterium*, *Paenibacillus provencensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Enterobacter cowanii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, seis en el intestino de abejas obreras de 14 a 22 días (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus flexus*, Morfotipo 11, Morfotipo 12, *Enterobacter cowanii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*) y cinco en el intestino de abejas obreras de 10 a 13 días (*Bacillus flexus*, Morfotipo 9, Morfotipo 10, y *Enterobacter cowanii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, lo cual corresponde al 71.4% de la riqueza total registrada. Nuestros resultados mostraron que la microbiota de larvas, pupas y adultos difiere sustancialmente en su composición. Esto concuerda con los trabajos realizados por Martinson, Moy & Moran (2012) y Powell, Martinson, Urban-Mead & Moran (2014), quienes encontraron que las larvas y las obreras recién emergidas de *A. mellifera* poseen muy pocas bacterias intestinales, pero a medida que transcurren los días estas poblaciones aumentan gradualmente en el íleon y en el intestino posterior.

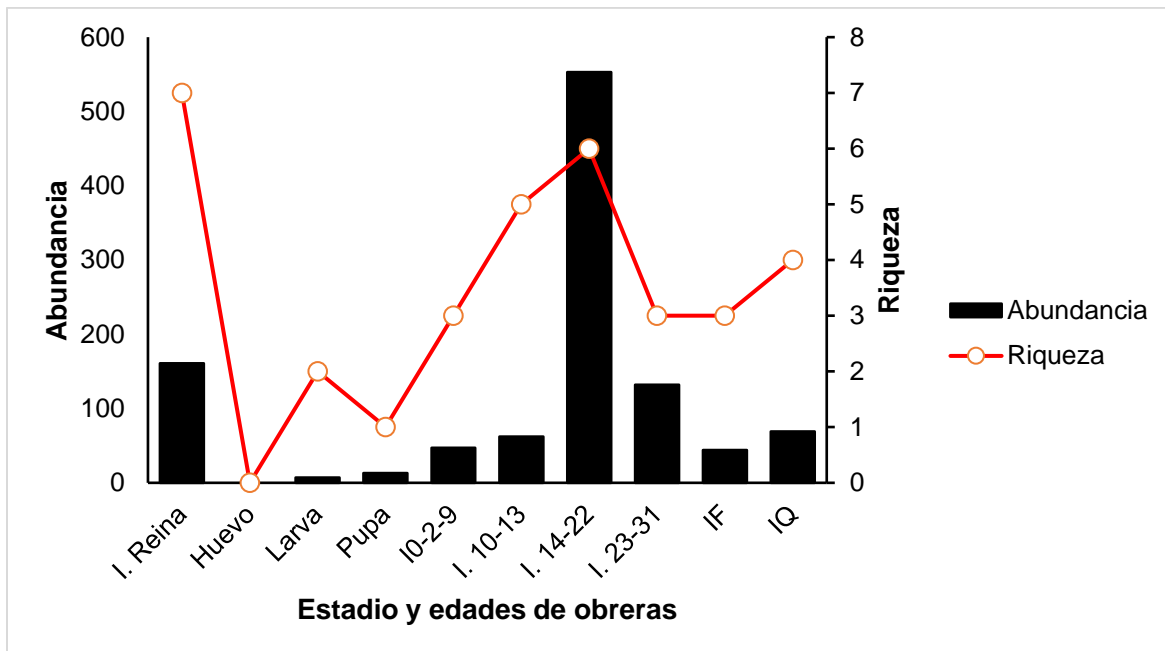
Las obreras que para este estudio fueron caracterizadas por edades, fue similar a pesar de diferir en algunas de las actividades realizadas, como componente común se aislaron diferentes especies del género *Bacillus*, como por ejemplo, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis* especies comunes en Apoidea y que podrían estar participando en la conversión metabólica del alimento, al producir enzimas como lipasas, aminopeptidasas, estererasas, proteasas, fosfatasas y glicosidasas, como también algunas cepas pueden tener actividad antimicrobiana contra organismos patógenos que podrían causar el deterioro del alimento almacenado y ayudar a la prevención de enfermedades en la colonia (Gilliam et al. 1990; Cano et al., 1994; Evans & Armstrong, 2005).

En la tabla 4 y Figura 13, se puede observar como la abundancia de los morfotipos bacterianos varía entre las diferentes edades de las obreras siendo muy superior en la edad de 14-22 días, casta que realiza la actividad de trofalaxis (en *Apis mellifera* es denominada “nurse”), esta casta cumple una labor importante al alimentar a las obreras más jóvenes y podría estar distribuyendo parte de la microbiota a las obreras jóvenes y reina como lo sugiere Kapleim et al. (2015) en su trabajo con *A. mellifera*. Es importante recordar, que parte de la microbiota asociada al tracto digestivo de las abejas es adquirido del polen de las plantas que visitan, especialmente especies del género *Bacillus* (Gilliam, Roubik & Lorenz 1990), adicionalmente factores climáticos, fuentes de alimentación pueden influir en la diversidad de bacterias asociadas (Corby-Harris, Maes &

Anderson, 2014). En los huevos no se obtuvo bacterias durante los cultivos, este resultado concuerdan con otros estudios como el de Gilliam (1997). Sin embargo, es importante tener presente que técnicas más robustas como estudios moleculares podrían revelar la presencia de especies no cultivables, como se ha reportado por Xu, Wu, Guo & Li (2014), detectaron la presencia de un pequeño número de cepas bacterianas *Gilliamella apicola* y *Snodgrassella alvi* en los huevos de *Bombus lantschouensis* mediante la secuenciación del gen 16S rDNA. Por otro lado, es importante mencionar que la microbiota de los estadios de *T. (T.) angustula* experimentó un cambio drástico en la abundancia a medida que envejecían, lo cual podría estar relacionado con la división reproductiva altamente dividida del trabajo, ya que como sabemos las adultas realizan trabajos laboriosos dentro y fuera de la colmena, que incluyen el de cuidar la descendencia, recolecta de néctar, polen, etc.

**Tabla 5.** Abundancia de morfotipos bacterianos (UFC) en las muestras intestinales aislada en estadios de desarrollo y edades de obreras de *Trigona (Tetragonisca) angustula*. Int\_Rei: Intestino Reina, Int\_I0-2-9: Intestino obrera de 2 a 9 días, Int\_10-13: Intestino obrera de 10 a 13 días, Int\_14-22: Intestino obrera de 14 a 22 días, Int\_23-31: Intestino obrera de 23 a 31 días, Int\_for: Intestino forrajera, Int\_gua: Intestino guardiana.

Estadio de desarrollo y edades	UFC	UFC/mL
Huevo	0	0
Larva	7	0.00007
Pupa	13	0.00013
Int_Rei	161	0.015011
Int_I0-2-9	47	0.000344
Int_10-13	62	0.0062
Int_14-22	553	0.001876
Int_23-31	132	0.000924
Int_for	44	0.00404
Int_gua	69	0.000231
<b>Total</b>	<b>1088</b>	<b>0.028826</b>



**Figura 13.** Riqueza y abundancia de microorganismos asociados a los estadios de desarrollo y edades de obreras de *Trigona (Tetragonisca) angustula*.

Las variaciones en la riqueza y abundancia bacteriana de *T. (T.) angustula* (Figura 13) posiblemente están asociados con diferencias en comportamiento, tipos de alimentación (polen y néctar), morfología intestinal (continuo en adultos y discontinuo en larvas) y condiciones climáticas (Martinson et al., 2012; Powell et al., 2014).

En la tabla 5 se observa como varía la abundancia de la microbiota entre las diferentes castas y edades, la microbiota en las larvas es menor comparado con las adultas jóvenes este resultado coincide con el trabajo realizado por Anderson et al. (2011), posiblemente esto se deba a la morfología del tracto digestivo, en el caso de *A. mellifera* se ha demostrado que poseen un intestino discontinuo, en el cual el intestino anterior está desconectado del posterior, para evitar que el área de alimentación se contamine con microorganismos procedentes de los excrementos de la larva, adicionalmente las obreras dejan un suministro de alimento que no solo les proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo, también va acompañada de la microbiota necesaria que garantice el óptimo aprovechamiento de nutrientes y actividad antimicrobiana para preservar el lugar libre de microorganismos oportunistas y patógenos (Martinson et al., 2012; Vojvodic et al., 2013; Evans & Armstrong, 2006; Cano et al., 1994). Anderson et al. (2011) y Evans & Armstrong (2006) reportan la presencia de una microbiota rica

en especies del género *Bacillus* con propiedad inhibitoria contra cepas de *Paenibacillus larvae* principal patógeno de las abejas.

La presencia de bacterias de la familia Enterobacteriaceae (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Hafnia*, *Klebsiella*, y *Erwinia*) son comúnmente aisladas del tracto digestivo de abejas, especialmente se han encontrado en la capsula rectal del intestino de *A. mellifera* (Lyapunov et al. 2008). La alta presencia de *Enterobacter cowanni* puede estar relacionada con la época del año en el que se realizó el trabajo, que estuvo caracterizado por las lluvias y bajas temperaturas, como lo siguiere Lyapunov y colaboradores al detectar un incremento de especies del genero *Klebsiella* durante el invierno.

La otra especie una bacteria anaeróbica facultativa, se aisló en alta proporción y estaba presente en casi todas las muestras fue *Leuconostoc pseudomesenteroides*, el género *Leuconostoc* es un género de bacterias del ácido láctico Gram- positivas, en abejas no ha sido reportado pero se encuentra en una amplia variedad de ambientes, como plantas, alimentos fermentados, silos de alimento y tractos gastrointestinales de animales (Okada et al., 2015). En la industria del alimento se reconoce por sus propiedades fermentativas y juega un papel muy importante en la formación de compuestos aromáticos (Meslier et al. 2012).

**Tabla 7.** Riqueza y abundancia de morfotipos asociados a los estadios y edades de *Trigona (Tetragonisca) angustula*. Int\_Rei: Intestino Reina, Int\_I0-2-9: Intestino obrera de 2 a 9 días, Int\_10-13: Intestino obrera de 10 a 13 días, Int\_14-22: Intestino obrera de 14 a 22 días, Int\_23-31: Intestino obrera de 23 a 31 días, Int\_for: Intestino forrajera, Int\_gua: Intestino guardiana.

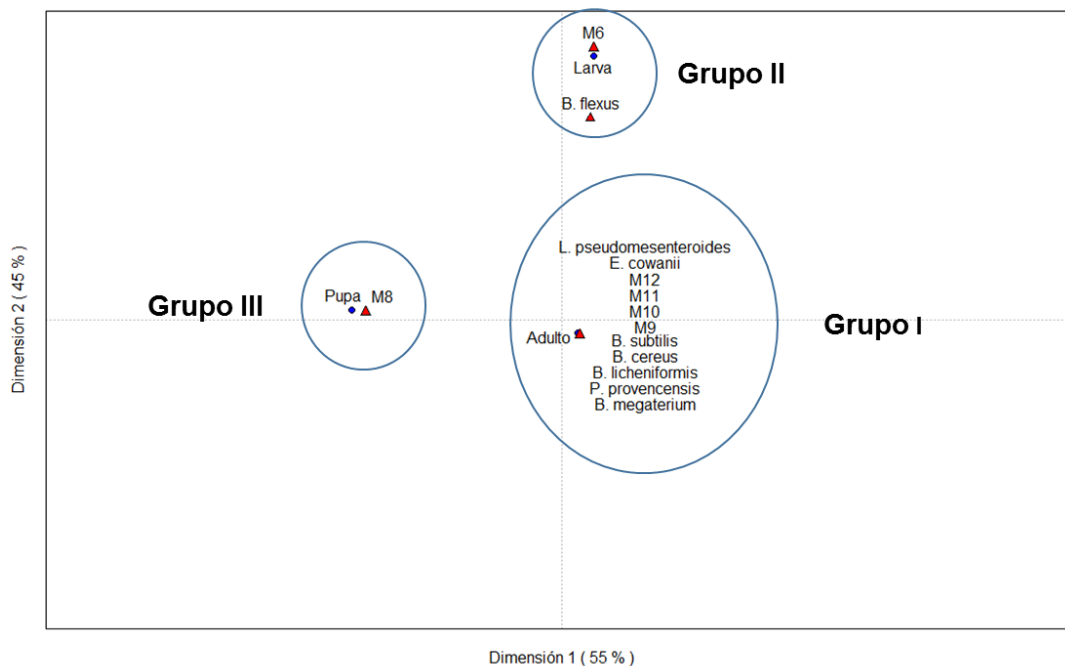
Morfotipos	Aislamientos	Huevo	Larva	Pupa	Int_Rei	Int_I0-2-9	Int_10-13	Int_14-22	Int_23-31	Int_for	Int_gua	Total	Identificaciones
Morfotipo 1	UNCSAB09-01				6							6	<i>Bacillus megaterium</i>
Morfotipo 2	UNCSAB09-02				1							1	<i>Paenibacillus provencensis</i>
Morfotipo 3	UNCSAB09-03				2							2	<i>Bacillus licheniformis</i>
	UNCSAB09-14						8					8	
Morfotipo 4	UNCSAB09-04				1							1	<i>Bacillus cereus</i>
Morfotipo 5	UNCSAB09-05				1							1	<i>Bacillus subtilis</i>
	UNCSAB09-20										13	13	
Morfotipo 6	UNCSAB09-06		2									2	Sin identificar
Morfotipo 7	UNCSAB09-07		5									5	<i>Bacillus flexus</i>
	UNCSAB09-12						7					7	
	UNCSAB09-16							6				6	
Morfotipo 8	UNCSAB09-08			13								13	Sin identificar
Morfotipo 9	UNCSAB09-09					3						3	Sin identificar
	UNCSAB09-10						12					12	
Morfotipo 10	UNCSAB09-11						5					5	Sin identificar
Morfotipo 11	UNCSAB09-13							2				2	Sin identificar
	UNCSAB09-17								8			8	
	UNCSAB09-19										5	5	

Morfotipos	Aislamientos	Huevo	Larva	Pupa	Int_Rei	Int_I0-2-9	Int_10-13	Int_14-22	Int_23-31	Int_for	Int_gua	Total	Identificaciones
Morfotipo 12	UNCSAB09-15							2				2	Sin identificar
	UNCSAB09-18									4		4	
Morfotipo 13	UNCSAB09-21				26							26	<i>Enterobacter cowanii</i>



	UNCSAB09-23					15						15	
	UNCSAB09-25						7					7	
	UNCSAB09-27							25				25	
	UNCSAB09-29								109			109	
	UNCSAB09-31									22		22	
	UNCSAB09-33										48	48	
Morfotipo 14	UNCSAB09-22				124							124	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	UNCSAB09-24					29						29	
	UNCSAB09-26						31					31	
	UNCSAB09-28							510				510	
	UNCSAB09-30								15			15	
	UNCSAB09-32									18		18	
	UNCSAB09-34										3	3	
<b>Número de colonias</b>		0	7	13	311	91	131	1600	271	106	123	<b>2653</b>	

El intercambio continuo de alimentos durante todas las etapas de desarrollo de estas abejas hace que el establecimiento y mantenimiento de las bacterias intestinales sea diferente a medida que envejecen, lo cual es consistente con nuestros datos que sugieren una comunidad bacteriana similar en las abejas adultas pero diferentes en los estadios iniciales. El análisis de componentes principales mostro una dispersión de los puntos en el plano, en donde los puntos azules en el plano representan los grupos de edades de abejas y los triángulos rojos los morfotipos bacterianos. En la Figura 14 se observa que tanto la riqueza como la abundancia de los microorganismos intestinales varían con el estado de desarrollo (círculos diferentes). Lo cual se refleja en los tres grupos formados, donde se presentan bacterias únicas por cada estadio, por ejemplo los especímenes adultos (obreras de diferentes edades) tienden a formar un grupo compacto debido a que cuentan con una microbiota homogénea (Grupo I). Este grupo estaba representado por *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus provencensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, M6, *Bacillus flexus*, M9, M10, M11, M12, *Enterobacter cowanii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*; mientras que en las larvas se encontraron M6 y *Bacillus flexus* (Grupo II). Finalmente, la pupa solo incluyo a M8 (Grupo III). Este resultado difiere del trabajo de Kaplem et al. (2015) en la cual los autores reportan que la microbiota asociada a la reina, conforman un grupo diferente, posiblemente los resultados se ven influenciados por las técnicas utilizadas y especies no cultivables no se ven reflejadas en el resultado final, no obstante si se observa que el número de bacterias aisladas del tracto digestivo de la reina fue mayor.



**Figura 14.** Análisis de correspondencia entre las muestras que se aislaron en el laboratorio, correspondientes a los estadios de *Trigona (Tetragonisca) angustula* y los morfotipos encontrados.

El análisis de similitud muestra resultados diferentes al análisis de componentes principales (Figura 14), pues muestra una clara separación entre los estados de desarrollo y la microbiota intestinal, de igual manera muestra que existe una mayor similitud entre el intestino de las obreras de 23 a 31 días (I. 23-31) y el intestino de las guardianas (33 a 35) (70%), ya que la composición de bacterias en el tracto intestinal de estas obreras forman un grupo compacto debido a que cuentan con una microbiota homogénea, podemos observar que comparten diferentes cepas bacterianas como por ejemplo: Morfotipo 11, *Enterobacter cowanii* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*. El huevo y la pupa fueron los más disimiles en cuanto a la composición de morfotipos de bacterias, ya que las muestras del intestino comparten un menor número de morfotipos o están ausentes (en los huevos) (tabla 6).



## Conclusiones

Caracterizar la microbiota intestinal de *T. (T.) angustula* constituye un punto fundamental en la ecología microbiana, ya que permite comprender mejor los beneficios y las ventajas competitivas que pueden ofrecer a sus especies hospedadoras. Muy seguramente, su origen o diversidad además de su supervivencia (de las bacterias) puede ser facilitado por el contacto social (por comportamiento de trofalaxis o de limpieza entre otros) o por el contacto con el entorno de la colmena y dependiendo de las diferentes labores de las obreras en la colonia.

Nuestros resultados demostraron que las obreras de la especie de *T. (T.) angustula* realizan una sucesión de tareas a medida que envejecen, tales como el mantenimiento de las crías dentro de la colmena, construcción de celdas, custodia de la entrada, así como la colecta de polen y néctar de flores fuera del nido.

Se encontraron diferencias sustanciales en las comunidades bacterianas del tracto digestivo de *T. (T.) angustula*, dichas diferencias están claramente asociadas a los diferentes estadios, al tipo de labor, a la forma del intestino y la dieta utilizada.

La comunidad microbiana de *T. (T.) angustula* estuvo dominada por los géneros que pertenecen a las Enterobacteriaceae (*Enterobacter cowanii*) y Firmicutes (*Leuconostoc pseudomesenteroides*), las cuales pueden ser bacterias simbióticas comunes asociadas al intestino.

Nuestros datos sugieren que entre obreras no hay una diferencia marcada en la microbiota aunque las obreras de 14 a 22 días presentaron un mayor número de especies y número de colonias.

Finalmente, el trabajo realizado permite separar en tres grupos bien definidos las castas de abejas de la especie *T. (T.) angustula*, sin embargo, la comunidad bacteriana de las abejas adultas tienden a formar un grupo compacto debido a que cuentan con una microbiota homogénea.

## Bibliografía

- Ahn, J., Hong, I., Bok, J., Kim, B., Song, J., & Weon, H. (2012). Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50(5), 735-745. <http://doi: 10.1007/s12275-012-2188-0>
- Al-Ghamdi, A., Ali Khan, K., Javed Ansari, M., Almasaudi, S., & Al-Kahtani, S. (2018). Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus* larvae infected bee larvae. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 25(2), 383-387. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.07.005
- Alippi, A., & Reynaldi, F. (2006). Inhibition of the growth of *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 91(3), 141-146. doi: 10.1016/j.jip.2005.12.002
- Almeida, E., & Porto, D. (2014). Investigating Eusociality in Bees while Trusting the Uncertainty. *Sociobiology*, 61(4). doi: 10.13102/sociobiology.v61i4.355-368
- Amaya-Marquez, M., & Wells, H. (2008) Social complexity and learning foraging tasks in bees. *Caldasia* 30(2), 469–477.
- Amdam G., Fennern E., & Havukainen, H. (2011) in: Neurobiology and behavior of honeybees, eds Galizia CG, Eisenhardt D, Giurfa M (Springer, Heidelberg), 17–29.
- Anderson, K. E, Sheehan T. H, Eckholm, B. J, Mott, B. M & DeGrandi-Hoffman, G. (2011) An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Soc* 58: 431–444.
- Anjum, S., Shah, A., Aurongzeb, M., Kori, J., Azim, M., Ansari, M., & Bin, L. (2018). Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 388-392. [doi: 10.1016/j.sjbs.2017.05.008](http://doi: 10.1016/j.sjbs.2017.05.008)
- Ascher, J.S. & Pickering, J. (2016) Discover Life Bee Species Guide and World Checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). [http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea\\_species](http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species) [draft 45, accessed 18 May 2016].

- Augusto, S., & Garofalo, C. (2009). Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 525-538. [doi: 10.4238/vol8-2kerr004](https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr004)
- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F., & Widmer, F. (2007). Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 600-610. [http://doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x](http://doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x)
- Baquero, L., & Stamatti, G. (2007). Cría y Manejo de Abejas sin aguijón. Fundación Pro Yungas. Ediciones Del Subtrópico.
- Barbosa, R., Leong, S., Vinnere-Pettersson, O., Chen, A., Souza-Motta, C., & Frisvad, J. et al. (2017). Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Studies in Mycology*, 86, 29-51. [doi: 10.1016/j.simyco.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.001)
- Beetsma, J. (1979). The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World*, 60(1), 24–39. <http://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097727>
- Breed, M., Guzmán-Novoa, E., & Hunt, G. (2004). Defensive behavior of honey bees: Organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 271–298. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123155>
- Breznak, J. (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 453-487. [http://doi: 10.1146/annurev.ento.39.1.453](http://doi:10.1146/annurev.ento.39.1.453)
- Camargo, C. (1972). Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Rev Brasil Biol*, 32 (1):133-138.
- Cano, R. J., Borucki, M. K., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H. N., Poinar, G. O., & Pollard, K. J. (1994). *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2164–2167.
- Cardinal, S., & Danforth, B. (2011). The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. *Plos ONE*, 6(6), e21086. [doi: 10.1371/journal.pone.0021086](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021086)
- Cardinal, S., Straka, J., & Danforth, B. (2010). Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16207-16211. [doi: 10.1073/pnas.1006299107](https://doi.org/10.1073/pnas.1006299107)

- Carina Audisio, M., Torres, M., Sabaté, D., Iburguren, C., & Apella, M. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*, 166(1), 1-13. [doi: 10.1016/j.micres.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003)
- Carvalho-Filho, F., & De Oliveira, F. (2017). Notes on the nesting biology of five species of Euglossini (Hymenoptera: Apidae) in the Brazilian Amazon. *Entomobrasilis*, 10(1), 64. [doi: 10.12741/ebrasilis.v10i1.672](https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v10i1.672)
- Carvalho-Zilse, G. (2005). *Criação de abelhas sem ferrão*. Manaus: ProVárzea/Ibama: Inpa.
- Chandler, J., Lang, J., Bhatnagar, S., & Eisen, J. (2011). Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: *Ecological Context of a Host – Microbe Model System*, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002272>
- Chouvenc, T., Efstathion, C., Elliott, M., & Su, N. (2013). Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1770), 20131885-20131885. [doi: 10.1098/rspb.2013.1885](https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1885)
- Corby-Harris, V., Maes, P., & Anderson, K. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Plos ONE*, 9(4), e95056. [doi: 10.1371/journal.pone.0095056](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095056)
- Cox-Foster, D., Conlan, S., Holmes, E., Palacios, G., Evans, J., & Moran, N. et al. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287. <http://doi: 10.1126/science.1146498>
- Cronin, A. (2001). Social flexibility in a primitively social allodapine bee (Hymenoptera: Apidae): results of a translocation experiment. *Oikos*, 94(2), 337-343. [doi: 10.1034/j.1600-015-0436-0](https://doi.org/10.1034/j.1600-015-0436-0)
- Cruz-Landim, C., Serrão J., & Silva-de-Moraes, R. (1996) Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios* 88: 95-104.
- da Silva, C., Stevens, M., & Schwarz, M. (2015). Casteless sociality in an allodapine bee and evolutionary losses of social hierarchies. *Insectes Sociaux*, 63(1), 67-78. [doi: 10.1007/s00040-015-0436-0](https://doi.org/10.1007/s00040-015-0436-0)
- Danforth, B. (2001). Evolution of sociality in a primitively eusocial lineage of bees. *Proceedings of the National Academy Of Sciences*, 99(1), 286-290. [doi: 10.1073/pnas.012387999](https://doi.org/10.1073/pnas.012387999)



- Danforth, B. (2007). Bees. *Current Biology*, 17(5), R156-R161. [doi: 10.1016/j.cub.2007.01.025](https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.025)
- Díaz, S., de Souza Urbano, S., Caesar, L., Blochtein, B., Sattler, A., Zuge, V., & Haag, K. (2017). Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 143, 35-39. [doi: 10.1016/j.jip.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.012)
- Dillon, R., & Dillon, V. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71-92. [http://doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123416](http://doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123416)
- Disayathanoowat, T., Young, J., Helgason, T., & Chantawannakul, P. (2011). T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(2), 273-281. [doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01216.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01216.x)
- Dohanik, V., Souza, E., Lisboa, L., Zanuncio, J., & Serrão, J. (2016). Development of antennal sensilla of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) during pupation. *Brazilian Journal of Biology*, 77(2), 284-288. [doi: 10.1590/1519-6984.12515](https://doi.org/10.1590/1519-6984.12515)
- Dukas, R., & Real, L. (1991). Learning foraging tasks by bees: a comparison between social and solitary species. *Animal Behaviour*, 42(2), 269-276. [doi: 10.1016/s0003-3472\(05\)80558-5](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(05)80558-5)
- Engel, P., & Moran, N. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699-735. [http://doi: 10.1111/1574-6976.12025](http://doi:10.1111/1574-6976.12025)
- Engel, P., Martinson, V., & Moran, N. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 11002-11007. [http://doi: 10.1073/pnas.1202970109](http://doi:10.1073/pnas.1202970109)
- Engels, W., & Imperatriz-Fonseca, V. L. 1990 Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In *Social insects. An evolutionary approach to castes and reproduction* (ed. W. Engels), pp. 167–230. Berlin, Heidelberg: Springer
- Evans, J., & Armstrong, T. (2005). Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 44(4), 168-171. [doi: 10.1080/00218839.2005.11101173](https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101173)

- Everaars J., & Dormann C. (2014). Simulation of solitary (non-*Apis*) bees competing for pollen. In: Devillers J, editor. In Silico Bees: CRC Press. p. 209–68.
- Flores-Prado, L. (2012). Evolución de la sociabilidad en Hymenoptera: Rasgos conductuales vinculados a niveles sociales y precursores de sociabilidad en especies solitarias. *Revista Chilena De Historia Natural*, 85(3), 245-266. doi: [10.4067/s0716-078x2012000300001](https://doi.org/10.4067/s0716-078x2012000300001)
- Flores-Prado, L., Chiappa, E., & Mante, M. (2012). Interacciones entre hembras de *Protandrena evansi* (Hymenoptera: Andrenidae), una abeja de nidificación comunal. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(1), 118-123. Retrieved March 25, 2019, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882012000100021&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882012000100021&lng=en&tlng=es).
- Gibbs, J., Brady, S., Kanda, K., & Danforth, B. (2012). Phylogeny of halictine bees supports a shared origin of eusociality for *Halictus* and *Lasioglossum* (Apoidea: Anthophila: Halictidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(3), 926-939. doi: [10.1016/j.ympev.2012.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.013)
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1), 1-10. doi: [10.1016/s0378-1097\(97\)00337-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(97)00337-6)
- Gilliam, M., Prest, D., & Lorenz, B. (1989). Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*, 20(1), 53-68. [http://doi: 10.1051/apido:19890106](http://doi:10.1051/apido:19890106)
- Gilliam, M., Roubik, D., & Lorenz, B. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21(2), 89-97. doi: [10.1051/apido:19900201](https://doi.org/10.1051/apido:19900201)
- Grosso Ferreira, A., & Bego Rolandi, L. (2002). Labor division, average life span, survival curve, and nest architecture of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Sociobiology* 40: 615-637.
- Gruter, C., Menezes, C., Imperatriz-Fonseca, V., & Ratnieks, F. (2012). A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(4), 1182-1186. doi: [10.1073/pnas.1113398109](https://doi.org/10.1073/pnas.1113398109)

- Hammel, B., Vollet-Neto, A., Menezes, C., Nascimento, F., Engels, W., & Grüter, C. (2016). Soldiers in a stingless bee. *The American Naturalist*, 187(1), 120-129. <http://doi:10.1086/684192>
- Hammer, O., D. Harper & P. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*, 4: 1-9.
- Hughes, W., Oldroyd, B., Beekman, M., & Ratnieks, F. (2008). Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science*, 320(5880), 1213-1216. [doi:10.1126/science.1156108](http://doi:10.1126/science.1156108)
- Jeyaprakash, A., Hoy, M., & Allsopp, M. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 84(2), 96-103. [doi:10.1016/j.jip.2003.08.007](http://doi:10.1016/j.jip.2003.08.007)
- Kamil, A. (2004). Sociality and the evolution of intelligence. *Trends In Cognitive Sciences*, 8(5), 195-197. [doi: 10.1016/j.tics.2004.03.002](http://doi:10.1016/j.tics.2004.03.002)
- Kapheim, K., Rao, V., Yeoman, C., Wilson, B., White, B., Goldenfeld, N., & Robinson, G. (2015). Caste-specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*, 10(4), e0123911. [http://doi: 10.1371/journal.pone.0123911](http://doi:10.1371/journal.pone.0123911)
- Keller, L. (2003). Behavioral plasticity: levels of sociality in bees. *Current Biology*, 13(16), R644-R645. [doi: 10.1016/s0960-9822\(03\)00571-2](http://doi:10.1016/s0960-9822(03)00571-2)
- Kerr, W. E., Stort, A. C., & Montenegro, M. J. (1966). Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas no gênero *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38(1), 149–168.
- Khan, K., Ansari, M., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Harakeh, S., & Iqbal, J. (2017). Investigation of gut microbial communities associated with indigenous honey bee (*Apis mellifera jemenitica*) from two different eco-regions of Saudi Arabia. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 24(5), 1061-1068. [doi: 10.1016/j.sjbs.2017.01.055](http://doi:10.1016/j.sjbs.2017.01.055)
- Killer, J., Dubna, S., Sedlacek, I., & Svec, P. (2013). *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents

- of American and European foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 1), 152-157. <http://doi: 10.1099/ijs.0.053033-0>
- Klaus, H., Gustavo, M., Carla, J., Goncalo, P., Weyder, S., Rodrigo, D., & Bitondi, M. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37(6), 144–163. <http://doi.org/10.1051/apido>
- Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19288-19292. <http://doi: 10.1073/pnas.1110474108>
- Koch, H., Abrol, D., Li, J., & Schmid-Hempel, P. (2013). Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology*, 22(7), 2028-2044. [doi: 10.1111/mec.12209](http://doi: 10.1111/mec.12209)
- Koch, H., Cisarovsky, G., & Schmid-Hempel, P. (2012). Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 81(6), 1202-1210. <http://doi: 10.1111/j.1365-2656.2012.02004.x>
- Kocher, S., & Paxton, R. (2014). Comparative methods offer powerful insights into social evolution in bees. *Apidologie*, 45(3), 289-305. [doi: 10.1007/s13592-014-0268-3](http://doi: 10.1007/s13592-014-0268-3)
- Kwapong P., Aidoo, K., Combey dan, R., & karikari, A. (2010). Stingless bees. importance management and utilisation. A training manual for stingless beekeeping Unimax Macmillan LTD.
- Kwong, W., & Moran, N. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384. <http://doi: 10.1038/nrmicro.2016.43>
- Kwong, W., Medina, L., Koch, H., Sing, K., Soh, E., & Ascher, J. et al. (2017). Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances*, 3(3), e1600513. [doi: 10.1126/sciadv.1600513](http://doi: 10.1126/sciadv.1600513)
- Leonhardt, S., & Kaltenpoth, M. (2014). Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *Plos ONE*, 9(8), e105718. [doi: 10.1371/journal.pone.0105718](http://doi: 10.1371/journal.pone.0105718)

- Libbrecht, R., & Keller, L. (2015). The making of eusociality: insights from two bumblebee genomes. *Genome Biology*, 16(1). doi: [10.1186/s13059-015-0635-z](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0635-z)
- Lim, H., Chu, C., Seufferheld, M., & Cameron, S. (2015). Deep sequencing and ecological characterization of gut microbial communities of diverse bumble bee species. *PLOS ONE*, 10(3), e0118566. [http://doi: 10.1371/journal.pone.0118566](http://doi:10.1371/journal.pone.0118566)
- Lisboa, L., Serrao, J., Cruz-Landim, C., & Campos, L. (2005). Effect of Larval Food Amount on Ovariole Development in Queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae). *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 34(3), 179-184. [http://doi: 10.1111/j.1439-0264.2005.00591.x](http://doi:10.1111/j.1439-0264.2005.00591.x)
- Lockhart, P. J., & Cameron, S. A. (2001). Trees for bees. *Trends in ecology and evolution*, 16(2), 84–88. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02054-1](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02054-1)
- Lyapunov, YaE, Kuzyaev, R.Z., Khismatullin, R.G., Bezgodova, O.A. (2008) Intestinal enterobacteria of the hibernating *Apis mellifera mellifera* L. bees. *Microbiology* 77, 421–428
- Martínez, D. (2015). Estandarización de protocolo para la división de nidos de la especie *Tetragonisca angustula* y evaluación de su adaptación a diferentes diseños de colmenas en La Mesa (Cundinamarca). Tesis de pregrado.
- Martinson, V., Danforth, B., Minckley, R., Rueppell, O., Tingek, S., & Moran, N. (2010). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3), 619-628. doi: [10.1111/j.1365-294x.2010.04959.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04959.x)
- MARTINSON, V., DANFORTH, B., MINCKLEY, R., RUEPPELL, O., TINGEK, S., & MORAN, N. (2010). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3), 619-628. doi: [10.1111/j.1365-294x.2010.04959.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04959.x)
- Martinson, V., Moy, J., & Moran, N. (2012). Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(8), 2830-2840. doi: 10.1128/aem.07810-11

- Martinson, V., Moy, J., y Moran, N. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the Honeybee Worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2830-2840. <http://doi.org/10.1128/AEM.07810-11>
- Mateus, S., Ferreira – Caliman, M.J., Menezes, C., Grüter, C. (2019) Beyond temporal – polyethism: division of labor in the eusocial bee *Melipona marginata*. *Insectes Sociaux*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-019-00691-2>
- Meeus, I., Parmentier, L., Billiet, A., Maebe, K., Van Nieuwerburgh, F., & Deforce, D. et al. (2015). 16S rRNA Amplicon Sequencing Demonstrates that Indoor-Reared Bumblebees (*Bombus terrestris*) Harbor a Core Subset of Bacteria Normally Associated with the Wild Host. *PLOS ONE*, 10(4), e0125152. doi: 10.1371/journal.pone.0125152
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F., Venturieri, G., & Imperatriz-Fonseca, V. (2013). The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. *Pot-Honey*. [http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7\\_10](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10)
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Marsaioli, A., Zampieri, D., Fontoura, I., Luchessi, A., & Imperatriz-Fonseca, V. (2015). A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*, 25(21), 2851-2855. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.028
- Michener, C. (1969). Comparative social behavior of bees. *Annual Review of Entomology* 14: 299-342.
- Michener, C. (1974). *The Social Behavior of the Bees*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Michener, C.D. (2007) *The Bees of the World*. 2nd Edition, John Hopkins University Press, Baltimore.
- Mohr, K., & Tebbe, C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8(2), 258-272.
- Morales Soto, G., Botero Garces, N., & García Mejía, I. (1999). Observaciones sobre algunos comportamientos de *Trigona (Tetragonisca) angustula*. Illiger (Hym. Apidae), 52(2), 721–732.

- Moran, N. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 Suppl, 8627–8633. <http://doi.org/10.1073/pnas.0611659104>
- Moran, N., & Baumann, P. (1994). Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. *Trends In Ecology y Evolution*, 9(1), 15-20.
- Moran, N., Hansen, A., Powell, J., & Sabree, Z. (2012). Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *Plos ONE*, 7(4), e36393. doi: 10.1371/journal.pone.0036393
- Moritz, B., & Crailsheim, K. (1987). Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal Of Insect Physiology*, 33(12), 923-931. doi: [10.1016/0022-1910\(87\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90004-7)
- Nates-Parra G. N., & Rosso-Londoño, J. M (2013). Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) utilizadas en meliponicultura en Colombia. *Acta biológica Colombiana*, 18(3): 415-426.
- Nates-Parra, G. (2001). Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana*, 2(3):233–248.
- Nates-parra, G., Lopera, A. V., & Briceño, C. V. (1989). Ciclo de desarrollo de *Trigona (Tetragonisca) angustula*, Latreille 1811 (Hymenoptera, Trigonini). *Acta Biológica Colombiana*, 5(1).
- Neff, J. (2008). Components of nest provisioning behavior in solitary bees (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie*, 39(1), 30-45. doi: [10.1051/apido:2007055](https://doi.org/10.1051/apido:2007055)
- Nogueira-neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo, SP. Edição Nogueirapis, 446p.
- Obregón, D., Rodríguez, A., Chamorro, F., & Nates-Parra, G. (2013). Pot-Honey. In P. Vit, S. R. M. Pedro, y D. Roubik (Eds.), *Pot-Honey* (pp. 337–346). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>

- Olofsson, T., & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57(4), 356-363. [doi: 10.1007/s00284-008-9202-0](https://doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0)
- Olofsson, T., & Vásquez, A. (2009). Phylogenetic comparison of bacteria isolated from the honey stomachs of honey bees *Apis mellifera* and bumble bees *Bombus* spp. *Journal Of Apicultural Research*, 48(4), 233-237. [doi: 10.3896/ibra.1.48.4.02](https://doi.org/10.3896/ibra.1.48.4.02)
- Olofsson, T., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, E., & Vasquez, A. (2014). *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 9), 3109-3119. [doi: 10.1099/ijs.0.059600-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.059600-0)
- Oster, G. F., and E. O. Wilson. 1978. Caste and ecology in the social insects. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Page, R. E., & Erber, J. (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften*, 89(3), 91–106. <http://doi.org/10.1007/s00114-002-0299-x>
- Paludo, C., Menezes, C., Silva-Junior, E., Vollet-Neto, A., Andrade-Dominguez, A., & Pishchany, G. et al. (2018). Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific Reports*, 8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19583-9>
- Parmentier, A., Meeus, I., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Vandamme, P., & Smagghe, G. (2016). A different gut microbial community between larvae and adults of a wild bumblebee nest (*Bombus pascuorum*). *Insect Science*, 25(1), 66-74. [doi: 10.1111/1744-7917.12381](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12381)
- Parmentier, L., Meeus, I., Mosallanejad, H., de Graaf, D., & Smagghe, G. (2015). Plasticity in the gut microbial community and uptake of Enterobacteriaceae (Gammaproteobacteria) in *Bombus terrestris* bumblebees' nests when reared indoors and moved to an outdoor environment. *Apidologie*, 47(2), 237-250. [doi: 10.1007/s13592-015-0393-7](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0393-7)
- Parra, M. (1990). Abejas de Colombia. III. Clave para géneros y subgéneros de Meliponinae (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana* 115-128.



- Paxton, R., Kukuk, P., & Tengö, J. (1999). Effects of familiarity and nestmate number on social interactions in two communal bees, *Andrena scotica* and *Panurgus calcaratus* (Hymenoptera, Andrenidae). *Insectes Sociaux*, 46(2), 109-118. doi: [10.1007/s000400050120](https://doi.org/10.1007/s000400050120)
- Peters, R., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., & Meusemann, K. et al. (2019). Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology* 27, 1013–1018.
- Poulsen, M., Cafaro, M., Erhardt, D., Little, A., Gerardo, N., & Tebbets, B. et al. (2009). Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Environmental Microbiology Reports*, 2(4), 534-540. doi: [10.1111/j.1758-2229.2009.00098.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00098.x)
- Powell, J., Martinson, V., Urban-Mead, K., & Moran, N. (2014). Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Applied And Environmental Microbiology*, 80(23), 7378-7387. doi: 10.1128/aem.01861-14
- Prato, M., & Soares, A. E. E. (2013). Production of sexuals and mating frequency in the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae). *Neotropical Entomology*, 42(5), 474–482. <http://doi.org/10.1007/s13744-013-0154-0>
- Promnuan, Y., Kudo, T., Ohkuma, M., & Chantawannakul, P. (2012). *Streptomyces Chiangmaiensis* sp. nov. and *Streptomyces lannensis* sp. nov., isolated from the South-East Asian stingless bee (*Tetragonilla collina*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 5), 1896-1901. doi: [10.1099/ijs.0.045930-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.045930-0)
- Rasmussen, C. & S. Cameron. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society* 99:206–232.
- Ratnieks, F. (2001). Heirs and spares: Caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(5), 467–473. <http://doi.org/10.1007/s002650100388>
- Rehan, S., & Richards, M. (2010). Nesting biology and subsociality in *Ceratina calcarata* (Hymenoptera: Apidae). *The Canadian Entomologist*, 142(01), 65-74. doi: [10.4039/n09-056](https://doi.org/10.4039/n09-056)
- Rehan, S., & Richards, M. (2013). Reproductive aggression and nestmate recognition in a subsocial bee. *Animal Behaviour*, 85(4), 733-741. doi: [10.1016/j.anbehav.2013.01.010](https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.01.010)

- Rehan, S., Berens, A., & Toth, A. (2014). At the brink of eusociality: transcriptomic correlates of worker behaviour in a small carpenter bee. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1). doi: [10.1186/s12862-014-0260-6](https://doi.org/10.1186/s12862-014-0260-6)
- Rehan, S., Glastad, K., Lawson, S., & Hunt, B. (2016). The genome and methylome of a subsocial small carpenter bee, *Ceratina calcarata*. *Genome Biology and Evolution*, 8(5), 1401-1410. doi: [10.1093/gbe/evw079](https://doi.org/10.1093/gbe/evw079)
- Rodriguez-Serrano, E., Inostroza-Michael, O., Avaria-Llautureo, J., & Hernandez, C. (2012). Colony size evolution and the origin of eusociality in corbiculate bees (Hymenoptera: Apinae). *Plos ONE*, 7(7), e40838. doi: [10.1371/journal.pone.0040838](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040838)
- Romiguier, J., Cameron, S., Woodard, S., Fischman, B., Keller, L., & Praz, C. (2015). Phylogenomics controlling for base compositional bias reveals a single origin of eusociality in corbiculate bees. *Molecular Biology and Evolution*, 33(3), 670-678. doi: [10.1093/molbev/msv258](https://doi.org/10.1093/molbev/msv258)
- Rosa, C., & Lachance, M. (2005). *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana*. 6: 27-29.
- Rosa, C., Lachance, M., Silva, J., Teixeira, A., Marini, M., Antonini, Y., & Martins, R. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 271-275. doi: [10.1016/s1567-1356\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/s1567-1356(03)00173-9)
- Sabaté, D., Carrillo, L., & Carina Audisio, M. (2009). Inhibition of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Research In Microbiology*, 160(3), 193-199. doi: 10.1016/j.resmic.2009.03.002
- Sakagami, S. (1966). Techniques for the observation of behaviour and social organization of stingless bees by using a special hive. *Papéis Avulsos Do Departamento de Zoologia*.
- Sakagami, S. F., & Zucchi, R. (1974). Oviposition Behavior of Two Dwarf Stingless Bees, *Hypotrigona (Leurotrigona) muelleri* and *H (Trigonisca) duckei*, with Notes on the Temporal Articulation of Oviposition Process in Stingless Bees (With 27 Text-figures and 8 Tables). *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI. ZOOLOGY*, 19(2), 361-421.

- Sakagami, S. F., Beig, D., Zucchi, R., & Akahira, Y. (1963). Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees.
- Santo Domingo, J., Kaufman, M., Klug, M., Holben, W., Harris, D., & Tiedje, J. (1998). Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Molecular Ecology*, 7(6), 761-767. [http://doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00390.x](http://doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00390.x)
- Scheiner, R., Abramson, C. I., Brodschneider, R., Crailsheim, K., Farina, W. M., Fuchs, S., & Thenius, R. (2013). Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–58. <http://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.04>
- Schultz, T. R., Engel, M. S., & Aschier, J. S. (2001). Evidence for the origin of eusociality in the corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 74(1), 10–16.
- Silva, W., & Paz, J. (2012). Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza Online*.
- Silva-Matos, E. V, Noll, F. B., & Zucchi, R. (2000). Sistemas de regulação social encontrados em abelhas altamente eussociais (Hymenoptera; Apidae, Meliponinae). *Anais IV Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto*, 95–101.
- Stark, R., Hefetz, A., Gerling, D., & Velthuis, H. (1990). Reproductive competition involving oophagy in the socially nesting bee *Xylocopa sulcatipes*. *Naturwissenschaften*, 77(1), 38-40. [doi: 10.1007/bf01131797](http://doi:10.1007/bf01131797)
- Szolderits, M., & Crailsheim, K. (1993). A comparison of pollen consumption and digestion in honeybee (*Apis mellifera carnica*). *Drones and Workers*, 39(10), 877–881.
- Tarpy, D., Mattila, H., & Newton, I. (2015). Development of the Honey Bee Gut Microbiome throughout the Queen-Rearing Process. *Applied And Environmental Microbiology*, 81(9), 3182-3191. doi: 10.1128/aem.00307-15
- Teixeira, A., Marini, M., Nicoli, J., Antonini, Y., Martins, R., Lachance, M. & Rosa, C. (2003) *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 339-343. [doi:10.1099/ijs.0.02262-0](http://doi:10.1099/ijs.0.02262-0)
- Thompson, G. J., & Oldroyd, B. P. (2004). Evaluating alternative hypotheses for the origin of

- eusociality in corbiculate bees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(2), 452–456. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.06.016>
- Tierney, S., Smith, J., Chenoweth, L., & Schwarz, M. (2008). Phylogenetics of allodapine bees: a review of social evolution, parasitism and biogeography. *Apidologie*, 39(1), 3-15. [doi: 10.1051/apido:2007045](https://doi.org/10.1051/apido:2007045)
- Torres, A., Hoffmann, W., & Lamprecht, I. (2009). Thermal investigations of a nest of the stingless bee *Trigona (Frieseomelitta) nigra paupera* provancher in Colombia. *Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry*, 95(3), 737-741. doi: 10.1007/s10973-008-9466-4
- VanEngelsdorp, D., Evans, J., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., & Nguyen, B. et al. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *Plos ONE*, 4(8), e6481.
- Vasquez, A., & Olofsson, T. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apicult Res*, 48: 189–195.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *Plos ONE*, 7(3), e33188. doi: 10.1371/journal.pone.0033188
- Veen, J., & Sommeijer, M. (2000). Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini), 47, 70–75.
- Vojvodic, S., Rehan, S., & Anderson, K. (2013). Microbial gut diversity of africanized and european honey bee larval instars. *Plos ONE*, 8(8), e72106. [doi: 10.1371/journal.pone.0072106](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072106)
- WANG, M., ZHAO, W., XU, H., WANG, Z., & HE, S. (2015). *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. *European Journal Of Entomology*, 112(4), 619-624. doi: 10.14411/eje.2015.095
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., & Wright, R. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931–949. <http://doi.org/10.1038/nature05260>
- Wille, A. (1983). Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 41-64. [doi: 10.1146/annurev.en.28.010183.000353](https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.000353)

- Wilson, E. O., & Hölldobler, B. (2005). Eusociality: Origin and consequences. *PNAS*, 102(38), 651–652. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.10.009>
- Winston, L. (2014). The division of labor among worker honey bees (Hymenoptera : Apidae): The effects of multiple patriline Author (s): S. A .Kolmes, M. L. Winston and L. A. Fergusson Source : *Journal of the Kansas Entomological Society* , Vol . 62 , No . 1 ( Jan , 62(1), 80–95.
- Winston, M. L., Michener, C. D., & Canada, A. (1977). Dual origin of highly social behavior among bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), 1135–1137. <http://doi.org/10.1073/pnas.74.3.1135>
- XU Long-long, WU Jie, GUO Jun, LI Ji-lian. Dynamic Variation of Symbionts in Bumblebees During Hosts Growth and Development. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(10): 2030-2037 [doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2014.10.017](http://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2014.10.017)