

Caracterización molecular preliminar de abejas Angelita (*Tetragonisca Angustula*) del estado Guárico mediante marcadores moleculares RAPD

Preliminary molecular characterization of Angelita Bees (*Tetragonisca Angustula*) from Guarico State through RAPD markers

Efraín Salazar¹, Víctor Crespo², Antonio J. Manrique³, Luis Castro¹, Elba Vallejo¹ y María Torrealba¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Aragua, Venezuela. Correo electrónico: efra63@gmail.com.

²Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos. Facultad de Agronomía. Guárico, Venezuela.

³Federación Bolivariana de Apicultores de Venezuela (FEBOAPIVE).

RESUMEN

Para caracterizar molecularmente abejas angelita *Tetragonisca angustula* del estado Guárico, se extrajo ADN en 20 abejas por localidad de 5 zonas identificadas como Minera (Muestra 1), San Juan (Muestra 2), Cruz (Muestra 3), Calzadilla (Muestra 4), UNERG (Muestra 5). Las amplificaciones de los ADN se realizaron mediante la amplificación al azar de ADN Polimórfico utilizándose 10 primers 10 mer de anclaje al azar. Los resultados permitieron asignarle a cada muestra un patrón de bandas característico convirtiéndose en su identidad genética. Se generaron 82 bandas con un 66% de bandas polimórficas. Las poblaciones estudiadas se orientan en un grupo principalmente, a excepción de la muestra colectada en San Juan, la cual se comporta como un material fuera de tipo. Sin embargo, la riqueza genética se estimó baja (Índice de Shannon $H=0.75$) posiblemente por ser la misma especie. El índice de Margalef ($I=1.25$) corrobora la baja diversidad genética, a pesar de la separación de las muestras como genotipos diferentes. La distancia de Jaccard osciló entre 0,43 y 0,86, lo cual resultó contradictorio con los valores obtenidos para los índices de diversidad. Los marcadores RAPD resultaron útiles para caracterizar preliminarmente las muestras de abejas angelitas seleccionadas.

Palabras clave: Variabilidad Genética, Abejas sin aguijón, Caracterización Molecular, RAPD.

ABSTRACT

In order to molecularly characterize stingless angelita bees (*Tetragonisca angustula*) from Guárico State, DNA was isolated from 20 bees per location from 5 zones identified as Minera (Sample 1), San Juan (Sample 2), Cruz (Sample 3), Calzadilla (Sample 4), UNERG (Sample 5). DNA amplifications were done using random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Results allowed to assign a characteristic band patterns to each sample which became their genetic fingerprint. 82 bands were generated with a 66% of polymorphic bands. Studied individuals were grouped in one cluster, except sample from San Juan, which behave as an outsider. However genetic richness was estimated as low (H Shannon index= 0.75) possibly due to be working with the same species. Margalef Index ($I=1.25$) corroborated that genetic diversity was low, in spite of the separation of samples as different genotypes. Jaccard distance ranged between 0.43 and 0.86, which resulted contradictory with the obtained values for diversity indexes. RAPD markers were useful to preliminary characterize samples of angelita bees.

Key words: genetic diversity, angelita bees, molecular characterization, RAPD.

INTRODUCCIÓN

La abeja sin aguijón angelita (*Tetragonisca angustula* Latreille, Hymenoptera, Apidae) representa una especie de gran importancia debido, entre otros aspectos, a su contribución en la formación y producción de bienes agroforestales gracias a su función como agente polinizador de las Angiospermas. Ellas cumplen un papel importante no sólo en la polinización de las plantas nativas de los trópicos y subtropicos sino que también se pueden explotar para la extracción de su miel y utilizar en la polinización de cultivos de importancia económica (Nascimento *et al.*, 2012).

La conservación de las diversas especies de abejas sin aguijón depende de la conservación de los bosques y viceversa (Chamorro *et al.*, 2013). Por ello los programas de reforestación se deben llevar a cabo en cada región acorde a las plantas nativas del lugar, no sólo para regenerar y proteger la tierra, sino también para tratar de restablecer el equilibrio ecológico. Muchos de los árboles utilizados por las abejas sin aguijón para establecer sus nidos son especies forestales que se pueden utilizar para muchos propósitos (forraje, madera, sombra, cercas vivas y alimentos.), sin embargo, la información que existe es muy poca o está dispersa. Estas abejas ya utilizadas desde tiempos precolombinos por nuestros indígenas están en peligro de extinción junto con los bosques, por ello se deben implementar proyectos donde el estudio de ambos sean el foco de atención (Aguilar, 1999).

La especie ha sido reportada con una amplia distribución en las zonas neotropicales de América Latina (Nogueira Neto, 1997), excepto en las montañas andinas y en algunas zonas de la selva nublada amazónica (Camargo *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2004). En Venezuela, Rodríguez-Parilli y Velázquez (2011) realizaron un estudio de distribución de abejas sin aguijón en el estado Guárico, y encontraron una amplia distribución de especies botánicas visitadas, y establecieron la presencia de poblaciones de *Tetragonisca angustula* en la zona.

A pesar de haberse realizado trabajos en la caracterización bioquímica (Castanheira y Contel, 2005), caracterización molecular basada en marcadores RAPD (Oliveira *et al.*, 2004), en

sitios de restricción del ADN mitocondrial (Koling y Moreto, 2010) y en el uso de microsatélites y ADN mitocondrial (Francisco *et al.*, 2014), la diversidad genética de esta especie, así como su taxonomía necesita ser estudiada más a fondo. La utilidad de los marcadores RAPD para la caracterización de especies de *Tetragonisca* ha sido demostrada. Oliveira *et al.* (2004) establecieron que primers RAPD como OPL-11 resultaron útiles para la identificación de subespecies de abejas angelita.

Sin embargo, Baitala *et al.* (2006) utilizaron los marcadores RAPD para la caracterización de especies del género *Tetragonisca*, reportando, que si bien se podía hacer la caracterización, no era posible la separación entre subespecies, incluso siguiendo el protocolo descrito en el trabajo de Oliveira *et al.* (2004).

Por su parte, en el caso de abejas, fue posible el estudio de diversidad genética de abejas productoras de miel (*Apis mellifera* L.) en la provincia de Mayabeque utilizando primers RAPD de las series OPA y OPB (Pérez *et al.*, 2013). Armas *et al.* (2011) utilizaron cebadores RAPD de la serie OPA, para la caracterización molecular de abejas sin aguijón del Género *Melipona*. Encontraron que solo 1 (OPA16) de las 18 secuencias analizadas fue capaz de generar polimorfismo en este grupo de individuos. Adicionalmente, utilizaron como unidad de análisis patas de 5 individuos.

La presente investigación es uno de los primeros esfuerzos en caracterizar molecularmente abejas angelita en Venezuela, y tuvo como objetivo general la caracterización preliminar de muestras de la especie *Tetragonisca angustula* proveniente de cinco zonas del estado Guárico, mediante la técnica de Amplificación al azar de ADN Polimórfico (RAPD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron abejas angelita sin aguijón (*Tetragonisca angustula* L.) silvestres provenientes de cinco zonas del estado Guárico. Las abejas fueron recolectadas en bolsas plásticas y luego se congelaron a una temperatura de -40°C identificándose de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 1. En todos los casos se recolectaron 20 individuos por localidad. La

unidad experimental estuvo conformada por 5 individuos y se realizaron 4 repeticiones por genotipo estudiado. Para el caso de los análisis moleculares se utilizaron los cuerpos completos de los individuos. Las colectas se realizaron entre Enero y Marzo del 2011.

Extracción y cuantificación del ADN

Para la extracción del ADN se procesaron muestras de *Tetragonisca angustula* según el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) modificado (CIAT, 1999), y algunas variaciones realizadas en el presente trabajo. Los individuos completos de la unidad experimental (5 abejas) se maceraron juntos en nitrógeno líquido utilizando morteros de porcelana de 70ml de capacidad. Se agregaron 700 µl de Tampón de Extracción (CTAB 2%) precalentado a 65°C y las muestras se incubaron en un termal mixer Eppendorf, modelo confort, a 65°C por 45 min, en agitación constante a 700 rpm. Posteriormente se adicionó 400 µl de Acetato de Potasio 5 M, pH 4,0 y se mezclaron tres veces por inversión del tubo y se incubaron a -20°C por 30 min.

Las muestras se centrifugaron por 10 min a 6000 rpm a 4°C y el líquido sobrenadante de cada muestra se pasó a nuevos tubos, agregándose a cada uno 400 µl de Acetato de Potasio 5 M. Las muestras se agitaron nuevamente por inversión suave y repetida de los tubos, y se centrifugaron por 4 min a 6000 rpm a 4°C. Para cada muestra, la mitad del volumen del sobrenadante se colocó, respectivamente, en un tubo nuevo. A cada muestra se le agregó 400 µl de Isopropanol frío y 40 µl de Acetato de Sodio 3M, pH 5,2 y se centrifugaron por 5 min. a

12000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 400 µl de Etanol frío al 70% y se centrifugaron por 3 min. a 12.000 rpm a 4°C.

Los tubos se colocaron boca abajo, con la tapa abierta, sobre papel secante por unos minutos, a fin que escurriese el exceso de líquido y posteriormente se centrifugaron al vacío a 60°C en un Concentrador Eppendorf modelo SpeedVac durante 6 min. A cada muestra se le agregaron 100 µL de Buffer TE para resuspender el ADN. Los tubos se incubaron a 4°C toda la noche.

Las muestras completamente resuspendidas se mantuvieron a 4°C hasta el momento del análisis molecular. Una vez extraído el ADN genómico se verificó su calidad a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con 100 voltios (v), durante 45 minutos utilizando Buffer TBE 0,5X como buffer de electrodo. Para estimar las concentraciones del ADN aislado se usó una solución 100 ng.µL⁻¹ del ADN del bacteriófago Lambda (Promega). Los análisis se realizaron en un digitalizador de imágenes Chemi-Doc de Bio Rad, usando el Software Quantity One versión 4,2.

Análisis espectrofotométrico de la concentración y pureza

Para el análisis espectrofotométrico se utilizó un espectrofotómetro Thermo modelo Biomate. Se utilizó la función de análisis de ácidos nucleicos. Se calibró el equipo colocando como blanco una muestra inicial conteniendo 500 µL de agua destilada estéril. Posteriormente, se procedió al análisis de cada muestra agregando en la cubeta

Cuadro 1. Procedencia geográfica de las muestras de *Tetragonisca angustula* analizadas.

MUESTRAS	Procedencia	# individuos
1	Minera	20
2	San Juan	20
3	Cruz	20
4	Calzadilla	20
5	UNERG	20

490 μL de agua destilada estéril más 10 μL de la muestra de ADN aislado durante la extracción. La medida de la concentración de la solución se obtuvo en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, previa conversión con el factor de dilución. La pureza del ADN aislado se estimó mediante la relación A_{260}/A_{280} , la cual para un ADN de doble cadena puro debe estar entre 1,7 y 2,0 (Warburg y Christian, 1942).

Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD)

La amplificación al azar (RAPD) se realizó en tubos de pared extra delgada de 0,2mL de capacidad conteniendo 15 μL de mezcla de reacción. Para la caracterización molecular se utilizaron 10 oligonucleótidos iniciadores (OPB 01, OPB 02, OPB 03, OPB 04, OPB 05, OPB, 06, OPB 07, OPB 08, OPB 09 y OPB 10), desarrollados por Operon Technologies (Cuadro 2). La amplificación de los ADN se efectuó en un termociclador MJ-Research PT-200, con un segmento inicial de 95°C por 5 min, para la desnaturalización de la molécula. Posteriormente se aplicaron 45 ciclos de amplificación que incluyeron un segmento de 94°C durante 1 min, seguido por 36°C durante 30s y finalmente 72°C durante 2 min. Se realizó una fase final a 72°C para que la enzima de ADN polimerasa efectuase la extensión final de la cadena. Una vez finalizada la amplificación las muestras se

mantuvieron a 4°C hasta el momento del análisis de los productos de amplificación.

Separación electroforética de los Productos de Amplificación

Los productos de amplificación RAPD se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) durante dos horas a 100v con Buffer TBE 0,5X. La visualización y análisis se realizó con el equipo ChemiDoc de Bio Rad, Software Quantity One Versión 4.2. Los productos RAPD se compararon con el patrón de tamaño molecular del ADN del fago Lambda (Promega) digerido con BstEII (Promega). Para cada iniciador se calculó el porcentaje de bandas polimórficas (%BP) y el Contenido de información Polimórfica (PIC) según la metodología de Roldán-Ruiz *et al.* (2000).

El conjunto de bandas de amplificación obtenidas por cada uno de los cebadores para cada muestra analizada, se convirtió en su patrón de bandas para el mencionado cebador. Se obtuvieron los patrones de bandas característicos para cada genotipo estudiado y se hizo un análisis descriptivo de los patrones encontrados a fin de establecer semejanzas o diferencias entre los genotipos. Adicionalmente, la información en los geles de agarosa permitió

Cuadro 2. Secuencias de los cebadores utilizados en el presente estudio.

OPB 01	GTTTCGCTCC
OPB 02	TGATCCCTGG
OPB 03	CATCCCCCTG
OPB 04	GGACTGGAGT
OPB 05	TGCGCCCTTC
OPB06	TGCTCTGCCC
OPB 07	GGTGACGCAG
OPB 08	GTCCACACGG
OPB 09	TGGGGGACTC
OPB 10	CTGCTGGGAC

realizar una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de bandas por cebador.

La matriz obtenida con los marcadores polimórficos fue analizada con el programa estadístico InfoStat versión 2.0. La matriz fue utilizada para realizar el análisis de agrupamiento (dendrograma), a través del análisis multivariado de conglomerado jerárquico usando el método de agrupamiento de Ward y la distancia de Jaccard. Para el estudio de la diversidad genética se utilizó el índice H de Shannon y Wieber (1949) y el índice de Margalef (1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo de extracción de ADN genómico a partir de muestras de *Tetragonisca angustula* fue eficiente para el aislamiento de ADN intacto, tal como se observa en la Figura 1. Las bandas de ADN se ubican en la parte superior del gel como una unidad discreta. Las zonas que se observan como un barrido corresponden a fracciones ARN, las cuales no interfieren en el proceso de amplificación.

Los patrones de bandas obtenidos para cada grupo estudiado al utilizar los cebadores de anclaje al azar seleccionados se presentan en la Figura 2. Como puede observarse, los

cebadores seleccionados en su mayoría fueron capaces de producir patrones de bandas en todos los grupos. En la generalidad de los casos los patrones obtenidos son específicos para cada localidad analizada, y la presencia o ausencia de los patrones de bandas específicos obtenidos para cada tipo de insecto permitiría la identificación molecular de las abejas en cada localidad.

Con excepción del primer OPB01, todos los demás fueron capaces de distinguir al menos tres tipos de patrones diferentes (Cuadro 3). Dado el número de muestras tan bajo, se considera que el poder discriminatorio de los cebadores seleccionados es alto, al permitir poder identificar los grupos.

El porcentaje que se presenta en el Cuadro 3 se obtuvo al multiplicar por 100 el número de patrones obtenidos y dividirlos entre 5, que representó el total de patrones posibles a generarse, correspondiendo al número total de muestras. En el dendrograma del análisis de conglomerados, utilizando el total de las bandas producidas con todos los cebadores que se muestra en la Figura 3, se observa el agrupamiento de los genotipos estudiado en un grupo principal, y la muestra 2 (San Juan) se ubica totalmente separada del resto, lo que parece indicar que es totalmente

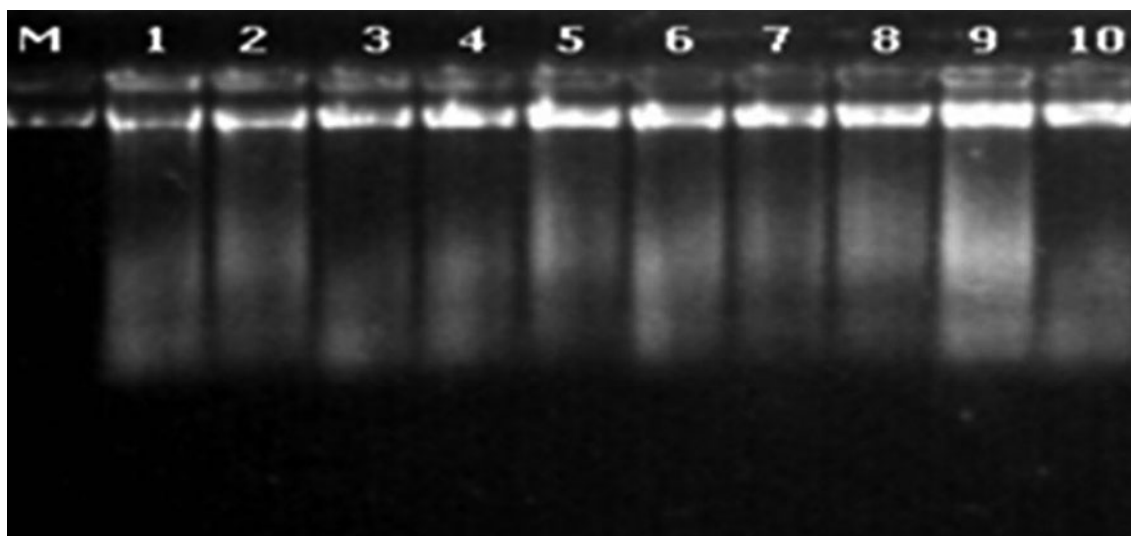


Figura 1. Gel de calidad de ADN genómico aislado a partir de abejas *Tetragonisca angustula*. M= Marcador de concentración (ADN bacteriófago Lambda 100ng/ μ l). 1 y 2= Minera; 3 y 4= San Juan, 5 y 6=Cruz. 7 y 8= Calzadilla. 9 y 10= UNERG.

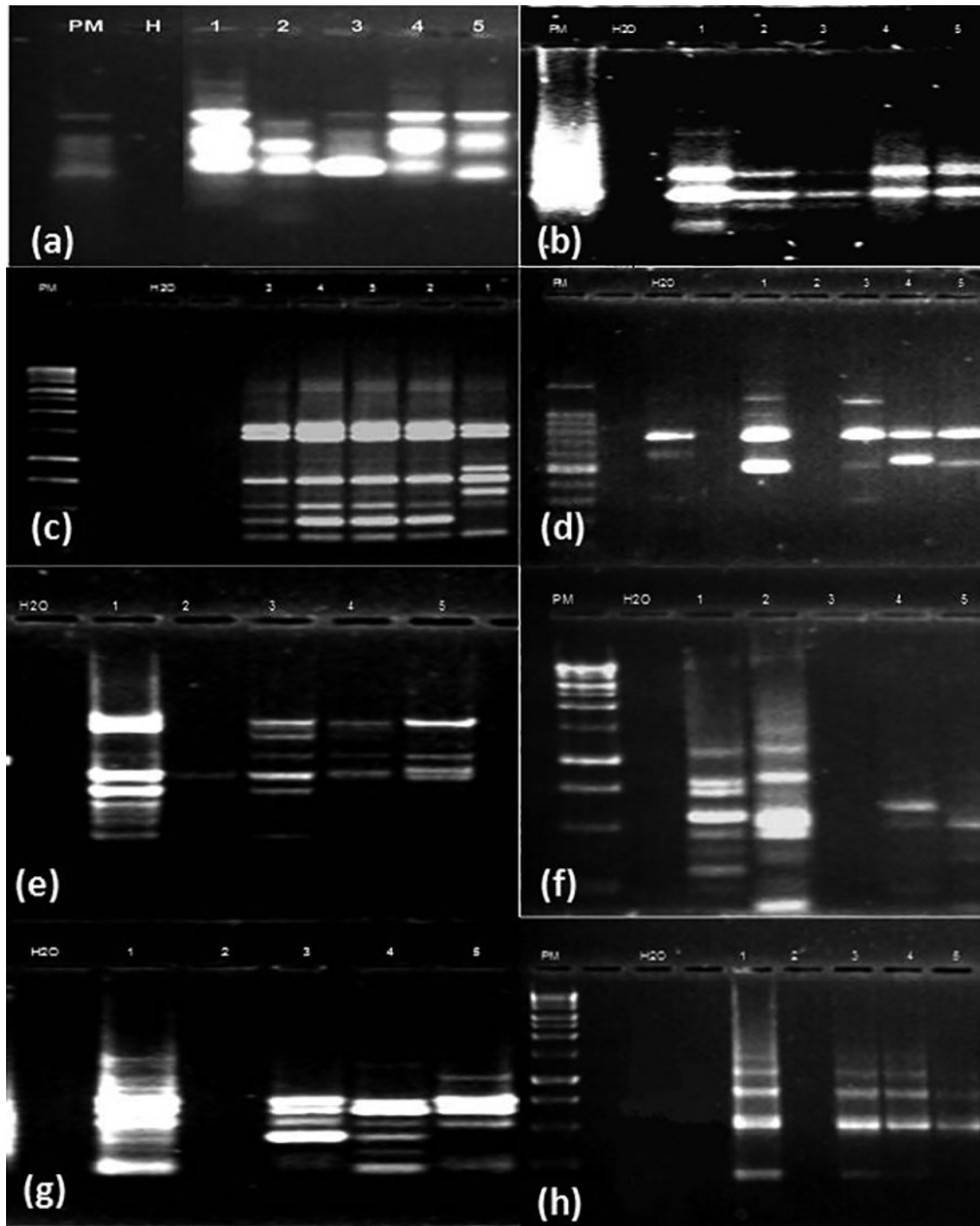


Figura 2. Patrones de bandas RAPD obtenidos para los 5 genotipos de abejas analizados. PM= marcador de tamaño (Kb)Ladder 1 Kb (PROMEGA), H2O=reacción blanco sin ADN. 1= minera, 2= San Juan, 3=Cruz, 4= Calzadilla, 5= UNERG. (a)= primer OPB02, (b)= OPB04, (c)= OPB01, (d)= OPB05. (e)=OPB07, (f)=OPB08, (g)=OPB09 y (h)= OPB10.

Cuadro 3. Número de Patrones de bandas RAPD obtenidos para cada genotipo de abeja estudiado con cada primer seleccionado.

Primer	# Patrones	Nomenclatura De Los Patrones	% Patrones
OPB 01	2	1a, 1b	40
OPB 02	3	2a, 2b, 2c	60
OPB 03	3	3a, 3b, 3c	60
OPB 04	4	4a, 4b, 4c, 4d	80
OPB 05	4	5a, 5b, 5c, 5d	80
OPB 06	3	6a, 6b, 6c	60
OPB 07	4	7a, 7b, 7c, 7d	80
OPB 08	5	8a,8b,8c,8d,8e	100
OPB 09	5	9a,9b,9c,9d,9e	100
OPB 10	3	10a, 10b, 10c	60

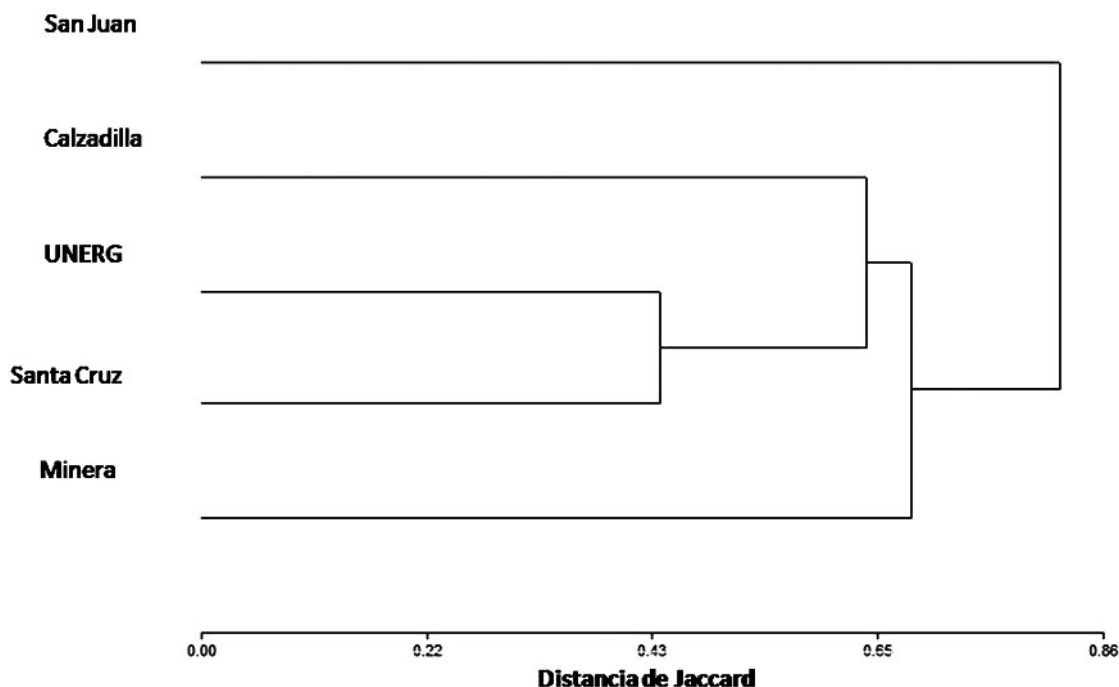


Figura 3. Dendrograma producto del análisis de conglomerado jerárquico utilizando todos las secuencias iniciadoras estudiadas.

diferente a las demás muestras. No obstante, es importante señalar que esta muestra presentó mayor similitud con la muestra 1 (Minera) que con el resto de los materiales estudiados. Las muestras 3 (Cruz), 4 (Calzadilla) y 5 (UNERG) se agruparon más cercanas genéticamente entre sí, donde las menores distancias se observaron entre las muestras 3 y 5.

La muestra 1 (Minera), a pesar de mostrar similitudes con las muestras 3, 4 y 5, y formar parte de la misma unidad de agrupamiento, presenta diferencias genéticamente significativas, que la colocan como un genotipo aparte.

Estos resultados sugieren la existencia de variabilidad genética entre los grupos de abejas

Angelita colectadas en el estado Guárico, pudiendo estar representadas al menos por tres tipos de abejas desde el punto de vista genético. Es importante señalar, que Nates-Parra y Rosso-Londoño (2013) establecieron que existe una amplia diversidad genética en los grupos de abejas sin aguijón, la mayor parte de las cuales están sin identificar. Para el caso de abejas Angelita, reportaron una amplia distribución geográfica, y altitudinal (100-1900 m.s.n.m.), lo cual indica una amplia capacidad de adaptación de esta especie.

Por otro lado, se ha establecido que la biología reproductiva de la especie favorece la formación de poblaciones aisladas, y una rápida especiación debido al flujo limitado de genes entre las colonias (Brito y Arias, 2010; Quezada-Euán *et al.*, 2012), lo cual pudiera explicar la diversidad encontrada entre sitios de colecta relativamente próximos. La riqueza genética entre los grupos estudiados se estimó baja (Índice de Shannon $H=0,75$) posiblemente por tratarse de la misma especie. El índice de Margalef ($I=1,25$) corrobora que existe una baja diversidad genética, a pesar que los datos establecen la separación de las muestras como genotipos diferentes. La distancia de Jaccard osciló entre 0,43 y 0,86, lo cual resultó contradictorio con los valores obtenidos para los índices de diversidad.

CONCLUSIONES

La técnica de RAPD fue estandarizada para esta especie y permitió la amplificación de bandas en casi todas las muestras estudiadas. Los resultados permiten asignarle a cada unidad experimental un patrón de bandas característico para cada uno de los cebadores analizados lo cual se convierte en su identidad genética. Los individuos se separaron en dos grandes grupos de acuerdo a sus características genéticas, donde la muestra 2 (San Juan) se separó completamente del resto de las localidades. Fue detectada una alta variabilidad genética intra grupal en los genotipos estudiados de acuerdo a las distancias obtenidas; sin embargo, la diversidad genética global se estimó baja, por los valores de los índices de diversidad estudiados y esto quizás se deba al poco número de individuos analizados.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, I., 1.999. El potencial de las abejas nativas sin aguijón (Apidae: meliponinae) en los sistemas agroforestales. Universidad de Heredia. Heredia Costa Rica. Disponible en línea: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99//AguilarI.html> [Abr. 27, 2007].
- Armas, G., E. Solorzano, M. García, y C. Monroy. 2011. Diferenciación genética y fenética de *Melipona beecheii*, *Melipona yucatanica* y *Melipona solani* por medio de RAPD'S-PCR y Morfometría en Guatemala. Memorias del VII Seminario Mesoamericano sobre Abejas Nativas. pp. 37-46.
- Baitala, T. V., C. A. Mangolin, V. A. A. Toledo and M. C. C. Ruvolo-Takasusuki. 2006. RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations. *Sociobiology* 48: 861-873.
- Brito, R. M. and M. C. Arias. 2010. Genetic structure of *Partamonahelleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insect. Soc.* 57, 413–419.
- Camargo, J. M. F. and S. R. M. Pedro. 2007. *Meliponini* Lepeletier, 1836. In: Moure JMS, Urban D, Melo GAR (eds) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, pp. 273–578.
- Castanheira, E. B. and E. P. Contel. 2005. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *J. Apicult. Res.* 44, 101–105.
- Chamorro, F. J., G. Nates-Parra and T. Kondo. 2013. Mielato de *Stigmatococcus* (Hemiptera: Stigmatococcidae): recurso melífero de bosques de roble en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 61-70.
- CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1999. Taller integración de fitopatología, mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia al añublo del arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Octubre 14-18, Cali, Colombia.

- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.
- Francisco, F. O., L. R. Santiago, R. M. Brito, B. P. Oldroyd and M. C. Arias. 2014. Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie*, Volume 45, Issue 1, pp. 1-9.
- Kearns, C., D. Inouye and N. Waser. 1998. Endangered Mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 83 p.
- Koling, D. F. and G. Moretto. 2010. Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. *Apidologie* 41, 454–462.
- Margalef, R. 1969. El ecosistema pelágico del Mar Caribe. *Memoria Fund. La Salle Cien. Nat.*, 5-36 pp. Referenciada. 23/0672009. Disponible en línea: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726221621001&script=scarttext.* [Mar. 23, 2015].
- Nascimento, W. M., E. M. L. Gomes, E. A. Batista e R. A. Freitas. 2012. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. *Horticultura Brasileira* 30: 494-498.
- Nates-Parra, G. e J. Rosso-Londoño. 2013. Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) utilizadas en meliponi cultura en Colombia. *Acta biol. Colomb.* 18(3):415-426.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão*. São Paulo, Nogueirapis Editora, 445 p.
- Oliveira, R. C., F. M. F. Nunes, A. P. S. Campos, S. M. Vasconcelos, D. Roubik, L. R. Goulart and W. E. Kerr. 2004. Genetic divergence in *Tetragonisca caangustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 27, 181–186.
- Pérez, A., N. Martínez, O. Uffo, B. Peteira, J. Demedio y D. Rodríguez. 2013. Estimación de la diversidad genética en *Apis mellifera* L. en el centro de crianza de abejas reinas de la provincia Mayabeque. *Rev. Salud Anim.* Vol. 35 No. 2 (2013): 142.
- Quezada-Euán, J. J. G., W. J. May-Itzá, M. Rincón, P. de la Rúa, P. and R. J. Paxton. 2012. Genetic and phenotypic differentiation in endemic *Scaptotrigona hell wegeri* (Apidae: Meliponini): implications for the conservation of stingless bee populations in contrasting environments. *Insect Conserv. Diver.* 5, pp. 433–443.
- Rodríguez, M., 2000. *Guía de laboratorio de biología molecular*. Universidad Libre Seccional Barranquilla, Colombia. Disponible en línea: <http://www.unilibrebaq.edu.co>. [Mar. 31, 2007].
- Rodríguez-Parilli, S. y M. Velásquez. 2011. Lugares de actividad de las abejas (Hymenoptera:Apoidea) presentes en bosque seco tropical del estado Guárico, Venezuela. *Zootecnia Trop.*, 29(4): 421-433.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker and M. de Loose. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). *Mol. Breed* 6: 125-134.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52 (3-4): pp. 591–611.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Warburg, O. and W. Christian. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310:384-421.