



ESTADO PLURINACIONAL DE
BOLIVIA

MINISTERIO DE
DESARROLLO RURAL Y TIERRAS



MINISTERIO DE DESARROLLO RURAL Y TIERRAS

**PROGRAMA NACIONAL DE FORTALECIMIENTO Y APOYO A LA
PRODUCCIÓN APÍCOLA, BAJO CRITERIOS DE RESILIENCIA AL
CAMBIO CLIMÁTICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACION AGRPECUARIA Y
FORESTAL**

**PROYECTO: “DESARROLLO DE TECNOLOGÍA E INVESTIGACIÓN
PARA EL MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN APÍCOLA EN
BOLIVIA”**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES
MELÍFERAS, MELIPONAS Y
POLINIZADORAS PARA ÁREAS
PROTEGIDAS, VALLES MESO TÉRMICOS,
TRÓPICO, AMAZONIA, CHACO Y
CHIKUITANIA BOLIVIANA**

BOLIVIA

2024



INDICE GENERAL

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ABEJAS MANEJADAS Y NATIVAS PRODUCTORAS DE MIEL Y OTROS PRODUCTOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA APÍCOLA DENTRO DE TODO EL TERRITORIO DE INTERVENCIÓN DEL PROGRAMA NACIONAL APÍCOLA: CARACTERIZACIÓN DE ECOTIPOS (SUBESPECIES Y/O RAZAS) DE *APIS MELLIFERA*

1	<i>ANTECEDENTES</i>	1
2	<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
3	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	3
4	<i>CARACTERÍSTICAS DE APIS MELLIFERA</i>	3
5	<i>OBJETIVO GENERAL</i>	4
5.1	Objetivos Específicos.....	4
6	<i>ESTUDIO DE MORFOMETRIA GEOMETRICA</i>	4
6.1	Protocolo obtención de muestras en campo	4
a)	<i>Objeto</i>	5
b)	<i>Alcance</i>	5
c)	<i>Material</i>	5
d)	<i>Actividades previas a la colecta</i>	6
e)	<i>Actividades en el ingreso al apiario el día de la colecta:</i>	6
f)	<i>Actividades en el apiario:</i>	7
g)	<i>Actividades a la salida del apiario el día de colecta:</i>	7
h)	<i>Actividades en la sede o lugar de acopio:</i>	7
6.2	Análisis por morfometría geométrica.....	8
6.2.1	Muestras de Apis mellifera analizadas de 900 individuos.....	12
6.3	Microfotografías para análisis de morfometría.....	12
6.4	Obtención de landmarks y variables morfométricas	13
6.5	Análisis estadístico.....	15
6.6	Resultados del análisis de morfometría.....	15
7	<i>Análisis de biología molecular</i>	18
7.1	Metodología.....	18
7.2	Preparación de las librerías mediante código de barras y secuenciación	20



7.3	Análisis bioinformático	21
7.4	Secuenciación gen COX1	22
7.5	Árbol filogenético	22
7.6	Resultados del análisis genético	23
8	Discusión.....	26
9	Conclusiones.....	29
DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE CONSTRUCCIÓN DE TIPOS DE NIDO, TIPOS DE ENTRADA AL NIDO Y MATERIAL UTILIZADO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PIQUERAS, DISTRIBUCIÓN, COMPORTAMIENTO DE PECOREO, PARA SU CLASIFICACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE LAS ESPECIES Y VARIEDADES EN ABEJAS NATIVAS		
10	<i>Abejas sin aguijón de la tribu Meliponini (Apidae)</i>	30
11	<i>Meliponicultura en Bolivia</i>	30
12	<i>Taxonomía de las abejas sin aguijón</i>	31
13	<i>Especies de abejas sin aguijón y aquellas manejadas en Bolivia</i>	33
14	<i>Características biológicas</i>	34
14.1	<i>Individuos de la colonia.</i>	34
14.2	<i>Nidos</i>	34
a)	<i>Estructura general</i>	34
b)	<i>Tamaño, forma y ubicación del nido</i>	34
c)	<i>Materiales de construcción</i>	34
d)	<i>Reservas de alimento</i>	35
e)	<i>Cría</i>	35
f)	<i>Piqueras</i>	35
g)	<i>Defensa</i>	35
14.3	<i>Colmena artificiales</i>	35
15	<i>Especie colectadas en el trabajo de campo de la consultoría</i>	36
15.1	<i>Tetragonisca angustula (Latreille, 1811)</i>	36
15.1.1	<i>Nombre común: Señorita</i>	36
a)	<i>Morfología observable</i>	36
b)	<i>Nidificación</i>	37
c)	<i>Características de la piquera</i>	38
d)	<i>Comportamiento de pecoreo</i>	38



e) <i>Diferencia con las Apis mellifera</i>	39
f) <i>Distribución</i>	39
15.2 <i>Melipona</i> Moure, 1942.....	40
15.2.1 Especies registrados y sus características	40
a) <i>Morfología observable</i>	40
b) <i>Nidificación</i>	41
c) <i>Características de la piquera</i>	41
d) <i>Comportamiento de pecoreo</i>	41
e) <i>Distribución</i>	41
15.2.2 <i>Melipona</i> (Michmelia) <i>eburnea</i> Friese, 1900	42
a) <i>Morfología observable</i>	42
b) <i>Nidificación</i>	43
c) <i>Características de la piquera</i>	43
d) <i>Comportamiento de pecoreo</i>	44
e) <i>Distribución</i>	44
15.3 <i>Scaptotrigona</i> Moure, 1942	45
15.3.1 <i>Scaptotrigona depilis</i> (Moure, 1942)	45
a) <i>Morfología observable</i>	45
b) <i>Nidificación</i>	46
c) <i>Características de la piquera</i>	46
d) <i>Comportamiento de pecoreo</i>	46
e) <i>Distribución</i>	46
6.3.2. <i>Scaptotrigona polysticta</i> Moure, 1950.....	47
a) <i>Morfología observable</i>	47
b) <i>Nidificación</i>	48
c) <i>Características de la piquera</i>	49
d) <i>Comportamiento de pecoreo</i>	49
e) <i>Distribución</i>	50
15.4 <i>Nannotrigona</i> Cockerell (1922)	50
a) <i>Morfología observable</i>	50
b) <i>Nidificación y características de la piquera</i>	51
c) <i>Pecoreo</i>	52



d) Distribución.....	52
15.5 <i>Partamona</i> (Schwartz, 1948).....	53
a) Morfología observable.....	53
b) Nidificación y características de la piquera.....	54
c) Pecoreo	55
c) Distribución.....	55
15.6 <i>Trigona</i> Jurine, 1807.....	55
a) Morfología observable	55
b) Nidificación y características de la piquera.....	55
c) Distribución.....	57
15.7 <i>Plebeia</i> Schwartz, 1938.....	58
a) Morfología observable	58
b) Nidificación y características de la piquera.....	58
c) Distribución.....	59
15.8 <i>Scaura</i> Schwartz, 1938	60
a) Morfología observable	60
b) Nidificación y características de la piquera.....	61
c) Distribución.....	62
15.9 <i>Oxytrigona Scaura</i> Cockerell, 1917	62
a) Morfología observable	62
b) Nidificación y características de la piquera.....	63
c) Distribución.....	63
15.10 <i>Tetragona</i> Lepeletier & Audinet-Serville, 1828	64
a) Morfología observable	64
b) Nidificación y características de la piquera.....	64
c) Distribución.....	64
15.11 <i>Ptilotrigona</i> Moure, 1951	65
a) Morfología observable	65
b) Nidificación y características de la piquera.....	66
c) Distribución.....	66
16 Conclusiones	66



17	Recomendaciones:	67
18	Referencias.....	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Registros de linajes y subespecies por morfomeitra, de 900 muestras <i>A. mellifera</i> de Bolivia.....	15
Tabla 2. Similitud genética de 900 muestras de <i>A. mellifera</i> de Bolivia	25
Tabla 3. Relación taxonómica de las abejas sin aguijón.....	31
Tabla 4. Lista de géneros para Bolivia y aquellas manejadas.....	33

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Buenas prácticas en el apiario	8
Figura N° 2: Organización de las muestras de campo.....	8
Figura N° 3: Selección de cada muestra individual.....	9
Figura N° 4: Disposición de cada muestra debajo el estereomicroscopio.....	9
Figura N° 5: Obtención de cada ala.	10
Figura N° 6: Montaje de cada ala.....	10
Figura N° 7: Lámina ya terminada con las alas montadas aptas para microfotografía.	11
Figura N° 8: Laminario con las láminas de cada par de alas	11
Figura N° 9: Obtención de microfotografías mediante la cámara del estereomicroscopio.....	12
Figura N° 10: Puntos homólogos en el ala de <i>Apis mellifera</i> para análisis por morfometría geométrica	13
Figura N° 11: Ejemplo de la presentación de la base de datos de alas de 900 muestras, con puntos Puntos homólogos referenciados de alas de <i>Apis mellifera</i> para análisis por morfometría geométrica.....	14
Figura N° 12: Distribucion de linajes morfométricos de <i>Apis mellifera</i> en Bolivia	16
Figura N° 13: Distribucion de subespecies de <i>Apis mellifera</i> en Bolivia	17
Figura N 14: Muestras sin alas, separadas para análisis molecular	18
Figura N° 15: Extracción de DNA de cada muestra individual, posteriormente a la extracción de las alas.	19
Figura 16: Árbol filogenético de máxima similitud construido con MEGA 11 para de estructuración poblacional a partir de 42 muestras secuenciadas seleccionadas al azar dentro del presente estudio	23



Figura. 17: Árbol filogenético de la diversidad genética de abejas en Bolivia comparada con la diversidad genética mundial.	24
Figura N° 18: Distribución de linajes morfométricos de <i>Apis mellifera</i> en Bolivia	25
Figura 19. Filogenia de la Subtribu Meliponina (New World Meliponini) Fuente: Engel et al., (2023)	32
Figura 20. Morfología de <i>Tetragonisca angustula</i> (Foto: RPSP).	36
Figura 21. Piquera de <i>Tetragonisca angustula</i> en caja tecnificada.	38
Figura 22. Distribución <i>Tetragonisca angustula</i> en la región Neotropical	39
Figura 23: <i>Melipona baeri</i> (Foto Rich Hoyer, 2022)	40
Figura 24. <i>Melipona baeri</i> recogiendo substrato para la construcción del nido (Foto Dirko, 2021)	41
Figura 25. Distribución <i>Melipona baeri</i> en Sud América.	42
Figura 26. Morfología de <i>Melipona eburnea</i> en Sud América (Foto: RPSP).	43
Figura 27. Piquera de <i>Melipona eburnea</i> en caja tecnificada	44
Figura 28. Distribución <i>Melipona eburnea</i> en Sud América	44
Figura 29. Morfología de <i>Scaptotrigona depilis</i> (Foto: RPSP).	45
Figura 30. Piquera de <i>Scaptotrigona depilis</i>	46
Figura 31. Distribución <i>Scaptotrigona depilis</i>	47
Figura 32. Morfología de <i>Scaptotrigona polysticta</i> (Foto: RPSP).	48
Figura 33. Piquera de <i>Scaptotrigona polysticta</i>	49
Figura 34. Distribución <i>Scaptotrigona polysticta</i>	50
Figura 35. <i>Nannotrigona</i> sp. (Colectada en el trabajo de consultoría, Arriba), <i>Nannotrigona melanocera</i> citado en Lucia y Alvarez, (2022) (abajo)	51
Figura 36. Piquera de <i>Nannotrigona melanocera</i>	52
Figura 37. Distribución de <i>Nannotrigona melanocera</i>	52
Figura 38. <i>Partamona</i> sp. (Colectada en el trabajo de consultoría, Arriba), <i>Partamona combinata</i> citado en Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020) (abajo)	53
Figura 39. Nidos de la especie de <i>Partamona combinata</i>, citado en Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)	54
Figura 40: Distribución de <i>Partamona</i>: <i>Partamona combinata</i> (Izquierda) y <i>Partamona epiphytophila</i> (derecha)	55
Figura 41. <i>Trigona guianae</i> (Arriba) y <i>Trigona cilipes</i> (Abajo) Fuente: Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)	56



<i>Figura 42. Nido de Trigona guianae (Izquierda) y Trigona cilipes (derecha). Fuente: Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 43. Distribución de Trigona guianae (Izquierda) y Trigona cilipes (derecha)</i>	<i>57</i>
<i>Figura 44. Plebeia sp. (colectada en campo, Arriba), Plebeia alvarengai registrado por A.B.E.L.H.A. (2016).....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 45. Nido de Plebeia alvarengai</i>	<i>59</i>
<i>Figura 46. Distribución de Plebeia alvarengai.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 47. Scaura sp. (colectada en campo, Arriba), Scaura latitarsis registrado por A.B.E.L.H.A. (2016).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 48. Nido de Scaura latitarsis. Fuente: Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)</i>	<i>61</i>
<i>Figura 49. Distribución de Scaura sp.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 50 Oxytrigona sp.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 51. Distribución de Oxytrigona sp.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 52. Tetragona sp.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 53. Distribución de Tetragona sp.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 54. Ptilotrigona sp.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 55. Ptilotrigona sp.....</i>	<i>66</i>



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ABEJAS MANEJADAS Y NATIVAS PRODUCTORAS DE MIEL Y OTROS PRODUCTOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA APÍCOLA DENTRO DE TODO EL TERRITORIO DE INTERVENCIÓN DEL PROGRAMA NACIONAL APÍCOLA: CARACTERIZACIÓN DE ECOTIPOS (SUBESPECIES Y/O RAZAS) DE *APIS MELLIFERA*

1 ANTECEDENTES

El "Estudio de identificación de especies de abejas manejadas y nativas productoras de miel y otros productos de importancia económica apícola dentro de todo el territorio de intervención del programa nacional apícola: Caracterización de ecotipos (subespecies y/o razas) de *Apis mellifera*" se erige como un pilar fundamental en la concepción de un Plan de Ordenamiento Territorial Apícola. Su relevancia radica en la capacidad para identificar la amplia diversidad de subespecies y/o razas de *A. mellifera* presentes en el área priorizada por el programa nacional apícola.

Este documento proporcionará información crucial sobre la adaptabilidad biológica de *A. mellifera* en las diversas ecorregiones vinculadas a la producción apícola del país. Además, desempeñará un papel fundamental en el análisis de la adaptación al cambio climático y sus consiguientes impactos en la producción apícola.

La identificación precisa debajo del nivel de especie desencadenará una revalorización significativa de su papel en la propagación genética de forma natural. Este conocimiento contribuirá no solo a procesos de regeneración de plantas y sistemas, sino también al mantenimiento del equilibrio en los ecosistemas. Además, se espera que este estudio fomente el incremento de la producción de especies específicas que dependen crucialmente de agentes polinizadores. En resumen, este trabajo fortalecerá el entendimiento entre la diversidad de abejas y el sostenimiento de sistemas productivos de importancia económica.

Este estudio también coadyuvará al "Estudio de vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de polinizadores (*Apis mellifera*, y especies de abejas nativas de Bolivia)" y a la formulación del Plan de Ordenamiento Territorial Apícola, ya que se constituye en un insumo de planificación estratégica del sector apícola y que permitirá establecer lineamientos de acciones estratégicas de mediano y largo plazo.

2 INTRODUCCIÓN

La morfometría geométrica surge a finales de los años 80 como un nuevo modo de estudiar las diferencias morfológicas, teniendo en cuenta la globalidad de la forma. Se diferencia de la morfometría tradicional en que el estudio de la forma se realiza mediante coordenadas de puntos, o landmarks, representadas en un plano o en un espacio cartesiano. La morfometría geométrica, llamada por Bookstein (1993) "nueva síntesis morfométrica", deriva de la síntesis de dos escuelas que se desarrollaron independientemente durante el siglo pasado. Por una parte la aproximación que se origina directamente de la biometría de Karl Pearson, Francis Galton, W. F. R. Weldon y Ronald Aylmer Fisher, quienes aplicaron el álgebra de la estadística multivariante (especialmente



matrices de covarianza) a conjuntos de distancias, tomadas a partir de una muestra de individuos; y por otra parte la aproximación geométrica asociada al nombre de D'Arcy Wentworth Thompson (1860-1948) con el uso de la representación directa de la diferencia de forma mediante rejillas de deformación.

Los trabajos que establecieron la base teórica de la morfometría geométrica aparecieron en los años ochenta: Bookstein (1984) propuso la descripción de la forma mediante coordenadas cartesianas que permitían visualizar las diferencias entre individuos y la posibilidad de aplicar pruebas t de Student para valorar la significación estadística; Goodall (1983) describió cómo utilizar los valores de las F en coordenadas no estandarizadas para la dimensión; y finalmente Kendall (1984) teorizó la existencia de un espacio de la forma (o espacio de Kendall) demostrando cómo los trabajos de Bookstein y Goodall se interpretaban en este espacio. A finales de los años 80, la estadística multivariante y la posibilidad de representar visualmente las diferencias morfológicas encontradas entre organismos hallaron su síntesis en la morfometría geométrica, que ha tomado contribución de las matemáticas, de la estadística, de la geometría no Euclídea y del desarrollo de los ordenadores cada vez más potentes con la finalidad de realizar las operaciones complicadas de los cálculos necesarios.

La morfometría geométrica estudia la forma de los organismos, entendiéndose como forma (form) el conjunto de dos componentes: dimensión (size) y conformación (shape). La dimensión viene definida por el tamaño del centroide (centroid size), que constituye una estimación geométrica de la dimensión de un objeto en todas las direcciones respecto a su centroide, a diferencia de las medidas lineales entre dos puntos, y se define como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las distancias entre el centroide del objeto y cada punto homólogo. La conformación se caracteriza únicamente por su propiedad geométrica (la posición relativa de las coordenadas en el espacio), y a su vez está formada por un componente uniforme y otra no uniforme. La primera representa toda la diferencia de forma asociada a una escala infinita, es decir no localizada en ningún punto del objeto que se está estudiando. Forman parte de esta transformación el alargamiento (dilatación) o la compresión o bien el deslizamiento de una parte sobre la otra. Las diferencias no uniformes son aquéllas localizadas en determinadas áreas de la configuración.

Los métodos geométricos, los cuales se aplican a datos obtenidos en forma de coordenadas de landmarks en dos o tres dimensiones, han engendrado un especial entusiasmo porque permiten recuperar y visualizar la información espacial que no es capturada por el conjunto de medidas de distancias. En estudios de sistemática, la morfometría geométrica es una herramienta muy potente. El análisis de grupos muy próximos, como es el caso de poblaciones, demos y subespecies, siempre implica la comparación de formas muy similares, que difieren sobre todo en pequeños desplazamientos relativos de landmarks. Esto significa que es más probable que los landmarks sean homólogos cuando se comparan diferentes formas de grupos próximos que cuando los taxones no están tan relacionados.

Es así que la morfometría geométrica ha sido utilizada en años recientes para caracterizar las diferentes subespecies de *Apis mellifera* con resultados muy promisorios.



Al igual que la morfometría geométrica, herramienta genética también han contribuido con mucha información para caracterizar las subespecies de *A. mellifera*.

3 JUSTIFICACIÓN

Bolivia presenta cuatro regiones con una enorme variabilidad climática y ecosistémica, donde se encuentra una amplia gama de temperaturas y condiciones ambientales características de un país megadiverso. La enorme diversidad social, económica y ambiental en su interior permite hablar de estas cuatro regiones en Bolivia.

Estas regiones, han cambiado en forma acelerada en los últimos años y la percepción acerca de ellas no se ha ajustado a las nuevas dinámicas que han surgido como resultado de cambios en las condiciones externas y también internas, asociadas a la ampliación de demandas resultantes del crecimiento de la población (Ministerio de Educación, Ministerio de Salud y Deportes, Instituto Nacional de Estadística. Estimaciones y proyecciones de población, Revisión 2020).

Los procesos de deforestación y praderización, intensificación de actividades extractivas como la pesca y la minería, uso descontrolado de agroquímicos, entre otros, todas ellas con sus efectos adversos, provocan en algunos casos sobreexplotación, en otra subutilización o transformación de las aptitudes del territorio. En contraposición a las potencialidades culturales, naturales y biofísicas de estas regiones, cuyo desarrollo ha sido frenado por falta de estudios especializados que determinen a nivel espacial sus verdaderas aptitudes, sus limitantes, sus variables y tendencias, en términos productivos.

Actualmente existen estudios técnicos sobre algunos aspectos potenciales de estas regiones, sin embargo, estos no exhiben de manera específica la interrelación de las diferentes variables como el: suelo, agua, sociedad/cultura, naturaleza, clima, recursos genéticos, etc. para definir de manera contundente las potencialidades actuales y futuras, ligadas a sus restricciones naturales y antrópicas. Bajo este contexto, con la implementación del proyecto, se logrará obtener información con la calidad necesaria, para planificar el desarrollo productivo de estos territorios y así responder oportunamente a los grandes desafíos nacionales tendientes a la creación y/o fortalecimiento de empresas nacionales estratégicas.

Así el presente estudio basado en la morfología cuantitativa y la genética, se orienta a caracterizar los diferentes ecotipos de *A. mellifera* que están presentes en el país, exclusivamente en las áreas de trabajo del programa apícola.

4 CARACTERÍSTICAS DE APIS MELLIFERA

La abeja melífera occidental *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) es una especie eusocial y un polinizador importante desde el punto de vista ecológico y económico (Esther. E. et al. 2015).

La más reciente revisión global de la diversidad moderna de *Apis mellifera* mediante enfoques morfométricos y genéticos (Yliasov et al. 2020) sugirió que existen aproximadamente treinta y tres subespecies distintas de abejas melíferas clasificadas en al menos seis grupos evolutivos (4 según otros autores) diferentes (A, M, C, O, Z y Y) como ser:



- (A) subespecies africanas.
- (M) subespecies del norte y oeste de Europa.
- (C) subespecies del norte del Mediterráneo.
- (O y C) subespecies del norte del Mediterráneo.
- (O y Z) subespecies de Oriente Medio.
- (Y) subespecies de Etiopía.

Estas 33 subespecies en su distribución original se distribuyen en:

África (11 subespecies),

Asia occidental y Oriente Medio (9 subespecies)

Europa (13 subespecies).

Esta gran diversidad puede deberse a la adaptación regional y a las condiciones ecológicas propias de cada región geográfica (Ruttner. F. 1988).

La taxonomía de la abeja melífera *Apis mellifera* contiene muchos problemas debido a la especificidad de la estructura de la población, las características de la biología y las resoluciones de los métodos de discriminación de subespecies de abejas melíferas. Hay muchas zonas de transición entre rangos de subespecies que llevaron a cambios graduales de características entre subespecies vecinas.

5 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio morfométrico y genético para identificar las subespecies de abejas manejadas y nativas, especializadas en la producción de miel y otros productos de relevancia económica en todo el territorio designado por el programa nacional apícola. Este estudio se concibe como un componente crucial de información de apoyo adicional destinado a la formulación del plan de ordenamiento territorial apícola.

5.1 Objetivos Específicos

- Realizar un estudio detallado de muestreo e identificación de subespecies (ecotipos y/o razas) de *Apis mellifera*.

6 ESTUDIO DE MORFOMETRIA GEOMETRICA

6.1 Protocolo obtención de muestras en campo

Con el objetivo de garantizar la máxima fidelidad de los datos de la biología de las muestras de abejas, los datos obtenidos mediante estudios genético-moleculares deben reflejar de manera precisa el estado de los tejidos, las abejas completas o las colonias de abejas justo antes del momento de muestreo. Por ende, la recolección y almacenamiento de las muestras deben asegurar un estado óptimo de los tejidos para garantizar la integridad de los datos.



Aunque los avances tecnológicos en biología molecular permiten la obtención de una gran cantidad de datos, a menudo se olvida que errores en la colecta, almacenamiento y procesamiento de las muestras pueden influenciar en la interpretación de los resultados y la calidad de estos (Chernesky et al. 2003). Estos problemas son especialmente evidentes cuando se comparan datos de distintos estudios o laboratorios (Birch et al. 2004).

Una solución es la optimización de los protocolos de colecta, almacenamiento y procesamiento primario, mediante buenas prácticas estandarizadas por cada laboratorio que permitan minimizar la influencia de la degradación de las muestras y garanticen la fiabilidad de los datos. Pudiendo tomar prácticas de otros campos de la biología aplicada, por ejemplo, laboratorios de análisis clínico-moleculares (Valentine-Thon et al., 2001).

Un buen manejo de las muestras permitirá la obtención de resultados óptimos, para conservar propiedades morfológicas y/o fisicoquímicas, garantizando extracciones de material genético de alta pureza y concentración, características fundamentales para realizar futuros procedimientos que conlleven a la obtención de resultados de calidad.

a) Objeto

Estandarizar el proceso de toma de muestras de abejas melíferas para su uso en estudios de morfometría geométrica y genética.

b) Alcance

El presente protocolo es de uso y aplicación en los procesos de recolección de toma de muestras de *Apis mellifera*, por parte de los técnicos, encargados de la colecta del material de abejas en las áreas de estudio.

c) Material

El material para realizar la colecta consiste en:

- Traje de apicultura completo
- GPS
- Cámara fotográfica
- Herramientas básicas de apicultura
- Barbijo
- Aspersor con alcohol al 70%
- Tubos falcón de 50 ml
- Etanol de concentración $\geq 70\%$
- Marcadores indelebles, al menos 2 colores (rojo y azul)
- Cooler (conservadora) de 7 a 12 litros



- Geles refrigerantes
- Cinta maskin
- Papel vegetal (cebolla)
- Lápiz
- Parafilm de cocina
- Formulario de registro de muestras
- Guantes de nitrilo (o de lavar ropa). No usar guantes de látex, la visita a los apicultores debe estar previamente confirmada mediante la socialización respectiva.

d) Actividades previas a la colecta

Planificación de los Apiarios:

- Realizar la planificación de los apiarios que serán visitados con el objetivo de asegurar una cantidad adecuada de material. Este proceso debe llevarse a cabo un día antes de la visita.

Preparación de Elementos Refrigerantes:

- Congelar los geles refrigerantes al menos 12 horas antes de la salida para la recolección. Asegurarse de contar con suficientes geles tanto para los coolers utilizados en el campo como para aquellos que se colocarán en los envíos de muestras al laboratorio.

Preparación de Tubos Falcón:

- Llenar los tubos Falcón con alcohol hasta aproximadamente el 70% de su capacidad (35 ml para tubos de 50 ml). Numerar los tubos en el área externa de forma secuencial con un marcador indeleble, siguiendo el número aproximado de apiarios de donde se obtendrán las colectas. Esta numeración será única y correlativa durante todo el proceso de colecta.
- **Preparación de Etiquetas:**
- Preparar etiquetas de papel vegetal (2,5 cm x 1,5 cm) en una cantidad equivalente al número de tubos que se utilizarán al día siguiente, incluyendo algunas etiquetas adicionales como reserva. Estas etiquetas se utilizarán para identificar de manera única y clara cada muestra recolectada.

e) Actividades en el ingreso al apiario el día de la colecta:

- El técnico responsable deberá ir acompañado de una segunda persona, que puede ser el apicultor, para auxiliar en la manipulación del material.
- Se toma normalmente una muestra (un tubo) por apiario, a menos que el apicultor indique diferencias significativas en comportamiento, agresividad o productividad entre colmenas, en cuyo caso se pueden tomar múltiples muestras por apiario.



- Antes de ingresar al apiario, se procede a limpiar las manos con alcohol al 70%. Posteriormente, se utiliza un aspersor con alcohol para rociar las partes del traje de apicultura que podrían contaminar el apiario, incluyendo la parte inferior de los calzados y todas las herramientas que se usarán en el proceso de obtención de muestras. Se evita el uso de guantes de látex, ya que estos inhiben la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Este procedimiento se considera como evidencia de inocuidad al ingresar al apiario.

f) Actividades en el apiario:

- Se toma una fotografía previa de la colmena que será analizada posteriormente. Una persona retira un cuadro de la cámara de cría con nodrizas, asegurándose de que la reina no esté presente. Se procede a abrir el primer tubo Falcón numerado, mientras la segunda persona coloca el tubo por debajo del conjunto de nodrizas, asegurándose de incluir al menos 25 abejas. El cuadro se vuelve a colocar en su lugar, y la segunda persona cierra el tubo. Este último se homogeneiza, agitándolo suavemente para garantizar que todas las abejas estén completamente inmersas en alcohol, y se almacena en el cooler entre los geles refrigerantes congelados.

g) Actividades a la salida del apiario el día de colecta:

- Al retornar al punto de ingreso, se utiliza alcohol para completar cualquier espacio vacío en cada tubo que contenga muestras, asegurándose de que estén numerados de forma secuencial. Se coloca una etiqueta de papel vegetal dentro del tubo, que incluya el número del frasco, el lugar del apiario, la fecha y el nombre del técnico. Esta etiqueta se sitúa antes de cerrar definitivamente el tubo, sellándolo con parafilm y colocando un trozo de masquín sobre el frasco con información adicional.
- Luego, los tubos se disponen entre los geles refrigerantes en el cooler para su transporte al siguiente apiario o al lugar de acopio. Este proceso se repite según la cantidad de colmenas y apiarios a estudiar, manteniendo la secuencia de tubos numerados.

h) Actividades en la sede o lugar de acopio:

- Concluido el proceso del día, se retorna a la sede o al sitio de acopio del material. Las muestras se guardan en un congelador común si deben ser almacenadas por algunos días. Si el material se enviará al laboratorio en LP, las muestras almacenadas o recién recibidas se acondicionan en un nuevo cooler con geles refrigerantes recién congelados y se envían herméticamente cerradas al laboratorio.
- Se informa al laboratorio mediante llamada o mensaje de texto sobre el envío del material, indicando el número de guía para el seguimiento correspondiente.



Figura N° 1 Buenas prácticas en el apiario



6.2 Análisis por morfometría geométrica

Se han evaluado 900 especímenes de abejas de la especie *Apis mellifera*, para el trabajo de morfometría y biología molecular. De acuerdo al procedimiento establecido, de cada uno de los individuos seleccionados, se han obtenido placas con las alas en montaje estandarizado para microfotografías y el resto del cuerpo se utiliza para los análisis de biología molecular. En las siguientes fotografías se describe gráficamente el trabajo realizado.

Figura N° 2: Organización de las muestras de campo.





Figura N° 3: Selección de cada muestra individual.

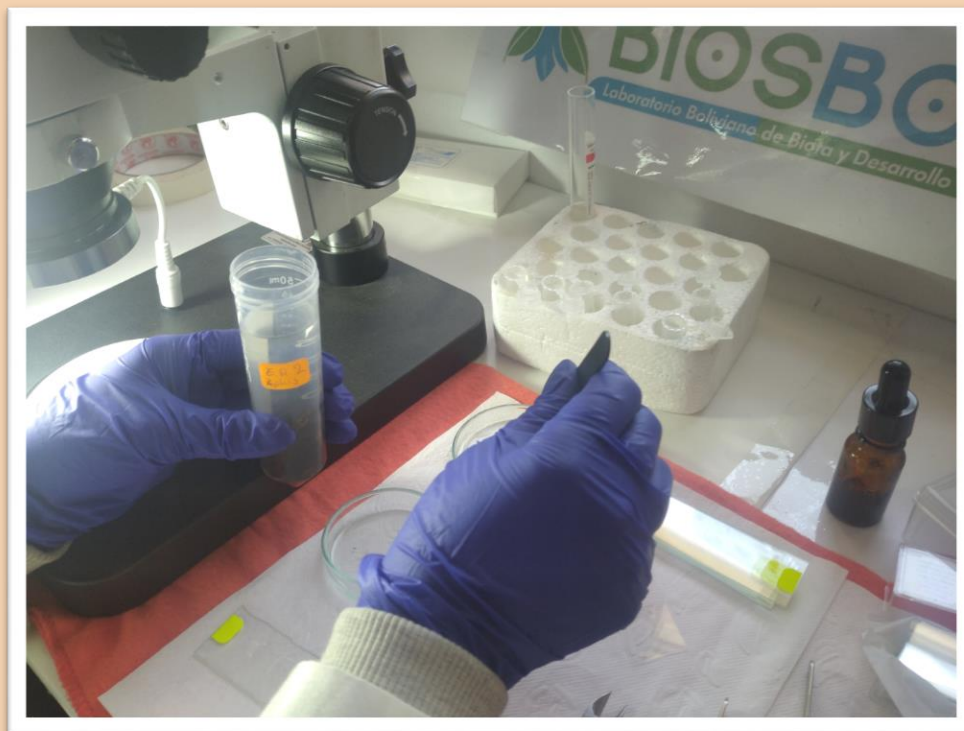


Figura N° 4: Disposición de cada muestra debajo el estereomicroscopio.





Figura N° 5: *Obtención de cada ala.*

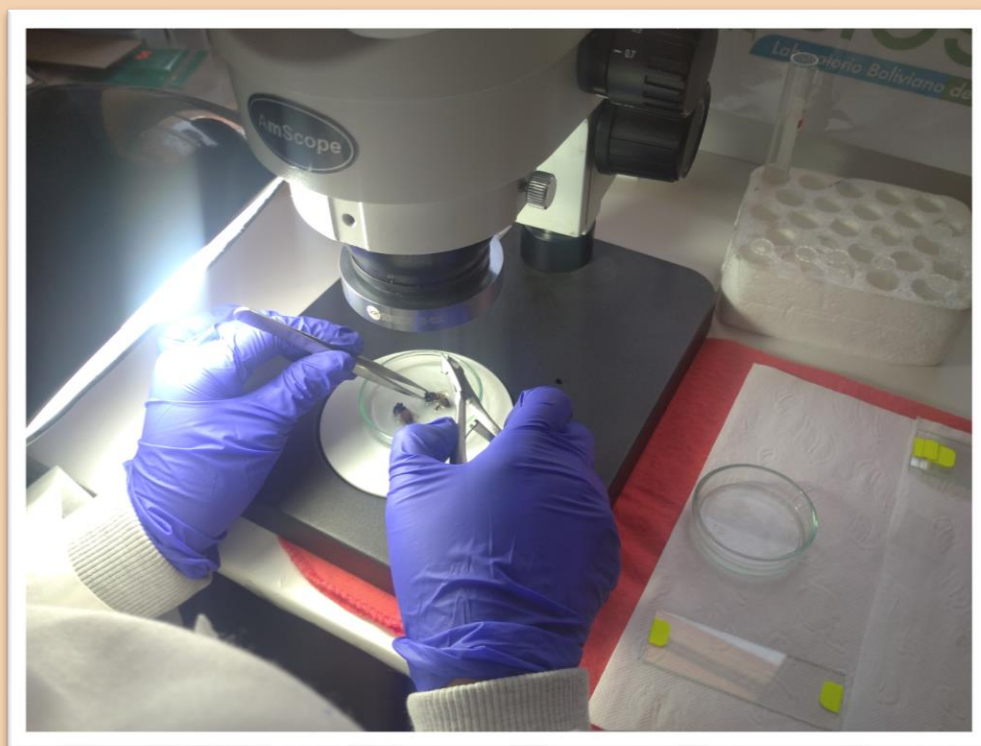


Figura N° 6: *Montaje de cada ala.*

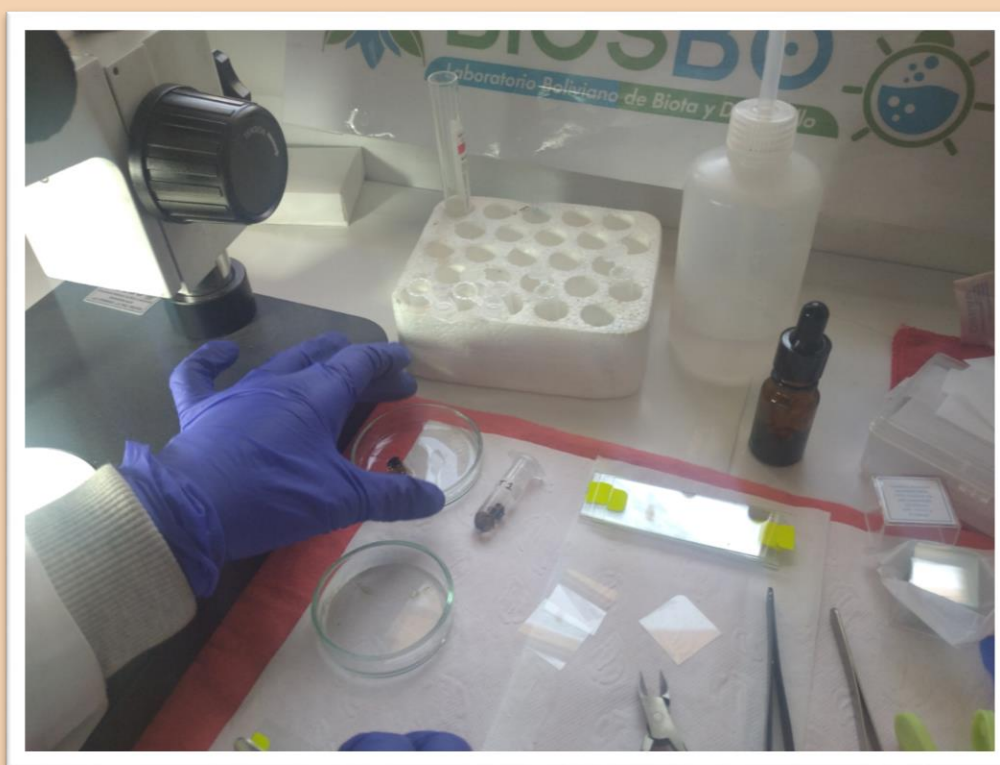




Figura N° 7: Lámina ya terminada con las alas montadas aptas para microfotografía.

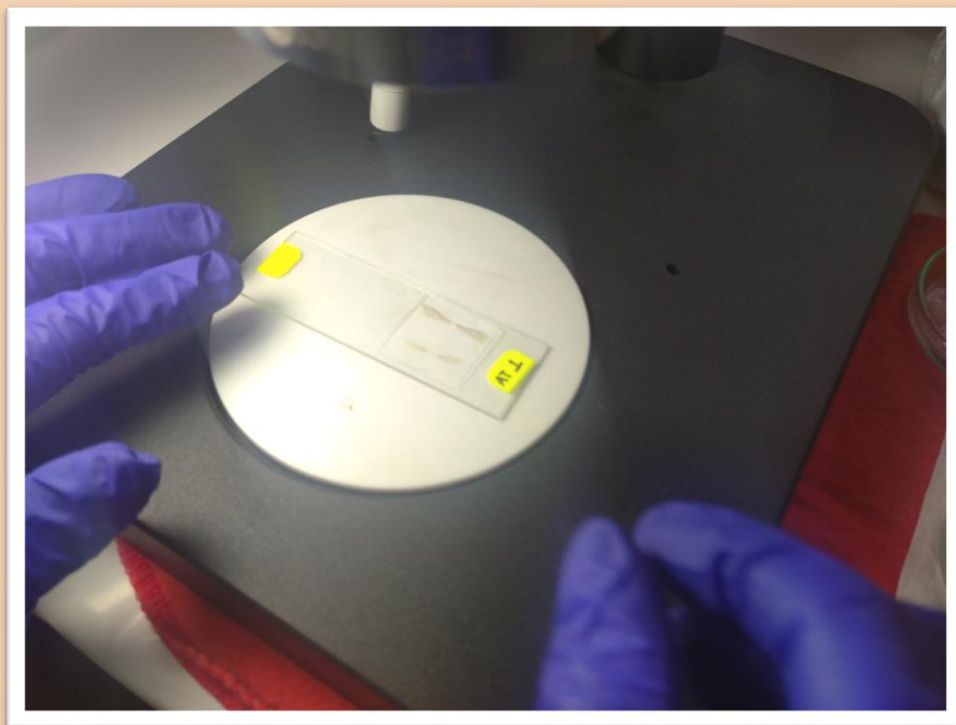
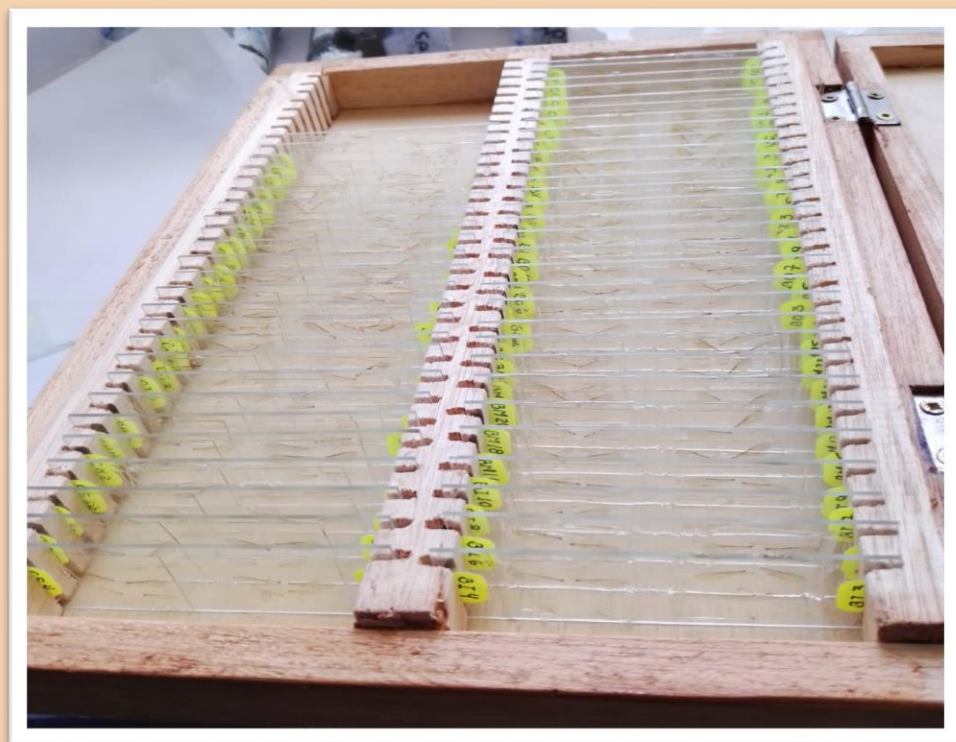


Figura N° 8: Laminario con las láminas de cada par de alas





6.2.1 Muestras de *Apis mellifera* analizadas de 900 individuos

En el presente Informe se reporta también trabajo de campo que ha cubierto varios municipios. El detalle del origen material biológico montado para análisis morfométrico de 900 placas seleccionadas, con información del lugar de procedencia y sus códigos respectivos se encuentra en el anexo 1.

6.3 Microfotografías para análisis de morfometría

"Para llevar a cabo el análisis de morfometría, se ha seguido rigurosamente la metodología propuesta. Una vez completado el montaje y documentadas las alas de los 900 individuos procesados, posteriormente se procedió a realizar la referenciación de cada una de ellas en un sistema de coordenadas X Y."

Para la referenciación de las alas de los individuos, se utilizan puntos de referencia concretos, de intersecciones que presentan una característica definida y repetible en cada ala. Estos puntos son seleccionados porque son visibles en todas las estructuras que se están comparando y se pueden identificar con precisión en cada muestra, además proporciona una identificación precisa y única para cada ala, lo que es crucial en estudios morfométricos para asegurar que cada muestra se pueda rastrear de manera específica.

En el análisis morfométrico de alas de abejas es esencial este paso, para garantizar la trazabilidad y la contextualización espacial de los datos, lo que a su vez contribuye a un análisis más preciso.

Figura N° 9: *Obtención de microfotografías mediante la cámara del estereomicroscopio*

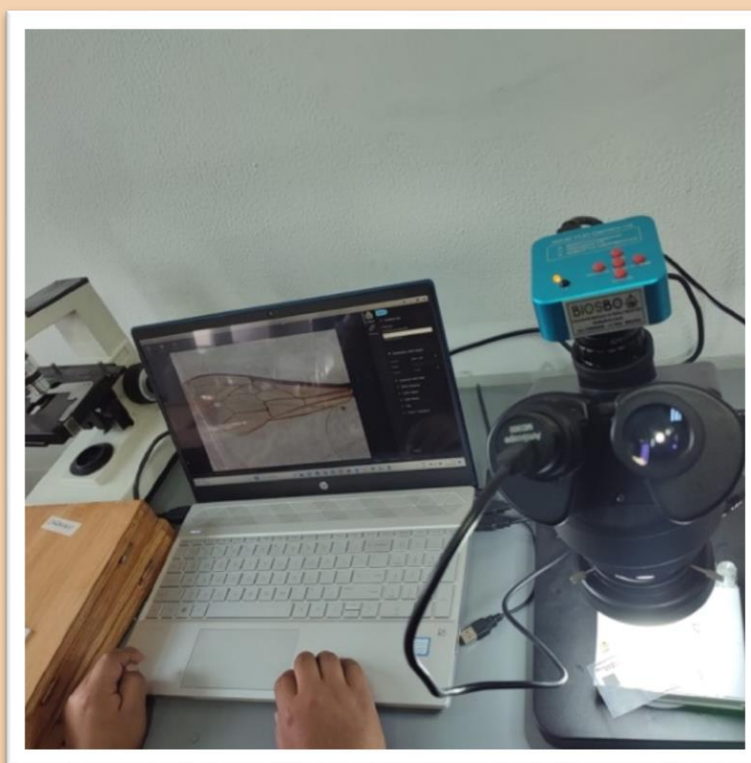
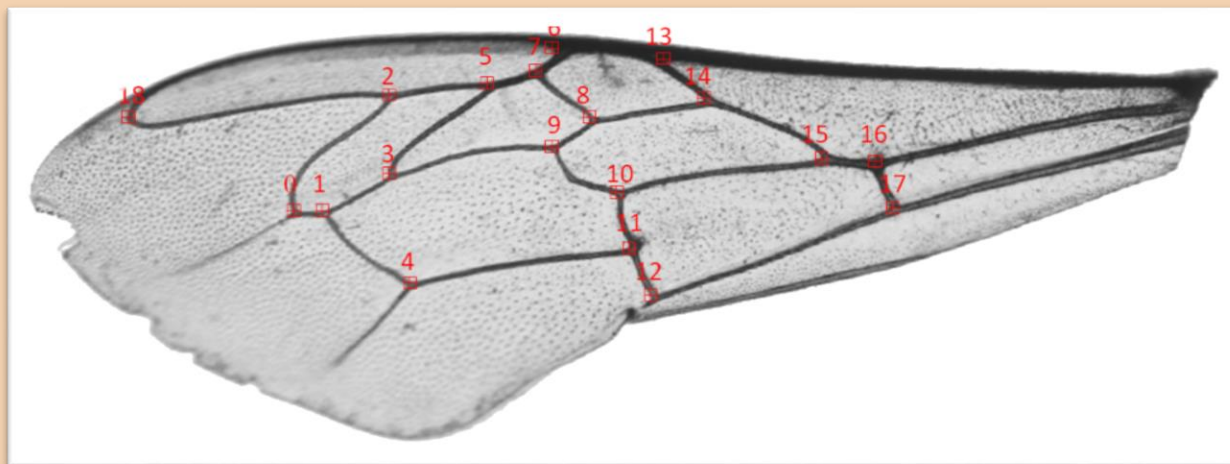




Figura N° 10: *Puntos homólogos en el ala de Apis mellifera para análisis por morfometría geométrica*



6.4 Obtención de landmarks y variables morfométricas

Las estructuras referenciadas, fueron registradas mediante el software TPSDIG. Que es un software utilizado en morfometría geométrica para la digitalización y el análisis de hitos (puntos de referencia anatómicos o landmarks) en imágenes digitales. Así, los "puntos de referencia obtenidos" se constituyen en los landmarks, que identifican puntos anatómicos específicos y fácilmente identificables en la estructura de las alas. Estos puntos serán utilizados para cuantificar y analizar variación de la forma de las alas.

El conjunto de datos de landmarks (19 puntos en coordenadas x, y) debe organizarse para su lectura en formato TPS. Los datos de todas las muestras se colocan uno después de otro, en un único documento, donde solo se indica el número de landmarks.

Los datos para análisis conjunto están organizados en líneas como en el siguiente ejemplo (ejemplo con 9 landmarks para 2 muestras):

LM=9

```
463,00000 1022,00000
517,00000 1003,00000
647,00000 1178,00000
643,00000 1040,00000
622,00000 817,00000
847,00000 1137,00000
1001,00000 1183,00000
959,00000 1134,00000
1048,00000 1028,00000
```



LM=9

450,00000 1018,00000
 506,00000 1008,00000
 652,00000 1196,00000
 617,00000 1052,00000
 634,00000 840,00000
 842,00000 1178,00000
 965,00000 1229,00000
 933,00000 1182,00000
 1040,00000 1072,00000

Figura N° 11: Ejemplo de la presentación de la base de datos de alas de 900 muestras, con puntos homólogos referenciados de alas de *Apis mellifera* para análisis por morfometría geométrica

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	COMUNIDAD	CÓD.	ALAS MONTADAS	ALAS CON PUNTOS	TPS
LA PAZ	SORATA	COMANI	A1			LM=19 498,00000 786,00000 558,00000 767,00000 694,00000 956,00000 695,00000 812,00000 655,00000 591,00000 894,00000 916,00000 1043,00000 966,00000 1003,00000 923,00000 1081,00000 808,00000 1005,00000 773,00000 1087,00000 668,00000 1079,00000 567,00000 1108,00000 463,00000 1235,00000 891,00000 1297,00000 791,00000 1456,00000 650,00000 1556,00000 609,00000 1564,00000 525,00000 233,00000 1073,00000
			A2			LM=19 454,00000 855,00000 501,00000 841,00000 649,00000 1026,00000 632,00000 879,00000 611,00000 652,00000 856,00000 985,00000 998,00000 1026,00000 958,00000 982,00000 1037,00000 866,00000 951,00000 831,00000 1026,00000 717,00000 1019,00000 610,00000 1033,00000 512,00000 1183,00000 941,00000 1251,00000 831,00000 1412,00000 685,00000 1502,00000 646,00000 1488,00000 568,00000 197,00000 1138,00000

Mediante el programa MorphoJ se utilizaron los datos de las 900 muestras para analizar la variación detectable entre los landmarks de cada muestra respecto al conjunto entero.

Esta variación a su vez, es contrastada en dicho programa con una base de datos internacional de morfometría de todas las subespecies de *A. mellifera*, para cuantificar la variación de las 900 muestras, respecto a las subespecies de *A. mellifera* de la base de datos internacional y, se obtiene una matriz de datos que expresa la cuantificación de la variación de los landmarks entre las muestras y la base de datos internacional. Dicha matriz es utilizada en los análisis estadísticos posteriores.



6.5 Análisis estadístico

La matriz de variación obtenida en el programa MorphoJ se usa como datos de ingreso para un análisis multivariado, siendo específicamente realizado un análisis discriminante en el software estadístico JMP.

El análisis discriminante nos permite, desde la perspectiva de la morfometría de las alas, ver el grado de homogeneidad entre grupos, detectar outliers, y el grado de relacionamiento entre grupos.

En este primer caso, el análisis discriminante permite asignar la mejor correspondencia entre las 900 muestras y los grupos de subespecies de *A. mellifera* de la base de datos internacional, permitiendo así, asignar la correspondencia de cada una de las 900 muestras con alguna de las subespecies de *A. mellifera*.

6.6 Resultados del análisis de morfometría

A seguir se muestra el resultado del análisis de 900 individuos de *Apis mellifera* respecto al linaje identificado, recordando que las subespecies de *A. mellifera* se agrupan dentro de estos linajes.

Tabla 1. Registros de linajes y subespecies por morfometría, de 900 muestras *A. mellifera* de Bolivia

LINAJE	SUBESPECIE POR LINAJE	REGISTROS
A	A	863
	<i>A. mellifera adansonii</i>	416
	<i>A. mellifera cecropia</i>	9
	<i>A. mellifera cypria</i>	3
	<i>A. mellifera intermissa</i>	3
	<i>A. mellifera litorea</i>	134
	<i>A. mellifera major</i>	29
	<i>A. mellifera meda</i>	9
	<i>A. mellifera monticola</i>	177
	<i>A. mellifera ruttneri</i>	3
	<i>A. mellifera sahariensis</i>	54
	<i>A. mellifera scutellata</i>	24
	<i>A. mellifera unicolor</i>	2
C	C	21
	<i>A. mellifera caucasia</i>	1
	<i>A. mellifera ligustica</i>	4
	<i>A. mellifera macedonica</i>	16
Y	Y	9
	<i>A. mellifera jemenitica</i>	9
M	M	7
	<i>A. mellifera mellifera</i>	7



Los linajes y las subespecies de *A. mellifera* dentro de estos linajes, pueden ser observados respecto a su distribución espacial en las ecoregiones donde se está implementando el programa apícola, en los siguientes mapas:

Figura N° 12: *Distribucion de linajes morfométricos de Apis mellifera en Bolivia*

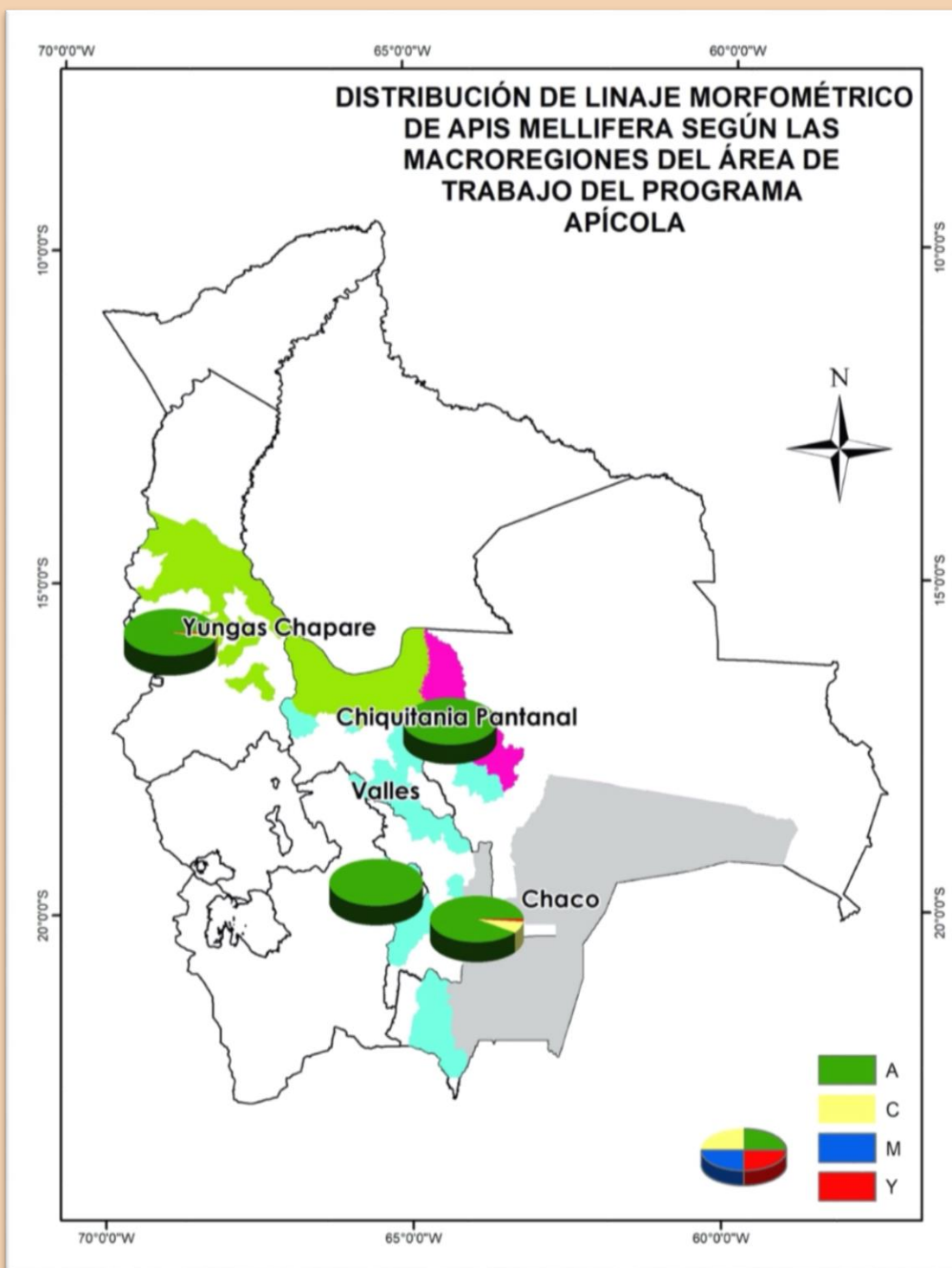
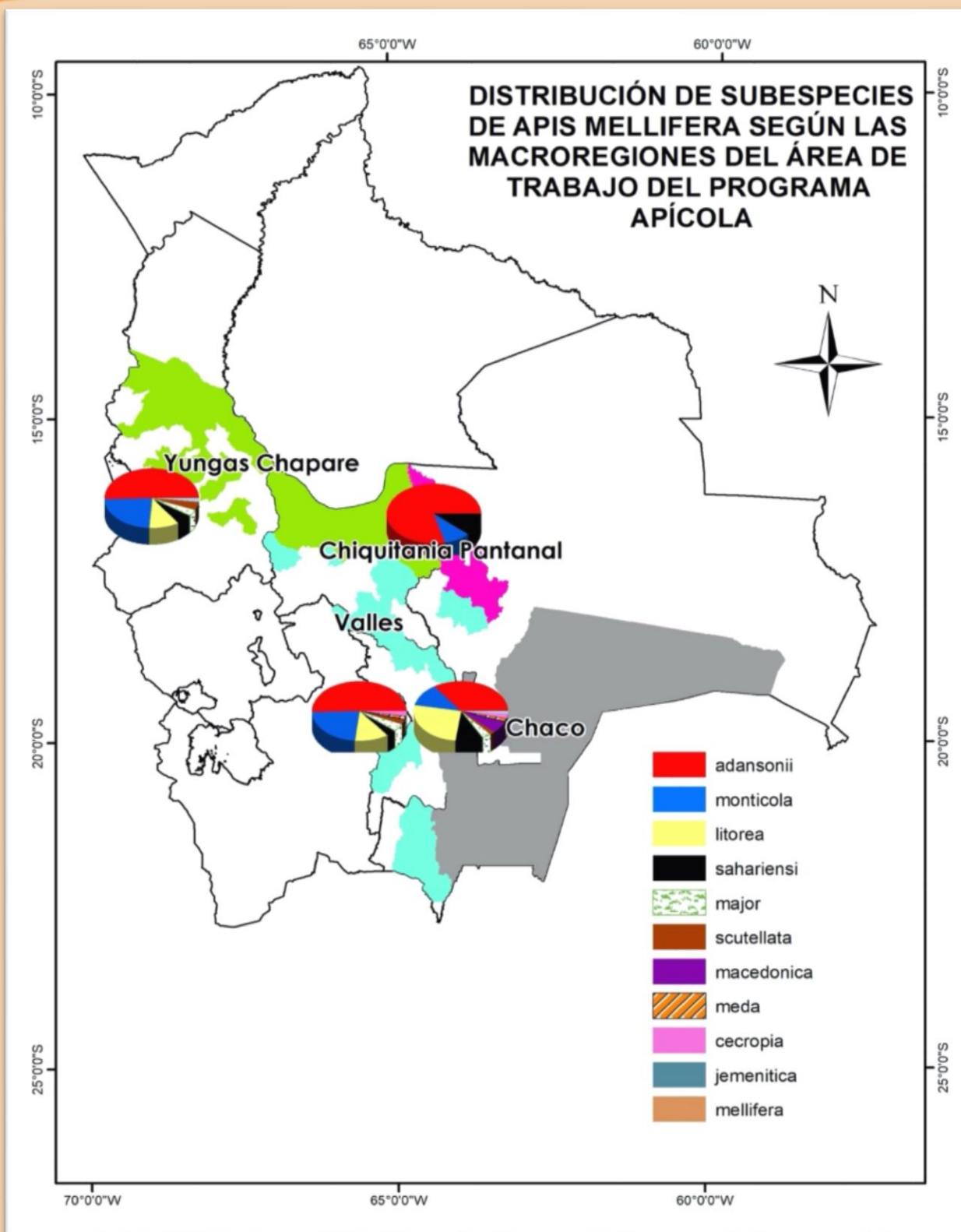




Figura N° 13: *Distribucion de subespecies de Apis mellifera en Bolivia*





El detalle de distribución cada subespecie se puede observar en el anexo 1 y 2

Después del análisis morfométrico se observa que predominan muestras con similitud morfológica relacionada a distintas subespecies del linaje A (África), siendo la subespecie *A. mellifera adansonii* la que se detecta con mayor intensidad, pero también existen muestras con similaridad asignada a otras subespecies de otros linajes en diferentes proporciones (linajes C. Y y M).

Este análisis es realizado por primera vez en Bolivia, y podrá ser de utilidad para la toma de decisiones de manejo, sanidad, producción y otros, en relación a los posibles ecotipos detectados.

7 Análisis de biología molecular

La segunda fase de análisis de laboratorio comprende la caracterización genética de ecotipos de *Apis mellifera* para el proyecto apícola.

Esta fase incluye:

- Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos de *Apis mellifera* de diferentes eco-regiones de Bolivia.
- Preparación de librerías para secuenciar genomas mitocondriales.

7.1 Metodología

El material genético de los individuos de abejas melíferas, fue obtenido de apiarios ubicados en diferentes eco-regiones de Bolivia. Las muestras fueron obtenidas previa desinfección para visita del apiario siguiendo buenas prácticas para evitar contaminación de patógenos al apiario. Las muestras fueron obtenidas y almacenadas en tubos falcón de 15 ml libres de DNAsas, RNAsas y pirógenos, en alcohol al 96% con datos del lugar, la fecha de colecta y almacenadas en conservadoras con gel refrigerante para su transporte a la ciudad de LP.

Para la extracción del ADN, una vez recibidos los individuos, fueron codificados y colocados en tubos de 1,5 ml y almacenados a -80 °C hasta el momento de iniciar el proceso de extracción de ADN.

Figura N 14: Muestras sin alas, separadas para análisis molecular





Figura N° 15: *Extracción de DNA de cada muestra individual, posteriormente a la extracción de las alas.*



El primer paso para extraer los ácidos nucleicos consiste en triturar 50 mg del abdomen del insecto utilizando un mortero. El triturado fue colocado en un nuevo tubo de micro centrífuga de 1,5 ml. Para evitar la contaminación cruzada, el mortero fue limpiado profundamente para cada nueva muestra. Luego se añadieron 180 μ l de tampón ATL con 20 μ l de proteinasa K: mezclando en vórtex e incubándose a 56 °C en agitación en un termobloque destinado a promover la lisis celular mediante medios químicos y físicos. Esta incubación se realizó durante 3 horas. Al finalizar esta etapa se pudo observar que el lisado era viscoso, pero no gelatinoso, ya que una solución más densa no pasaría por la columna de sílica en los pasos sucesivos.

Una vez finalizada la incubación se mezclaron las muestras en vórtex durante 15s y se añadieron 200 μ l de tampón a la muestra. A continuación, se añadieron 200 μ l de etanol (96-100%) y se volvió a mezclar a fondo agitando en vórtex. La mezcla resultante se colocó en una columna DNeasy Mini spin, la cual se encontraba al interior de un tubo de colecta de 2ml. Se centrifugo la mezcla 1 minuto a 8000 rpm. Se descarto el filtrado y el tubo de colecta.

En un nuevo tubo de colecta se añadieron 500 μ l de Buffer AW1, utilizando la misma columna DNeasy y se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm, desechando el flujo y el tubo de colecta.

Se instaló la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recogida de 2 ml, añadiendo 500 μ l de de tampón AW2 y centrifugando durante 3 minutos a 20.000 x g (14.000 rpm) para secar la membrana DNeasy membrane. Desechando el flujo y el tubo de recogida.

Es importante destacar el secado la membrana de la columna de centrifugación DNeasy Mini, ya que el etanol residual puede interferir con las reacciones posteriores. Este paso de centrifugación garantiza que no se arrastre etanol residual durante la siguiente elución.



Tras el paso de centrifugación, se retiró cuidadosamente la columna de centrifugación DNeasy Mini para que la misma no entre en contacto con el flujo, ya que esto provocaría el arrastre de etanol.

Finalmente se colocó la columna de centrifugación DNeasy Mini en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml, pipeteando 100 µl de tampón directamente sobre la membrana DNeasy. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y, se procedió a la centrifugación durante 1 min a 8000 rpm para la elución de los ácidos nucleicos. El material genético resultante fue cuantificado mediante espectrofotometría UV con un equipo NanoDrop ND-1000, a objeto de evaluar la concentración y la calidad de los mismos a las siguientes longitudes de onda en el espectro ultravioleta: A230, A260 y A280.

Para enriquecer las regiones hipervariables de la COX1 mitocondrial utilizamos el kit de PCR Phusion high-fidelity M0530L (New England BioLabs Inc.) de acuerdo a lo indicado en el manual de usuario provisto por el fabricante en las siguientes proporciones:

Reactivos	Volumen µl
Buffer de Reacción HF– (5X)	2
dNTPs 10 mM	0,5
<i>Primers F (10uM)</i>	0,5
<i>Primers R (10uM)</i>	0,5
H2O Libre de RNasas	1,5
<i>Phusion Polymerase</i>	0.25
Muestra cDNA	2,5
Volumen total reacción	25 ul

La amplificación se desarrolló de acuerdo al siguiente protocolo:

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo	No. de Ciclos
Iniciación	95°	2 min	1
Desnaturalización	95°	30 s	
Annealing	50°	45 s	30
Terminación	72°	6 min	

Finalizada la amplificación se procedió a preparar la librería y la adhesión del código de barras para la secuenciación

7.2 Preparación de las librerías mediante código de barras y secuenciación

Una vez cuantificadas las muestras, se procedió a la preparación de la librería. Para comenzar, se normalizó la cantidad de ADN de cada muestra a 50ng siguiendo las instrucciones del kit de código de barras para ADN V14 (SQK-RBK 114-96) provisto por Oxford Nanopore Technologies. Se



realizó este procedimiento en lotes de 96 muestras por ronda de secuenciación. Es importante recalcar que la calidad y cantidad del material genético es de suma importancia, no utilizar suficiente ADN o con contaminantes impacta de forma negativa en el resultado final.

Una vez terminada la normalización de la cantidad de ADN se preparó en una placa de 96 pocillos conteniendo lo siguiente:

- 10 μ l de agua libre de nucleasas
- 5 μ l de muestra normalizada a 50ng
- 1 μ l de cada código de barras del kit

Los componentes fueron mezclados por pipeteo y luego precipitados por centrifugación. Luego se procedió a incubar la placa con los 96 códigos de barras durante 2 minutos a 30 °C y luego a 80 °C por otros 2 minutos. Todo este proceso se desarrolló en un termociclador BIO-RAD CFX96.

Posteriormente todos los pocillos fueron agrupados en un solo tubo Eppendorf LoBind de 1.5 ml al cual se agregaron 1000 μ l de la solución AMPure, la cual contiene perlas magnéticas que permiten la purificación del material genético. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Acabado este tiempo se agregaron 3 ml de etanol al 80% sin tocar el pellet, removiendo el etanol por pipeteo y descartándolo, cada lavado se realizó dos veces. Luego del último lavado se dejó secando el pellet. Para separar el ADN del precipitado adherido a las perlas magnéticas se aplicaron 15 μ l de la solución de elución y se cuantificaron 2 μ l de la misma para evaluar tanto la concentración final como la presencia de contaminantes.

En un tubo separado se prepararon 1.5 μ l de la solución Rapid Adapter y 3.5 μ l del Adapter Buffer y de esta mezcla se añadió 1 μ l a la solución que contiene el ADN de todas las muestras. En este punto la librería se encuentra lista para ser secuenciada y, mientras se preparan los otros componentes se debe almacenar la muestra en hielo.

Antes de colocar el material genético a la celda del flujo en el secuenciador es necesario preparar la solución de cebado y de carga, para lo cual es necesario mezclar 30 μ l de la solución de anclaje de la celda de flujo con 1170 μ l de la solución de lavado específica de la celda de flujo. De esa mezcla se cargaron 800 μ l en el puerto de carga evitando burbujas de aire dentro de la celda.

Antes de colocar las muestras en el secuenciador se preparó una solución con 37.5 μ l de tampón de secuenciación con 25.5 μ l de solución con cuentas de librería y 12 μ l de ADN y, se homogenizó por pipeteo cuidadosamente para no generar burbujas. Finalmente se colocó la mezcla en el puerto de carga de la celda de flujo y, se coloca todo el volumen y luego se cierra la tapa para sellar el circuito.

7.3 Análisis bioinformático

La programación de la secuenciación se realizó mediante el programa MinKNOW (v. 23.07.15) para Windows. Luego de concluido el proceso de secuenciación, se procedió a la llamada de bases (base-calling) que consiste en transformar las señales eléctricas brutas generadas por el dispositivo



MinION almacenados en archivos FAST5 a formato FASTQ. La llamada de bases consiste en asignar bases nucleotídicas (A, T, C, G) a las señales eléctricas correspondientes. Para este proceso se utilizó el software Guppy (v.7.1.4) en un supercomputador. También se evaluó la calidad de los datos de llamada de bases para identificar y filtrar las lecturas de baja calidad utilizando el programa FASTQC (v.0.9.0). En este paso se comprueba la longitud de la lectura, la precisión de la llamada de bases y las puntuaciones de calidad de la secuenciación.

7.4 Secuenciación gen COX1

Una vez obtenidas las secuencias con mejor calidad se procede a verificar que las secuencias están alineadas a los genes de interés del genoma mitocondrial de referencia de la abeja *Apis mellifera* con el alineador Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM, v.0.7.17.2).

Una vez verificadas que las secuencias se alinean con las regiones hipervariables del gen de interés, en este caso la citocromo c oxidasa (COX1), se procede a exportar las secuencias en formato fasta. La verificación visual se hizo con el Visor de genomas IGV (Integrative Genomics Viewer, v.2.16.12) (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Estas son regiones normalmente utilizadas en genética para realizar inferencias de especie, sub-especie, estructuración poblacional, entre otras aplicaciones. Finalmente, cada secuencia fue alineada con la base de datos mundial (Servidor local, actualizada al 10-03-2022) con el programa Blastn (v.2.14.1)(Camacho et al., 2009).

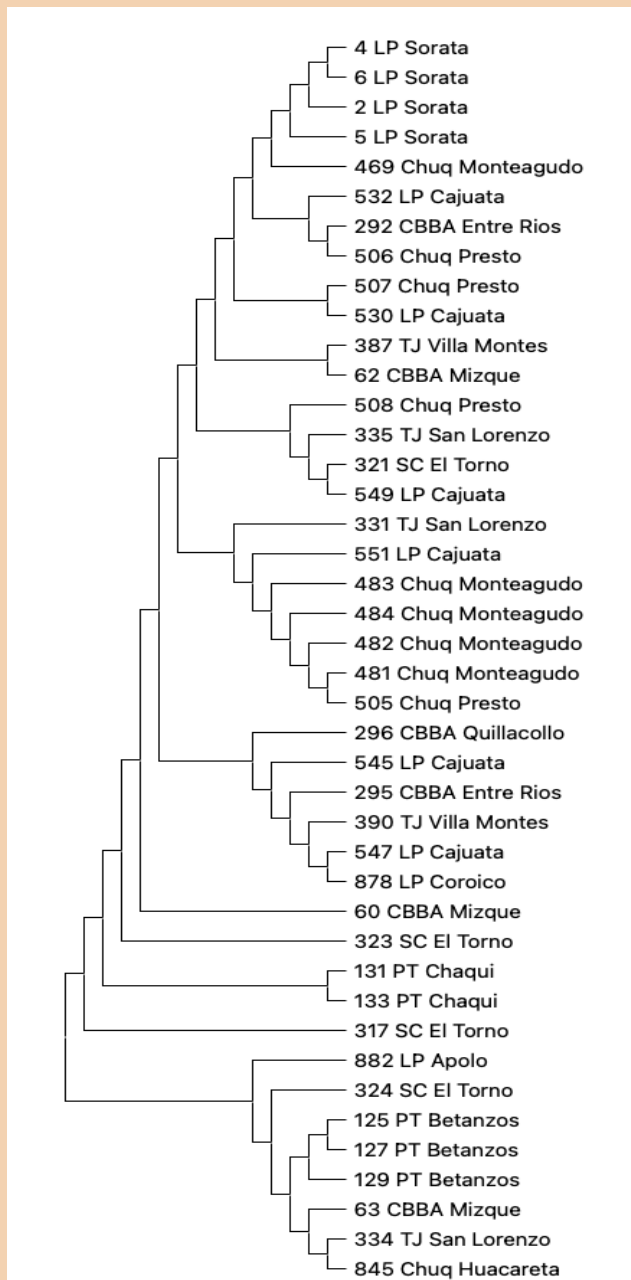
7.5 Árbol filogenético

Para representar gráficamente la estructuración poblacional de los individuos muestreados se escogieron muestras al azar de las distintas localidades muestreadas a partir de la base de datos generada y se procedió a realizar un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 11, donde el primer paso fue alinear las secuencias. Posteriormente se elaboró el árbol filogenético utilizando el método de Máxima similitud, aplicando el modelo evolutivo de Tamura-Nei asumiendo tasas evolutivas uniformes.



7.6 Resultados del análisis genético

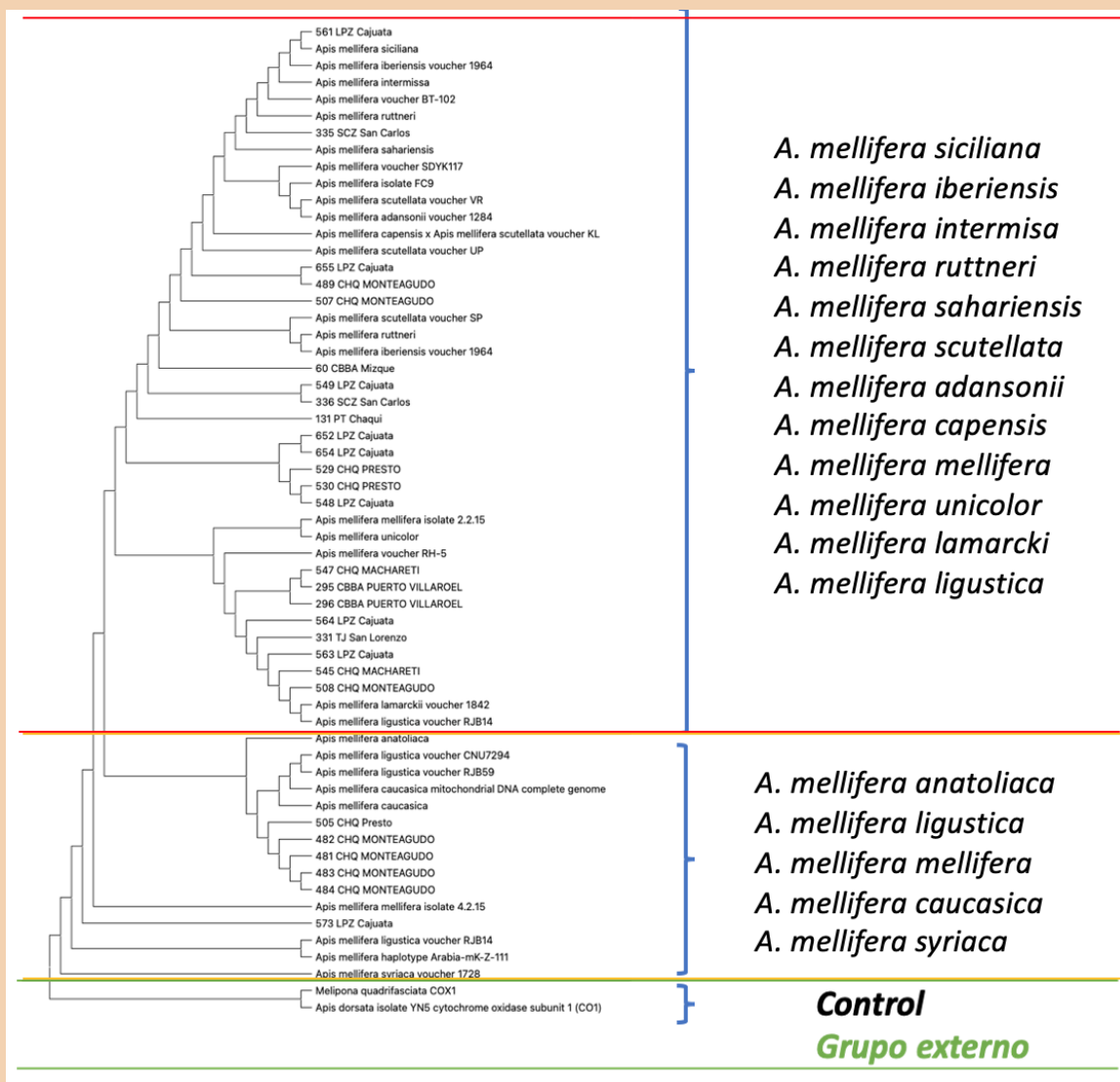
Figura 16: *Árbol filogenético de máxima similitud construido con MEGA 11 para de estructuración poblacional a partir de 42 muestras secuenciadas seleccionadas al azar dentro del presente estudio*



En la figura 16 se puede observar un árbol filogenético construido a partir de 42 muestras seleccionadas al azar de todos los departamentos muestreados. En él, se puede observar la estructuración que existe en relación a los lugares de muestreo, vale decir que se pueden apreciar ciertos patrones de agrupación en función al lugar de toma de muestra.



Figura. 17: Árbol filogenético de la diversidad genética de abejas en Bolivia comparada con la diversidad genética mundial.



El árbol filogenético de la figura 17 muestra las secuencias COX1 de las distintas subespecies de *A. mellifera* descritas en el presente estudio en relación a muestras de todo el mundo. Como se puede observar en el gráfico la diversidad de abejas en Bolivia agrupa a distintas subespecies (*A.m.scutellata*, *A.m.capensis*, *A.m.sahariensis*, *A.m.iberiensis*, *A.m.monticola*, *A.m.adansonii*, *A.m.unicolor*, *A.m.mellifera* y *A.m.ligustica*). Considerando que este trabajo se realiza por iteraciones y simulaciones, en el presente análisis las abejas se agrupan en dos linajes grandes, el linaje A y el linaje C. Tal como describe Tihelka et al., 2020. Algunas subespecies pueden ser asignadas de forma errónea a otros grupos debido a fallas en la identificación taxonómica, a la referencia utilizada en la base de datos, o simplemente a que se está usando un solo gen para realizar la asignación de especies durante la subida de los datos a NCBI. Se utilizó como grupo control los genes de *Apis dorsata* y *Melipona quadrifasciata*.



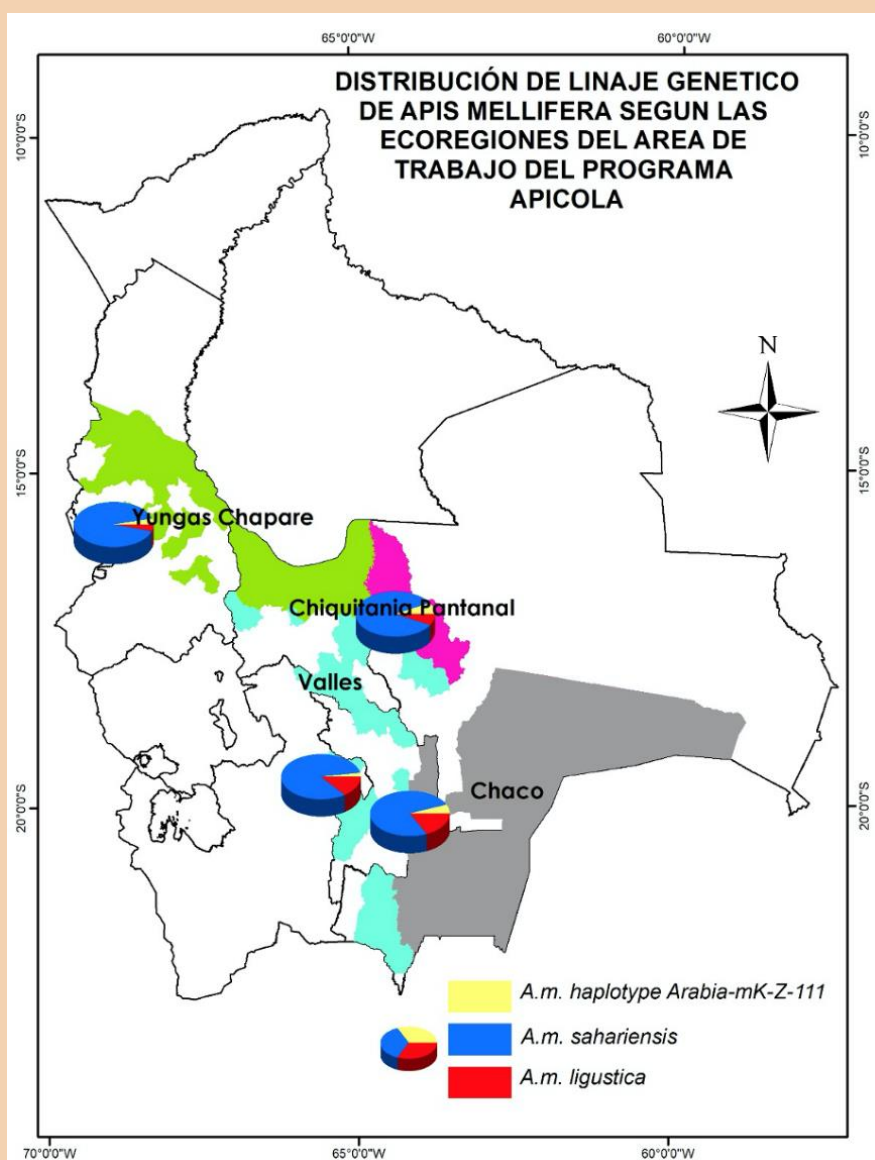
Finalmente, se obtuvo la similitud genética de cada una de las 900 muestras (tabla 2).

Tabla 2. Similitud genética de 900 muestras de *A. mellifera* de Bolivia

similitud genética	número de muestras
A.m. haplotype Arabia-mK-Z-111 mitochondrion, complete genome	28
A.m. ligustica mitochondrion, complete genome	80
A.m. sahariensis mitochondrion, complete genome	789

No se incluye 3 muestras que fueron contaminadas

Figura N° 18: Distribución de linajes morfométricos de *Apis mellifera* en Bolivia





Así, los resultados combinados de la morfometría geométrica y la genética muestran que *A. mellifera sahariensis* es el linaje genético predominante, pero, este linaje se distribuye entre practicamente todas las muestras definidas por morfometría geométrica.

8 Discusión

En el presente proyecto, analizamos y comparamos la región hipervariable del COX1 de la mitocondria de 900 individuos colectados en 7 departamentos de Bolivia. Se encontró que principalmente se encontraron individuos de la sub especie *A. mellifera saharensis* con 789 individuos, luego la *A. mellifera ligustica* con 80 individuos, y finalmente la subespecie *A. mellifera mellifera* (Arabia-mK-Z-111) con 28 individuos, Nuestros análisis filogenéticos sugieren que existe una baja estructuración poblacional de las abejas de Bolivia, por la cantidad de subespecies también podemos inferir que la diversidad genética de *A. mellifera* en Bolivia es reducida. Esto puede ser explicado al efecto fundador y el tiempo que esta especie fue introducida en Sudamérica. Dos estudios a gran escala de la secuencia del genoma han mostrado la historia evolutiva de la abeja melífera *Apis mellifera* en Latino America (Whitfield et al. 2006a, Wallberg et al. 2014).

Tras destacar el origen de la especie *Apis mellifera* procede de África, estos estudios también describieron el patrón geográfico y temporal de la diversificación en el Nuevo Mundo. Curiosamente, estos estudios mostraron una distribución diferencial de las subespecies europeas inicialmente introducidas en America Latina, con una ocurrencia preferencial de *A. m. mellifera* en Brasil, Paraguay y el norte de Argentina (la provincia de Misiones), mientras que un híbrido entre *A. m. mellifera* y *A. m. carnica* está más distribuido hacia el sur del continente. La segunda ola de introducción que involucró a la abeja africana *A. m. scutellata* permitió su establecimiento general a través de un híbrido *A. m. mellifera-scutellata* por encima de la latitud de 33°11.603'S. Una zona híbrida entre *A. m. mellifera-carnica* y *A. m. scutellata* se da en el rango de latitud de 31°04.993'S y 33°11.603'S (Wallberg et al. 2014). En el presente estudio se pueden apreciar que genéticamente predomina la subespecie *saharensis* lo cual tendría relación con lo mencionado por otros autores, donde a partir de la segunda ola de introducción de la especie se estaría evidenciando que el linaje africano, con sus respectivas subespecies, es predominante en el territorio boliviano.

En el presente proyecto se ha seleccionado la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (COX1), la cual es un gen mitocondrial que se utiliza ampliamente en estudios de población e identificación de especies, sobre todo en el campo de la taxonomía molecular y el código de barras. Sus propiedades son diversas, podemos citar que la COX1 presenta un buen equilibrio entre conservación y variabilidad de la secuencia ya que ciertas regiones del gen se conservan entre especies, lo que lo hace útil para identificar relaciones a niveles taxonómicos superiores. Al mismo tiempo, existen regiones variables que pueden utilizarse para distinguir entre especies o subespecies estrechamente relacionadas. Por otro lado, esta región se encuentra en las mitocondrias de casi todos los organismos eucariotas, y su estructura primaria está relativamente conservada en una amplia gama de taxones. Esta universalidad permite el uso de un marcador estandarizado en diversos organismos (Changbunjong, T., et al 2016).



Una de las propiedades más interesantes de las regiones de COX1 es que evoluciona con relativa rapidez, especialmente en comparación con los genes nucleares. Esta rápida evolución puede ser útil para distinguir entre especies estrechamente emparentadas y para estudiar acontecimientos evolutivos recientes. También esta secuencia es utilizada a menudo como código de barras de ADN para la identificación de especies. La idea es utilizar una secuencia de ADN corta y estandarizada de un gen específico como etiqueta molecular para identificar y distinguir especies, así es como el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) ha aprobado la COX1 como marcador estándar de código de barras de ADN para animales (Changbunjong, T., et al 2016). Asimismo, la COX1 tiene una longitud manejable para la secuenciación, lo que le otorga una buena relación precio-calidad para estudios a gran escala. El uso estandarizado de COX1 como código de barras facilita la comparación de resultados entre diferentes estudios y laboratorios. Por esta razón existen diversas bases de datos de referencia como la del NCBI o el Barcode of Life Data Systems (BOLD), por citar algunas, que recopilan secuencias de COX1 de varias especies que son utilizadas como referencia para la identificación de especies mediante la comparación de una secuencia desconocida con una base de datos conocida. En virtud a las razones citadas previamente la COX 1 permiten conocer mejor las relaciones evolutivas entre especies, evaluar la biodiversidad y abordar cuestiones relacionadas con la genética de poblaciones y la filogeografía (Viricel, A., & Rosel, P., 2012).

La asignación de subespecie en relación a la secuencia de las regiones hipervariables de la COX1 se realiza comparando con una base de datos de secuencias conocidas. Para poder entender como funciona la herramienta la asignación de subespecies es importante conocer la herramienta BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) por sus siglas en ingles del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) se utiliza principalmente para comparar secuencias biológicas, como secuencias de ADN, ARN o proteínas, con su base de datos para encontrar secuencias con similitudes (Camacho et al., 2009).

BLAST se basa en la comparación de secuencias de muestras con una base de datos de secuencias conocidas. Para la identificación de especies, normalmente se utilizan bases de datos que contienen secuencias de diversas especies.

Los usuarios proporcionan una secuencia de consulta, que puede ser una secuencia de ADN, ARN o proteína obtenida a partir de una muestra de interés. Esta herramienta utiliza un algoritmo para identificar regiones de similitud local entre la secuencia de consulta y las secuencias de la base de datos. El algoritmo busca regiones cortas y similares (denominadas "coincidencias") en lugar de intentar alinear globalmente las secuencias completas. BLAST asigna puntuaciones a las coincidencias en función de la similitud de las secuencias. Las coincidencias con puntuaciones de similitud más altas se clasifican mejor y van primeras en la lista de coincidencias. Una de las funciones que permite la clasificación de una mejor coincidencia es el valor E (valor esperado) que estima el número de aciertos que se esperaría que se produjeran por azar. Los valores E más bajos indican una mayor significación. Por otro lado, se tiene la Puntuación máxima en bits calculada a partir de las coincidencias y discordancias encontradas en las alineaciones locales.



Cuanto mayor sea la puntuación máxima, mejor será la alineación. También es fundamental tomar en cuenta la Puntuación total que es la suma de las puntuaciones de alineación de todos los segmentos de secuencia o alineaciones locales. Cuanto mayor sea la puntuación, mejor será la alineación. Cuando las puntuaciones máxima y total son iguales, existe un alineamiento global entre la consulta y su coincidencia en la base de datos. Esto significa que las secuencias se pueden alinear sin inserciones ni supresiones largas. Otro de los parámetros importante es la Cobertura de la consulta, definida por el porcentaje de la longitud de la secuencia de consulta que se incluye en los alineamientos con la secuencia coincidente. Finalmente se puede citar el Porcentaje de identidad que consiste en el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre la consulta alineada y las secuencias de la base de datos (Camacho et al., 2009).. Una secuencia de consulta puede tener un bajo porcentaje de identidad con una secuencia y aún así ser un acierto significativo.

Es importante señalar que BLAST por sí solo puede no ser suficiente para la identificación definitiva de especies, especialmente si la secuencia de consulta es relativamente corta o si la base de datos carece de una representación completa de determinadas especies. Además, algunas secuencias pueden conservarse en distintas especies, lo que puede dar lugar a coincidencias con varias especies potenciales.

Al cotejar las secuencias y realizar la asignación de subespecies nos encontramos que en varios casos las muestras son asignadas a *A.m. saharensis* y *A.m. mellifera*, esto se puede explicar a que estamos comparando un solo gen mitocondrial y aunque se analizara la secuencia del genoma mitocondrial en su integridad podríamos incrementar el poder de discriminación de los ensayos, ya que estas subespecies de abejas son genéticamente muy similares a nivel de genomas mitocondriales, es aquí que resaltamos la importancia de incluir análisis morfológicos permitirán separar los individuos de ambos grupos (Reybroek, W. et al. 2014).

Una de las consideraciones técnicas mas importantes al momento de analizar fragmentos de ADN es utilizar secuencias que sean relativamente fáciles de alinear, ya que los vacíos producidos por inserciones o deleciones tienen impacto en la reconstrucción filogenética. Se espera que la inclusión de un mayor número de sitios, especialmente de sitios hipervariables, dé lugar a valores de apoyo más elevados que permitan ser el sustento de nudos para poder realizar una asignación a un grupo determinado. Sin embargo, no existe un patrón consistente en todas las muestras. Por este motivo proponemos realizar secuenciación a partir de genes conocidos que tengan tanto sitios conservados como hipervariables en los cuales puedan existir regiones de alineamiento confiable (Eiminafar, a. et al, 2018). Por ellos se escogió el gen de la COX1 en el presente estudio.

El ADN mitocondrial se ha utilizado ampliamente como marcador en estudios genéticos de poblaciones, biogeográficos, filogenéticos y de códigos de barras de ADN. y de códigos de barras de ADN (Fourdrilis, S. et al. 2016). Debido a su relativa rápida coalescencia, se deberían poder distinguir grupos recíprocamente monofiléticos incluso cuando los análisis de marcadores nucleares no lo consigan. Sin embargo, basándonos en nuestros resultados la aplicación de un solo gen mitocondrial parecería no ser un marcador molecular lo suficiente para la clasificación filogenéticos de *Apis*, resultados similares se ha encontrado en otros taxones (Wu, J. et al. 1998).



Nuestros resultados no parecerían ser específicos a los patrones hereditarios mitocondriales ya que resultados similares se han observados para loci de polimorfismos de un solo nucleótido en genomas nucleares. La ausencia de la diferenciación genética, inclusive en secuencias de ADN mitocondrial, en taxones donde existen diferencias fenotípicas claras entre poblaciones se ha reportado en otros invertebrados (Bulgin, N. et al. 2003) y pueden deberse a la retención de la diversidad genética ancestral en linajes que han divergido recientemente (Eiminafar, a. et al, 2018).

En el presente estudio se ha encontrado que el 99,67% de las muestras corresponden a *A. mellifera* con sus correspondientes subespecies, mientras que el 0,33% restante corresponde a las siguientes especies *Argopistes tsekooni*, *Haematopota vexativa* y *Damora sagana*. Lamentablemente estas muestras presentaron bajos rendimientos de ADN con bajos índices de calidad lo que ha generado secuencias pobres pese a nuestros esfuerzos por optimizar tanto la calidad de la muestra como la calidad de la secuenciación. No obstante, consideramos que por la cantidad de muestras procesadas y tomando en cuenta los tiempos de llegada de los individuos al laboratorio, esta cantidad de individuos indeterminados es despreciable.

9 Conclusiones

Durante el presente estudio se extrajo el ADN de 900 muestras de abejas *Apis mellifera* provenientes de los departamentos del proyecto apícola y se obtuvieron marcadores moleculares y por morfometría geometría, concluyéndose que morfológicamente existen varias tendencias asociadas con diferentes subespecies de y al menos 3 variantes genéticas con un marcador molecular que, se disgrega entre más de 10 posibles ecotipos detectados por morfometría geométrica.



DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE CONSTRUCCIÓN DE TIPOS DE NIDO, TIPOS DE ENTRADA AL NIDO Y MATERIAL UTILIZADO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PIQUERAS, DISTRIBUCIÓN, COMPORTAMIENTO DE PECOREO, PARA SU CLASIFICACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE LAS ESPECIES Y VARIEDADES EN ABEJAS NATIVAS

10 Abejas sin aguijón de la tribu Meliponini (Apidae)

Las abejas sin aguijón o Meliponinos, este último término acuñado por Moure (1963) este indica que son abejas pertenecientes a la tribu Meliponini (del griego meli (μέλι) = miel y ponos (πόνος) = trabajo, ini = sufijo que indica o agrupa como tribu a los animales). La distribución de los Meliponinos es pantropical, es decir, que se encuentran en límites latitudinales de los trópicos (Hrncir *et al.*, 2016; Wilms *et al.*, 1996). Se han descrito más de 500 especies a nivel global y en la región Neotropical se tienen registrado encima de 400 especies (Michener, 2013), llegando a representar 80% de todas las especies de abejas sin aguijón. En la región Neotropical se han encontrado en las áreas tropicales y subtropicales, distribuidas desde el Sur de México hasta el Norte Argentino (Camargo *et al.*, 2013). Los registros de especies que se tiene para Bolivia, aun no se ha actualizado por lo que se tiene de ellas 22 géneros y 93 especies (Camargo y Pedro, 2013), aunque este número puede ser mayor.

Las abejas sin aguijón son especies altamente eusociales (Luna-Lucena *et al.*, 2019; Michener, 2007), que aparecieron aproximadamente desde el Cretácico tardío (65–70 Ma, Maastrichtiano tardío), el cual está fuertemente relacionado con la diversificación y origen de las Angiospermas a través de la polinización (Engel, 2000; Grimaldi, 1999). Esta relación aun continua en la actualidad, que se ve reflejada en la variedad de familias de Angiospermas (silvestres y cultivadas) que son polinizadas por estas abejas y han sido reportados en diferentes investigaciones (Emperatriz-Fonseca *et al.*, 2012; Lima-Verde *et al.*, 2014; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018; Urquiza *et al.*, 2022).

En este escenario las abejas sin aguijón, recientemente están siendo valorados por el interés económico en la producción agrícola (Heard, 1999; Meléndez *et al.*, 2018; Venturieri *et al.*, 2012). Es por ello, que la actividad denominada Meliponicultura (término relacionado con la crianza y domesticación de abejas sin aguijón), posibilita que cultivos sean beneficiados por estos polinizadores nativos (Slaa *et al.*, 2006; Venturieri, 2008).

11 Meliponicultura en Bolivia

La crianza de las abejas sin aguijón fue llamada por primera vez con el término de meliponicultura en Brasil que fue propuesto por Nogueira-Neto (1953) para denominar la cría o cultivo de abejas sin aguijón (Meliponini) (Nates-Parra y Rosso-Londoño, 2013). Esta práctica se ha ido desarrollando desde tiempos precolombinos (1000 A.C.), como son los mayas que criaban abejas en vasijas (denominados jobones) (Orellana *et al.*, 2021). Actualmente la Meliponicultura se encuentra en desarrollo en la región Neotropical y esta actividad ocurre principalmente en países donde existen los Meliponinos.



Las experiencias de especies manejadas en Meliponarios en Bolivia, posiblemente datan desde los trabajos de Kempff-Mercado (1968), donde por primera vez se reportan especies procedentes de Santa Cruz de Bolivia. Uno de los primeros trabajos que fue enfocado hacia la Meliponicultura, fue desarrollado por (Montaño, 1996) en comunidades indígenas Sirionó de Ibiato en el Beni, a través del apoyo de The Nature Conservancy, que a la fecha continúan trabajando en esta iniciativa (Townsend *et al.*, 2021). A ese trabajo continuaron proyectos de apoyo en establecimiento de Meliponarios en diferentes regiones de Santa Cruz por Ferrufino y Aguilera (2006), otros proyectos apoyados por WCS (Wildlife Conservation Society) apoyaron a los Guaranís en el Isosog (Martínez y Cuéllar, 2004), también han implementado Meliponarios en Parque Nacional Amboró (Ferrufino, 2013) y el Parque Nacional y ANMI Kaa-Iya del Gran Chaco (Territorios Vivos, 2013). Otros proyectos implementados por WCS, fue realizado en comunidades indígenas de los Tacanas (La Paz) para el contribuir en el desarrollo de Meliponarios (Alipaz *et al.*, 2006).

En la región del Chaco (Tarija) la Fundación PUMA trabajo con inventarios y desarrollo de guías para la crianza de abejas sin aguijón (Clemente y Lahore, 2010). En Cochabamba hubo iniciativas de Meliponicultura impulsadas a partir del Gobierno Autónomo Departamental de Cochabamba para Comunidades Yuracares (GADC/ALD, 2014). Recientemente en los yungas de La Paz en Caranavi y Yolosa están también desarrollándose estas iniciativas de manera comunal (Flores, 2016) o privadas como Senda Verde (Ossio y Levy, 2020). Como también en Chuquisaca a través de diferentes proyectos que fueron implementados como la Fundación PASOS en el Área Protegida Serranía del Iñaño, están trabajando apoyando a asociaciones productoras especialmente conformadas por mujeres (PASOS, 2019).

Este estudio biológico no solo busca comprender las características únicas de este grupo, sino también explorar cómo este conocimiento puede contribuir a diversificar los ingresos de pequeños productores mediante el comercio de miel, cera y otros productos. De manera que resulta importante generar información sobre la biología, comportamiento y manejo racional de estas especies en su rango de distribución.

12 Taxonomía de las abejas sin aguijón

Las abejas sin aguijón pertenecen al linaje Anthophila (del griego “que aman las flores”), los cuales están dentro de la superfamilia Apoidea dentro el orden Hymenoptera (ver cuadro 1). Aunque también están considerados dentro el linaje Aculeata, estos presentan una característica particular a otros taxas, al ser abejas con aguijón atrofiado tanto aquellas del nuevo mundo como del viejo mundo (Engel *et al.*, 2023).

Tabla 3. Relación taxonómica de las abejas sin aguijón

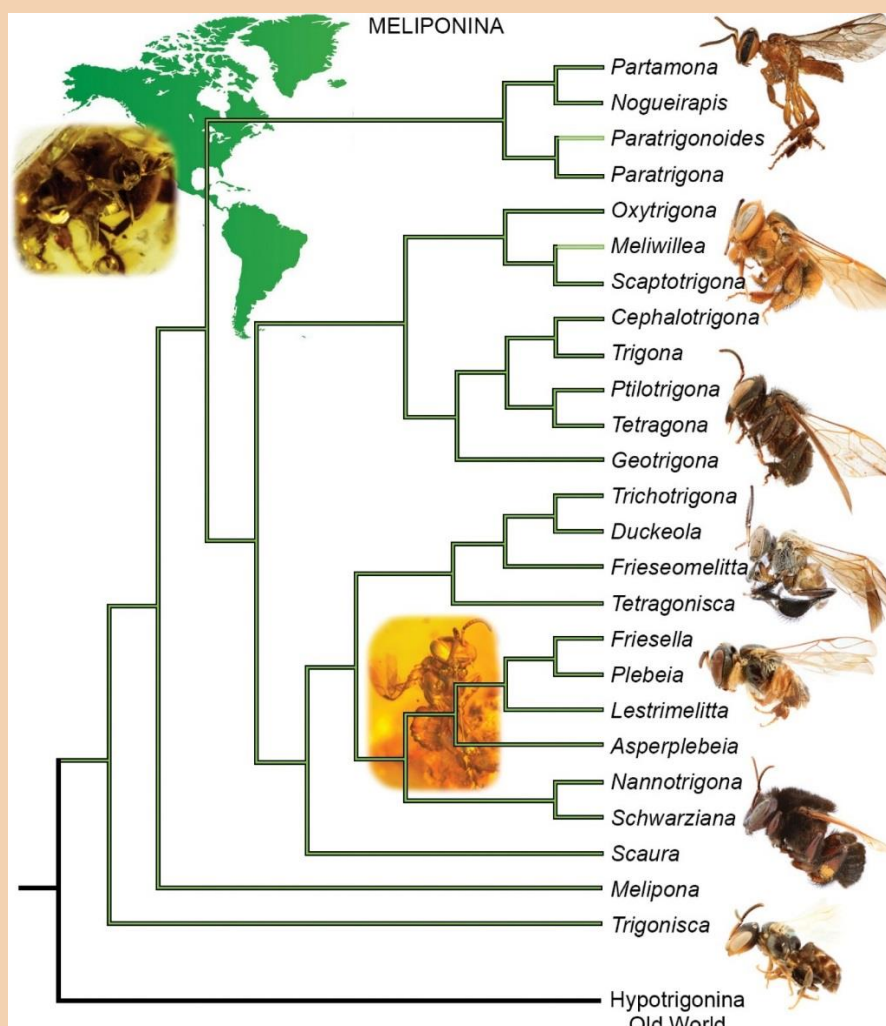
Categorías Taxonómicas	Taxon
Reino	Animalia (Animales)
Filo	Arthropoda (Artrópodos)
Subfilo	Hexápoda (Hexápodos)
Clase	Insecta (Insectos)



Orden	Hymenoptera (del griego himen: membrana y pteros: ala)
Suborden	Apocrita (Abdomen con un tergo incorporado al torax)
Clado	Aculeata (ovopositor modificado en aguijón)
Superfamilia	Apoidea (Abejas, avispas y abejas sin aguijón)
Familia	Apidae (Abejas)
Clado	Anthophila (altamente relacionadas con flores)
Subfamilia	Apinae (Abejas melíferas y abejas sin aguijón)
Tribu	Meliponini (abejas con aguijón atrofiado)
Subtribu	Meliponina (Abejas sin aguijón del Nuevo Mundo) Hypotrigonina (Abejas sin aguijón del Viejo Mundo)

En la región Neotropical las abejas sin aguijón (25 géneros), es un linaje más diversificado a comparación de otras abejas sin aguijón (19 géneros) del viejo mundo (África, Asia y Australia) (ver figura 20).

Figura 19. Filogenia de la Subtribu Meliponina (*New World Meliponini*) Fuente: Engel et al., (2023)





13 Especies de abejas sin aguijón y aquellas manejadas en Bolivia

En Bolivia los registros de especies que se tiene para Bolivia, son 22 géneros y 93 especies (Camargo y Pedro, 2013), aunque el número de géneros se incrementó a 23. Además, se pueden encontrar varias especies de abejas sin aguijón que son manejadas en la meliponicultura por lo menos unas 8 especies (ver cuadro 2).

Tabla 4. *Lista de géneros para Bolivia y aquellas manejadas*

Genero	Especies manejadas en Meliponarios
<i>Celetrigona</i> Moure, 1950	
<i>Cephalotrigona</i> Schwarz, 1940	
<i>Dolichotrigona</i> Moure, 1950	
<i>Duckeola</i> Moure, 1944	
<i>Frieseomelitta</i> von Ihering, 1912	
<i>Geotrigona</i> Moure, 1943	
<i>Lestrimelitta</i> Friese, 1903	
<i>Leurotrigona</i> Moure, 1950	
<i>Melipona</i> Illiger, 1806	<i>Melipona rufiventris</i> <i>Melipona ebúrnea</i> <i>Melipona tumupasae</i> <i>Melipona brachychaeta</i>
<i>Nannotrigona</i> Cockerell, 1922	
<i>Nogueirapis</i> Moure, 1953	
<i>Oxytrigona</i> Cockerell, 1917	
<i>Paratrigona</i> Schwarz, 1938	
<i>Partamona</i> Schwarz, 1939	
<i>Plebeia</i> Schwarz, 1938	
<i>Plectoplebeia</i> Melo, 2016	
<i>Ptilotrigona</i> Moure, 1951	
<i>Scaptotrigona</i> Moure, 1942	<i>Scaptotrigona polysticta</i> <i>Scaptotrigona postica</i> <i>Scaptotrigona depilis</i>
<i>Scaura</i> Schwarz, 1938	
<i>Schwarzula</i> Moure, 1946	
<i>Tetragona</i> Lepeletier & Serville, 1828	
<i>Tetragonisca</i> Moure, 1946	<i>Tetragonisca angustula</i>
<i>Trigona</i> Jurine, 1807	
<i>Trigonisca</i> Moure, 1950	



14 Características biológicas

14.1 Individuos de la colonia.

Está conformado por la reina que es la hembra fértil que se dedica a la reproducción; es la única que pone huevos para mantener la población y garantiza la supervivencia de las próximas generaciones; las obreras son las abejas que realizan los trabajos de recolección de néctar, polen, agua, resinas vegetales, semillas, arcilla que usa para la construcción del nido, alimentación propia y la de la demás población y los y por último los zánganos: individuos dedicados a fecundar a las nuevas reinas Tusó 2014. El ciclo de desarrollo de esta especie es de 36 días, donde según (Nates, 2006), el huevo dura 6 días, la larva y pupa tiene una duración de 10 y 20 días respectivamente (Cortes & Olarte, 2019).

14.2 Nidos

El nido de las abejas sin aguijón, construyen en diferentes tipos de sustrato (p.e. troncos, suelo, termiteros y otros) y que por medio de la piquera es posible reconocer algunas especies (Hernández *et al.*, 2015; Imperatriz-Fonseca y Alves, 2020), las cuales están hechas principalmente por resinas proveniente de árboles, combinados con arcilla. Según la especie, aunque comparten características comunes, en general, las abejas sin aguijón eligen arboles huecos, paredes y cualquier lugar que ofrezca un espacio libre de humedad excesiva y que esté libre de hormigas y otras especies que representen un peligro. Estos espacios son adaptados por las abejas para convertirlos en su hábitat.

a) Estructura general

Los nidos de las abejas sin aguijón de la tribu Meliponini pueden tener una estructura compleja y diversa. Están compuestos por una serie de cerdas o compartimentos, que a menudo se asemejan a tubos o pequeñas bolsas, y se ubican en una disposición que puede ser horizontal o vertical, según la especie.

El nido se compone de varias partes clave, entre las que destacan la piquera o entrada, con medidas de 0,7 - 0,9 m de diámetro y 1-3,5 cm de profundidad. Además, se encuentran pots de almacenamiento, contruidos con cerumen, donde se guardan la miel y el polen, fundamentales como fuentes de energía y proteína.

b) Tamaño, forma y ubicación del nido

El tamaño del nido varía, con estructuras como discos de cría y pots de almacenamiento. La forma incluye alveolos elipsoidales en los discos de cría. La ubicación se elige estratégicamente en lugares libres de humedad y riesgos.

c) Materiales de construcción

Las abejas sin aguijón utilizan una variedad de materiales para construir sus nidos. Estos pueden incluir cera, resinas, polen, madera o tierra.



Para enfrentar riesgos de humedad, las abejas utilizan batumes, un material rígido. Se mezcla barro, resinas vegetales y semillas repelentes para neutralizar estos riesgos. También, se emplea para sellar aberturas. El involucro del nido consiste en delgadas láminas de cerumen, dispuestas en capas para mantener la temperatura adecuada en el área de cría.

d) Reservas de alimento

Dentro de los compartimentos del nido, las abejas almacenan alimento, como polen y néctar, para alimentar a las crías y a las abejas adultas.

e) Cría

Los discos de cría, hechos de cerumen, son paneles con alveolos elipsoidales dispuestos horizontalmente. Aquí, las abejas depositan huevos, larvas y pupas. Las operarias inicialmente proveen alimento, luego la reina deposita los huevos, y finalmente otras operarias sellan los alveolos hasta que las abejas jóvenes emergen.

f) Piqueras

La entrada al nido, llamada piquera, es esencial para controlar el acceso y salida de las abejas. Sus medidas son fundamentales para la defensa del nido. En las abejas sin aguijón de la tribu Meliponini, las piqueras también varían según la especie y las necesidades de la colonia.

El tamaño de la piquera es una característica importante. Es lo suficientemente grande para permitir que las abejas entren y salgan, pero lo suficientemente pequeña para evitar que depredadores y otros intrusos entren con facilidad.

La forma de la piquera puede ser circular u ovalada, y su diseño puede variar según la especie. Algunas piqueras pueden ser tubulares. La ubicación de la piquera en el nido puede estar en la parte superior, lateral o inferior, y también puede variar según la especie.

g) Defensa

Algunas especies de abejas sin aguijón de la tribu Meliponini tienen estructuras defensivas cerca de la piquera para evitar la entrada de depredadores, como resinas pegajosas o proyecciones duras.

La defensa del nido se asegura a través de la ubicación estratégica, la piquera como punto de control de acceso y salida, y el uso de materiales como el batumen para sellar aberturas y enfrentar riesgos externos.

14.3 Colmena artificiales

En la meliponicultura, se utilizan cajas o colmenas específicas para albergar a las abejas sin aguijón. Estas colmenas son de diseño especializado o denominadas como cajas racionales para el desarrollo de las colonias de los meliponinos, aunque todavía existen todavía el uso de cajas rústicas. Algunos tipos comunes de colmenas utilizados en Bolivia incluyen:

- Colmenas de tronco o colmenas rústicas hechas de madera.
- Colmenas modernas hechas de materiales más ligeros, como PVC o plástico.



- Colmenas horizontales y verticales, que pueden variar en forma y tamaño.

15 Especie colectadas en el trabajo de campo

15.1 *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

15.1.1 Nombre común: Señorita

Estas abejas se caracterizan por ser especies sociales, y se distinguen por tener un aguijón atrofiado, estructura vestigial reducida la cual no es funcional y por lo tanto no pican (Camargo y Posey, 1990). Viven en grupos de colonias en estrecha relación con la vegetación circundante, de manera que la productividad que proveen sus alimentos depende de la flora melífera existente.

a) Morfología observable

Abejas con integumento amarillo y negro; cuerpo muy esbelto; longitud del cuerpo entre 4.4-4.7 mm; integumento amarillo en el pronoto, escutelo, patas y metasoma; con marcas amarillas en la carita y los lados del oscuro; mandíbulas, clípeo y escapos amarillo intenso (Ayala, 1999).

Figura 20. Morfología de *Tetragonisca angustula* (Foto: RPSP).





b) Nidificación

El proceso de construcción del nido es muy complejo en las abejas melíponas. La construcción del nuevo nido empieza varios días antes de que la nueva reina emprenda su vuelo al nido. La multiplicación de colonias en *T. angustula* empieza con la exploración de posibles lugares para desarrollar el nuevo nido. Esta tarea es realizada por las abejas exploradoras (obreras). Después las abejas exploradoras son las encargadas de limpiar la cavidad y cerrar las grietas con propóleo. Seguidamente las obreras transportan propóleo, miel y polen de la colonia madre a la colonia hija. Las obreras empiezan a construir las celdas de miel, polen y panales antes de la llegada de la nueva reina, esto lo realizan para evitar la muerte de la reina en caso que durante la construcción del nido sea invadido por hormigas o fóridos. Posteriormente llegan del nido original una reina virgen acompañada de numerosas obreras al nuevo sitio, para comenzar a integrar la población de la nueva colonia. Al cabo de 7 u 8 semanas la colonia está plenamente constituida, sus adultos son hijos de la reina nueva, la cual se apareo en los primeros días de su arribo a la colmena. Arsaluza (s/f). La inversión más grande de la colonia madre es en propóleo y obreras. Aproximadamente unas 500 a 1000 obreras entran a la colonia hija siguiendo a la nueva reina, es una pequeña cantidad de obreras comparado con la población de la colmena madre Veen y Sommeijer, (1996), citado por Flores, N. 2016 (p. 19).

La abeja *T. angustula*, nidifica en troncos de árboles huecos vivos y muertos. Su ingreso está a baja altura, a un promedio de 0.49 metros (rango 0.19 a 1.50 metros) (Townsend, 2016). El nido es pequeño, aproximadamente unos 15 a 20 cm de diámetro. Existe una gran variedad de árboles para nidificar, como: *Amburana cearensis*, *Astronium urundeuva*, *Calycophyllum multiflorum*, *Cardenasiodendron sp.*, *Cedrela sp.*, *Cordia trichotoma*, *Cydonia oblonga*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Erythrina sp.*, *Gallesia integrifolia*, *Lithraea ternifolia*, *Machaerium scleroxylon*, *Myroxylon peruiferum*, *Ocotea sp.*, *Opuntia sp.*, *Persea sp.*, *Phyllanthus sp.*, *Piptadenia boliviana*, *Prosopis sp.*, *Pseudobombax argentinum*, *Rhamnus sphaerospermus*, *Schinopsis sp.*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tipuana tipu*.

También se observa sus nidos en paredes de casas, agujeros en el suelo, recipientes como calabazos, canastos, cajones, etc. Suelen hacer sus nidos en troncos de bambú (*Bambusa guadua*), higuerón (*Ficus subandina*), guadua (*Guadua angustifolia*) y calabazo (*Crescentia cujete*) (Nates-Parra, 2001).



Figura 21. Piquera de *Tetragonisca angustula* en caja tecnificada.



c) Características de la piquera

La entrada del nido es una pipa, no demasiado corto, construido con cerumen suave, su pared es delgada y tiene pequeños orificios. Panales horizontales o helicoidales, donde cria y coloca las celdas reales. Alrededor de los panales de cría, se construyen pequeños frascos de comida, llegando a medir 1.5 cm. El tamaño de las colonias: 2,000-5,000 abejas. Puede o no puede mostrar un comportamiento agresivo, sin embargo, este comportamiento es corto. Es una de las abejas más fáciles de criar (Imperatriz *et al.*, 2011; Nogueira-Neto, 1997)

d) Comportamiento de pecoreo

Son abejas poco defensivas, y pueden encontrarse pecoreando en una variedad de plantas, desde cítricos, hortalizas como: zanahoria, cebolla y variedad de plantas silvestres.



e) Diferencia con las *Apis mellifera*

Según Flores, N. (2016). “Las abejas meliponas, en comparación con las *Apis mellíferas*, son más higiénicas, ya que buscan fuentes de néctar en árboles más altos, con lo cual evitan flores rastreras localizadas en lodazales o contaminadas por las heces fecales de animales domésticos. Su preferencia por el polen rico en lípidos, alcaloides y flavonoides confiere propiedades medicinales a su miel, combatiendo bacterias y beneficiando la salud humana”. Además, “las abejas meliponas son polinizadoras más eficientes, especialmente en flores acampanadas como orquídeas, contribuyendo a la conservación de selvas y flora nativa. Su actividad primaria en las comunidades tropicales las hace esenciales para el ecosistema. Una diferencia clave es la tolerancia de las reinas meliponas hacia otras reinas vírgenes, en contraste con las *Apis* que las eliminan. En colonias de meliponas, varias reinas vírgenes pueden coexistir, siendo mantenidas en áreas específicas por las obreras. Este comportamiento permite la convivencia armoniosa y, en ausencia de reemplazo de la reina madre, las vírgenes son eventualmente sacrificadas por las obreras. (p. 14)

f) Distribución

Se encuentran presentes en la región Neotropical desde México hasta el norte de Argentina. Con alta adaptabilidad en ambientes urbanos.

Figura 22. Distribución *Tetragonisca angustula* en la región Neotropical





15.2 *Melipona* Moure, 1942

15.2.1 Especies registrados y sus características

15.2.1.1 *Melipona (Melipona) baeri*. Vachal, 1904

Nombre común: Erereu orito (Tacana)

Venturieri *et al.* (2003) señala que “las abejas meliponas son más higiénicas que las *Apis mellifera* debido a que las abejas sin aguijón alcanzan más el vuelo en busca de fuentes de néctar procedente de árboles de mayor altura, al contrario, las abejas *Apis*, pecorean en cualquier flor, inclusive las rastreras las cuales son localizadas en lodazales o contaminadas por las heces fecales de animales domésticos como bovinos o porcinos

a) Morfología observable

Abejas de tamaño medio, con longitud total aproximado de 8 a 10 mm; un ancho de tórax de 3.5 a 4 mm. El pronoto casi invariablemente negro, con un poco de amarillo. El abdomen con frecuencia en la unión de los tergitos posee manchas amarillas conspicuas (Schwarz, 1932).

Figura 23: *Melipona baeri* (Foto Rich Hoyer, 2022)





b) Nidificación

Los nidos están en las cavidades de los árboles, a menudo en grandes troncos de árboles, o presentan anidación subterránea (Emperatri-Fonseca et al, 2012).

Figura 24. *Melipona baeri* recogiendo substrato para la construcción del nido (Foto Dirko, 2021)



c) Características de la piquera

La entrada del nido de algunas es llamada “boca de sapo” o “sapa” debido a la forma de la entrada de su nido.

d) Comportamiento de pecoreo

Son abejas poco defensivas, y pueden encontrarse pecoreando en una variedad de plantas, sus actividades se desarrollan a una temperatura mayor a los 15°C

e) Distribución

Se encuentran presentes en Sur América especialmente en Bolivia (Potosí, Chuquisaca, Tarija y Santa Cruz), hasta el norte de Argentina.



Figura 25. Distribución *Melipona baeri* en Sud América.



15.2.2 *Melipona (Michmelia) eburnea* Friese, 1900

Nombre común: Shepeste (Yuracare), Boca y sapo (español)

a) Morfología observable

Abejas de tamaño medio, con longitud total aproximado de 8 a 10 mm; un ancho de tórax de 3.5 a 4 mm. El pronoto casi invariablemente amarillo. El abdomen con frecuencia en la unión de los tergitos posee manchas amarillas conspicuas (Schwarz, 1932).



Figura 26. *Morfología de Melipona eburnea en Sud América (Foto: RPSP).*



b) Nidificación

El nido de cría es sobrepuesto horizontalmente, compuesto por celdas de cría de igual tamaño. Con aspecto liso o rayado, la abertura del nido de la entrada con un amplio labio y por ello es conocido como boca y sapo. Los nidos están en las cavidades de los árboles, a menudo en grandes troncos de árboles, o presentan anidación subterránea (Emperatri-Fonseca et al, 2012).

c) Características de la piquera

La entrada del nido de algunas es llamada “boca de sapo” o “sapa” debido a la forma de la entrada de su nido.



Figura 27. *Piquera de Melipona eburnea en caja tecnificada*



d) Comportamiento de pecoreo

Las obreras viven cerca de 36 a 43 días, tiene un comportamiento poco agresivo. La mayor parte se alimentan desde las 5 a 7 horas. Su actividad de forrajeo son comprometidas cuando la temperatura y humedad exceden los 30°C y 90% de humedad.

e) Distribución

Se encuentran presentes en Sur América especialmente en Bolivia (Cochabamba, La Paz y Pando).

Figura 28. *Distribución Melipona eburnea en Sud América.*





15.3 Scaptotrigona Moure, 1942

- Especies registrados y sus características

15.3.1 Scaptotrigona depilis (Moure, 1942)

Nombre común: Negro (Español), Jallp'a negra (Quechua), Bussa (Yuracare), Jobobosi (Tacana), Tisoa (Yuqui)

a) Morfología observable

Abejas de tamaño medio, con longitud total aproximado alrededor de 6 mm; con un peso entre 15-22 mg y son de color negro (Schwarz, 1938). Álvarez 2017, citado por Dávalos (2022), señala que “las especies de abejas del género Scaptotrigona (Moure, 1942) poseen un tamaño promedio que va de 5 a 7mm, muy robustas, en donde la cabeza y el mesosoma son fuertemente punteado. Este género comprende alrededor de 22 especies de abejas, es un grupo poco estudiado en su ecosistema, existiendo varias especies que aún no han podido ser identificadas. Son potencialmente aptas para ser utilizadas comercialmente en la producción de miel. (p. 1)

Figura 29. Morfología de *Scaptotrigona depilis* (Foto: RPSP).





b) Nidificación

Anidan en secciones parcialmente huecas de árboles en las selvas tropicales. Uno de los árboles comunes anidados por 5. postica es el *Caryocar brasiliense*, también conocido como el árbol de cerrado (Antonini 8: Martins, 2003). En Chuquisaca (Bolivia) se ha encontrado nidos en troncos de *Tipuana tipu*, *Myroxylon peruiferum*, *Machaerium scleroxylon*, *Amburana cearensis*, *Persea* sp., y *Schinopsis* sp.

Figura 30. *Piquera de Scaptotrigona depilis*



c) Características de la piquera

Estructura en forma de tubo de color café oscuro con porosidad fina. Con dimensiones en promedio de 2.3 cm de ancho y 3.3 cm de altura que puede variar dependiendo la especie. La entrada al nido tiene un área transversal media de 143.5 mm² y está custodiada por alrededor de 8 guardias. Estas abejas se paran cerca de la entrada, — ocasionalmente — volando — hacia adelante y hacia atrás delante de la entrada (Couvillon et al., 2008).

d) Comportamiento de pecoreo

Son abejas muy defensivas, y pueden encontrarse pecoreando en una variedad de plantas. Utilizan señales de feromonas para comunicarse entre sí y marcar la ubicación de fuentes de alimentos. Estas feromonas ayudan a otras abejas de la colonia a encontrar las flores o árboles que contienen néctar y polen.

e) Distribución

Se encuentran presentes en la región Neotropical principalmente en la región sureste hasta el norte de Argentina.



Figura 31. *Distribución Scaptotrigona depilis*



6.3.2. *Scaptotrigona polysticta* Moure, 1950

Nombre común: Negro (Español), Jallp'a negra (Quechua), Bussa Wooso (Yuracare)

a) Morfología observable

Abejas de tamaño poseen un tamaño promedio que va de 6 mm, muy robustas, en donde la cabeza y el mesosoma son fuertemente punteado. Este género comprende alrededor de 22 especies de abejas, es un grupo poco estudiado en su ecosistema, existiendo varias especies que aún no han podido ser identificadas. Son potencialmente aptas para ser utilizadas comercialmente en la producción de miel. (p. 1)



Figura 32. Morfología de *Scaptotrigona polysticta* (Foto: RPSP).



b) Nidificación

Anidan en secciones parcialmente huecas de árboles en las selvas tropicales. Uno de los árboles comunes anidados por *S. postica* es el Caryocar brasiliense, también conocido como el árbol de cerrado (Antonini 8: Martins, 2003). En Chuquisaca (Bolivia) se ha encontrado nidos en troncos de *Tipuana tipu*, *Myroxylon peruiferum*, *Machaerium scleroxylon*, *Amburana cearensis*, *Persea* sp., y *Schinopsis* sp.



Figura 33. Piquera de *Scaptotrigona polysticta*



c) Características de la piquera

Construido con cerumen de coloración oscura y el largo de la entrada del tubo se direcciona hacia abajo. Entrada del nido con mas de seis guradias

d) Comportamiento de pecoreo

Son abejas muy defensivas, y pueden encontrarse pecoreando en una variedad de plantas. Utilizan señales de feromonas para comunicarse entre sí y marcar la ubicación de fuentes de alimentos. Estas feromonas ayudan a otras abejas de la colonia a encontrar las flores o árboles que contienen néctar y polen.



e) Distribución

Se encuentran presentes en la región Neotropical principalmente en la región sureste hasta el norte de Argentina.

Figura 34. *Distribución Scaptotrigona polysticta*



15.4 *Nannotrigona* Cockerell (1922)

a) Morfología observable

Abejas pequeñas con apariencia delicada, tímida. Tienen coloración negro mate en la cabeza y tórax, el abdomen es negro brillante. También presenta dibujos amarillos en la parte dorsal del tórax y sus ojos suelen ser de color verde amarillento con pequeñas sombras grises; las alas son de color marrón oscuro.



Figura 35. *Nannotrigona* sp. (Colectada en el trabajo de consultoría, Arriba), *Nannotrigona melanocera* citado en Lucia y Alvarez, (2022) (abajo)



b) Nidificación y características de la piquera

El nido es construido con cerumen marrón con los discos de cría horizontales y sobrepuestos, con presencia de celdas realeras y envueltos por involucro. El tubo de entrada del nido posee una larga abertura que tiene en promedio 1,2 cm y el largo vario de 8 a 57 cm, en cuyo margen se posicionan las abejas guardianas.



Figura 36. Piquera de *Nannotrigona melanocera*



c) Pecoreo

En áreas urbanas en promedio recorren 450 m mientras que, en áreas con cultivos agrícolas, la distancia de retorno al nido puede ser de hasta 600 metros

d) Distribución

Se encuentran presentes en la Región Neotropical con distribución característica desde el extremo Sur de México Hasta Paraguay. Las especies más frecuentes son *Nannotrigona* (*Nannotrigona*) *melanocera* (Schwarz, 1938).

Figura 37. Distribución de *Nannotrigona melanocera*





15.5 *Partamona* (Schwartz, 1948)

a) Morfología observable

Abejas pequeñas generalmente de cuerpo negro, con granulado opaco muy fino y dibujos amarillos en la cabeza tórax y patas (variable), el cuerpo en general presenta poca velloosidad, el abdomen es igual o ligeramente más ancho que el tórax, las patas presentan una corbícula ancha con forma de cucharita redondeada.

Figura 38. *Partamona* sp. (Colectada en el trabajo de consultoría, Arriba), *Partamona combinata* citado en Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020) (abajo)

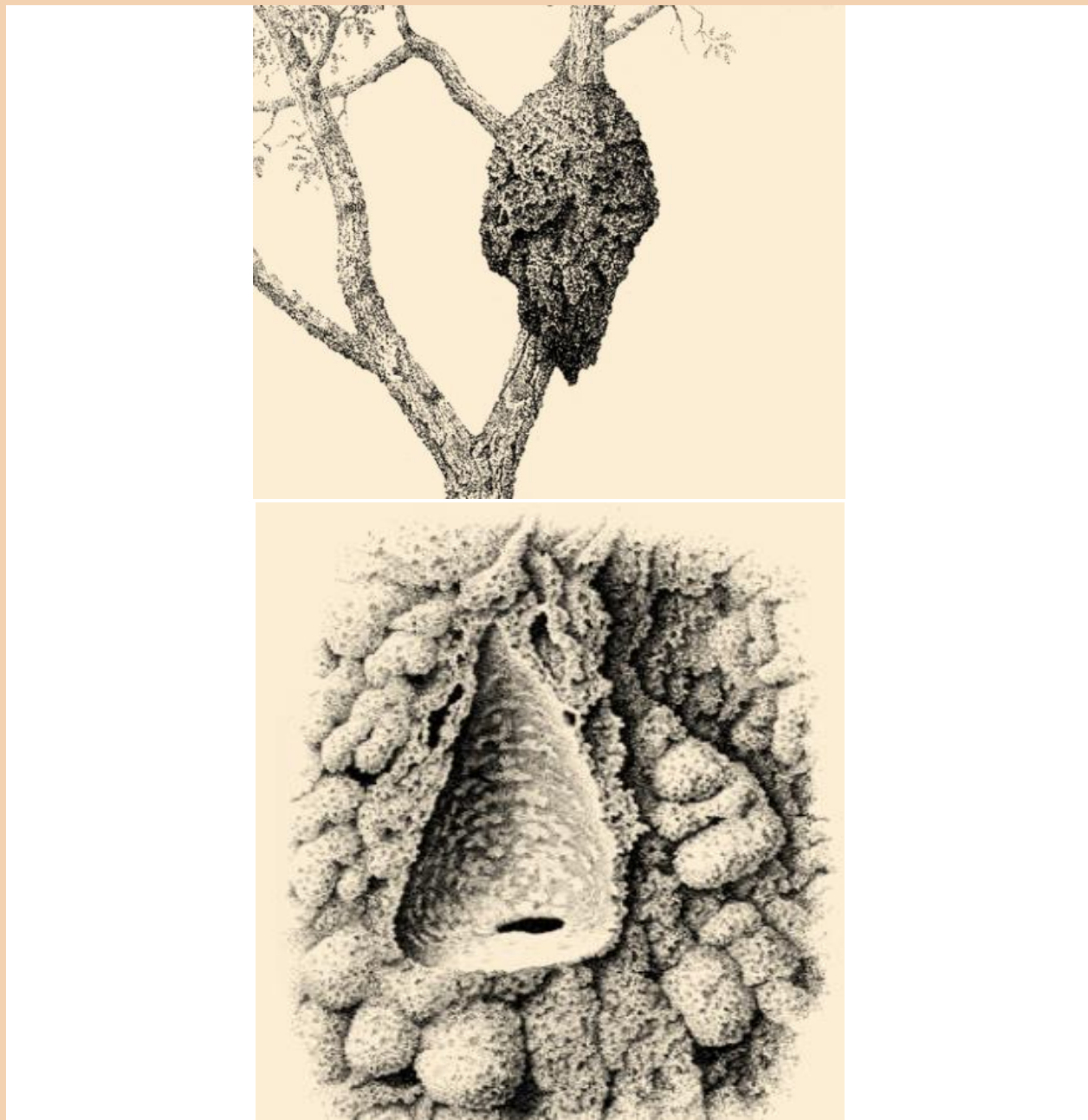




b) Nidificación y características de la piquera

El material de construcción de la entrada se conforma mayoritariamente de resinas y, en menor cantidad, cera y barro. En la parte interna pueden elaborar una pared con perforaciones del tamaño de la abeja. Generalmente están asociados a nidos activos o abandonados de termitas. La parte inferior de la entrada presenta estructuras en forma de barba, que suelen colgar de la misma.

Figura 39. Nidos de la especie de *Partamona combinata*, citado en Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)





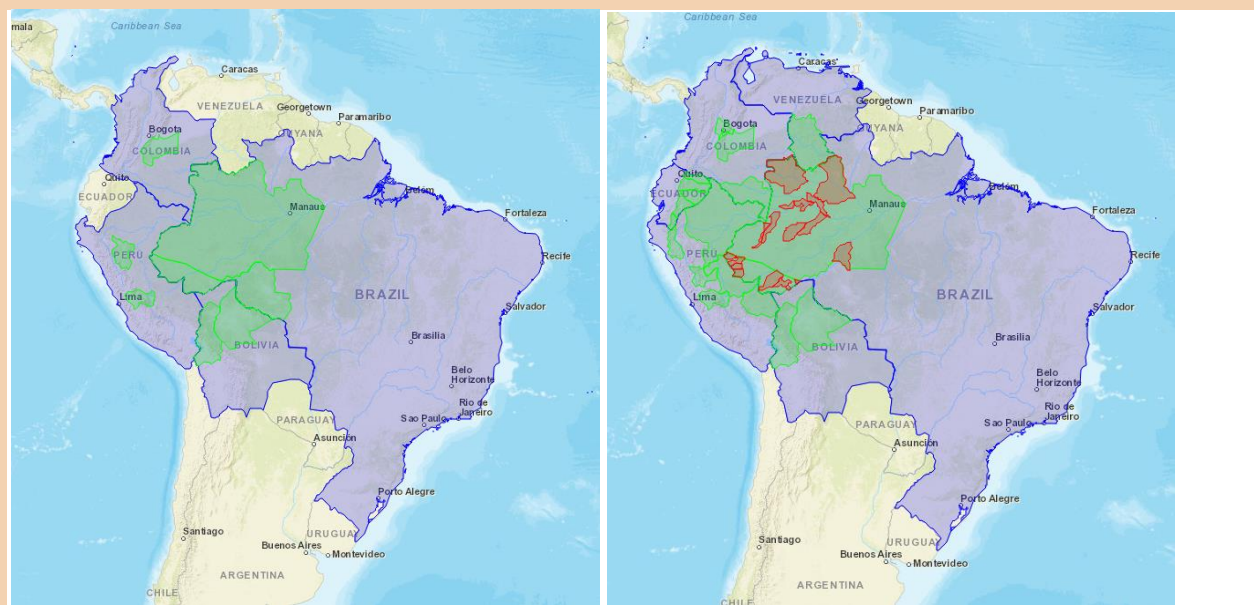
c) Pecoreo

Son muy defensivas ante cualquier alteración de su entorno. La piquera presenta un número considerable de abejas guardianas. El ataque de estas abejas es muy persistente y masivo, sus mordidas podrían resultar molestas y en cierta forma perjudiciales.

c) Distribución

Este grupo de abejas tiene registros desde el Sur de Estados Unidos hasta el Norte de Argentina. En Bolivia existen más de 8 especies las especies más frecuentes son *Partamona combinata* y *Partamona epiphytophila*

Figura 40: Distribución de *Partamona*: *Partamona combinata* (Izquierda) y *Partamona epiphytophila* (derecha)



15.6 Trigona Jurine, 1807

a) Morfología observable

Abejas de cuerpo mediano, generalmente negro, con mandíbulas que pueden ser a veces rojizas. El abdomen es corto y ancho y las alas oscuras. Algunas especies pueden presentar pelos muy grandes en el clípeo (en la parte media de la cara).

b) Nidificación y características de la piquera

Las abejas construyen sus nidos, expuestos de forma esférica sobre ramas de árboles y, de tamaño variable. La estructura del nido se conforma por una mezcla de cera, resinas, material vegetal en descomposición, excremento, etc. La capa de estos materiales que envuelven al nido forma numerosas depresiones (similar a pequeños cráteres). La entrada suele ser construida de diversos materiales como resinas, barro y partículas de arena. El tamaño de la entrada oscila entre 3 a 5 o 6



cm de largo y ancho. La entrada puede estar conformada por un conjunto de laberintos, los cuales se conectan a la cámara de cría. No suelen ser significativamente agresivos, algunas especies tiene guardianas y otras no.

Figura 41. *Trigona guianae* (Arriba) y *Trigona cilipes* (Abajo) Fuente: Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)





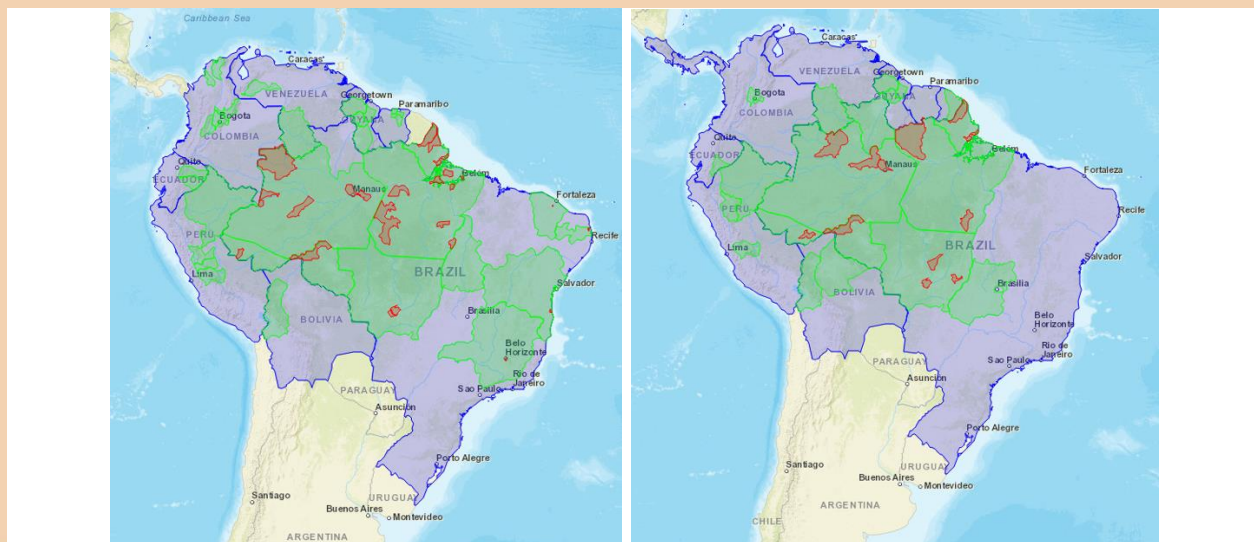
Figura 42. Nido de *Trigona guianae* (Izquierda) y *Trigona cilipes* (derecha). Fuente: Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)



c) Distribución

El género *Trigona* tiene amplia distribución en todo el continente americano. En Bolivia mas de 15 especies, de estas 3 especies son las más frecuentes *Trigona guianae*, *Trigona amalthea* y *Trigona cilipes*

Figura 43. Distribución de *Trigona guianae* (Izquierda) y *Trigona cilipes* (derecha)





15.7 *Plebeia* Schwartz, 1938

a) Morfología observable

Especies pequeñas generalmente de tonalidad negra, aunque el abdomen puede ser más claro y robusto. Pueden tener dibujos amarillos en la cara y tórax, y patas oscuras con tarsos amarillos.

b) Nidificación y características de la piquera

La piquera se presenta como un agujero redondo, un poco más grande del tamaño de la cabeza de la abeja. El diámetro promedio es 0,5 cm. El material de construcción es resinoso con pequeñas puntuaciones del mismo alrededor de la entrada. Durante el pecoreo no hay flujo constante de salida y entrada de abejas en la piquera. Suelen colectar sudor de humanos y animales.

Figura 44. *Plebeia* sp. (colectada en campo, Arriba), *Plebeia alvarengai* registrado por A.B.E.L.H.A. (2016)





Figura 45. Nido de *Plebeia alvarengai*



c) Distribución

El género *Plebeia* tiene una distribución característicamente Neotropical, en Bolivia más de 6 especies, de ellos los más comunes son *Plebeia alvarengai*, *Plebeia remota* y *Plebeia intermedia*

Figura 46. Distribución de *Plebeia alvarengai*





15.8 *Scaura* Schwartz, 1938

a) Morfología observable

Abejas pequeñas generalmente oscuras con poca velloidad y abdomen café oscuro, basitarso más ancho e hinchado que la tibia (en el tercer par de pata de algunas especies). Poseen puntuación densa en la cabeza y tórax y los ojos son color café.

Figura 47. *Scaura* sp. (colectada en campo, Arriba), *Scaura latitarsis* registrado por A.B.E.L.H.A. (2016)





b) Nidificación y características de la piquera

La entrada tiene forma tubular y está compuesta por cera con porosidad fina. Su diámetro promedio es aprox. 1 cm y su longitud de 2 cm aproximadamente. Este grupo frecuentemente construye sus nidos en termiteros y, en ciertas ocasiones, en nidos de hormigas. Se observan abejas guardianas en la piquera, aunque su comportamiento no es agresivo.

Figura 48. Nido de *Scaura latitarsis*. Fuente: Imperatriz-Fonseca y Alves, (2020)





c) Distribución

Existen registros dispersos de este grupo de abejas en la Región Neotropical. En Bolivia existen 3 especies de los cuales la más frecuente es *Scaura latitarsis*, registro que se está actualizado y procede de Cochabamba.

Figura 49. Distribución de *Scaura* sp.



15.9 *Oxytrigona Scaura* Cockerell, 1917

a) Morfología observable

El cuerpo completo de estas abejas es de color amarillo hasta anaranjado, con ojos verdes. Su cabeza es más ancha que larga, y el espacio entre sus ojos es mucho mayor al tamaño de los mismos.



Figura 50 *Oxytrigona* sp.



b) Nidificación y características de la piquera

Este grupo de abejas no construye piquera. La entrada es amplia; lo que permite la salida e ingreso de muchas obreras que se ubican a diferentes alturas. En general, se caracterizan por defender la colonia segregando una sustancia irritante causante de quemaduras en la piel. El nombre del género hace referencia a la segregación de estas sustancias.

c) Distribución

Se tienen datos de distribución de este grupo de abejas desde Centro América, hasta el sur de Brasil.

Figura 51. *Distribución de Oxytrigona* sp.





15.10 *Tetragona* Lepeletier & Audinet-Serville, 1828

a) Morfología observable

Son abejas de cuerpo mediano, de tonalidad naranja, con la mitad de la parte frontal de la cabeza y costados del tórax amarillos. La región superior de su cabeza y tórax son de coloración café y la parte inferior de la corbícula negra; tiene ojos verdes.

Figura 52. *Tetragona* sp.



b) Nidificación y características de la piquera

Para este grupo de abejas, es característica la piquera en forma tubular y resinosa sin porosidad. El extremo es biselado e irregular con forma ovalada. El ancho general aproximado es de 1 cm y casi 2 de altura y la longitud puede variar de 4 a 8 o 9 cm. El comportamiento de este grupo no es defensivo. La piquera generalmente cuenta con un grupo reducido de abejas guardianas en la entrada.

c) Distribución

Tiene una distribución que comprende Centro América hasta el Sur de Brasil con un registro en Chile.



Figura 53. Distribución de *Tetragona* sp.



15.11 *Ptilotrigona* Moure, 1951

a) Morfología observable

Este grupo de abejas tiene el tegumento liso y pulido, con una leve puntuación ligera. El color varía entre las especies entre amarillento café hasta negruzco. Las alas levemente amarillentas hasta ferrugíneas, la cabeza es negra con dibujos amarillos. Los dientes de la mandíbula son muy grandes.

Figura 54. *Ptilotrigona* sp





b) Nidificación y características de la piquera

La entrada en este grupo tiene bastantes variaciones, a veces pueden ser tubos ornamentados con proyecciones radiculiformes, otras veces son tubos más simples con pocas proyecciones restrictas al borde apical. Generalmente habitan arboles vivos en donde impermeabilizan el interior con aplicaciones resinosas ennegrecidas, formando un revestimiento uniforme.

Especies de este género están ente los mas agresivos, donde varias abejas se sitúan en el tupo de la entrada y atacan a la menor aproximación, incluso reaccionando a la presencia de observadores a más de 10 metros de distancia.

c) Distribución

Este grupo de abejas está restringido prácticamente a la cuenca del Amazonas con lgunos registros en Colombia y Panama, fuera de esta cuenca.

Figura 55. *Ptilotrigona* sp



16 Conclusiones

El estudio detallado de las características de las abejas meliponas revela su relevancia en la mejora de actividades productivas relacionadas con este tipo de abejas. El conocimiento adquirido puede ser clave para el manejo adecuado y sostenible de estas especies.

Las poblaciones de abejas meliponas enfrentan un serio riesgo de desaparición. Este peligro se deriva principalmente de la destrucción y alteración de su hábitat, así como de la desaparición o sustitución de especies vegetales cruciales para su supervivencia y alimentación.

Las abejas meliponas desempeñan un papel vital como polinizadores. Su contribución se extiende más allá de los bosques, alcanzando incluso los campos agrícolas. Esta función subraya la importancia de su conservación no solo para el ecosistema natural, sino también para la agricultura.



17 Recomendaciones:

En base al estudio de “Descripción de las formas de construcción de tipos de nido, tipos de entrada al nido y material utilizado para la construcción de piqueras, distribución, comportamiento de pecoreo, para su clasificación y reconocimiento de las especies y variedades en abejas nativas”, se plantea las siguientes recomendaciones a ser consideradas en Plan de Ordenamiento Territorial Apícola.

- Implementar medidas efectivas para conservar y proteger los hábitats naturales de las abejas meliponas. La preservación de áreas boscosas y la promoción de prácticas agrícolas sostenibles pueden contribuir significativamente a la conservación de estas poblaciones.
- La reintroducción y protección de especies vegetales esenciales para la alimentación de las abejas meliponas son imperativas. La restauración de estas plantas no solo beneficia a las abejas, sino que también fortalece la biodiversidad en general.
- Fomentar prácticas agrícolas que respeten y promuevan la presencia de abejas meliponas puede tener impactos positivos tanto en la producción de alimentos como en la salud de los ecosistemas locales.
- Dada la importancia de las abejas meliponas, se recomienda continuar con investigaciones que profundicen en su comportamiento, necesidades y características específicas. Esto puede facilitar el desarrollo de estrategias más precisas para su conservación y manejo.

Como resumen, se puede plantear que la conservación de las abejas meliponas es esencial para la biodiversidad y la sostenibilidad ambiental, y las acciones recomendadas buscan abordar las amenazas actuales y futuras que enfrentan estas especies cruciales para el equilibrio de los ecosistemas tan frágiles como en Bolivia.



18 Referencias

- A.B.E.L.H.A. (2016), “Sistema de información científica sobre abejas Neotropicales”, *Abelhas no Brasil*, disponible en: <http://abelha.cria.org.br/> (accedido 15 diciembre 2022).
- Alipaz, M., Alvarez, M., Alvarez, V., Buchapi, C., Buchapi, G., Buchapi, I., Cartegena, L., *et al.* (2006), *Experiencias en la crianza de abejas nativas en dos comunidades Tacanas.pdf*, editado por Society/Bolivia, W.C., Greco, La Paz, Bolivia.
- Ayala, R. (1999), “Revision de las abejas sin aguijon de Mexico (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)”, *Folia Entomológica Mexicana*, No. 106, pp. 1–123.
- Camargo, J.M.F. y Pedro, S.R.M. (2013), “Meliponini Lepeletier, 1836”, en Moure, J.S., Urban, D. y Melo, G.A.R. (Eds.), *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version.*, Projeto GEF Polinizadores e ao FUNBIO, disponible en: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.
- Camargo, J.M.F. y Posey, D.A. (1990), “O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponidae, Apidae, Hymenoptera): notas adicionais”, *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia*, Vol. 6 No. 1, pp. 17–42.
- Camargo, J.M.F., Roubik, D.W. y Pedro, S.R.M. (2013), “Historical biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the Neotropical region”, en Vit, P., Pedro, S.R.M. y Roubik, D.W. (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, Springer, New York, pp. 19–34.
- Clemente, K.J. y Lahore, J.L. (2010), “Manual de Meliponicultura”, *Fundacion PUMA - ADACHACO*, Asociación de Apicultores del Gran Chaco (ADACHACO) - Fundación PUMA., Villa Montes, Tarija.
- Emperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D. de A. y Saraiva, A.M. (2012), “Polinizadores e Polinização – um Tema Global”, en Emperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D. de A. y Saraiva, A.M. (Eds.), *Polinizadores no Brasil*, First., Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, pp. 25–48.
- Engel. (2000), “A New Interpretation of the Oldest Fossil Bee (Hymenoptera: Apidae)”, *American Museum Novitates*, Vol. 3296 No. 3296, pp. 1–11.
- Engel, M.S., Rasmussen, C., Ayala, R. y Oliveira, F.F. De. (2023), “Stingless bee classification and biology (Hymenoptera, Apidae): a review, with an updated key to genera and subgenera”, *ZooKeys*, No. 1172, pp. 239–312.
- Ferrufino, U. (2013), “Meliponicultura en proyectos de conservación del Parque Nacional Amboró, Santa Cruz, Bolivia”, en Zamora, G. (Ed.), *Memoria VIII congreso mesoamericano de abejas nativas Costa Rica 2013*, Universidad Nacional - Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales - Ministerio de Cultura y Juventud -, Costa Rica, pp.



250–258.



- Ferrufino, U. y Aguilera, F.J. (2006), “Producción rural sostenible con abejas melíferas sin aguijón”, Asociación Ecológica del Oriente - A.S.E.O., Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Flores, N. (2016), *Caracterización de la meliponicultura (cria de abejas sin aguijón - Tetragonisca angustula) en la región de Entre rios provincia Caranavi del departamento de La Paz*, Universidad Mayor de San Andres.
- GADC/ALD. (2014), *Transferencia de recursos publicos-privados en especie para el proyecto “Implementación de capacidades productivas de miel en mujeres Yuracares- Tropicó”*, Gobierno Autonómico Departamental de Cochabamba - Asamblea Legislativa Departamental, Cochabamba, Bolivia.
- Grimaldi, D. (1999), “The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous”, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 86 No. 2, pp. 373–406.
- Heard, T.A. (1999), “The role of stingless bees in crop pollination”, *Annual Review of Entomology*, No. 44, pp. 183–206.
- Hernández, P., Espinoza, F., Padilla, S., Benitez, J., Zamora, L., Aguilar, I. y Herrera, E. (2015), *Guía práctica de identificación de abejas nativas sin aguijón (Apidae, Meliponini) por medio de sus entradas*, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT) - Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.
- Hrncir, M., Jarau, S. y Barth, F.G. (2016), “Stingless bees (Meliponini): senses and behavior”, *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, Springer Berlin Heidelberg, Vol. 202 No. 9–10, pp. 597–601.
- Imperatriz-Fonseca, V.L. y Alves, D.D.A. (2020), *Abelhas Sem Ferrão do Pará: A partir das Expedições Científicas de João M. F. Camargo*, Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará, disponible en: <https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal/Sebrae/UFs/RN/Anexos/Meliponicultura-Abelhas-sem-ferrao-do-Para.pdf>.
- Imperatriz, V.L., Nogueira-Neto, P., Cortopassi, M., Nunes, P. y Giannini, T. (2011), “*Tetragonisca angustula angustula* Latreille”, *Guia Ilustrado das Abelhas sem Ferrão do Estado de São Paulo*, disponible en: <http://www.ib.usp.br/beesp/index.htm>.
- Kempf-Mercado, N. (1968), *Contribución al conocimiento de las Abejas Indígenas (Meloponidae) del departamento de Santa Cruz*, Editorial Don Bosco, La Paz, Bolivia.
- Lima-Verde, L.W., Loiola, M.I.B. y Freitas, B.M. (2014), “Angiosperm flora used by meliponine guilds (Apidae, Meliponina) occurring at rainforest edges in the state of Ceará, Brazil”, *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, Vol. 86 No. 3, pp. 1395–1409.
- Lucia, M. y Alvarez, L.J. (2022), “Apidae (Hymenoptera: Anthophila) species from Argentina



and Uruguay”, *Apidae - Especies de Argentina y Uruguay*, disponible en: <https://biodar.unlp.edu.ar/apidae/index-es.html> (accedido 4 enero 2023).

- Luna-Lucena, D., Rabico, F. y Simoes, Z.L. (2019), “Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae)”, *Current Opinion in Insect Science*, Vol. 31, pp. 20–28.
- Martínez, T. y Cuéllar, R.L. (2004), “Manejo de abejas nativas señorita (*Trigona tetragonisca angustula*) y abeja corta pelo (*Escaptutrigona posica*) en tres comunidades de Isoso”, *MEMORIAS: VII Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía y América Latina*, Wildlife Conservation Society, Ilheus, Brasil, pp. 557–561.
- Meléndez, V., Ayala, R. y Delfin, H. (2018), “Crop Pollination by Stingless Bees”, en Vit, P., Pedro, S.R.M. y Roubik, D.W. (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*, Springer International Publishing AG, Switzerland, pp. 139–154.
- Michener, C.D. (2007), *The Bees of the World*, Second Edi., The Johns Hopkins University Press, Maryland.
- Michener, C.D. (2013), “The Meliponini”, en P, V., SRM, P. y D, R. (Eds.), *Pot-honey: a legacy of stingless bees*, Springer, New York, pp. 3–17.
- Montaño, M.E. (1996), *La explotación de miel silvestre y su importancia en la comunidad indígena Sirionó de Ibiato en el Beni, Bolivia*, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno.
- Moure, J.S. (1963), “Sobre a identidade dos Meliponinos descritos por Spinola em 1853 (Hymenoptera, Apoidea)”, *An bras. Cienc.*, Rio de, pp. 257–269.
- Nates-Parra, G.G. (2001), “Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia”, *Biota Colombiana*, Vol. 2 No. 3, pp. 233–248.
- Nates-Parra, G.G. y Rosso-Londoño, J.M. (2013), “Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera : Meliponini) utilizadas en meliponicultura en Colombia”, *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 18 No. 3, pp. 415–425.
- Nogueira-Neto, P. (1997), *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*, *Acta Amazonica*, Vol. 34, Urna Edição Nogueirapis, Sao Paulo, Brasil, disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200021>.
- Orellana, R., Chuburn, C., Balam, C., Ceiba, L., Ain, I.C., Superior, M., Superior, M., *et al.* (2021), “Abejas del Mayab , de la cosmogonía maya a una colección etnobiológica del Jardín Botánico Regional ‘ Roger Orellana ’”, Vol. 167, pp. 162–167.
- Ossio, V. y Levy, M. (2020), “Curso de Meliponicultura - Senda Verde”, *Senda Verde: Refugio de Animales*, disponible en: <https://sendaverde.org/es/about-us/> (accedido 15 octubre 2022).



PASOS, F. (2019), “Apoyo a la producción apícola para la dinamización socioeconómica del Chaco Chuquisaqueño”, *Fundación PASOS*, disponible en: <http://www.pasosbolivia.org/proyectos/apoyo-a-la-produccion-apicola-la-dinamizacion-socioeconomica-del-chaco-chuquisaque-o> (accedido 28 septiembre 2020).

Ramírez-Arriaga, E., Pacheco-Palomo, K.G., Moguel-Ordoñez, Y.B., García, R.Z. y Godínez-García, L.M. (2018), “Angiosperm Resources for Stingless Bees (Apidae, Meliponini): A Pot-Pollen Melittopalynological Study in the Gulf of Mexico”, en Vit, P., Pedro, S.R.M. y Roubik, D.W. (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*, Springer International Publishing AG, pp. 111–130.

Slaa, E.J., Sánchez Chaves, L.A., Malagodi-Braga, K.S. y Hofstede, F.E. (2006), “Stingless bees in applied pollination: Practice and perspectives”, *Apidologie*, Vol. 37 No. 2, pp. 293–315.

Territorios Vivos, F. (2013), *Meliponicultura en el Chaco Boliviano; La miel de los pueblos del Chaco*, Bolivia.

Townsend, W.R. (2016), “Densidad y patron de distribución de las colmenas naturales de abejas nativas (Meliponini) en Proterillo del Guendá, Porongo, Santa Cruz”, *Boletín Tesape Arandu*, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, Vol. 6 No. 26, pp. 02–17.

Townsend, W.R., Adler, M., Martinez, M., Cuellar, W., Rodriguez, F., Cuellar, P. y Toledo, M. (2021), *Explorando la relacion de las abejas sin aguijón y plantas en los TCOs Sirionó y Lomerío: Guía Ilustrada*, Museo de Historia Natural Noel Kempff - UAGRM & Fundación Noel Kempff, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Urquizo, O.N., Cardozo-Alarcón, F., Adler, M., Lozano, R., Calcina-Mamani, S., Collao-Alvarado, K., Niemeyer, H.M., *et al.* (2022), “Pollen Preference Patterns by *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) in a Boliviano–Tucumano Forest”, *Neotropical Entomology*, Springer International Publishing, No. 0123456789, disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00986-3>.

Venturieri, G.C. (2008), “Contribuição para a criação racional de meliponíneos Amazonicos”, *Documentos Embrapa Amazônia Oriental*, Vol. 330, pp. 1–26.

Venturieri, G.C., Alves, D.A., Villas-Bôas, J., Carvalho, C.A.L. de, Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F.A.L., *et al.* (2012), “Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola”, en Imperatriz-Fonseca, V.L., Lange, D.A.C., Alves, D. de A. y Saraiva, A.M. (Eds.), *Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*, Editora da Universidad de São Paulo, pp. 213–236.

Venturieri, G.C., Raiol, V. de F.O. y Pereira, C.A.B. (2003), “Avaliação da introdução da criação racional de melipona fasciculata (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança - PA, Brasil”, *Biota Neotropica*, Vol. 3 No. 2, pp. 1–7.



- Wilms, W., Imperatriz-Fonseca, V.L. y Engels, W. (1996), "Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian atlantic rainforest", *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, Vol. 31 No. 3-4, pp. 137-151.
- Adjlane N., Badmazhapova E., Berezin A., Borodachev A., Brandorf A., Dar S. A., Dukku U.H., Eskov E., Gajda A., Gregorc A., Gulov A., Gushchina E., Hatjina F., Ilyasov R.A., Kandemir I., Kireeva T., Konusova O., Kucher A., Kwon H.W., Lee M.-I, Mitrofanov D., Ostroverkhova N., Özkan-Koca A., Pogorelov Y., Raffiudin R., Requier F., Rodrigues M., Seeley T.D., Yartsev V. (2020) *Phylogenetics of bees*. Editors: Ilyasov R.A., Kwon H.W. Boca Raton, London, New-York: CRC Press Taylor & Francis Group. 290.
- Ballare, K. M., Pope, N. S., Castilla, A. R., Cusser, S., Metz, R. P., & Jha, S. (2019). *Utilizing field collected insects for next generation sequencing: Effects of sampling, storage, and DNA extraction methods*. *Ecology and Evolution*, 9(24), 13690-13705.
- Bextine, B., Tuan, S. J., Shaikh, H., Blua, M., & Miller, T. A. (2004). *Evaluation of methods for extracting Xylella fastidiosa DNA from the glassy-winged sharpshooter*. *Journal of economic entomology*, 97(3), 757-763.
- Birch, L., English, C. A., Burns, M., & Keer, J. T. (2004). *Generic scheme for independent performance assessment in the molecular biology laboratory*. *Clinical chemistry*, 50(9), ...1553-1559.
- Calfee E, Agra MN, Palacio MA, Ramírez SR, Coop G. (2020). *Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas*. *PLoS Genet*.19-16.
- Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AE, Del Lama MA. *Genetic structure of Africanized honeybee populations (Apis mellifera L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns*. *Heredity (Edinb)*. 2006;97(5):329-35.
- Chávez-Galarza, J., López-Montañez, R., Jiménez, A., Ferro-Mauricio, R., Oré, J., Medina, S., & Vásquez, H. (2021). Mitochondrial DNA variation in peruvian Honey Bee (*Apis mellifera* L.) populations using the tRNA_{Leu-cox2} intergenic region. *Insects*, 12(7), 641.
- Chernesky, M; Jang, D; Chong, S; Sellors, J; Mahony, j (2003) *Impact of urine collection order on the ability of assays to identify Chlamydia trachomatis infections in men. Sexually Transmitted Diseases* 30(4): 345-347.
- Dillon, N., Austin, A. D., & Bartowsky, E. (1996). *Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects*. *Insect Molecular Biology*, 5(1), 21-24.
- Duchene. S.. Archer. F. I.. Vilstrup. J.. Caballero. S. & Morin. P. A. (2011). *Mitogenome .phylogenetics: The Impact of Using Single Regions and Partitioning Schemes on Topology. Substitution Rate and Divergence Time Estimation*. *Plos One*. 6(11). 1-12.



- Esther. E. et al. (2015). *Detoxification mechanisms of honey bees (Apis mellifera) resulting in tolerance of dietary nicotine*. Scientific reports. 5. 11779
- Evans, J. D., Schwarz, R. S., Chen, Y. P., Budge, G., Cornman, R. S., De la Rua, P., & Pinto, M. A. (2013). *Standard methods for molecular research in Apis mellifera*. Journal of apicultural research, 52(4), 1-54.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th*.
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2010). *An introduction to forensic genetics*. John Wiley & Sons.
- Litvinoff L, Menescardi F, Porrini L, Russo R, Liendo MC, Nucci A, Lusarreta E, Ventura R, Espasadin L, Monmany-Garzia AC, Scannapieco ACand Galindo-Cardona A (2023) *Morphometric and genetic characterization as tools for selection of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) stocks in an area of natural hybridization in Argentina*. Front. Insect Sci. 2:1073999.
- Mardis. E. R. (2008) *Next-generation DNA sequencing methods*. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 9. 387- 402
- Moritz, R. F. A., Cornuet, J. M., Kryger, P., Garnery, L., & Hepburn, H. R. (1994). *Mitochondrial DNA variability in South African honeybees (Apis mellifera L)*. Apidologie, 25(2), 169-178.
- Oldroyd. B. P & Thompson. G. J. (2007). Behavioral genetics of the Honey bee *Apis mellifera*.Advances in Insect Physiology. 33. 1-49
- Post, R.J., Flook, P.K. and Wilson, M.D. (1992) DNA analysis in relation to insect taxonomy, evolution and identification. Insect Molecular Science (Crampton, J.M. and Eggteston, P., eds), pp. 21-34. Royal Entomological Society and Academic Press
- Reiss, R., Schwert, D. and Ashworth, A.C. (1995) *Field preservation of Coleoptera for molecular genetic studies*. Environmental Entomology 24: 716-719.
- Ruttner. F. (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer Verlag. Heidelberg. ... Berlin. New York. 284
- Valentine-Thon, E., van Loon, A. M., Schirm, J., Reid, J., Klapper, P. E., & Cleator, G. M. (2001). *European proficiency testing program for molecular detection and quantitation ... of hepatitis B virus DNA*. Journal of Clinical Microbiology, 39(12), 4407-4412.
- Wang YS, Dai TM, Tian H, Wan FH, Zhang GF. (2019) *Comparative analysis of eight DNA extraction methods for molecular research in mealybugs*. PLoS One. Dec 31;14(12):e0226818. doi: 10.1371/journal.pone.0226818.



R. A. Ilyasov, M. Lee, J. Takahashi, H. W. Kwon, and A. G. Nikolenko, “A revision of subspecies structure of western honeybee *Apis mellifera*,” Saudi Journal of Biological Sciences, vol. 27, pp. 3615–3621, 2020

Ilyasov R.A., Lee M.L., Takahashi J.I., Kwon H.W., Nikolenko A.G. (2020) *A revision of subspecies structure of western honey bee Apis mellifera*. Saudi J. Biol. Sci. 2020; 27:3615–3621.

