

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD  
DUBPROGRAMA DE EDC-BIOLOGIA

**INFORME FINAL DE EDC**  
**LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA APLICADA Y PARASITOLOGÍA (LENAP)**  
**(Enero 2009 - Febrero 2010)**

Raquel Asunción Lima Cordón.  
SUPERVISOR (A): Licda. Eunice Enríquez.  
ASESOR INSTITUCIONAL: Licda. Elizabeth Solórzano.

Vo. Bo. ASESOR INSTITUCIONAL

0

## **INDICE**

INTRODUCCIÓN	2
CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC	2
ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRACTICA DE EDC	3
ACTIVIDADES DE SERVICIO	3
Servicio en el Herbario BIGU	3
Limpieza de Bioterio	3
Etiquetado de abejas e ingreso de datos a la colección	3
Extracción de ADN mantenimiento de colecciones	4
Día de la Biodiversidad	4
ACTIVIDADES DE DOCENCIA	4
Revisión del meliponario	4
Discusión de Artículos científicos	5
ACTIVIDADES NO PLANIFICADAS	5
Expoabeja 2009	5
Gira de Campo	5
ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN	5
Extracción de ADN	5
Amplificación de ADN	6
Electroforesis	6
BIBLIOGRAFÍA	7
ANEXOS	7

## 1. INTRODUCCIÓN

En el presente informe final, se dan a conocer las actividades de servicio, docencia e investigación, que durante el período de enero del 2009 a febrero del 2010 se llevaron a cabo dentro del Herbario BIGU y el LENAP (Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología). Esto se realiza con el fin de dar un seguimiento a las actividades que el estudiante propuso en su Plan de Trabajo y así mismo corroborar el cumplimiento de las actividades y objetivos establecidos para cada actividad programada.

En las actividades de Servicio, se acumularon un total de 180 horas (65.5%), en las actividades de Docencia se acumularon 105 horas (68%) y finalmente en las actividades de Investigación se acumularon 255 horas (79%)

## 2. CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC

**Cuadro 1.** Resumen de las Actividades de EDC realizadas en el período de febrero del 2009 a febrero del 2010 en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología-LENAP

<b>PROGRAMA UNIVERSITARIO</b>	<b>FECHA DE REALIZACIÓN</b>	<b>HORAS ACUMULADAS</b>	<b>EDC</b>
<b>SERVICIO</b>			
Servicio en el Herbario BIGU.	Febrero del 2009	40 horas	
Limpieza de Bioterio.	Marzo-mayo 2009	25 horas	
Etiquetado e ingreso de abejas a la base de datos de la colección.	Marzo-mayo 2009	15 horas	
Extracción de ADN.	Marzo-mayo 2009	40 horas	
Mantenimiento de colecciones	Marzo-mayo 2009	25 horas	
Día de la biodiversidad	Mayo del 2009	15 horas	
	<b>HORAS ACUMULADAS</b>	<b>160 horas</b>	
<b>DOCENCIA</b>			
Revisión del Meliponario.	Marzo-mayo 2009	35 horas	
Discusión de Artículos Científicos.	Marzo-mayo 2009	15 horas	
Gira de Campo	Junio 2009	40 horas	
<b>ACTIVIDADES NO PLANIFICADAS</b>			
Expoabeja 2009		10 horas	
	<b>HORAS ACUMULADAS</b>	<b>100 horas</b>	
<b>INVESTIGACION</b>			
Realización de protocolo	Marzo 2009	20 horas	
Extracción de ADN	Ago.-Sep. 2009	20 horas	
Amplificación de ADN	Nov. 2009- Enero 2010	45 horas	
Electroforesis	Dic. 2009-enero 2010	35 horas	

Análisis de Resultados	Ene.-Feb. 2010	50 horas
Elaboración del Informe Final	Feb. 2010	60 horas
	<b>HORAS ACUMULADAS</b>	<b>230 horas</b>

---

### 3. ACTIVIDADES DE SERVICIO

1. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Servicio en el Herbario BIGU

**OBJETIVOS:** Contribuir a la preservación y ordenamiento de la colección de plantas.

**DESCRIPCIÓN:**

Montaje y etiquetado: Consistió en montar cada planta sobre un formato de papel Texcote. Luego se le colocó su respectiva etiqueta tanto en la planta montada como a los duplicados que ésta presentara.

Ingreso de plantas al cuaderno de registro: consistió en ingresar los datos de cada etiqueta por planta montada al cuaderno de Registro. Esto con el fin de llevar un registro de la cantidad de muestras que se encuentran dentro de la colección del Herbario.

Intercalado de plantas: Consistió en intercalar las muestras montadas (previamente registradas tanto en el cuaderno como en la base de datos del Herbario) en sus respectivos armarios de acuerdo a la distribución de las familias de plantas.

**RESULTADOS:** Se registró un aumento en la cantidad de muestras reportadas para el Herbario BIGU y por lo tanto se logró preservar cada muestra en un buen estado.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** ninguna.

2. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Limpieza de Bioterio

**OBJETIVOS:** Que el estudiante conserve el Bioterio de una forma limpia y ordenada.

**DESCRIPCIÓN:** La limpieza se realiza 2 veces por semana y uno la realiza 1 vez al mes. Ésta consistió en la limpieza de las cajas donde se encuentran los ratones, en donde se les cambia la viruta o cama, se lavan las pachas con agua y luego se les agrega agua limpia; por último se limpia el resto de Bioterio barriendo y trapeando el área de trabajo.

**RESULTADOS:** Se logró mantener la población de ratones del LENAP en condiciones óptimas para su mantenimiento.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** ninguna.

3. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Etiquetado e ingreso de abejas a la base de datos de la colección

**OBJETIVOS:** Etiquetar, conservar y actualizar la base de datos de abejas.

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en colocar las etiquetas a los especímenes previamente montados; posteriormente se ingresaron los datos de las etiquetas de cada espécimen en la base de datos correspondiente.

**RESULTADOS:** Se logró etiquetar y conservar las abejas colectadas, sin embargo el ingreso de abejas a la base de datos de la colección lo realizó personal del LENAP capacitado para ello.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Ninguna.

**4. NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Extracción de ADN

**OBJETIVOS:** Practicar las diferentes técnicas para la extracción de ADN.

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en separar el material genético de las patas de las abejas que se estudiaron, posteriormente el ADN extraído se amplificó y analizó por medio de técnicas de RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic ADN)

**RESULTADOS:** Se logró practicar la técnica de RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic ADN), utilizada en la extracción de ADN.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Ninguna.

**5. NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Disección de chinches

**OBJETIVOS:** Aprender la técnica de disección e identificar si éstas son positivas o negativas para *Tripanosoma cruzi*

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en obtener una muestra de las heces de las chinches vivas o recién muertas, posteriormente se colocó la muestra en un porta y cubreobjetos, la cual fue analizada en el microscopio. La chinche fue colocada en frascos con etanol y glicerina, los cuales se etiquetaron y se ingresaron al cuaderno de registros.

**RESULTADOS:** Se logró obtener muestras de heces que permitieron analizar si las muestras eran o no positivas para *Tripanosoma cruzi*. Así mismo se logró preservarlas en etanol con glicerina.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** ninguna.

**6. NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Día de la Biodiversidad

**OBJETIVOS:** Preparar y organizar actividades didácticas relacionadas con el Día de la Biodiversidad, para un grupo de estudiantes de colegio.

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en preparar y organizar actividades didácticas sobre la polinización. En dicha actividad se dieron trifoliales (Anexo 4) que contenían una breve explicación sobre los temas centrales de la polinización, así mismo se dio una charla informativa de 5-10 minutos de duración.

**RESULTADOS:** Se logró preparar y organizar bien la actividad, así mismo se logró impartir la información con el material preparado.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Ninguna.

**4. ACTIVIDADES DE DOCENCIA**

**1. NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Revisión del Meliponario

**OBJETIVOS:** Prestar los servicios que requiere el Meliponario para su mejor cuidado.

**DESCRIPCIÓN:**

Dar de comer a las abejas: Consistió en preparar una solución de agua con azúcar las cuales se colocaron en cada colmena.

Revisión de la actividad de la colmena: Consistió en chequear que actividad presenta la colmena (si tiene guardián, y hacer el conteo de la entrada y salida de las abejas a la colmena) bajo las condiciones ambientales presentes.

**RESULTADOS:** Se preservó la población de abejas de cada una de las colmenas que se encuentran en el meliponario.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** ninguna.

2. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Discusión de Artículos científicos

**OBJETIVOS:** Mantener actualizado al grupo de investigación.

**DESCRIPCIÓN:** La discusión de artículos científicos consistió en leer previamente artículos relacionados con los temas establecidos por el grupo de Biología Molecular. Luego éstos fueron discutidos por el grupo de investigación.

**RESULTADOS:** Se logró mantener al grupo de investigación actualizado en cuanto a las técnicas moleculares que se utilizan en estudios moleculares que se realizan actualmente.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Dificil organización dentro del grupo de investigación.

## 5. ACTIVIDADES NO PLANIFICADAS

1. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Expo-abeja 2009

**OBJETIVOS:** Apoyar en la organización y exposición de la actividad Expoabeja 2009.

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en preparar el material didáctico para llevar a cabo la exposición de los meliponicultores. Así mismo se les impartió una breve información sobre las abejas (Meliponas) y los productos que se comercializan.

**RESULTADOS:** Se logró organizar de manera ordenada a los expositores, así mismo se contó con el material didáctico suficiente para la realización de dicha actividad.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** ninguna.

2. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Gira de Campo

**OBJETIVOS:** Apoyar a investigadoras del LENAP en la colecta, etiquetado y montado de abejas, en los departamentos de Totonicapán y Huehuetenango.

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en la participación, durante 4 días, en la gira de campo realizada en Huehuetenango y Totonicapán. La cual consistió en la recolección de abejas en diferentes sitios de colecta (Anexo 4). Posteriormente, los especímenes colectados eran montados con alfileres entomológicos y etiquetados con su respectiva información.

**RESULTADOS:** Se logró apoyar a las investigadoras del LENAP, en la colecta de abejas, así mismo se logró etiquetar y montar todos los especímenes colectados durante la gira de campo.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Ninguna.

## 6. ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

1. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Extracción de ADN

**OBJETIVOS:** Extraer el ADN de las patas de las abejas que se están estudiando, así mismo enriquecer la colección de ADN de abejas.

**DESCRIPCIÓN:**

Extracción de ADN de Abejas:

Extracción de patas: Consistió en la extraer las patas traseras de las abejas con ayuda de una pinza estéril, procurando obtener la mayor cantidad de músculo.

Extracción de ADN de las patas: Consistió en separar el material genético de las patas de las abejas que se están estudiando, utilizando el método de extracción salina (Dodecil Sulfato de Sodio).

**RESULTADOS:** Se logró extraer ADN de las patas de 40 abejas, utilizando la técnica de extracción salina (Dodecil Sulfato de Sodio).

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Ninguna.

## 2. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Amplificación de ADN

**OBJETIVOS:** Obtener segmentos de ADN amplificados por medio de la técnica de PCR

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en hacer una mezcla de: 25 ng de ADN genómico, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 nM Tris, pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1mM para cada trifosfato desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.4 μM de cebador o iniciador (Operón tecnológico Alameda, AL, USA) y una unidad de Taq polimerasa. La mezcla se incubó en un termociclador modelo PTC-100 y se programo para que éste llevara a cabo 40 ciclos, cada ciclo consistió de una fase de desnaturalización (30 segundos a 35°C) y una fase de extensión (1 minuto a 72°C). Una última fase se realiza al final de los 40 ciclos (7 minutos a 72°C). (Solórzano E.O. 2005.)

**RESULTADOS:** Se logró trabajar 9 amplificaciones, con tres cebadores, en las cuales se obtuvieron segmentos de ADN sintetizados a partir del ADN genómico extraído de las patas por medio de la técnica de PCR.

**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** No salió a la primera debido a contaminación, por lo que se tuvo que realizar repeticiones.

## 3. **NOMBRE DE LA ACTIVIDAD:** Electroforesis

**OBJETIVOS:** Visualizar los productos de la PCR

**DESCRIPCIÓN:** Consistió en la separación de los productos de reacción de la mezcla que se realizó en la amplificación de ADN. Éstos se colocaron en geles de 1.2% de agarosa que contienen 10 μg/ml de bromuro de etidio inmerso en una solución amortiguadora de TBE (90mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8.0). Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador, con luz UV y luego, los geles revelados fueron fotografiados. (Waldschmidt *et al.* 2002)

**RESULTADOS:** Se observaron y registraron los productos de la PCR (las bandas de ADN, visualizadas con luz UV). Sin embargo en algunos geles no se logró visualizar ningún producto de la PCR y en otros presentaban bandas ajenas al ADN de las abejas (Contaminacion que provenía de los reactivos). (Anexo 5)

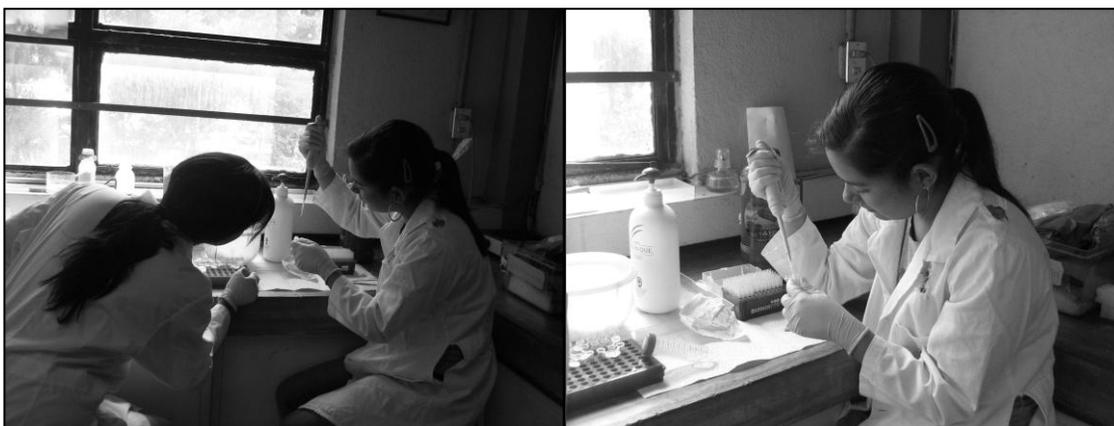
**LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS:** Ninguna.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alquijay B. Enríquez E. 2006. Programa Analítico, Práctica de Experiencias docentes con la comunidad-EDC carrera biología. Universidad de San Carlos de Guatemala, USAC. 55Pp.
2. Solórzano E.O. 2005. Informe final de Investigación, Comparación de la Variabilidad Genética de 3 poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) provenientes de El Tule, La Brea y El Carrizal (Jutiapa, Guatemala) por medio de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD-PCR). Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP). Universidad de San Carlos de Guatemala, 49 Pp.
3. Waldschmidt, A.M. Marco-Junior P. Barros, E.G. Campos L.A.O. 2002. Genetic Analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. Universidad estatal del Sudoeste de Bahia (UESB).Brazil.Rev. Braz. J. Biol., 62(4B): 923-928

## 8. ANEXOS

**Anexo 1:** Extracción de ADN de las patas de abejas.



**Anexo 2:** Discusión de artículos científicos del grupo de Biología Molecular.



**Anexo 3: Ejemplar del Trifoliar Impartido en la Actividad del Día de la Biodiversidad.**

**POLINIZACIÓN**



Universidad de  
San Carlos de  
Guatemala

Para mayor información:

Raquel Asunción Lima Cordón  
[ralinda7@yahoo.com](mailto:ralinda7@yahoo.com)

Laboratorio de Entomología Aplicada y  
Parasitología, LENAP  
[www.usac-lenap.org](http://www.usac-lenap.org)

Universidad de San Carlos de Guatemala

Laboratorio de Entomología Aplicada y  
Parasitología, LENAP

Jardín Botánico, CECON

Elaborado por Raquel Asunción Lima Cordón  
Cierre: 20/01/2005 Guatemala, 2009

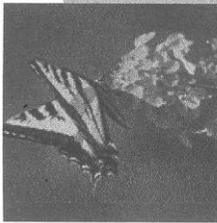
¿SABES QUÉ ES LA POLINIZACIÓN ?

¿SABES CÓMO OCURRE?

¿SABES QUÉ ADAPTACIONES HAN DESARROLLADO LAS PLANTAS PARA PODER SER POLINIZADAS?

¿SABES CUÁL ES LA IMPORTANCIA DE ESTE PROCESO?





## QUE ES?

La polinización es el proceso por el cual se transfiere el polen de los estambres hasta los estigmas de las plantas con flores.

## TIPOS DE POLINIZACION

- Anemofila:** por medio del viento
- Hidrófila:** por medio del agua,
- Zoofila:** por medio de un polinizador animal.

## ADAPTACIONES DE LAS PLANTAS

Plantas anemófilas: suelen ser pequeñas, incoloras, verdes, poco llamativas. Producen grandes cantidades de polen y tienen estigmas plumosos para poder captar los granos de polen.

Plantas hidrófilas. Producen flores pequeñas e inconspicuas. Los granos de polen tienen adaptaciones especiales para ser llevados por el agua y los estigmas son muy ramificados para poder atrapar los granos de polen.

Plantas zoofilas: deben llamar la atención de sus vectores con colores y olores atractivos

## ADAPTACIONES DE LOS POLINIZADORES

Abejas y otros insectos: presencia de pelos plumosos alrededor del cuerpo; aparato bucal alargado especializado para succionar el néctar; presencia de órganos para transporte del polen; los órganos visuales y olfativos están adaptados para identificar a las flores por sus perfumes, colores y diseños

Aves: presencia de picos y lenguas largas que están adaptados para beber el néctar de flores tubulares o en forma de trompeta.

Mamíferos: presencia de una lengua larga que puede extenderse casi la misma longitud de su cuerpo y posee ciertas carnosas en su punta.



Murciélago

## TIPOS DE POLINIZADORES

La mayoría de los polinizadores pertenecen a los grupos Himenóptera (abejas, avispas y hormigas), Díptera (moscas y mosquitos), Lepidóptera (mariposas y mariposas nocturnas o polillas) y Coleóptera (escarabajos).

Sin embargo existen otro tipo de animales que pueden actuar como polinizadores, entre ellos están algunas aves (colibrís) y mamíferos (murciélagos) que habitan las regiones tropicales del planeta.



Colibrí

## IMPORTANCIA DE LA POLINIZACION

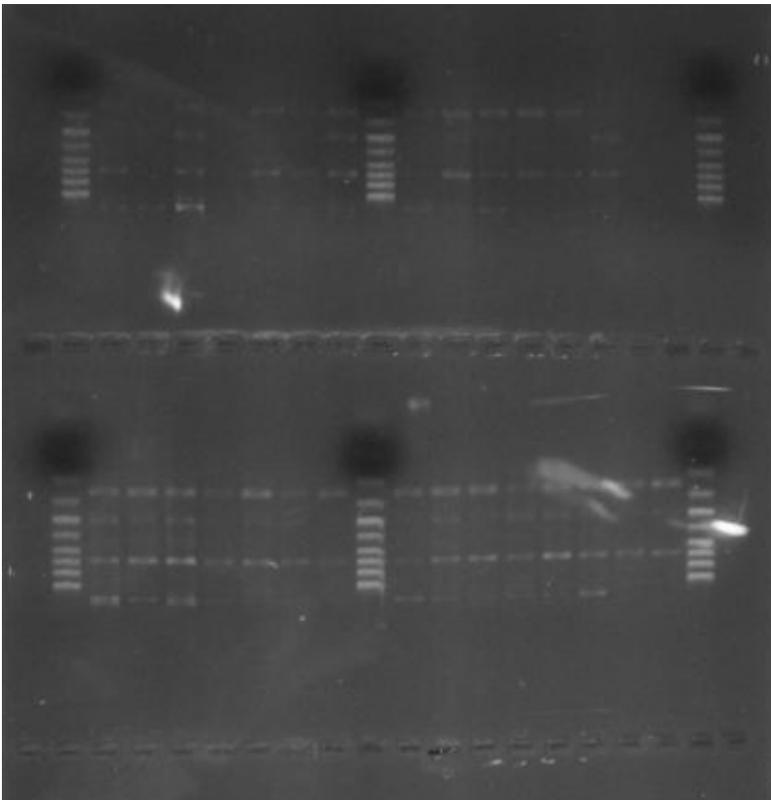
Es vital para la producción de alimentos y medios de vida de los seres humanos, relaciona directamente los ecosistemas silvestres con los ecosistemas de producción agrícola. Además, muchas plantas dependen de los polinizadores y de la polinización para su supervivencia.

Si este proceso no se llevara a cabo, muchas especies y procesos de los ecosistemas, dejarían de existir.

**Anexo 4:** Colectando abejas en la gira de Campo, en los Cuchumatanes, Huehuetenango.



**Anexo 5:** Gel de Electroforesis que muestra las bandas de ADN amplificado



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD  
SUBPROGRAMA DE EDC-BIOLOGÍA

**INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN**  
**Estudio de la Estructuración Genética de *Melipona beecheii* en Guatemala**

Raquel Asunción Lima Cordón.  
SUPERVISOR (A): Licda. Gabriela Armas.  
ASESOR INSTITUCIONAL: Licda. Elizabeth Solórzano.

Vo. Bo. ASESOR INSTITUCIONAL

## RESUMEN DE INVESTIGACION

### Estudio de la Estructuración Genética de *Melipona beecheii* en Guatemala

Raquel Lima, Elizabeth Solórzano

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología, LENAP

Las abejas sin aguijón son insectos de importancia ecológica y económica, por su rol de polinizadores y su uso en la meliponicultura. Debido a la gran variedad en tamaño y color que presentan en su rango de distribución natural, el objetivo del presente estudio fue identificar si ésta variación está relacionada con una estructuración genética entre los individuos de *Melipona beecheii* que se distribuyen en Guatemala, utilizando la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD-PCR). Los análisis mostraron que si existe una diferencia significativa entre las frecuencias fenotípicas presentadas entre los individuos de las diferentes localidades, sin embargo no se encontró correlación entre distancias genéticas y físicas, es decir, la distancia física no influye en la distancia genética entre localidades. Así mismo se encontró que los individuos de *Melipona beecheii* en las diferentes regiones estudiadas, posiblemente no están presentando estructuración genética, sin embargo se pudo establecer que las variaciones fenotípicas encontradas a lo largo de su distribución son producto del ambiente y no de una estructuración genética.

**PALABRAS CLAVE:** Estructuración genética, *Melipona beecheii*, variaciones fenotípicas, distancia genética, Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD-PCR).

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
RESUMEN DE INVESTIGACION	12
TITULO	14
INTRODUCCIÓN	14
RESUMEN	14
REFERENTE TEÓRICO	15
Generalidades de las abejas sin aguijón (meliponas).	15
Importancia de las abejas sin aguijón	15
Género <i>Melipona</i>	15
<i>Melipona beecheii</i>	16
Estructuración genética	16
Técnicas moleculares utilizadas para los estudios genéticos de poblaciones	16
Estudios moleculares del género <i>Melipona</i>	17
Estudios realizados en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología- Lenap	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	19
HIPÓTESIS	19
METODOLOGÍA	20
DISEÑO	20
Población	20
Muestra	20
Técnicas a usar en el proyecto de investigación	20
Recolección de datos	21
Análisis de datos	21
TECNICAS A USAR EN EL PROCESO DE INVESTIGACION	22
RESULTADOS	23
Prueba exacta de Fisher	23
Distancias genéticas	24
Prueba de Mantel	24
DISCUSION DE RESULTADOS	25
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	30

## 1. TITULO

Estudio de la Estructuración Genética de *Melipona beecheii* en Guatemala

## 2. INTRODUCCION

Las abejas sin aguijón pertenecen al Orden Hymenoptera, Familia Apidae, Subfamilia Apineae, tribu Meliponinae. Dentro de las abejas sin aguijón se encuentran las del género *Melipona*, las cuales se encuentran distribuidas desde México hasta Costa Rica. Estudios realizados por Yurrita y Enríquez (2005), establecen que en Guatemala, la especie *Melipona beecheii* se encuentra distribuida en 17 diferentes municipios pertenecientes a 10 de los 22 departamentos, sin embargo son estudios preliminares, ya que aun no se conoce con exactitud su distribución en Guatemala.

Se ha visto que el tamaño y coloración de dichas abejas varía tanto en su rango de distribución natural como dentro del rango de distribución en Guatemala (Quezada, 2005). Éstas variaciones se estudiaron utilizando la técnica de la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD-PCR); con el fin de establecer si éstas están relacionadas con una estructuración genética en *Melipona beecheii*. Los análisis de los datos permitieron establecer que si existe una diferencia significativa entre las frecuencias fenotípicas entre los individuos de las diferentes regiones. No se encontró correlación entre las distancias genéticas y las distancias físicas; así mismo se pudo identificar que los individuos de *Melipona beecheii* posiblemente no están presentando estructuración genética en su rango de distribución en Guatemala y su cambio fenotípico a lo largo de su distribución es producto del ambiente y no de una estructuración genética.

## 3. RESUMEN

Las abejas sin aguijón son insectos de importancia ecológica y económica, por su rol de polinizadores y meliponicultura. Debido a la gran variedad en tamaño y color que presentan en su distribución, el objetivo del presente estudio fue identificar si existe una estructuración genética entre los individuos de *Melipona beecheii* que se distribuyen en Guatemala, utilizando la técnica de RAPD-PCR. Los análisis mostraron que si existe una diferencia significativa entre las frecuencias fenotípicas presentadas entre los individuos de las diferentes localidades, no se encontró correlación entre distancias genéticas y físicas. Así mismo se encontró que los individuos de *Melipona beecheii* en las diferentes regiones, posiblemente no están presentando estructuración genética, sin embargo se pudo establecer que las variaciones fenotípicas encontradas a lo largo de su distribución son producto del ambiente y no de una estructuración genética.

#### 4. REFERENTE TEORICO

##### **Generalidades de las abejas sin aguijón (meliponas).**

Las abejas sin aguijón pertenecen al Orden Hymenoptera, Familia Apidae, Subfamilia Apineae, tribu Meliponinae. Éstas son consideradas como abejas sociales y su distribución se restringe a las regiones tropicales del planeta. Actualmente, hay 50 géneros de abejas sin aguijón, reportadas y distribuidas en todo el planeta; en donde 30 géneros se encuentran en el continente americano. Uno de los géneros endémicos de dicho continente, es el género *Melipona* el cual se cree que es un grupo relativamente nuevo de origen norteamericano. (Quezada, 2005; Yurrita y Enríquez, 2005)

Anatómicamente, la característica distintiva de este grupo de insectos, es la ausencia de un aguijón funcional y esto se debe a que tanto las obreras como las reinas poseen vestigios de lo que en el pasado fue un aguijón. Otras de las características que las distinguen es la gran reducción de la venación de las alas anteriores. (Quezada, 2005)

##### **Importancia de las abejas sin aguijón**

Éstas abejas juegan un papel importante dentro de los ecosistemas debido a que un 30-40% de las plantas con flores son visitadas por éstas abejas, por lo que también presentan un gran impacto en la polinización. Debido a ello, su conservación es muy importante, ya que al conservarlas, se estará manteniendo y conservando la mayoría de los bosques y cultivos (Quezada 2005; Jean-Prost *et al.* 2007).

En Guatemala se lleva a cabo la crianza artesanal de meliponas, con el fin de comercializar la miel que producen o bien utilizar dicha miel terapéuticamente. Debido a ello se consideran importantes económicamente. (Yurrita y Enríquez, 2005). Dentro de las abejas sin aguijón de mayor importancia en Guatemala, se encuentra las del género *Melipona* dentro del cual se encuentra la especie *M. beecheii*. (De la Rúa. *Et al.* 2007).

##### **Género *Melipona***

El género *Melipona*, se caracteriza por que son abejas con dimensiones corporales de alrededor de un centímetro, son robustas y presentan mucha pilosidad en el cuerpo. Las alas anteriores son cortas y no rebasan la longitud total del cuerpo. Son las únicas abejas que producen numerosas reinas pequeñas en celdas. (Quezada, 2005; Nates-Parra 1995).

## ***Melipona beecheii***

### **Taxonomía**

Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Hymenoptera
Familia:	Apidae
Subfamilia:	Meliponinae
Género:	<i>Melipona</i>
Especie:	<i>Melipona beecheii</i>

### **Biología**

Son abejas sociales, se caracterizan por establecer sus colonias en huecos de árboles, construyendo el nido con una mezcla de cera y propóleos, conocida como cerumen. Estas abejas son de mayor importancia en Guatemala por la producción de miel. Éste producto presenta cualidades medicinales y nutricionales por lo que es comercializado por los meliponicultores. (Yurrita y Enríquez, 2005)

### **Distribución**

*M. beecheii* presenta un rango de distribución natural desde el sur de México hasta Costa Rica. (De la Rúa. *Et al.* 2007). En Guatemala, estudios realizados por Yurrita y Enríquez (2005), muestran que éstas abejas se encuentran distribuidas en 17 municipios pertenecientes a los departamentos de Jutiapa, Retalhuleu, Quiché, Chiquimula, Zacapa, El Progreso, Guatemala, Santa Rosa, Alta Verapaz e Izabal. Sin embargo son estudios preliminares, ya que aun no se conoce con exactitud su distribución en Guatemala.

Se ha visto que los miembros de *M. beecheii* presentan un gradiente de tamaño y coloración a lo largo de su rango de distribución, en donde las abejas de coloración clara y pequeñas se encuentran distribuidas en la península de Yucatán y gradualmente las abejas más oscuras y de un mayor tamaño se encuentran distribuidas en toda Centro América hasta Costa Rica (Quezada, 2005).

### **Estructuración genética**

La Estructuración genética es el cambio en la variabilidad genética entre individuos de una misma especie. Ésta puede ser causada por el aislamiento de las mismas como consecuencia de cambios biogeográficos y cambios en la composición del paisaje, entre otros (Höglund, 2009).

Para Astorga & Ortiz (2006), la estructuración genética va a corresponder al menor nivel de diversidad biológica, lo cual considera como punto crítico para lograr que una especie se adapte y evolucione.

### **Técnicas moleculares utilizadas para los estudios genéticos de poblaciones.**

Actualmente los estudios genéticos de poblaciones utilizan técnicas moleculares para determinar la variación genética existente entre individuos de una misma especie o de diferentes especies. Entre las técnicas más utilizadas están las aloenzimas, RFLP, minisatélites, métodos basados en PCR como: microsátélites, AFLP, RAPDs, secuenciación de ADN (Höglund, 2009). En este estudio se utilizó la técnica de RAPDs-PCR.

#### Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Ésta técnica se basa en la copia de un pequeño fragmento de ADN que es multiplicado por medio de la enzima polimerasa y cebadores (no mayores de 10 pb en RAPD-PCR) de secuencia complementaria al ADN que se está estudiando. La multiplicación del ADN ocurre mediante la repetición de los ciclos que constan de tres fases: Desnaturalización del ADN por calentamiento del mismo a 95°C; enlace de los cebadores o fragmentos iniciadores al ADN, por el enfriamiento de la temperatura (Fase templado); y síntesis de ADN, por medio de la enzima polimerasa (Fase de polimerización). Debido a que en cada ciclo de PCR se duplica todo el ADN, en pocas horas, se pueden obtener más de mil millones de copias de un solo fragmento. (Solórzano, 2005; Landaverde, 2004).

#### Técnica de RAPD-PCR (Amplificación Aleatoria de ADN Polimorfo)

Ésta técnica utiliza cebadores de aproximadamente 10 pares de bases (para organismos eucarióticos) en secuencia aleatoria (oligonucleótidos). Debido a su tamaño, las probabilidades de que el cebador se una en distintos puntos del genoma es mayor. Esto hace que las regiones entre cada punto de unión (cebador+ADN) sean amplificadas por la enzima polimerasa, dando lugar a un fragmento con un peso molecular determinado. Los fragmentos amplificados, son analizados por electroforesis en gel, y con ello se puede detectar polimorfismo entre individuos de una misma especie (Solórzano, 2005; Landaverde, 2004).

### **Estudios moleculares del género *Melipona***

Las variaciones morfológicas presentes entre las especies del género *Melipona*, han sido punto de estudio para los análisis moleculares. Estos análisis se realizan con diferentes tipos de marcadores moleculares los cuales son utilizados para establecer la variabilidad entre poblaciones de especies emparentadas. Dichos estudios utilizan las técnicas de PCR (Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa), RAPD-PCR (Amplificación Aleatoria de ADN Polimorfo), RFLP (polimorfismos en la

longitud de los fragmentos de restricción) entre otras (Waldschmidt *et al.* 2002; De la Rúa *et al.* 2007)

Entre los estudios realizados con dicho género está el realizado por De la Rúa y col. (2007) en el cual se realizó un análisis RFLP de secuencias del ADN y fragmentos de ITS2 ribosomales en dos abejas sociales Neotropicales, *Melipona beecheii* y *Melipona yucatanica*, dicho estudio estableció a partir de los marcadores moleculares utilizados que si existe una diferencia entre las dos poblaciones de ambas especies, logrando distinguir tres patrones diferentes (Nco-1, Nco-2 y Nco-3) dentro de *Melipona beecheii* desde México hasta Costa Rica. Dichos autores no pudieron aclarar si estas diferencias tanto morfológicas como moleculares, se debían a la selección o a la deriva de las poblaciones. Sin embargo sostuvieron que una reducción de flujo de genes entre las poblaciones podría haber favorecido dicha diferenciación.

### **Estudios realizados en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología-Lenap**

En Guatemala, en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), se han realizado diversos estudios moleculares sobre la estructuración poblacional de *Triatomínos*. Entre dichos estudios está el realizado por Solórzano (2005), en donde determinó las Diferencias Genéticas de Poblaciones Centroamericanas de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera; Reduviidae)(Latreille 1811) por medio de ITS 2, el realizado por Landaverde (2004), en donde comparó poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica RAPD-PCR; el realizado por Calderón (2002), en donde determinó la Variabilidad Genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) en tres poblaciones silvestres del Atlántico y tres poblaciones domésticas del Pacífico de Guatemala utilizando la técnica de RAPD; sin embargo aún no se tiene suficiente información de estudios moleculares realizados con abejas, en especial con las abejas de *Melipona beecheii*.

Actualmente, un grupo de investigadoras del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), está llevando a cabo el estudio de la Comparación de la estructuración genética intra e interespecifica en tres especies del género *Melipona* en Guatemala y paralelo a éste, se ésta realizando el presente estudio sobre la Estructuración genética de *Melipona beecheii* en su rango de distribución en Guatemala.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las abejas del género *Melipona* pertenecen al grupo de abejas sin aguijón y su distribución se restringe a las regiones tropicales del planeta. Se ha visto que éstas abejas varían en tamaño y coloración a lo largo de su rango de distribución y así mismo se ha observado que dentro del rango de distribución en Guatemala, éstas abejas cumplen con dichas variaciones, en especial las abejas de *M. beecheii*. Dichas variaciones pueden o no estar relacionadas con una estructuración genética, y con el presente estudio se pretende evaluar si existe estructuración genética de *Melipona beecheii* dentro del rango en el cual se encuentra distribuida en Guatemala.

## 6. JUSTIFICACION

Las abejas del género *Melipona* juegan un papel importante dentro de los ecosistemas ya que un 30-40% de las plantas con flores son visitadas por éstas abejas. Éstos insectos presentan un gran impacto en la polinización por lo que su conservación es muy importante para el mantenimiento y conservación de los bosques y cultivos (Quezada 2005; Jean-Prost *et al.* 2007). Así mismo son de importancia económica en algunas comunidades guatemaltecas, debido a que la miel que producen es comercializada (Yurrita y Enríquez, 2005).

En Guatemala, existe poca investigación científica acerca de las especies de *Melipona*, por lo que se ha iniciado el estudio sistemático de las especies de dicho género. El presente estudio tiene como objetivo principal el evaluar si existe o no estructuración genética en *Melipona beecheii* dentro del rango en el cual se encuentra distribuida en Guatemala, así mismo establecer si existe correlación entre las distancias genéticas de los especímenes colectados y la distancia geográfica entre los puntos de colecta.

## 7. OBJETIVOS

- Determinar si existe o no estructuración genética entre los especímenes de *Melipona beecheii* que se distribuyen en Guatemala.
- Establecer si existe correlación entre las distancias genéticas de los especímenes colectados y la distancia geográfica entre los puntos de colecta.

## 8. HIPOTESIS

Existe estructuración genética en *Melipona beecheii* dentro de su rango de distribución en Guatemala.

## 9. METODOLOGIA

Se extrajo el ADN de 3 patas de cada uno de los especímenes de *Melipona beecheii* utilizando el método de extracción salina (Dodecil Sulfato de Sodio), posteriormente el ADN se amplificó utilizando la técnica de la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD'S). El ADN amplificado se corrió por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, los cuales fueron revelados en un transiluminador a una longitud de onda de luz UV de 256 nm. Los geles fueron fotografiados, y las fotografías digitales se analizaron en el programa Gene Profiler versión 4.1.

## 10. DISEÑO

### 10.1 POBLACION

Abejas de la especie *Melipona beecheii* colectadas en las cinco regiones Biogeográficas de Guatemala.

**Cuadro 1.** Agrupamiento Regional de los especímenes colectados por localidad, basado en sus características ecológicas.

<u>Localidades</u>	<u>Agrupación Regional</u>
Alta Verapaz Petén	Tierras Bajas de Petén (1)
Chiquimula Santa Rosa	Trifinio (2)
Jutiapa Retalhuleu	Costa Sur (3)
Escuintla Sololá	Altiplano (4)
Quiché	Triángulo Ixil (5)

Fuente: Comunicación Personal: Licda. Gabriela Armas

### 10.2 MUESTRA

Se colectaron 5 especímenes por colmena, de los cuales se analizó solamente 1 espécimen. Esto se debe a que las abejas son haplodiploides (en donde los machos proceden de huevos haploides y las hembras de huevos diploides) y monoándricas (un solo macho se aparea con la hembra), por lo que genéticamente no encontraríamos variaciones entre los individuos de la misma colmena (Waldschmidt *et al.* 2002).

### 10.3 TECNICAS A USAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION

Colecta: la colecta de los especímenes se llevó a cabo con redes entomológicas.

Extracción de ADN: consistió en extraer tres patas de cada abeja, con ayuda de una pinza estéril, las patas se colocaron en un tubo de micro centrifuga con etanol al 95% y se centrifugaron para tratar de remover la mayor cantidad posible de polen de las patas de la abeja. Posteriormente, se esperó a que el etanol se evaporara del tubo de micro centrifuga, para que las patas quedaran lo más secas posible (se colocaron en una secadora por poco tiempo en algunas ocasiones).

Una vez secas las patas, se colocaron en un nuevo tubo de microcentrífuga con un pistilo, y con ayuda de una pinza, se introdujo el tubo en un contenedor de nitrógeno líquido, lentamente y con cuidado para evitar que al momento del contacto con el nitrógeno líquido, las patas o el pistilo pudieran ser expulsados vigorosamente; una vez frío el tubo se procedió a macerar rápidamente las patitas, agarrando el tubo con ayuda de una toalla de papel para no lastimar la mano con el frío, el congelamiento facilitó la maceración. Luego al macerado se le agregó 100 µl de buffer de extracción y esto se mezcló con la ayuda de un pistilo. Luego se centrifugó momentáneamente para homogenizar todo al fondo del tubo de ensayo y se incubó la muestra a 65° C durante 15-30 minutos. Posteriormente, se le agregó 14 µl de K-Acetato 8M frío para una concentración final de 1M y se mezcló e incubó en hielo durante 15 minutos. Esto se centrifugó en frío 10 minutos a máxima velocidad (a 14,000 rpm). Luego se hicieron alícuotas de 200 µl de etanol frío al 95%. Y se transfirió el sobrenadante para cada muestra al tubo con etanol frío al 95%, en ese momento se observó la formación de una sustancia blanquecina como un halo, el cual corresponde a los fragmentos de ADN.

Se agitó suavemente y se incubó en hielo durante 10 minutos, luego se centrifugó 20 minutos en frío a máxima velocidad (14,000 rpm). Después de esto se observó la formación de un precipitado blanquecino, en el cual se encuentra el ADN aislado. Luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó en 100 µl de etanol al 70% y después en etanol al 95%. Éste precipitado se dejó secar por 12 horas y luego se disolvió en 50 µl de TE estéril con 1U ARNasa. La muestra se almacenó a -20°C

Amplificación de ADN: se hizo una mezcla de 25 µl que consiste de: 25 ng de ADN genómico, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 nM Tris, pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1mM para cada trifosfato desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.4 µM de cebador o iniciador (Operón tecnológico Alameda, AL, USA) y una unidad de Taq polimerasa. La mezcla fue incubada en un termociclador modelo PTC-100 y fue programado para que llevara a cabo 40 ciclos, cada ciclo consistió de una fase de desnaturalización (30 segundos a 35°C) y una fase de extensión (1 minuto a 72°C). Una última fase se realiza al final de los 40 ciclos (7 minutos a 72°C).

Electroforesis: consistió en la separación de los productos de reacción de la mezcla que se realizó en la amplificación de ADN. Éstos fueron colocados en geles de 1.2% de agarosa que contienen 10 µg/ml de bromuro de etidio inmerso en una solución buffer de TBE (90mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8.0). Las bandas de ADN fueron visualizadas bajo la luz UV y luego, los geles revelados fueron fotografiados. (Waldschmidt *et al.* 2002)

## **11. TÉCNICAS A USAR EN EL PROCESO DE INVESTIGACION**

### **11.1 RECOLECCION DE DATOS**

Los datos fueron recolectados a partir del análisis que se les realizaron a las bandas presentes en los geles revelados con luz UV. Esto se realizó con el Programa Gene Profiler versión 4.1, a partir de estos se construyó una matriz de presencia, ausencia de bandas, que posteriormente se convirtió en una matriz de 1 para presencia y 0 para ausencia de banda.

### **11.2 ANALISIS DE DATOS**

Para los análisis moleculares solo se utilizó un espécimen por colmena, esto se debe a que las abejas son haplodiploides (en donde los machos proceden de huevos haploides y las hembras de huevos diploides) y monoándricas (un solo macho se aparea con la hembra), por lo que genéticamente no encontraríamos variaciones entre los individuos de la misma colmena (Waldschmidt *et al.* 2002).

Los geles fotografiados, se analizaron en el programa Gene Profiler versión 4.1, y a partir de estos se construyó una matriz de presencia, ausencia de bandas, que posteriormente se convirtió en una matriz de 1 para presencia y 0 para ausencia de banda.

Los datos de esta matriz fueron analizados como frecuencias fenotípicas, las cuales fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de exactitud de Fisher para saber si existían diferencias significativas entre las frecuencias fenotípicas entre los sitios de colecta, este proceso se desarrolló utilizando el paquete de computo TFPGA (Herramientas para el análisis genético de poblaciones); con este paquete también se calcularon las distancias genéticas; y se realizó la prueba de Mantel para calcular la correlación lineal entre dos matrices de proximidad (distancias genéticas y físicas).

## **12. RESULTADOS**

Con el Programa Gene Profiler versión 4.1, se obtuvieron un total de 15 loci para el Cebador OPA16 (5'-AGCCAGCGAA-3') y 9 Loci para el Cebador OPL05 (5'-ACGCAGGCAC-3'), de los cuales se generó una matriz de presencia (1)-ausencia (0) para cada locus (Anexo 1a-b ). A partir de esta matriz se realizaron las siguientes pruebas estadísticas:

### **Prueba exacta de Fisher**

Con programa TFPGA se realizó la prueba exacta de Fisher para los dos cebadores utilizados (OPA16, OPL05). El cebador OPA16, presentó un  $p = 0.0364$ , y el cebador OPL05 presentó un  $p = 0.6225$  (Tabla 1, Anexo 1), para un  $\alpha=0.05$  (Raymond & Rousset. 1995). Esto muestra que los loci

identificados por el primer cebador (OPA16), muestran una diferencia significativa entre las frecuencias fenotípicas entre los sitios de colecta, mientras que los loci para el segundo cebador (OPL05) no muestran diferencias significativas entre dichas frecuencias.

**Tabla 1:** Valores de p utilizando la Prueba de Exactitud de Fisher para cada cebador

	<b>OPA16</b>	<b>OPL05</b>
<b>Valor de p</b>	0.0364	0.6225

Fuente: Datos experimentales obtenidos del programa TFGA

Las diferencias en las frecuencias fenotípicas entre los sitios de colecta, encontradas con el cebador OPA16 son estadísticamente más representativas con respecto al cebador OPL05. Esto se debe a que el cebador OPA16 presentó mayor polimorfismo con respecto al cebador OPL05. (Anexo 2-3).

### **Distancias genéticas**

Para obtener las distancias genéticas entre las diferentes localidades de Meliponas, se utilizó el programa TFGA para ambos cebadores. Y se obtuvo que para el Cebador OPA16, la mayor distancia genética de Roger's (1972) encontrada fue de 0.2289 (Matriz 1), entre las Regiones 4-5, individuos pertenecientes a las Regiones Biogeográficas del Altiplano y Triángulo Ixil respectivamente (Anexo 5).

**Matriz 1:** Matriz de Distancias Genéticas del cebador OPA16, basado en los cálculos de Roger (1972)

<b>Poblacion</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	***				
<b>2</b>	0.1039	***			
<b>3</b>	0.1696	0.1093	***		
<b>4</b>	<b>0.0856</b>	0.1895	0.1609	***	
<b>5</b>	<b>0.1904</b>	0.1204	0.1151	<b>0.2289</b>	***

Fuente: Datos experimentales obtenidos del programa TFGA

Los valores de distancia genética van desde 0 a 1, en donde los valores más cercanos a 1 determinan la lejanía evolutiva entre grupos de individuos. Con respecto al segundo cebador, OPL05, se obtuvo que la mayor distancia genética de Roger's, (1972) encontrada fue de 0.2742 (Matriz 2), entre las regiones 1-4, individuos pertenecientes a las Regiones Biogeográficas de Las Tierras Bajas del Norte y El Altiplano respectivamente.

En ambas matrices, la población 4, que pertenece al Altiplano, es la que más difiere de las demás poblaciones, sin embargo la matriz 2 no genera datos estadísticamente confiables debido a que la prueba de Fisher no presentó una diferencia significativa para ese cebador.

**Matriz 2:** Matriz de Distancias Genéticas del cebador OP605, basado en los cálculos de Roger (1972)

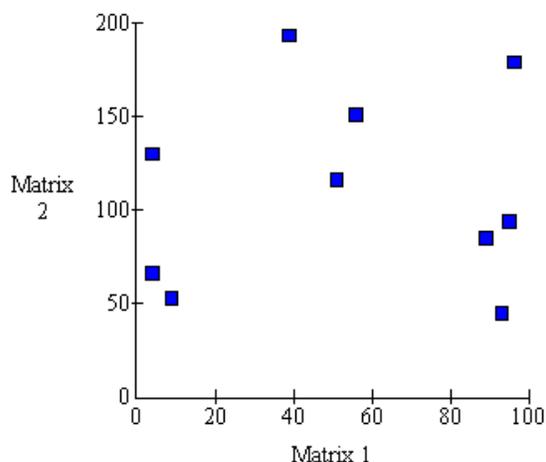
Población	1	2	3	4	5
1	***				
2	0.1694	***			
3	0.1957	0.1340	***		
4	<b>0.2742</b>	0.1305	0.0786	***	
5	0.1473	0.09820	0.0627	0.1413	***

Fuente: Datos experimentales obtenidos del programa TFPGA

### Prueba de Mantel

Los valores del coeficiente de correlación van desde -1 a 1, en donde valores muy cercanos a cero muestran que no existen correlación entre las variables que se están evaluando (Álvarez, 2007), La prueba de Mantel realizada, presentó un  $r=0.0790$ , lo cual indica que no existe una correlación entre las distancias genéticas y las físicas.

**Figura 1:** Prueba de Mantel que muestra un coeficiente de correlación de 0.0790.



Fuente: Datos experimentales obtenidos del programa TFPGA

La prueba de Mantel realizada mostró que no existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias físicas de las diferentes localidades, éstas últimas no pueden considerarse como una barrera que impida el flujo genético entre los individuos de cada Región establecida.

### 13. DISCUSION DE RESULTADOS

La distribución actual de la mayoría de los organismos, es producto de una serie de procesos geológicos a través del tiempo, ésta historia geológica podría ser una razón que explique el aislamiento que han sufrido algunas de las agrupaciones de individuos de *Melipona beecheii*; sin embargo se sabe que en la actualidad, su distribución se ve influenciada por la actividad meliponicultora que se practica en Guatemala desde la época de los Mayas.

Este intercambio no estaría provocando un aislamiento, sino al contrario, estaría favoreciendo el intercambio genético entre las diferentes regiones. Sin embargo los resultados demuestran que tres regiones (Altiplano, Trifinio y Tierras Bajas del Norte), presentan distancias genéticas que podrían estar asociadas a una estructuración genética. Existe la posibilidad de que éstas distancias estén siendo sobreestimadas, produciendo lo que es conocido como efecto Wahlund (fenómeno producido entre subpoblaciones aisladas genéticamente que poseen un origen común, pero sus frecuencias alélicas difieren) (Santacruz *Et al.*) producido por la “ausencia” de individuos de las localidades intermedias. Sin embargo, la estrecha distancia geográfica entre el Altiplano con el Trifinio, descarta la idea de éste fenómeno, mientras que para las Regiones del Altiplano con las Tierras bajas del Norte (cuya distancia geográfica es mayor) se esperaría que presentara este fenómeno, sin embargo se tienen individuos de las localidades intermedias, y no muestran diferencia alguna con los individuos del Altiplano y las Tierras bajas del norte.

Este comportamiento no muestra un patrón claro del comportamiento genético entre las localidades que determine con certeza si se está dando o no estructuración genética entre las diferentes poblaciones. Además se sabe que en la actualidad existe un movimiento pasivo de colmenas desde Santa Rosa a Retalhuleu (Regiones Altiplano-Trifinio) (Comunicación personal: Licda. Eunice Enríquez, Lcda. Gabriela Armas) y no se esperaría encontrar una mayor distancia genética, sin embargo son las localidades cuya distancia genética es mayor.

Debido a ello, se tomarán en cuenta aspectos como la vegetación, actividad antropogénica, deforestación, entre otros para determinar qué otros factores posiblemente estén influyendo en éstas distancias.

Como ya se mencionó anteriormente, los individuos del Altiplano con El Trifinio (Anexo 4); presentaron la mayor distancia genética (Matriz 1); ambas localidades, se caracterizan por tener una vegetación de encinares y pinares, selvas bajas caducifolias y algunos remanentes de selva mediana siempre verde de tierras templadas, debido a ello, la cobertura vegetal no podría considerarse como una barrera física, sin embargo al disminuir la escala biogeográfica y enfocarnos en una escala del paisaje, la Región del Altiplano presenta un 2.73% de la población Total de Guatemala (INE,2002) mientras que la región de Trifinio presenta un 8.83% (INE,2002) de la población Total. La diferencia en el tamaño demográfico influye en la fragmentación del paisaje que actualmente se está dando en Guatemala debido a la agricultura, ganadería y deforestación, como consecuencia de las necesidades antropogénicas de cada región. En el anexo 6 se puede

observar que para la Región del Altiplano, existe una mayor cobertura de cultivos de campo pequeño (60%) y áreas con 20-59% de cultivos; mientras que para la Región El Trifinio, además de presentar Cobertura de cultivos de campo pequeño (60%) y áreas con 20-59% de cultivos, presenta áreas de cobertura de pasto y bosque. (INE, 2008). Con ello se puede observar que la Región del Trifinio tiene mayor influencia antropogénica con respecto a la Región del Altiplano por lo que esto podría estar influenciando en el aislamiento de las abejas, provocando distancias genéticas mayores.

En cuanto a Las Tierras Bajas del Norte- El Trifinio presentaron la segunda distancia genética mayor (Matriz 1), como se mencionó anteriormente, el Trifinio presenta una vegetación de encinares y pinares, selvas bajas caducifolias y algunos remanentes de selva mediana siempre verde de tierras templadas; mientras que las Tierras Bajas del Norte se caracterizan por presentar vegetación de selvas subdeciduas y medianas siempre verdes. Esta diferencia entre el tipo de vegetación en éstas dos Regiones, podría conformar la primera barrera física que dificulte el desplazamiento de las abejas, aumentando un aislamiento entre ellas. Al disminuir la escala biogeográfica y enfocarnos en una escala del paisaje, la región de Trifinio presenta un 8.83% (INE,2002) de la población total, mientras que la Región de las Tierras Bajas del Norte, presenta un 10.17% (INE,2002) de la población Total, lo cual indicaría que por su cantidad de habitantes, la fragmentación sea mayor, sin embargo el área que presenta ésta región es mucho mayor con respecto a las otras dos regiones, disminuyendo la fragmentación.

Las condiciones de las tres regiones, coinciden con lo establecido por Höglund (2009), en donde el humano es el principal causante de la fragmentación, que es un proceso que contribuye al aislamiento entre poblaciones, así como a la creación de barreras que impiden un flujo genético entre ellas, esto puede aplicarse a las abejas debido a que son vulnerables a la perturbación. Cabe mencionar que la pérdida de los ecosistemas como consecuencia de la alta deforestación en Guatemala (2% anual), es la principal causa de las divisiones de las poblaciones de diferentes organismos. Esto trae como consecuencia alteraciones en la topografía, microclimas y gradientes ambientales a diferentes escalas (CONAP, 20060).

En cuanto a las Tierras Bajas del Norte con el Altiplano, son las agrupaciones que presentaron menor distancia genética, de 0.0856 a pesar que geográficamente son regiones distantes. Lo mismo ocurre entre las demás agrupaciones de individuos (Regiones del Triángulo Ixil, y Costa Sur) que a pesar de que muestran un vegetación muy diferenciada, ésta diferencia en la vegetación no ha hecho que los individuos de dichas regiones tengan distancias genéticas grandes, sino que presentan distancias pequeñas, es decir, no presentan mayor variación genética entre ellas, sin embargo se desconoce algún intercambio de colmenas entre estas regiones (Comunicación personal: Licda. Eunice Enríquez).

En base a lo anterior, no se puede establecer con claridad si los individuos de *Melipona beecheii* realmente estén presentando estructuración genética entre las regiones o simplemente las variaciones fenotípicas encontradas a lo largo de su distribución, sean en su mayoría producto del

ambiente (como diferencia en cobertura vegetal influenciada por la actividad antropogénica) y no un cambio en su estructura genética.

#### 14. CONCLUSIONES

- Los individuos de *Melipona beecheii* posiblemente no están presentando estructuración genética en su rango de distribución en Guatemala.
- Diferencias en la cobertura vegetal (influenciada en su mayoría por la actividad antropogénica) puedan estar influenciando en la expresión fenotípica de las abejas y no en su estructura genética.
- No se encontró correlación entre las distancias genéticas y físicas de los individuos de las 5 regiones Biogeográficas estudiadas.
- Las Regiones que presentaron mayor distancia genética son del Altiplano, Trifinio y Las Tierras Bajas del Norte, con una distancia genética de 0.2289 (Altiplano-Trifinio) y 0.1904 (Trifinio-Tierras Bajas del Norte).
- Las dos regiones que presentaron menor distancia genética son el Altiplano y las Tierras Bajas del Norte, con una distancia genética de 0.0856.

#### 15. RECOMENDACIONES

- Utilizar más cebadores polimórficos con el fin de tener más puntos de comparación que puedan fundamentar los fenómenos genéticos que estén ocurriendo dentro de los individuos de *Melipona beecheii*.
- Aspectos como la fragmentación de los paisajes, consecuencia de la deforestación, aumento demográfico, y la cobertura agropecuaria, deben ser considerados en estudios posteriores, como barreras ante el flujo genético entre los individuos de diferentes localidades.
- Extender el muestreo con abejas silvestres y no solo de colmenas, en cada una de las localidades en las que se distribuye *Melipona beecheii*.
- Determinar en futuros estudios la dinámica poblacional de individuos de abejas silvestres y colmenas.

## 16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alquijay B. Enríquez E. 2006. Programa Analítico, Práctica de Experiencias docentes con la comunidad-EDC carrera biología. Universidad de San Carlos de Guatemala, USAC. 55Pp.
2. Álvarez R.C. 2007. Estadística Aplicada a las ciencias de la salud. Ediciones Díaz de Santos. España. 996 Pp. Disponible en : [http://books.google.es/books?id=V2ZosgPY10kC&printsec=frontcover&source=gbs\\_navlinks\\_s#v=onepage&q=&f=false](http://books.google.es/books?id=V2ZosgPY10kC&printsec=frontcover&source=gbs_navlinks_s#v=onepage&q=&f=false)
3. Astorga M.P. Ortiz J.C. 2006. Variabilidad genética y estructura poblacional del tunicado *Pyura chilensis* Molina, 1782, en la costa de Chile. Rev. chil. hist. nat. [online]. vol. 79, no. 4 [citado 19.05.2009], pp. 423-434. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-078X2006000400002&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2006000400002&lng=es&nrm=iso) >. ISSN 0716-078X.
4. Burke, Seidler, Smith, 1992. Técnicas Moleculares en Ecología y Biología de la Conservación. Disponible en: <http://ebd10.ebd.csic.es/pdfs/sek.pdf>.
5. Calderón, C. 2002. Variabilidad genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) en tres poblaciones silvestres del Atlántico y tres poblaciones domésticas del Pacífico de Guatemala, Utilizando la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. 75 Pp.
6. CONAP. 2006. Perfil Ambiental de Guatemala. 441 Pp. Disponible en: <http://www.perfilambiental.org.gt>
7. De la Rúa. P. May-Itzá W. J. Serrano J. Quezada-Euán J.J.G. 2007. Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal DNA in two Neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). Birkhauer Verlag, Basel. Rev. Insect. Soc. 54
8. INE. 2002. XI Censo Nacional de Población. Guatemala. Disponible en: <http://www.ine.gob.gt/index.php/demografia-y-poblacion>
9. INE. 2008. Encuesta Nacional Agropecuaria. Guatemala. Disponible en: <http://www.ine.gob.gt/index.php/agricultura/45-agricultura/193-ena2008>
10. Jean-Prost P. Sierra E.A. 2007. Apicultura: Conocimiento de la abeja: manejo de la Colmena. Trad. Carlos de Linan. 7<sup>Ma</sup> Edición. Mundi-Prensa Libros. 789 pp. Disponible en: <http://books.google.com.gt>

11. Höglund J. 2009. Evolutionary Conservation Genetics. OXFORD University Press. United States. 189 Pp.
12. Landaverde, P. 2004. Comparación de poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR). Universidad de San Carlos de Guatemala. 109 Pp.
13. CONAP. 2006. Guatemala y su Biodiversidad, un enfoque histórico, cultural, biológico y ecológico. Mendez C. Diversidad Faunística de Guatemala. Cap 5. Guatemala. 30 Pp
14. Monroy M.C. Solórzano E. Armas A.G. Recinos M.J. Zehntner M.P. 2009. Protocolo de investigación: Comparación de la estructuración genética intra e interespecifica en tres especies del género *Melipona* en Guatemala. Guatemala.
15. Nates-Parra G. 1995. Las abejas sin aguijón del genero melipona (hymenoptera: meliponinae) en colombia. Dpto Biología, Universidad Nacional de Bogotá, Colombia. 13 Pp.
16. Quezada. J. J. 2005. Biología y uso de las abejas sin aguijón de la Península de Yucatán, México(hymenoptera, Meliponini. Editorial UADY, 2005 112 Pp. Disponible en: <http://books.google.com.gt>
17. Raymond M. Rousset F. 1995. An Exact Test For Population Differentiation. Institut des Sciences de l'Évolution. Rev. Evolution, 49(6). Pp 1280-1283. Diponible en: [http://www.evolutionhumaine.fr/michel/publis/pdf/raymond\\_1995\\_evolution.pdf](http://www.evolutionhumaine.fr/michel/publis/pdf/raymond_1995_evolution.pdf)
18. Santacruz D. Burbano C. Usaquén W. Marcadores moleculares en la acuicultura: presentación de un caso Prochilodus magdalenae en la Cuenca del Río Sinú. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: [http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/MEMORIAS\\_VALIDAS/pdfs/Burbano.pdf](http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/MEMORIAS_VALIDAS/pdfs/Burbano.pdf)
19. Solórzano E.O. 2005. Informe final de Investigación, Comparación de la Variabilidad Genética de 3 poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) provenientes de El Tule, La Brea y El Carrizal (Jutiapa, Guatemala) por medio de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD-PCR). Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP). Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, 49 Pp.
20. Waldschmidt, A.M. Marco-Junior P. Barros, E.G. Campos L.A.O. 2002. Genetic Analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. Universidad estatal del Sudoeste de Bahia (UESB).Brazil.Rev. Braz. J. Biol., 62(4B): 923-928

21. Yurrita C.L. Enríquez E. 2005. Distribución de abejas sin aguijón en Guatemala. Laboratorio de entomología Aplica y Parasitología (LENAP), Universidad de San Carlos de Guatemala.

**17. ANEXOS**

**Anexo 1a:** Matriz de presencia (1)-ausencia (0) para cada locus utilizando el cebador OPA16 (5'-AGCCAGCGAA-3')

Individuo	Población	Loci 1	Loci 2	Loci 3	Loci 4	Loci 5	Loci 6	Loci 7	Loci 8	Loci 9	Loci 10	Loci 11	Loci 12	Loci 13	Loci 14	Loci 15
5443	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5507	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5510	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5547	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5630	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5634	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5641	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5643	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5649	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5658	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5710	4	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5735	4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5796	5	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5807	5	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
6012	6	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6120	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6402	8	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
6533	9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6540	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6554	9	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
6560	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6564	9	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
6585	9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6598	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6605	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6611	9	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6619	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6878	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6918	10	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
6930	10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6958	11	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

<b>6980</b>	<b>11</b>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>6988</b>	<b>11</b>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<b>7107</b>	<b>11</b>	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<b>7117</b>	<b>12</b>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>7122</b>	<b>12</b>	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>7131</b>	<b>12</b>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<b>7138</b>	<b>11</b>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Fuente: Datos experimentales obtenidos del Programa Gene Profiler version 4.0

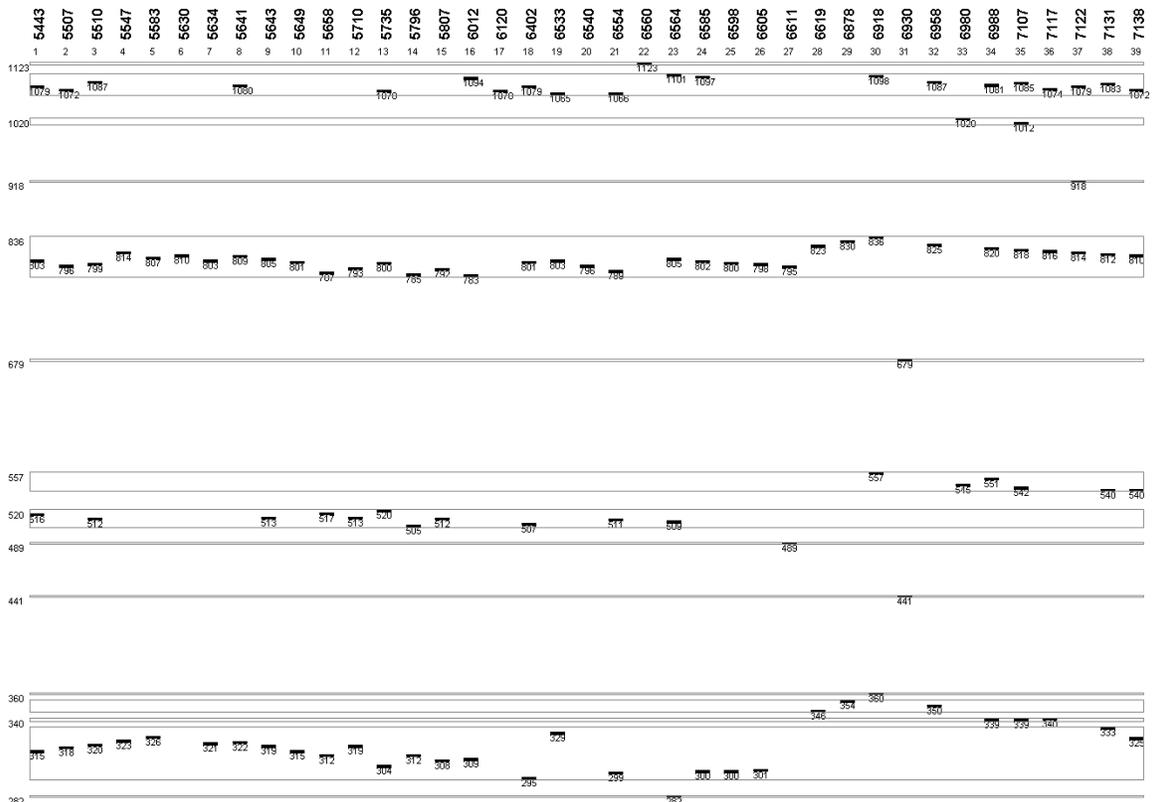
**Anexo 1b:** Matriz de presencia (1)-ausencia (0) para cada locus utilizando el cebador OPL05 (5'-ACGCAGGCAC-3')

<b>Individuo</b>	<b>Población</b>	<b>locus 1</b>	<b>locus 2</b>	<b>locus 3</b>	<b>locus 4</b>	<b>locus 5</b>	<b>locus 6</b>	<b>locus 7</b>	<b>locus 8</b>	<b>locus 9</b>
5443	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5507	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5510	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5547	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5796	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
5807	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
5630	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5634	2	0	0	0	1	1	1	0	1	0
5641	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0
5643	2	1	1	0	1	1	1	0	0	0
5649	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5658	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5710	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5735	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
6533	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6540	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6554	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6560	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6564	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
6585	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
6598	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
6605	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6611	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6619	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6878	2	1	0	0	1	1	1	1	0	0
6898	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
6918	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0

6930	2	1	1	1	0	1	1	0	0	1
6012	3	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6120	3	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6402	4	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6407	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0
6958	5	1	1	0	1	1	1	0	0	0
6980	5	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6988	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0
7107	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0
7117	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0
7122	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0
7131	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0
7138	5	1	0	0	1	1	0	0	0	0

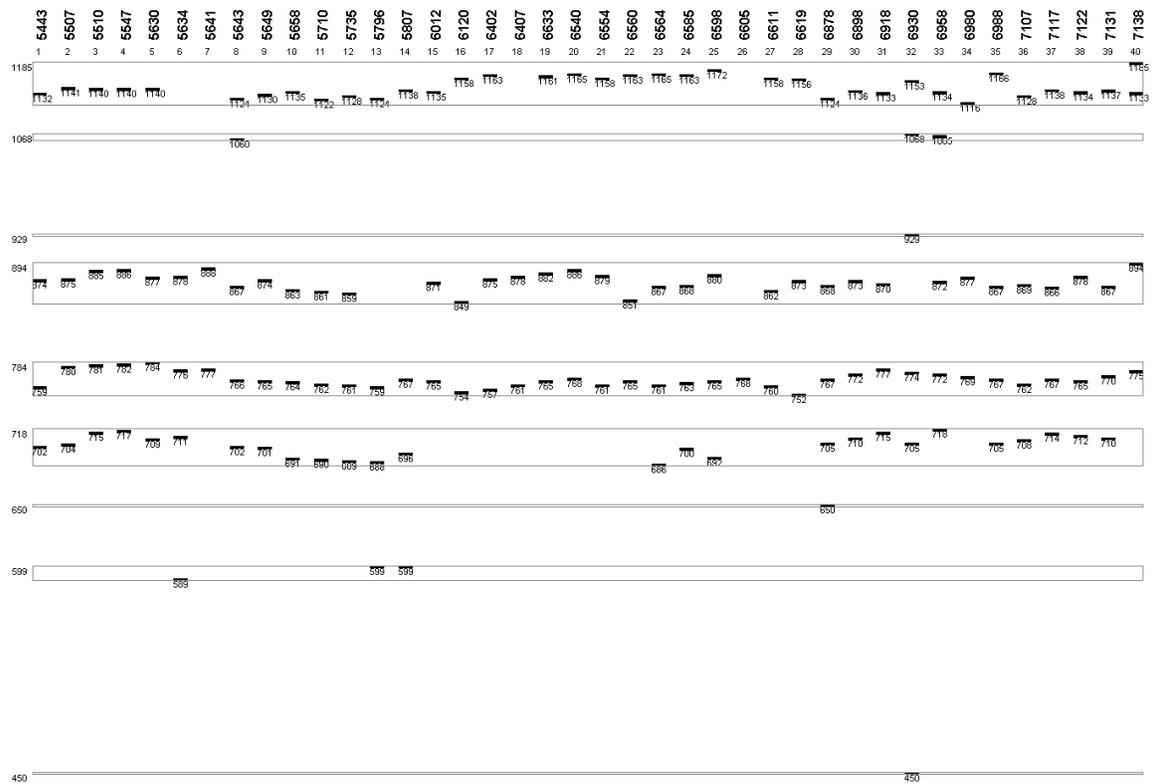
Fuente: Datos experimentales obtenidos del Programa Gene Profiler version 4.0

**Anexo 2:** Gel Ideal generado para el Cebador OPA16, con 15 loci identificados en base a su peso molecular. (eje X: individuos, eje Y: peso molecular).



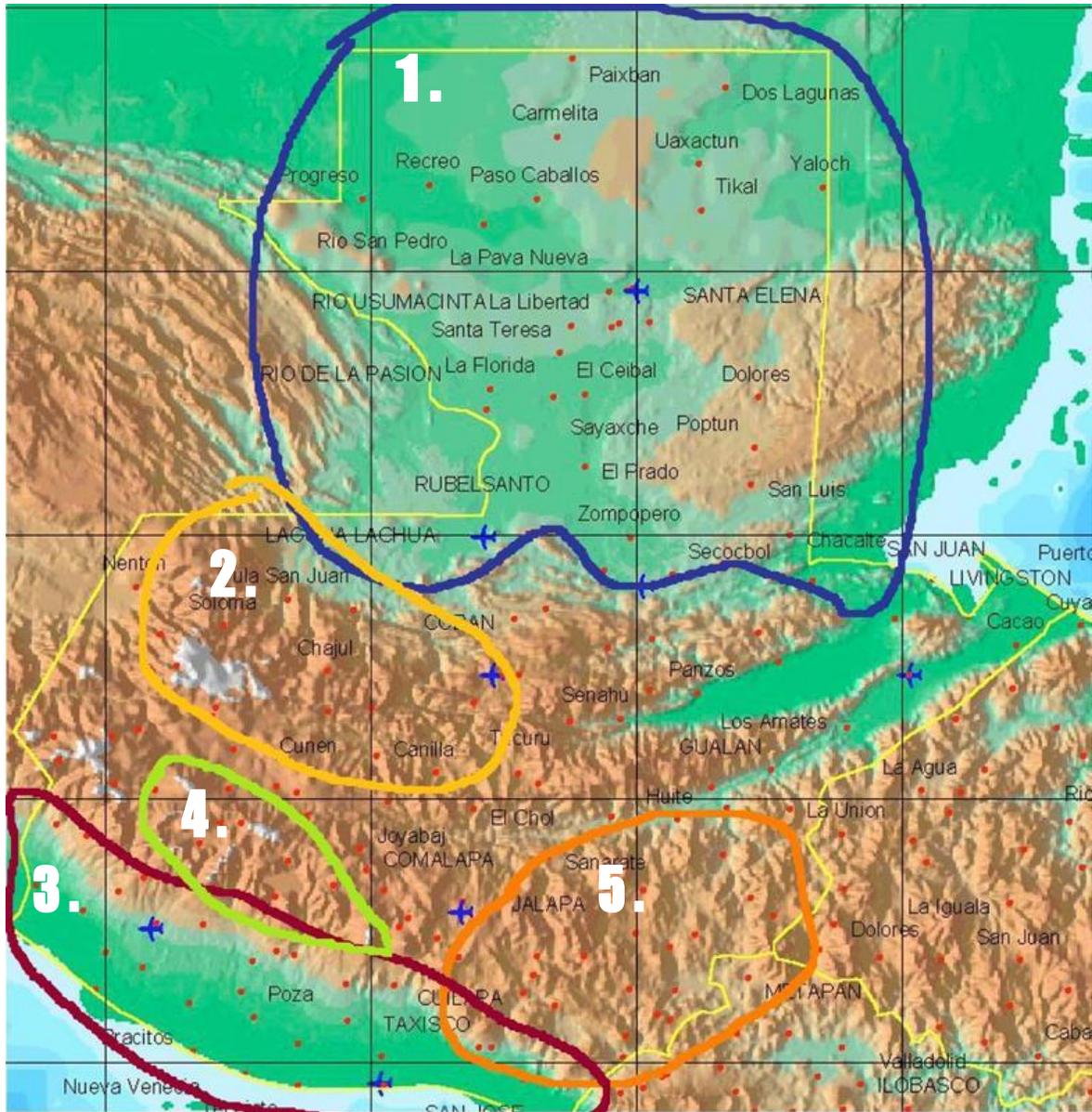
Fuente: Datos experimentales obtenidos del Programa Gene Profiler version 4.1

**Anexo 3:** Gel Ideal generado para el Cebador OPL05, con 9 loci identificados en base a su peso molecular. (Eje X: individuos, Eje Y: peso molecular).



Fuente: Datos experimentales obtenidos del programa Gene Profiler version 4.1

**Anexo 4:** Mapa con las 5 Regiones Biogeográficas estudiadas. **Azul:** Tierras Bajas del Norte (Agrupación 1); **Amarillo:** Triángulo Ixil (Agrupación 2); **Rojo:** Costa Sur (Agrupación 3); **Verde:** Altiplano (Agrupación 4); y **Anaranjado:** El Trifinio (Jutiapa, Chiquimula y Santa Rosa) (Agrupación 5)



**Anexo 5.:** Mapa de la Cobertura Vegetal según su uso. **A:** 60% cultivos de campo grande, **B.** 60% cultivos de campo pequeño; **C.** 20-59% de cultivos; **D.** menos del 20% de cultivos, en su mayoría son pastos o bosques; y **E.** horticultura.

