

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Variación en la expresión de genes en *Apis mellifera* L. por exposición corta a una dosis subletal de flupyradifurona

Tesis Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



Presenta: María Camila Girón López

Bajo la supervisión de:

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma



Chapingo, Estado de México, 20 de octubre de 2020



Variación en la expresión de genes en *Apis mellifera* L. por exposición corta a una dosis subletal de flupyradifurona

Tesis realizada por **MARIA CAMILA GIRON LOPEZ**, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS/EN PROTECCIÓN VEGETAL

Directora:

Dra. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

Asesor:

Dr. MATEO VARGAS HERNANDEZ

Asesor:

Dr. DIMAS MEJIA SANCHEZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROSv
LISTA DE FIGURAS vi
DEDICATORIAx
AGRADECIMIENTOSx
DATOS BIOGRÁFICOS xii
RESUMEN GENERALxiv
GENERAL ABSTRACTxv
1 INTRODUCCIÓN GENERAL 1
1.1 Objetivos 4
1.1.1 Objetivo general 4
1.1.2 Específicos 4
1.2 Justificación 4
2 REVISIÓN DE LITERATURA 6
2.1 Apis mellifera L
2.1.1 Sistemática y biología 6
2.1.2 Vida comunitaria7
2.2 Estructura genética de las abejas11
2.3 Importancia de las abejas 11
2.4 Polinizadores y polinización 12
2.5 Apicultura en México 12
2.6 Abejas e insecticidas neurotóxicos 13
2.6.1 Receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChRs)
2.6.2 Agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) 14
2.6.3 Neonicotinoides15
2.6.4 Sulfoximinas 16
2.6.5 Butenólidos 17
2.7 Efectos de insecticidas en abejas 19
2.8 Herramientas de los insectos en respuesta al estrés ocasionado por xenobióticos

2.8	3.1	Acetilcolinesterasa (AChE)	. 21
2.8	3.2	Monooxigenasas del citocromo P450	. 21
2.8	3.3	Antioxidantes primarios	. 22
2.9	Lite	ratura citada	. 22
3 DE	TEC	CION DE VARIACION EN LA EXPRESION GÉNICA EN ABEJA	S
MELIFE	ERA	S EXPUESTAS A FLUPYRADIFURONA	. 35
3.1	Res	sumen	. 35
3.2	Abs	stract	. 35
3.3	Intr	oducción	. 36
3.4	Ma	teriales y métodos	. 37
3.4	1.1	Colonias de A. mellifera	. 37
3.4	.2	Insecticida evaluado en obreras de A. mellifera	. 38
3.4	.3	Bioensayo: Pruebas de alimentación.	. 38
3.4	.4	Extracción de RNA	. 38
3.4	.5	Determinación de la calidad y cantidad de RNAs	. 39
3.4	.6	Síntesis de cDNA	. 39
3.4	1.7	Despliegue diferencial por RAPDs	. 40
3.4	8.4	Separación de productos de PCR	. 41
3.5	Res	sultados	. 41
3.5	5.1	Determinación de la calidad y cantidad de RNAs	. 41
3.5	5.2	Síntesis de cDNA	. 42
3.5	5.3	Despliegue diferencial por RAPDs	. 43
3.6	Dis	cusión	. 45
3.7	Cor	nclusiones	. 47
3.8	Lite	ratura citada	. 47
4 EF	ECT	O DE LA EXPOSICIÓN A FLUPYRADIFURONA SOBRE LA	
EXPRE	SIÓ	N GÉNICA RELATIVA EN ABEJAS MELIFERAS	. 51
4.1	Res	sumen	. 51
4.2	Abs	stract	. 51
4.3	Intr	oducción	. 52
4.4	Ma	teriales y métodos	. 53

4.	4.1	Colonias de A. mellifera	53
4.	4.2	Insecticida evaluado en obreras de A. mellifera	54
4.	4.3	Bioensayo: Pruebas de alimentación	54
4.5	Est	imación de la expresión genética relativa en abejas melíferas	55
4.	5.1	Extracción de RNA	55
4.	5.2	Síntesis de cDNA	56
4.	5.3	Determinación de la calidad y cantidad de RNAs y cDNAs	56
4. flu	5.4 ipyra	Determinación de la expresión génica asociada con la exposició difurona	n a 56
4.	5.5	Análisis de datos	57
4.6	Res	sultados	58
4.	6.1	Extracción de RNA y cDNA de las muestras	58
4.	6.2	Determinación de la calidad del RNA y cDNA	58
4. flu	6.3 ipyra	Determinación de la expresión génica asociada con la exposició difurona	n a 59
4.7	Dis	cusión	68
4.8	Coi	nclusiones	72
4.9	Lite	eratura citada	72

LISTA DE CUADROS

1

2	Cuadro 1. Ciclo de vida de una abeja reina (hembra fértil) en días
3	Cuadro 2. Ciclo de vida de una abeja obrera (hembra no fértil) en días
4	Cuadro 3. Actividades desarrolladas por abejas obreras dependiendo de la edad
5	del adulto 10
6	Cuadro 4. Ciclo de vida de una abeja macho (zángano) en días 11
7	Cuadro 5. Composición de la mezcla de PCR para la amplificación de fragmentos
8	de expresión diferencial en abejas expuestas a flupyradifurona 40
9	Cuadro 6. Iniciadores RAPDs utilizados para la amplificación de fragmentos de
10	expresión diferencial en abejas melíferas expuestas a flupyradifurona
11	Cuadro 7. Condiciones para la preparación del gel de poliacrilamida 41
12	Cuadro 8. Cuantificación de fragmentos detectados de novo tras la exposición al
13	insecticida flupyradifurona de abejas melíferas evaluadas con el iniciador J20 44
14	Cuadro 9. Cuantificación de fragmentos detectados de novo tras la exposición al
15	insecticida flupyradifurona de abejas melíferas evaluadas con el iniciador G0245
16	Cuadro 10. Descripción de los genes utilizados en el presente estudio 57
17	Cuadro 11. Expresión génica relativa en la población 1 de A. mellifera causada
18	por la exposición a la flupyradifurona63
19	Cuadro 12. Expresión génica relativa de la población de estudio 2 de A. mellifera
20	causada por la exposición a flupyradifurona66
21	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía externa de una abeja melífera Fuente: (Arizona State Figura 2. Origen de las poblaciones de abejas utilizadas en el presente estudio. El mapa corresponde al municipio de Texcoco de Mora; El color amarillo indica el lugar de origen de la población 1 (Molino de las flores). El color rojo indica el origen de la población 2 (Campo experimental de la Universidad Autónoma Figura 3. Perfil de muestras de RNA. La línea en amarillo muestra el RNA correspondiente a la subunidad ribosomal 18S (1900 pb), corroborando la presencia de RNA en todas las muestras. RNA Control (C), RNA Tratado (T); Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) corresponde al marcador de peso molecular 1 kb...... 42 Figura 4. Productos de cDNA obtenidos con PCR de muestras al azar. Los barridos indican la presencia del ácido nucleico. C: Control; T: tratado; Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) Figura 5. Perfiles de amplificación generados con el iniciador J20. En cada carril están los productos amplificados para las muestras de abejas en cada tiempo de evaluación. C: Control; T: tratado; Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) es el marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas muestran polimorfismos aleatorios; el color verde indica productos génicos presentes en el control que no están en la muestra tratada; y el color azul indica productos nuevos presentes en muestras tratadas pero ausentes en el control. Los productos en color rojo muestran fragmentos monomórficos presentes en ambas condiciones...... 44

DEDICATORIA

Primero a **Dios**, por su infinita gracia y bendición a cada paso.

A mi madre **Martha Girón** la mejor amiga que la vida me pudo dar y mi abuela **Esperanza López** mi compañía siempre. Les dedico todo mi esfuerzo en reconocimiento a su profunda abnegación, se merecen esto y mucho más ¡LAS AMO!

A mi padre **Israel**, gracias porque a pesar de no tenerte hace más años de los que puedo recordar, tu legado y tu amor siempre me acompañan.

A mi amado tío Israel, porque tu apoyo y fe están a mi lado cada día.

A mi hermano **Matheus Alejandro,** quien es la representación del amor fraternal e incondicional. Eres una bendición de Dios. Nunca me faltes.

A **Celeste**, **Valentina**, **Juan José y Junior**, esperando que el ejemplo sea una inspiración para trazar su propio camino.

Al resto de mi familia, los llevo en mi corazón. Soy feliz por tenerlos.

A mis amigos, quienes a pesar de la distancia han estado conmigo alentándome.

A todos ustedes con amor.

AGRADECIMIENTOS

Al encontrarme terminando este documento y así dos años de crecimiento no solo académico sino profesional y aún más importante personal, me detengo y medito que debería haber agradecido antes de siquiera empezar a escribir, porque fue gracias a todas las personas que me brindaron su compañía, apoyo y guía que ahora puedo finalizar esta etapa ¡A todos ellos, GRACIAS!

A mi familia por darme fuerzas para seguir en los momentos difíciles y ayudarme a superar cada desafío permitiéndome llegar a este punto de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la Universidad Autónoma Chapingo por abrir la puerta para formarme en la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por ser una guía, por su paciencia, consejos, interés, colaboración, perseverancia y críticas constructivas. Fue el pilar fundamental en el diseño e implementación de esta investigación. Sin ella no hubiera sido posible.

Al Dr. Mateo Vargas por ser el perfecto ejemplo de lo que es ser un maestro e investigador, por su tiempo y colaboración. De igual forma al Dr. Dimas Mejía por la asesoría recibida, su orientación e interés. A los doctores Raciel Hernández, Camilo Hernández, Héctor Lozoya, Manuel Tejeda, Andrés Bolaños y Anselmo Cabrera por su contribución durante mi formación en el programa.

A la MsC. Teresa Castillo por el material biológico para la realización de este estudio. Al Dr. Samir Samah por su compañía, guía y paciencia y a los ingenieros Pedro Cruz y Carlos Muñoz por su disposición, colaboración y amistad.

Al MsC. Daniel Estiven Quiroga, su colaboración durante el desarrollo de esta tesis fue clave, pero su amistad y compañía aun en la distancia han sido cruciales. A mis compañeros y amigos Alejandro Ávila y Esmeralda Hernández por los buenos momentos, su apoyo ha sido fundamental para la permanencia durante estos dos años. Que nuestra amistad perdure.

A la hermana que la vida me dio, por su aliento, su apoyo y amor. Por su amistad incondicional y por creer en mi a cada paso. A mis amigos Jorge, Marlon, Rubén, Sebastián, Alejandra, Jairo, Adriana, Johan, Álvaro, Derlyn, y José por su amistad y cariño; y a todas las personas que he olvidado mencionar, pero de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

"No permitas que nadie te diga que tus esfuerzos no importan o que tu voz no cuenta. Nunca creas que no puedes hacer la diferencia. Puedes."

Barack Obama

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	María Camila Girón López
Fecha de Nacimiento	9 de mayo de 1994
Lugar de Nacimiento	Pradera, Valle del Cauca, Colombia
CURP	GILC940509MNERPM05
Profesión	Ingeniera Agrónoma
Tarjeta Profesional:	76209-369568 VLL

Desarrollo académico

Bachillerato Institución Educativa Ateneo

Licenciatura Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Facultad de Ciencias Agropecuarias

Variación en la expresión de genes en *Apis mellifera* L. por exposición corta a una dosis subletal de flupyradifurona

RESUMEN GENERAL

Los servicios ecosistémicos que llevan a cabo las abejas les hacen estar expuestas a xenobióticos naturales y sintéticos, incluidos los plaguicidas. Como respuesta la industria ha desarrollado compuestos más seguros, entre los que se encuentra el flupyradifurone. Sin embargo, investigaciones recientes proporcionan evidencia de los efectos de este y su posible influencia en el deterioro de la salud de los polinizadores. Durante el experimento, obreras de edades mixtas de A. mellifera procedentes de dos poblaciones diferentes, fueron expuestas a una dosis subletal (645 ng/abeja) de flupyradifurona y se evaluaron durante el primer día tras la exposición: 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas. Se analizó de manera general la expresión diferencial de los genes con dos iniciadores para marcadores RAPDs. Además, se determinó la alteración de la expresión génica con PCR en tiempo real, ocasionada tras la exposición y los cambios en la actividad enzimática relacionada con tres genes antioxidantes primarios (CAT, SOD1 y Trxr1), un gen de detoxificación (CYP9Q3) y por último un gen con actividad neuronal (AChE1), lo cual permitió estimar el impacto fisiológico de la respuesta a la exposición del insecticida. Los resultados mostraron variación en el despliegue diferencial de las poblaciones en muestras tratadas y no tratadas. Se concluyó que la flupyradifurona causa alteración regulando negativa o positivamente la expresión de genes en individuos de abejas melíferas tras la exposición oral, lo cual podría causar a largo plazo un efecto adverso en la salud de las colmenas.

Palabras claves: RCP, RCP tiempo real, estrés oxidativo, efecto subletal, expresión génica

Tesis de Maestría en Ciencias, Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo Autor: María Camila Girón López Director de tesis: Ernestina Valadez Moctezuma

Variation in gene expression in *Apis mellifera* L. by short exposure to a sublethal dose of flupyradifurone

GENERAL ABSTRACT

The ecosystem services that bees carry out expose them to natural and synthetic xenobiotics, including pesticides. In response, the industry has developed safer compounds, including flupyradifurone. However, recent research provides evidence of the effects of this and its possible influence on the deterioration of the health of pollinators. During the experiment, mixed-age workers of A. mellifera from two different populations were exposed to a sublethal dose (645 ng/bee) of Flupyradifurone and were evaluated during the first day after exposure: 0.5, 1, 3, 6 and 24 hours. The differential expression of genes with two primers for RAPDs markers was generally analyzed. In addition, the alteration of gene expression was determined with real-time PCR, caused after exposure and the changes in the enzymatic activity related to three primary antioxidant genes (CAT, SOD1 and Trxr1), a detoxification gene (CYP9Q3) and by Lastly, a gene with neuronal activity (AChE1), which allowed estimating the physiological impact of the response to the exposure of the insecticide. The results showed variation in the differential display of the populations in treated and untreated samples. It was concluded that the flupyradifurone causes alteration by negatively or positively regulating the expression of genes in individuals of honey bees after oral exposure, which could cause a long-term adverse effect on the health of hives.

Key words: PCR, real-time PCR, oxidative stress, sublethal effect, gene expression

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los insectos polinizan más del 70% de los cultivos, contribuyendo con aproximadamente US \$215 mil millones a la economía global por año (Vanbergen et al., 2013), sin contar con que la mayoría de las especies cultivadas incrementa su rendimiento gracias a la polinización (Gallai et al., 2009). Sumado a ello, los servicios ecosistémicos que brinda la polinización entomófila son los encargados de sustentar la biodiversidad del planeta. Debido a la gran importancia en la economía mundial, la seguridad alimentaria y el mantenimiento de los ecosistemas, existe una inquietud latente a nivel global a causa de la disminución de los insectos polinizadores.

Las abejas, son por excelencia quienes cumplen con este nicho ecológico (Diaz Meraz, 2015). La especie de abeja más reconocida a nivel mundial es *Apis mellifera* L., ampliamente usada en la producción de miel y en programas de polinización dirigida, además de su valor cultural y contribución a la economía gracias a sus productos derivados (Brown & Paxton, 2009; Pantoja et al., 2014). En México, se calcula que el 85% de las plantas cultivadas comestibles depende de polinizadores para producir frutas, verduras y semillas (Ashworth et al., 2009), por lo que se hace evidente que las perturbaciones en sus poblaciones podrían derivar en pérdidas económicas relevantes (Pantoja et al., 2014). Numerosos estudios reportan una disminución en la salud de las abejas y en el número de colonias en todo el mundo (Matheson, 1993; Mullin et al., 2010; Negri et al., 2019; Valdés, 2013; Vanengelsdorp et al., 2011).

Muchos son los factores a los cuales se les atribuye la disminución de la salud de las abejas. Las diversas amenazas a estas, han sido revisadas a detalle por varios autores (González-Varo et al., 2013; Mack et al., 2000; Martin-Culma & Arenas-Súarez, 2018; Vanbergen et al., 2013); sin embargo, los avances de la agricultura moderna que incluyen entre otros la aplicación de ingeniería genética en los sistemas productivos y el uso de insecticidas de última generación para combatir plagas insectiles, ha originado un impacto negativo como resultado del problema que se genera al afectar sus poblaciones (Desneux et al., 2007;

Devillers et al., 2003; Kovács-Hostyánszki et al., 2017; Martin-Culma & Arenas-Súarez, 2018).

Se ha reportado que este tipo de productos pueden aumentar la mortalidad en *A. mellifera* a ciertas dosis letales (Needham et al., 1966), al ser transportados al apiario contaminando así el néctar y polen (Barker et al., 1980; Böhme et al., 2018), o a dosis sub letales, las abejas nodrizas pueden transferirlos a las larvas (Zhu et al., 2014); e incluso estudios recientes de Smith et al. (2020) demostraron que las colonias pueden verse afectadas semanas después de la exposición, ya que se ve alterado el desarrollo cerebral de las crías y por ende estas se convierten en adultos incapaces de buscar alimento. Los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en los insecticidas causan daños fisiológicos al absorberse o adherirse a los componentes celulares teniendo diversos impactos, incluidos la alteración genética (Dix, 1981).

En la investigación sobre insecticidas, particularmente ha sido clave la compresión del impacto de los productos a base de neonicotinoides en las abejas. Los insecticidas a base de butenólidos son las nuevas herramientas para el manejo de plagas y poseen el mismo modo de acción de los neonicotinoides como agonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (NAChR) (Elbert et al., 2008). Estudios sobre los efectos de la flupyradifurona (FPF) el insecticida insignia de las butenólidos, muestran efectos en niveles cognitivos en las abejas (Tan et al., 2017). Por esto, existe una necesidad inminente de evaluar los posibles efectos a nivel genético en los polinizadores, ya que estos efectos no se detectan mediante evaluaciones ecotoxicológicas estándar, pero pueden tener impactos importantes a nivel ecológico (Gross, 2018).

Los reportes sobre FPF han evaluado principalmente la alteración en el comportamiento de las abejas, no obstante diversos estudios han demostrado que las abejas alteran no solo su comportamiento sino la expresión génica después de la exposición a patógenos o xenobióticos y que estos están asociados con el trastorno del colapso de colmenas (Dainat et al., 2012; Tranque et al., 1998), para tal fin, se realiza el análisis de la expresión diferencial usando

la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa qPCR por sus siglas en ingles. Las enzimas antioxidantes actúan directamente sobre ROS (especies reactivas de oxígeno) para aliviar el estrés oxidativo y el daño celular por lo que su expresión luego de una exposición mostraría el nivel potencial de estrés que causa el producto en el organismo (Gregorc et al., 2018). Por su parte, se ha sugerido que la acetilcolinesterasa 1 de la abeja también está relacionada con la respuesta al estrés (Kim et al., 2019).

Episodios cortos de exposición a insecticidas en dosis subletales durante el desarrollo de las abejas tienen efectos adversos durante el resto de su ciclo de vida, lo que podría contribuir a la disminución en la salud de estos insectos (Al Naggar & Baer, 2019). Dado que la FPF y los neonicotinoides tienen el mismo sitio de acción (Bacci et al., 2018), se podría predecir que la exposición a éste tendría efectos similares a los reportados con neonicotinoides en *A. mellifera* (Chaimanee et al., 2016; Chakrabarti et al., 2018; Forfert et al., 2017).

Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que las poblaciones de abejas (*A. mellifera*) expuestas a flupyradifurona mostrarán variación en la expresión génica al comparar poblaciones expuestas y no expuestas. En consecuencia, este estudio tuvo como objetivo estimar la variación en la expresión génica de las abejas melíferas tras la exposición a flupyradifurona.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Determinar la variación en la expresión génica dada por la exposición de individuos de *A. mellifera* a la flupyradifurona.

1.1.2 Específicos

Evaluar la variación en el despliegue diferencial de genes en poblaciones de abejas expuestas y no expuestas a flupyradifurona.

Medir la expresión relativa de genes de abejas tras la exposición oral a flupyradifurona.

1.2 Justificación

A pesar de todas las investigaciones que se han realizado en las últimas décadas con la finalidad de identificar y examinar los factores que contribuyen a la disminución en las poblaciones de polinizadores, ningún factor ha podido explicar por completo este fenómeno. Sin embargo, la exposición a pesticidas sigue figurando entre las principales causas teniendo mucha documentación que lo respalda (Barranco et al., 2015; Diaz Meraz, 2015; Siviter et al., 2018).

Las nuevas generaciones de insecticidas al parecer cuentan con un perfil favorable para las colonias de abejas, la flupyradifurona incluida (USEPA, 2014). Al presente son pocas las investigaciones que estudiaron el impacto de la FPF en este tipo de insectos. Campbell et al. (2016) concluyeron que el uso adecuado de FPF no produce efectos adversos en las colonias de *A. mellifera*; sin embargo, otros estudios muestran lo contrario. Se ha evaluado la interacción entre este insecticida y otros estresores ecológicos junto con la variación en la expresión de genes de inmunidad y desintoxicación (Al Naggar & Baer, 2019), los efectos adversos sobre el gusto, la capacidad cognitiva (Hesselbach & Scheiner, 2018) y las habilidades motoras (Hesselbach & Scheiner, 2019).

Los insecticidas tienen la capacidad de perturbar el sistema antioxidante celular provocando daños en los organismos, los insectos controlan el impacto del estrés oxidativo mediante la activación de sistemas de protección que activan las enzimas antioxidantes y les permiten adaptase a su entorno (Maero & Anguiano, 2018). Hasta ahora solo se reporta un estudio sobre el efecto de FPF en la expresión diferencial de la citocromo P450, glutatión transferasa y la superóxido dismutasa 2 (Al Naggar & Baer, 2019). Con este estudio se pretendió evaluar otros genes en respuesta al estrés, estudios como este contribuyen al proporcionar evidencia empírica sobre la respuesta génica de la exposición de individuos a dosis subletales de un insecticida.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Apis mellifera L.

La abeja es un insecto que pertenece al orden de los himenópteros y la familia de los ápidos. Se conocen unas veinte mil especies diferentes y son las abejas del género *Apis mellifera* (Figura 1) las más adecuadas para la polinización, ayudando a la agricultura, a la producción de miel, jalea real, cera, propóleos y polen. Es un insecto social que vive en una colonia o una colmena que comprende de 50,000 a 80,000 individuos (Ramos & Carvalho, 2007).



Figura 1. Anatomía externa de una abeja melífera Fuente: (Arizona State University, 2020)

2.1.1 Sistemática y biología

La ubicación taxonómica de A. mellifera es la siguiente (Borror et al., 1989):

Dominio: Eucariota Reino Animal Filo Arthropoda Clase Insecta Orden Hymenoptera Superfamilia Apoidea Familia Apidae Subfamilia Apinae Tribu Apine Género *Apis* Especie *Apis mellifera L.*

2.1.2 Vida comunitaria

Las abejas melíferas son insectos sociales, lo que implica que siempre viven agrupados en colmenas. De acuerdo a la época del año, el número de abejas por colmenas puede variar, viéndose una disminución significativa durante la época invernal contrario a lo que ocurre durante el verano, ya que puede llegar a tener 40,000 individuos. Los miembros de una colonia son generalmente: Una reina, 500 a 1000 zánganos, y de 30 a 50,000 obreras (Abraham, 2018). Un enjambre, sin importar el número de individuos que contenga se reconoce como una sola entidad dado que cada miembro de la colonia de abejas dependen de los otros y no es posible que existan por separado (Crozier, 2019).

2.1.2.1 Castas de abejas melíferas

2.1.2.1.1 Abeja reina

La reina es la única abeja que cuenta con ovarios completamente desarrollados y será fértil durante toda su vida. Solo hay una por colmena y esta puede vivir usualmente entre 3 a 5 años, la reina nace después de 16 días y su ciclo biológico se estima como se muestra en el *Cuadro 1*. Se aparea solo una vez con varios zánganos (abejas machos), poniendo hasta 2000 huevos por día. Los huevos fertilizados se convierten en abejas obreras, únicamente hembras, y los huevos sin fertilizar se convierten en machos (zánganos). Cuando el ciclo de vida de esta llega a su fin o disminuye su productividad, el resto de abejas del panal "formarán" una nueva reina seleccionando una larva joven y alimentándola con jalea real dentro de una celdilla modificada llamada realera (Backyardbeekeepers, 2020; Suasnávar et al., 2015).

Etapas de desarrollo	Días
Huevo	3
Larva	5.5
Рира	7.5
Total	16

Cuadro 1. Ciclo de vida de una abeja reina (hembra fértil) en días

Fuente: (Suasnávar et al., 2015)

2.1.2.1.2 Características de la reina

La reina no cuenta con vellos en el noto del tórax, no posee corbícula (Abraham, 2018), y su abdomen es más largo que sus alas (Jordán, 2016). Es la única hembra que puede ser fecundada, y cuando eso ocurre el abdomen se torna de mayor tamaño que el de las abejas vírgenes debido al desarrollo funcional de los ovarios, variando el número promedio de posturas dependiendo de la capacidad de carga que tenga la colonia. Es el centro y vida de la colmena, para lo cual utiliza feromonas reales y de esta forma logra controlar la población dentro de la colonia, haciendo que se mantenga unida (Abraham, 2018). Posee aguijón, sin embargo, solo lo usa para pelear con otras reinas.

2.1.2.1.3 Abejas obreras

Son hembras que forman casi toda la población y tienen diferentes funciones dentro de la colmena. Su ciclo biológico dura aproximadamente 21 días como se observa en el Cuadro 2. Son la mano de obra productiva del panal, encargadas de fabricar y limpiar los panales, así como también mantener el orden dentro de éstos, colectar el polen y producir miel y cera, lo cual depende de su edad (días) dentro de los 38 a 45 días que puede durar como adulto. No pueden ser fecundadas y son de tamaño pequeño comparadas con la reina y los zánganos (Jordán, 2016).

Etapas de desarrollo	Días
Huevo	3
Larva	6
Рира	12
Total	21

Cuadro 2. Ciclo de vida de una abeja obrera (hembra no fértil) en días

Fuente: (Suasnávar et al., 2015)

2.1.2.1.4 Clases de obreras

En las abejas, la altamente evolucionada división del trabajo supone la realización de numerosas funciones, que cambian con la edad como se observa en el Cuadro 3. Todas las abejas obreras son hembras, y el tiempo que trabaja cada abeja en un puesto determinado cambiará dependiendo de las necesidades de la colonia (Hrassnigg et al., 2003). En una colonia se pueden encontrar:

- Constructoras: Son las encargadas de la construcción de los panales, la cual realizan en dos etapas: La primera, opercular las celdas con larvas, labor que realizan las abejas jóvenes; y la segunda, la construcción del panal por las abejas más viejas utilizando la cera producto de su cuerpo para dicho fin (Jordán, 2016).
- Nodrizas: Se encargan de alimentar a las larvas, primero con jalea real y más tarde con una mezcla de miel y polen.
- Aseadoras: Limpian la colmena y retiran de la colmena no solo objetos no identificados, sino también larvas y adultos enfermos y muertos.
- Ventiladoras: Ventilan la colmena para lograr mantener las condiciones ambientales dentro de la misma dado que las crías para desarrollarse necesitan entre 34 y 36 °C y humedad de 65 a 75% (Crozier, 2019).
- Guardianas: Brindan protección a la colmena. Evitando la entrada de abejas ajenas a la colmena, otros insectos y animales ajenos a la colmena.
- Pecoreadoras: El pecoreo de las abejas se basa en la recolección de polen néctar y agua. La corbícula de las patas traseras, es el lugar donde suelen

llevar el polen y el propóleo mientras que el néctar es acarreado en su estómago (Crozier, 2019).

 Exploradoras: Son las encargadas de buscar fuentes de alimentos y nuevos lugares de anidación, para cuando los encuentren, regresar a la colmena y comunicarle a las demás abejas a través de danzas (Jordán, 2016).

Cuadro 3. Actividades desarrolladas por abejas obreras dependiendo de la edad del adulto

Edad (días)	Actividades
1 al 3	Actividades de aseo tanto en panales como colmena y limpieza de huevos y larvas.
4 al 12	Proporcionar a las larvas de alimento y preparan a las nuevas reinas cuando la situación lo requiere.
13 al 18	Producción de cera, para construcción de panales y celdas reales.
19 al 20	Prestar servicios de seguridad y vigilancia en la colmena.

Fuente: (Suasnávar et al., 2015)

2.1.2.1.5 Zánganos

Tiene un promedio de vida de 80 días, como se observa en el Cuadro 4, su ciclo de vida es de aproximadamente 24 días. No realiza ningún trabajo dentro de la colmena, así que solo se dedica a alimentarse, limpiarse y esperar el vuelo nupcial, ya que su única función es aparearse con la reina. Sus requerimientos de alimentación son muy altos, por lo cual es necesario evitar el nacimiento de muchos individuos de esta casta. Cuando la capacidad de carga de la colmena se reduce y escasea el néctar o las condiciones ambientales no son favorables, las abejas obreras los eliminan (Crozier, 2019).

Etapas de desarrollo	Días
Huevo	3
Larva	6.5
Рира	14.5
Total	24

Cuadro 4. Ciclo de vida de una abeja macho (zángano) en días

Fuente: (Suasnávar et al., 2015)

2.2 Estructura genética de las abejas

Los organismos haplodiploides comprenden aproximadamente el 20% de los animales (Beye et al., 2003). Las hembras de las abejas melíferas son diploides, pero el macho (zángano) es haploide, resultado del desarrollo partenogenético de un huevo no fertilizado (arrenotoquia) (Hunt & Page, 1992). En las colonias de insectos eusociales (el nivel social máximo de relación entre animales, que cooperan en el cuidado de la cría y generalmente tienen castas estériles (Flores-Prado, 2012)), las poblaciones se diferencian en reinas que producen descendencia y obreras altruistas no reproductivas que recolectan y procesan alimentos, cuidan a las crías, construyen nidos y defienden colonias. Sorprendentemente, estas dos castas, ambas relacionadas con los insectos solitarios, se desarrollan a partir del mismo genoma (Weinstock et al., 2006). Sin embargo, los apareamientos múltiples de reinas reducen los altos grados de parentesco genético que existen entre las compañeras de nido haplodiploides (Crozier & Pamilo, 1996).

2.3 Importancia de las abejas

Alexander & Michener (1995) evidenciaron la estrecha relación entre las abejas y las plantas desde hace aproximadamente 100 millones de años, debido a los fósiles encontrados en ámbar producto de la recolección de resinas en árboles para la construcción de sus nidos. Es debido a esta relación que se ha propiciado el estudio de las abejas como polinizadoras, lo que muestra el nicho tan importante que cumplen en la reproducción de las angiospermas, conservación de la biodiversidad y al mismo tiempo de hábitats naturales dada su abundancia (Galetto et al., 2017; Rader et al., 2020).

2.4 Polinizadores y polinización

Las labores que desarrollan los polinizadores son cruciales para preservar los ecosistemas terrestres. Sin embargo, en la última década se ha observado una disminución significativa que puede tener efectos sobre la vida que se conoce. Para el caso de las abejas, éstas juegan un papel del primer orden en la polinización de la producción agrícola mundial (García, 2018).

La polinización puede suceder debido a la acción del viento, la gravedad y animales. Sin embargo, la polinización por animales incluyendo a los insectos es aproximadamente un 80% de la total realizada en sistemas agrícolas (Klatt et al., 2013; Rader et al., 2020). Entre los insectos que más contribuyen a la rentabilidad de los cultivos se encuentran las abejas silvestres, no obstante, las abejas melíferas (*Apis mellifera*) tienen un papel clave en el mismo. Klatt et al. (2013) realizó un estudio en un cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*), en el cual indica que el valor agregado de la polinización realizada por abejas fue estimado en 0.32 billones de dólares, además de aumentar la cantidad, la calidad, la forma y el sabor de las fresas.

2.5 Apicultura en México

La apicultura se basa en el aprovechamiento justo de las abejas con el fin de obtener productos derivados de éstas, principalmente miel, jalea real, cera y propóleo así también para el uso de las abejas en la polinización de cultivos agrícolas (De Freitas Barbosa & Pinheiro de Sousa, 2013).

Se reportó que la actividad apícola o el uso productivo de *Apis mellifera* fue introducida durante el siglo XVIII entre 1760 y 1770 en la Nueva España como respuesta a la necesidad de cera para actividades religiosas (Labougle & Zozaya 1986, citado por Rodríguez Balam & Pinkus Rendón, 2015). A pesar de ello, esta actividad económica cuenta con una amplia tradición en México. Se hablan de zonas del país en donde la apicultura se practicaba desde antes de la llegada de

los españoles al continente americano, teniendo transiciones que van desde la crianza de abejas sin aguijón (*Melipona beechei*) hasta que durante el siglo pasado se empezó a explotar la subespecie americana (*Apis mellifera* mellifera); en la década de los años 50 la abeja europea (*Apis mellifera* ligustica), y alrededor de 1980 la abeja africana (*Apis mellifera* scutelata) (Güemes-Ricalde et al. 2004).

México produjo 51,650 toneladas de miel en el 2017 por lo que se encuentra entre los principales productores y exportadores en el mundo. La actividad apícola es realizada a través de todos los estados del país, con un aproximado de 2 millones de colonias de abejas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018).

Dentro del territorio nacional es considerada una de las actividades primarias para el sustento debido al arraigo en la población, un estudio afirmó que la trascendencia económica que reviste esta actividad en México, se distingue por su participación relativa en la estructura de valor del ingreso pecuario, de la producción agropecuaria y del Producto Interno Bruto (PIB) nacional y, por su papel de generador de divisas (Magaña et al., 2012).

2.6 Abejas e insecticidas neurotóxicos

Aunque las causas de la gran pérdida de colonias de polinizadores alrededor del mundo son múltiples y variadas, a menudo es atribuida al uso de algunos tipos de productos químicos. Los insecticidas constituyen herramientas importantes para el control de plagas insectiles, no obstante su uso indiscriminado ha tenido consecuencias sobre las poblaciones de polinizadores y con esto efectos sobre los agroecosistemas (Bacci et al., 2018). Comercialmente, los más importantes son las neurotoxinas que actúan en diferentes receptores, enzimas o canales iónicos del sistema nervioso de los insectos (Narahashi, 1996).

2.6.1 Receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChRs)

Los nAChRs son canales iónicos que intervienen en la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso de los insectos y constituyen generalmente un objetivo importante para los insecticidas (Jones & Sattelle, 2010). Forman parte de la superfamilia de canales iónicos que se activan por ligando (Millar, 2006), encontrándose en especies que van desde bacterias hasta vertebrados. La disposición de cinco subunidades en torno a un canal central forman un receptor, sin embargo pueden unirse en diversas combinaciones y así determinar las características farmacológicas y funcionales de este (Millar & Denholm, 2007). Su principal función es la señalización molecular dentro del sistema nervioso y las uniones neuromusculares (Jones & Sattelle, 2010).

Análisis genómicos han demostrado que a diferencia de los nAChR de vertebrados los de los insectos permanecen compactos. *A. mellifera*, *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori* por ejemplo, poseen de 10 a 12 genes que codifican para los nAChR constituyendo una de las familias de genes más pequeñas de las cuales se conoce (Jones & Sattelle, 2010). Los nAChR en los insectos son los receptores postsinápticos más abundantes y su importancia como neurotransmisores se encuentra en la aptitud de estos frente a los insecticidas neurotóxicos (Matsuda et al., 2001)

2.6.2 Agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)

Los agonistas son sustancias con capacidad de unirse a un determinado receptor celular y provocar una acción determinada similar a la producida por una sustancia fisiológica (Katzung, 2016). El sistema colinérgico (que usa acetilcolina como neurotransmisor) está formado por tres componentes: el transmisor sináptico acetilcolina (ACh), acetilcolinesterasa (AChE) la enzima que se encarga de hidrolizar la acetilcolina y colina acetiltransferasa o colina acetilasa (ChA), la enzima que se ocupa de la síntesis de acetilcolina (Smallman & Mansingh, 1969). El descubrimiento de agonistas sintéticos que abordan selectivamente los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), ubicados en el sistema nervioso central de los insectos, para su uso como insecticidas fue un hito importante en la investigación aplicada de protección de cultivos. Estos compuestos, como resultado de su alta especificidad y versatilidad en los métodos de aplicación, abrieron una nueva era innovadora en el control de algunas de las plagas de

insectos más devastadoras del mundo (Jeschke et al., 2013). Estos insecticidas también contribuyeron enormemente a ampliar el conocimiento de la bioquímica de los receptores nicotínicos de acetilcolina de los insectos. El éxito económico mundial de los agonistas sintéticos de nAChR como insecticidas hace que el receptor nicotínico de acetilcolina siga siendo uno de los sitios diana más atractivos para la exploración en el descubrimiento de insecticidas (Jeschke et al., 2013) representados principalmente en 3 familias importantes: neonicotinoides, sulfoximinas y butenólidos (IRAC, 2017)

2.6.3 Neonicotinoides

Los neonicotinoides, son insecticidas sistémicos lo que significa que son absorbidos por la planta y transportados a sus diferentes órganos por medio de sus haces vasculares. Estos insecticidas exhiben una toxicidad muy alta para un gran número de invertebrados, particularmente insectos, y la exposición de éstos en campo puede causar efectos letales y subletales importantes. Resultando en impactos negativos, principalmente impactos ecológicos en invertebrados no objetivo en hábitats terrestres, acuáticos, marinos (Pisa et al., 2014). Afectan principalmente el sistema nervioso central de los insectos esto implica que su mecanismo de acción se encarga de interrumpir el sistema nervioso mediante la estimulación de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (Casimiro, 2016; García, 2018).

Los neonicotinoides logran reducir la ACh (acetilcolina) secretada en los alimentos destinados a las crías, disminuyen el tamaño de la glándula hipofaríngea lo que tiene efectos adversos en el desarrollo dentro de la colonia (Grünewald & Siefert, 2019).

Investigaciones de los últimos años indican que los neonicotinoides podrían contribuir a la muerte masiva de abejas debido a que pueden contribuir con el SCC "Síndrome de colapso de colmenas" (Barranco et al., 2015; Macias et al., 2018). Las abejas acaban contaminándose con los plaguicidas cuando recolectan el polen del que se alimentarán tanto la colonia como ellas mismas, (Blasco et al., 2018) así como cuando recogen el agua de gutación exudada

particularmente por la planta del maíz y que utilizan con dos finalidades: para refrescar a las crías en los días cálidos a través de un proceso de enfriamiento por evaporación y en los días en los que la recolecta de néctar es escasa debido a temperaturas frías o húmedas, el agua puede utilizarse para disolver la miel almacenada que después se utiliza para alimentar a las crías (Simon et al., 2013).

Entre los efectos observados en las abejas que se han contaminado se señalan los siguientes: la exposición fomenta el "trastorno en la capacidad de aprendizaje" que incluye la afección de sus capacidades olfatorias, de aprendizaje y memoria (Williamson & Wright, 2013), así como el "trastorno de la capacidad pecoredadora" por el cual las abejas se pierden al regresar a sus colmenas al ser incapaces de orientarse eficazmente aumentado la mortalidad (Reyes & Johnston, 2013), y el desarrollo disfuncional de las larvas, lo que se traduce en adultos poco eficientes y con pocas probabilidades de sobrevivencia (Smith et al., 2020).

2.6.4 Sulfoximinas

La sulfoximina es una molécula quiral de azufre que contiene nitrógeno. Se une a los nAChR en lugar de la ACh y actúa como activador alostérico (uniéndose en un lugar diferente al sitio activo) de éste. Por su modo de acción los casos de resistencia no son comunes (Bacci et al., 2018). Los insecticidas a base de sulfoximinas, representados principalmente por el sulfoxaflor, han mostrado eficacia frente algunas plagas insectiles con resistencia a los neonicotinoides (Zhu et al., 2011), la diferencia en la estructura tridimensional de la molécula evita la resistencia cruzada dado que esta impide que las sulfoximinas sean descompuestas por enzimas con función en el metabolismo de los neonicotinoides (Sparks et al., 2012). No obstante, aun con las diferencias químicas éstas al igual que los neonicotinoides actúan como agonistas de los nAChRs, por lo que compartir el mismo modo de acción biológico, abre la posibilidad de tener efectos similares sobre organismos no objetivo (Zhu et al., 2011). A través de estudios de modelación matemática, se ha demostrado que algunas sustancias a niveles subletales tienen cuantiosas consecuencias dañinas sobre las colonias de polinizadores (Bryden et al., 2013). Aunque teóricamente el sulfoxaflor tiene bajo impacto ambiental y no produce tantos efectos sobre los organismos no objetivo, está documentada su toxicidad en insectos polinizadores (Bacci et al., 2018).

La elección de un insecticida es el resultado de la evaluación de diversas características. Entre éstas la eficiencia del producto frente a las plagas objetivo es de vital importancia, sin embargo, no se deben dejar de lado los posibles efectos sobre insectos benéficos. Para permitir el uso del sulfoxaflor en Estados Unidos se dictaron cuatro medidas de mitigación como recomendación para evitar el daño en insectos polinizadores (Bacci et al., 2018).

Brown et al. (2016) realizaron un análisis y destacaron a las sulfoximinas como una amenaza potencial para los insectos polinizadores debido a la falta de información sobre los efectos subletales en estos. Un estudio con exposición en dosis reales de campo, mostró los graves efectos subletales del sulfoxaflor en las poblaciones de *Bombus terrestris*. Se evidenció que la exposición en etapas de crecimiento temprano produjo menor número de obreras y finalmente menor decendencia reproductiva. Los resultados muestran una advertencia sobre el uso de las sulfoximinas como reemplazo de los neonicotinoides (Siviter et al., 2018).

Como insecticida sistémico, el sulfoxaflor al igual que los neonicotinoides, puede presentarse tanto en el néctar como en el polen de las plantas luego de la aplicación del tratamiento, lo que implica que las abejas forrajeras pueden exponerse a estos (Botías et al., 2015). No obstante aun con la similitud en el modo de acción de estos productos, Siviter et al. (2019) no encontraron evidencia de que el sulfoxaflor influyera en el olfato y la memoria de las abejas, y concluyeron que la exposición aguda al producto no produce efectos negativos a nivel cognitivo.

2.6.5 Butenólidos

Los butenólidos como la flupyradifurona actúan uniéndose reversiblemente a los nAChR de los insectos semejante a lo que hacen los neonicotinoides y las sulfoximinas pero en un sitio de acción diferente, lo que origina diferentes

relaciones estructura-actividad (Jeschke et al., 2015) e implica que es diferente en cuanto a la unión al receptor y la medida en que se metaboliza. A diferencia de los neonicotinoides no son susceptibles a la aparición de resistencia en los insectos debido a la sobreexpresión de la enzima de desintoxicación CYP6CM1 (Nauen et al., 2015).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA) (2014) encontró a la flupyradifurona altamente tóxico para las abejas melíferas a través de estudios de exposición oral aguda y la aparición de efectos subletales a corto plazo en obreras recolectoras; sin embargo, concluyeron que representa un nivel de riesgo muy bajo para las abejas, y se define como relativamente "seguro para las abejas".

Al Naggar & Baer (2019) concluyeron que la exposición corta de las abejas a dosis subletales de flupyradifurona durante el desarrollo es suficiente para impactar de forma negativa el resto de su ciclo de vida. Debido a que la exposición al insecticida redujo significativamente la sobrevivencia de las abejas y modificó la expresión de varios genes inmunes y de desintoxicación.

2.6.5.1 Flupyradifurona

Bayer registró en años recientes una nueva molécula: Flupyradifurona (FPF) con el nombre comercial de Sivanto[™], basado en la estructura molecular del stemofoline, un componente derivado de la planta *Stemona japónica* (Nauen et al., 2015). Se clasifica como un butenólido y es un agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina al igual que los neonicotinoides(IRAC, 2017; Nauen et al., 2015).

La FPF provee protección rápida y sistémica por movilidad de xilema funciona como un imitador de acetilcolina en el sistema nervioso de los insectos al unirse reversiblemente a los receptores nicotínicos de acetilcolina post (nAChR). Los metabolitos de FPF incluyen al ácido 6-cloronicotínico, que también es un subproducto metabólico de la mayoría de los neonicotinoides (Giorio et al., 2017) y se ha reportado su efecto en organismos como los anfípodos causando estrés oxidativo (Malev et al., 2012).

Los estudios en años cercanos al lanzamiento de la FPF sugieren un impacto relativamente bajo en *A. mellifera* (Glaberman et al., 2014). Sin embargo, un informe de Hesselbach & Scheiner (2018) dio como resultado que las dosis agudas altas de FPF (1.2 µg I.A / abeja) disminuyeron la capacidad de respuesta a la sacarosa y el rendimiento en las actividades de acondicionamiento en la colmena, distinto a lo reportado por Bell et al. (2020) donde no se encontró evidencia de que la FPF altere la capacidad de respuesta de sacarosa de los recolectores de néctar a dosis realistas de campo durante el invierno o principios de la primavera.

Tosi & Nieh (2019) probaron los efectos tóxicos letales y subletales de FPF en diferentes épocas y tipos de obreras, mostrando que estos efectos se ven influenciados por estas características. Concluyeron que las abejas recolectoras fueron 4 veces más susceptibles al pesticida que las abejas en la colmena y se mostró un mayor efecto de FPF durante el verano.

Al Naggar & Baer (2019) compararon la expresión de cinco genes de desintoxicación y seis genes inmunes entre abejas infectadas y no infectadas con el hongo *Nosema* spp. que fueron alimentadas con flupyradifurona y encontraron que la expresión de estos genes dependía de la exposición o no al insecticida durante su etapa larval, siendo ésta siempre menor en abejas expuestas comparadas con el control.

2.7 Efectos de insecticidas en abejas

Durante su actividad de búsqueda de alimento, las abejas melíferas a menudo están expuestas a contactos directos y residuales con pesticidas, especialmente insecticidas, todas las sustancias específicamente diseñadas para matar, repeler, atraer o perturbar las funciones vitales de los insectos (Belzunces et al., 2012). Los insecticidas pueden ocasionar efectos letales y subletales de diferentes naturalezas que pueden afectar varios sistemas biológicos de la abeja.

De los mejores ejemplos documentados sobre como la aplicación de un insecticida afecta a las abejas y con ellas la polinización, es la disminución en la

cosecha del cultivo de arándano en New Brunswick, Canadá, como consecuencia de una reducción en las poblaciones de polinizadores debida a la aplicación de fenitrotion (Kevan, 1975). Un aumento en la mortalidad debido al impacto de los insecticidas puede reducir la frecuencia de visitas de abejas a las plantas con flores (Steffan-Dewenter & Tscharntke, 1999) lo que puede en algunos casos, reducir la calidad de un cultivo (Chagnon et al., 1993)

Los efectos subletales se han descrito como efectos sobre la fisiología y el comportamiento de un individuo que ha estado expuesto a un pesticida sin causar directamente la muerte (Desneux et al., 2007). Para las abejas melíferas, la exposición a dosis subletales de insecticidas puede influir en su capacidad de aprendizaje, orientación, alimentación o cuidado de crías (Thompson & Maus, 2007). Un ensayo de respuesta de extensión de trompa (PER) en concentraciones subletales de nueve insecticidas estimó y comparó los efectos en el rendimiento de aprendizaje de las abejas obreras y como resultado, se observaron rendimientos de aprendizaje reducido (Decourtye et al., 2005).

El estudio del efecto de las dosis subletales de fipronil en el comportamiento de la abeja mostró una vulnerabilidad particular de los procesos de memoria olfativa y la percepción de sacarosa (El Hassani et al., 2005). De igual forma los piretroides perturban el aprendizaje y la memoria, y una evaluación de Van dame et al. (1995) evidenció la alteración en el vuelo de las abejas. Igualmente, un estudio de Yang et al. (2008) dio como resultado un comportamiento anormal de forrajeo inducido por la dosis subletal de imidacloprid. Con características similares, una investigación de Tan et al. (2017) expuso como las dosis más bajas de FPF disminuyeron el aprendizaje olfativo y redujeron la memoria promedio en comparación con los controles de las abejas obreras. También, un ensayo de abejas a las que se les administró el insecticida imidacloprid por ingestión mostraron alteración significativa a la respuesta de locomoción y la orientación de vuelo (Santos et al., 2018).

2.8 Herramientas de los insectos en respuesta al estrés ocasionado por xenobióticos

Los sistemas involucrados en el metabolismo de los xenobióticos en la clase insecta están mediados por varias familias de enzimas (por ejemplo, esterasas, oxidasas de función mixta, glutatión S-transferasas) que juegan un papel en la desintoxicación, secuestro y excreción de insecticidas y su importancia difiere entre los grupos taxonómicos, los insecticidas a los cuales se enfrentan y la vía de aplicación (Panini et al., 2016). Estudios han informado el papel de la acetilcolinesterasa, las monooxigenasas P450 del citocromo y antioxidantes primarios (catalasa, glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa) están en la primera línea de defensa frente a insecticidas (De Smet et al., 2017; Harwell, 2007; S. Kim et al., 2019; Panini et al., 2016; Velki et al., 2011).

2.8.1 Acetilcolinesterasa (AChE)

La AChE se encarga de catalizar la hidrolisis de acetilcolina (un neurotransmisor en muchas sinapsis del sistema nervioso y en las conexiones neuromusculares) teniendo un papel importante en el sistema nervioso de los insectos. La inhibición de AChE está relacionada directamente con los mecanismos de acción toxica de los insecticidas organofosforados y carbamatos (Hernández et al., 1998). No obstante, Gyori et al. (2017) sugieren la presencia de mecanismos de bloqueo directo de AChE no establecido previamente para insecticidas agonistas de los nAChR evaluados previamente; y concluye que la enzima está entre los objetivos directos de estos. Ensayos sobre *Busaphelenchus xylophilus* (nematodo de la madera del pino) y *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) informan que éstos generan AChE en presencia de un estresor químico (Kang et al., 2011; Kim et al., 2014). Algunas evaluaciones muestran de igual forma, que la acetilcolinesterasa de *A. mellifera* tiene implicación en la respuesta del organismo al estrés debido su elevado nivel de expresión en condiciones de supresión.

2.8.2 Monooxigenasas del citocromo P450

Uno de los principales mecanismos que utilizan los insectos para hacer frente a los efectos negativos de las toxinas naturales y sintéticas es la resistencia
metabólica (Rand et al., 2015). Las monooxigenasas del citocromo P450, son una de las principales superfamilias de enzimas responsables del metabolismo o desintoxicación de toxinas (Li et al., 2007). Algunos estudios han demostrado la participación de este tipo de enzimas en la desintoxicación y metabolismo de diversos plaguicidas en abejas (Johnson et al., 2009, 2012; Mao et al., 2011).

2.8.3 Antioxidantes primarios

Los organismos han desarrollado sistemas de defensa antioxidantes para poder neutralizar las especies de oxígeno reactivo, retardando o previniendo la oxidación de un sustrato oxidable (lípidos, proteína, DNA) (Corrales & Muñoz, 2012). Los insectos cuentan con un conjunto de enzimas antioxidantes y antioxidantes de pequeño peso molecular que pueden formar una respuesta en cadena frente a oxidantes sintéticos y producidos de forma endógena (Felton & Summers, 1995); su función radica en que actúan conjuntamente para proteger a la célula; considerándose la primera línea de defensa la acción enzimática, encargándose de evitar la acumulación de ROS catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los radicales libres (Pham-Huy et al., 2008; Velki et al., 2011).

2.9 Literatura citada

- Abraham, A. (2018). Influencia del cambio de la abeja Reina, (Apis melifera L.) en los rendimientos de la colmena. [Universidad de Holguín]. https://repositorio.uho.edu.cu/jspui/bitstream/uho/5563/1/Adanai Abraham Castro.pdf
- Al Naggar, Y., & Baer, B. (2019). Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (Apis mellifera). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56224-1
- Alexander, B., & Michener, C. (1995). Phylogenetic studies of the families of shorttongued bees (Hymenoptera:Apoidea). *The University of Kansas Science Bulletin*, 55, 377–424.
- Arizona State University. (2020). *La anatomía de las abejas melíferas*. Ask A Biologist. https://askabiologist.asu.edu/anatomía-de-abejas-melíferas
- Ashworth, L., Quesada, M., Casas, A., Aguilar, R., & Oyama, K. (2009). Pollinatordependent food production in Mexico. *Biological Conservation*, 142(5), 1050–

1057. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.01.016

- Bacci, L., Convertini, S., & Rossaro, B. (2018). A review of sulfoxaflor, a derivative of biological acting substances as a class of insecticides with a broad range of action against many insect pests. In *Journal of Entomological and Acarological Research* (Vol. 50, Issue 3). PAGEPress Publications. https://doi.org/10.4081/jear.2018.7836
- Backyardbeekeepers. (2020). About Honeybees | Back Yard Beekeepers Association. https://backyardbeekeepers.com/about-honeybees/
- Barker, R. J., Lehner, Y., & Kunzman, M. R. (1980). Pesticides and honey bees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethoate. *Archives* of *Environmental Contamination and Toxicology*, *9*(2), 125–133. https://doi.org/10.1007/bf01055368
- Barranco, M., Vergara, C., & Mora, A. (2015). Conocimiento actual de efecto de los insecticidas derivados de la nicotina (neonicotinoides) en las poblaciones de abejas polinizadoras. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 2(3). https://doi.org/10.26423/rctu.v2i3.66
- Bell, H. C., Benavides, J. E., Montgomery, C. N., Navratil, J. R. E., & Nieh, J. C. (2020). The novel butenolide pesticide flupyradifurone does not alter responsiveness to sucrose at either acute or chronic short-term field-realistic doses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, *76*(1), 111–117. https://doi.org/10.1002/ps.5554
- Belzunces, L. P., Tchamitchian, S., & Brunet, J. L. (2012). Neural effects of insecticides in the honey bee. In *Apidologie* (Vol. 43, Issue 3, pp. 348–370). Springer. https://doi.org/10.1007/s13592-012-0134-0
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., & Omholt, S. W. (2003). The gene csd is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, *114*(4), 419–429. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00606-8
- Blasco, E., García, S. G., López Pérez, F., Ruiz, M. M., Revuelta Pérez, I., Gomes, C. A., García, E. A., Francisco, J., García, A., Betancor Rodríguez, A., Delgado Piqueras, F., Desdentado Daroca, E., Alberto, L., Regalado, F., García Pérez, M., García Ureta, A., Fraga, J. J., Moreno, J. J., Ramón, F. L., ... Martín, G. V. (2018). Actualidad Jurídica Ambiental Recopilacion mensual. *Centro Internacional de Estudios de Derecho Ambiental*, 80. www.actualidadjuridicaambiental.com
- Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C. P. W., Rosenkranz, P., & Wallner, K. (2018).
 Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (Apis mellifera) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany. In *PLoS ONE* (Vol. 13, Issue 7). Public Library of Science. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199995

Borror, D. J., Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (1989). An introduction to the

study of insects. An Introduction to the Study of Insects., Ed. 6.

- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E., & Goulson, D. (2015). Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environmental Science and Technology*, 49(21), 12731–12740. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03459
- Brown, M. J. F., Dicks, L. V, Paxton, R. J., Baldock, K. C. R., Barron, A. B., Chauzat, M.-P., Freitas, B. M., Goulson, D., Jepsen, S., Kremen, C., Li, J., Neumann, P., Pattemore, D. E., Potts, S. G., Schweiger, O., Seymour, C. L., & Stout, J. C. (2016). A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ*, *4*, e2249. https://doi.org/10.7717/peerj.2249
- Brown, M. J. F., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: A global perspective. In *Apidologie* (Vol. 40, Issue 3, pp. 410–416). https://doi.org/10.1051/apido/2009019
- Bryden, J., Gill, R. J., Mitton, R. A. A., Raine, N. E., & Jansen, V. A. A. (2013). Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecology Letters*, *16*(12), 1463–1469. https://doi.org/10.1111/ele.12188
- Campbell, J. W., Cabrera, A. R., Stanley-Stahr, C., & Ellis, J. D. (2016). An Evaluation of the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Safety Profile of a New Systemic Insecticide, Flupyradifurone, Under Field Conditions in Florida. *Journal of Economic Entomology*, 109(5), 1967–1972. https://doi.org/10.1093/jee/tow186
- Chagnon, M., Gingras, J., & DeOliveira, D. (1993). Complementary Aspects of Strawberry Pollination by Honey and IndigenQus Bees (Hymenoptera). *Journal of Economic Entomology*, 86(2), 416–420. https://doi.org/10.1093/JEE/86.2.416
- Chaimanee, V., Evans, J. D., Chen, Y., Jackson, C., & Pettis, J. S. (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (Apis mellifera) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology*, 89, 1– 8. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.004
- Chakrabarti, P., Sarkar, S., & Basu, P. (2018). Field Populations of Wild Apis cerana Honey Bees Exhibit Increased Genetic Diversity Under Pesticide Stress Along an Agricultural Intensification Gradient in Eastern India. *Journal* of Insect Science, 18(3). https://doi.org/10.1093/JISESA/IEY042
- Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC). (2017). Clasificación interactiva de MoA. https://irac-online.org/modes-of-action/
- Corrales, L. C., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, *10*(18), 213. https://doi.org/10.22490/24629448.1010

- Crozier, J. O. (2019). *Manual Técnico de Apicultura* http://www.dicta.gob.hn/files/2019,Manual-tecnico-de-apicultura.pdf
- Crozier, R., & Pamilo, P. (1996). *Evolution of social insect colonies: sex allocation and kin selection.* Oxford University Press.
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, 7(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151
- De Freitas Barbosa, W., & Pinheiro de Sousa, E. (2013). Nível tecnológico e seus determinantes na apicultura cearense. *Revista de Poítica Agrícola, XXII*(3), 32–47. http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/92887/1/Nivel-tecnologico-e-seus-determinantes-na-apicultura-cearense.pdf
- De Smet, L., Hatjina, F., Ioannidis, P., Hamamtzoglou, A., Schoonvaere, K., Francis, F., Meeus, I., Smagghe, G., & de Graaf, D. C. (2017). Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171529. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171529
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., & Pham-Delègue, M. H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee Apis mellifera. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), 242–250. https://doi.org/10.1007/s00244-003-0262-7
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J.-M. (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology*, *52*(1), 81–106. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440
- Devillers, J., Hà Pham-Delègue, M., Decourtye, A., Budzinski, H., Cluzeau, S., & Maurin, G. (2003). Modeling the acute toxicity of pesticides to Apis mellifera. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 103–109. https://www.researchgate.net/publication/228930013
- Diaz Meraz, R. A. (2015). Efecto de seis plaguicidas sobre mortalidad en dos especies de abejas: Apis mellifera y Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Apidae). Escuela Agrícola Panamericana.
- Dix, H. M. (1981). Environmental Pollution. *The Institute of Environmental Science Series*.
- El Hassani, A. K., Dacher, M., Gauthier, M., & Armengaud, C. (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (Apis mellifera). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(1), 30–39. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.07.008
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. In *Pest Management*

Science (Vol. 64, Issue 11, pp. 1099–1105). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/ps.1616

- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 29(2), 187–197. https://doi.org/10.1002/arch.940290208
- Flores-Prado, L. (2012). Evolución de la sociabilidad en Hymenoptera: Rasgos conductuales vinculados a niveles sociales y precursores de sociabilidad en especies solitarias. In *Revista Chilena de Historia Natural* (Vol. 85, Issue 3, pp. 245–266). Sociedad de Biologia de Chile. https://doi.org/10.4067/S0716-078X2012000300001
- Forfert, N., Troxler, A., Retschnig, G., Gauthier, L., Straub, L., Moritz, R. F. A., Neumann, P., & Williams, G. R. (2017). Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity. *PLoS ONE*, 12(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186109
- Galetto, L., Aguilar, R., Musicante, M., Astegiano, J., Ferreras, A., Jausoro, M., Torres, C., Ashworth, L., & Eynard, C. (2017). Fragmentación de hábitat, riqueza de polinizadores, polinización y reproducción de plantas nativas en el Bosque Chaqueño de Córdoba, Argentina. *Ecología Austral*, 17(1), 67–80. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2007000100006&Ing=es&tIng=es
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810–821. https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014
- García, A. (2018). La protección jurídica y administrativa de las abejas. Acutalidad Jurídica Ambiental, 80, 1–33.
- Giorio, C., Safer, A., Sánchez-Bayo, F., Tapparo, A., Lentola, A., Girolami, V., van Lexmond, M. B., & Bonmatin, J. M. (2017). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1: new molecules, metabolism, fate, and transport. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–33. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0394-3
- Glaberman, S., White, K., Steeger, T., Carleton, J., & Winfield, S. (2014). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960) Flupyradifurone.
- González-Varo, J. P., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Potts, S. G., Schweiger, O., Smith, H. G., Steffan-Dewenter, I., Szentgyörgyi, H., Woyciechowski, M., & Vilà, M. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 28, Issue 9, pp. 524–530). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.008

- Gregorc, A., Alburaki, M., Rinderer, N., Sampson, B., Knight, P. R., Karim, S., & Adamczyk, J. (2018). Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Scientific Reports*, 8(1), 15003. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33348-4
- Gross, M. (2018). Bee worries beyond neonicotinoids. *Current Biology*, *28*(19), R1121–R1123. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.045
- Grünewald, B., & Siefert, P. (2019). Acetylcholine and its receptors in honeybees: Involvement in development and impairments by neonicotinoids. In *Insects* (Vol. 10, Issue 12). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/insects10120420
- Güemes-Ricalde, F; Echazarreta-Gonzalez, C; Villanueva-G, R; Pat-Fernandez, J. M.; Gomez-Alvarez, R. (2004). La apicultura en la peninsula de Yucatan: Actividad de subsistencia en un entorno globalizado. *Revista Mexicana Del Caribe*, *17*, 67–94. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=12801604
- Gyori, J., Farkas, A., Stolyar, O., Székács, A., Mörtl, M., & Vehovszky, Á. (2017). Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. *Acta Biologica Hungarica*, 68(4), 345–357. https://doi.org/10.1556/018.68.2017.4.1
- Harwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, *35*(5), 1147–1150. https://doi.org/10.1042/BST0351147
- Hernández, F., Serrano, R., Pitarch, E., & López, F. J. (1998). Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 374(2–3), 215–229. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00400-0
- Hesselbach, H., & Scheiner, R. (2018). Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23200-0
- Hesselbach, H., & Scheiner, R. (2019). The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology*, *28*(3), 354–366. https://doi.org/10.1007/s10646-019-02028-y
- Hrassnigg, N., Brodschneider, R., Fleischmann, P., & Crailsheim, K. (2003). Las abejas obreras (Apis mellifera) son capaces de aprovechar el almidon como combustible para el vuelo y los zanganos no.
- Hunt, G. J., & Page, R. E. (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theoretical and Applied Genetics*, *85*(1), 15–20. https://doi.org/10.1007/BF00223839
- Jeschke, P., Nauen, R., & Beck, M. E. (2013). Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists: A Milestone for Modern Crop Protection. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(36), 9464–9485. https://doi.org/10.1002/anie.201302550

- Jeschke, P., Nauen, R., Gutbrod, O., Beck, M. E., Matthiesen, S., Haas, M., & Velten, R. (2015). Flupyradifurone (Sivanto[™]) and its novel butenolide pharmacophore: Structural considerations. In *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Vol. 121, pp. 31–38). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.10.011
- Johnson, R. M., Mao, W., Pollock, H. S., Niu, G., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2012). Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in Apis mellifera. *PLoS ONE*, 7(2), e31051. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031051
- Johnson, R. M., Pollock, H. S., & Berenbaum, M. R. (2009). Synergistic Interactions Between In-Hive Miticides in Apis mellifera. *Journal of Economic Entomology*, *102*(2), 474–479. https://doi.org/10.1603/029.102.0202
- Jones, A. K., & Sattelle, D. B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. Advances in Experimental Medicine and Biology, 683, 25– 43. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_3
- Jordán, B. R. (2016). Apicultura en el Ecuador. Universidad Técnica de Machala.
- Kang, J. S., Lee, D.-W., Koh, Y. H., & Lee, S. H. (2011). A Soluble Acetylcholinesterase Provides Chemical Defense against Xenobiotics in the Pinewood Nematode. *PLoS ONE*, 6(4), e19063. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019063
- Katzung, B. G. (2016). Farmacología Básica y Clínica. In McGraw Hill (13th ed.).
- Kevan, P. G. (1975). Forest application of the insecticide fenitrothion and its effect on wild bee pollinators (Hymenoptera: Apoidea) of lowbush blueberries (Vaccinium SPP.) in Southern New Brunswick, Canada. *Biological Conservation*, 7(4), 301–309. https://doi.org/10.1016/0006-3207(75)90045-2
- Kim, S., Kim, K., Lee, J. H., Han, S. H., & Lee, S. H. (2019). Differential expression of acetylcholinesterase 1 in response to various stress factors in honey bee workers. *Scientific Reports*, 9(1), 10342. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46842-0
- Kim, Y. H., Kwon, D. H., Ahn, H. M., Koh, Y. H., & Lee, S. H. (2014). Induction of soluble AChE expression via alternative splicing by chemical stress in Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 48(1), 75–82. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.001
- Klatt, B. K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., & Tscharntke, T. (2013). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775). https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2440
- Kovács-Hostyánszki, A., Espíndola, A., Vanbergen, A. J., Settele, J., Kremen, C.,
 & Dicks, L. V. (2017). Ecological intensification to mitigate impacts of conventional intensive land use on pollinators and pollination. In R. Irwin

(Ed.), *Ecology Letters* (Vol. 20, Issue 5, pp. 673–689). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/ele.12762

- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review Entomology*, *52*, 231–253.
- M., Casimiro, J. F. (2016). *Presencia de neonicotinoides en polen* [Universidad de Valladolid]. https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/17212/TFG-G1738.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Macias, J. O., Tapia Gonzalez, J. M., Contreras Escareño, F., Guzman Novoa, E., Medina Flores, C. A., & De la Mora Peña, A. (2018). El efecto de los agroquimicos sobre las abejas meliferas (Apis mellifera) y su relación con el síndrome del colapso de las colonias.
- Mack, R. N., Simberloff, D., Lonsdale, W. M., Evans, H., Clout, M., & Bazzaz, F.
 A. (2000). Biotic Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences, and Control. *Ecological Applications*, 10(3), 689. https://doi.org/10.2307/2641039
- Maero, E., & Anguiano, O. (2018). Efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo en adultos de Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae). *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 77(1). https://www.redalyc.org/jatsRepo/3220/322053849002/html/index.html
- Magaña, M., Moguel-Ordonez, Y., Sanginés-García, J. R., & Morales, C. (2012). Estructura e importancia de la cadena productiva y comercial de la miel en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *3*, 49–64.
- Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E., & Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to nontarget aquatic organisms: Microalgae Desmodesmus subspicatus and amphipod Gammarus fossarum. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(3), 178–186. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.07.008
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (Apis mellifera). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12657–12662. https://doi.org/10.1073/pnas.1109535108
- Martin-Culma, N. Y., & Arenas-Súarez, N. E. (2018). *Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. 14*, 232–240. https://doi.org/10.18041/entramado.2018v14n1.27113
- Matheson, A. (1993). World bee health report. *Bee World*, *74*(4), 176–212. https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099183
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine

receptors. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 22, Issue 11, pp. 573–580). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4

- Millar, N. S. (2006). Ligand-Gated Ion Channels. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1038/npg.els.0000154
- Millar, N. S., & Denholm, I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: Targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1), 53–66. https://doi.org/10.1007/s10158-006-0040-0
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., & Pettis, J. S. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*, *5*(3), e9754. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754
- Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target site of insecticides. In *Pharmacology and Toxicology* (Vol. 79, Issue 1, pp. 1–14). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., & Raupach, G. (2015). Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71(6), 850–862. https://doi.org/10.1002/ps.3932
- Needham, P. H., Solly, S. R. B., & Stevenson, J. H. (1966). Damage to honey bee colonies (Apis mellifera) by insecticides in Great Britain, 1956–65. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(3), 133–137. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170308
- Negri, P., Villalobos, E., Szawarski, N., Damiani, N., Gende, L., Garrido, M., Maggi, M., Quintana, S., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2019). Towards Precision Nutrition: A Novel Concept Linking Phytochemicals, Immune Response and Honey Bee Health. *Insects*, *10*(11), 401. https://doi.org/10.3390/insects10110401
- Panini, M., Manicardi, G. C., Moores, G. D., & Mazzoni, E. (2016). An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. In *ISJ* (Vol. 13, Issue 1). https://doi.org/10.25431/1824-307X/ISJ.V13I1.326-335
- Pantoja, A., Smith-Pardo, A., García, A., Sáenz, A., & Rojas, F. (2014). Sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe. Principios y avances. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. In *International Journal of Biomedical Science* (Vol. 4, Issue 2, pp. 89–96). Master Publishing Group. www.ijbs.org
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M.,

Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van Der Sluijs, J. P., Van Dyck, H., & Wiemers, M. (2014). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68–102. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x

- Rader, R., Cunningham, S. A., Howlett, B. G., & Inouye, D. W. (2020). Non-Bee Insects as Visitors and Pollinators of Crops: Biology, Ecology, and Management. *Annual Review of Entomology*, 65(1), 391–407. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025055
- Ramos, J., & Carvalho, N. (2007, August 10). Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de Apis mellifera. *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE ENGENHARIA FLORESTAL*.
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (Apis mellifera) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, *5*. https://doi.org/10.1038/srep11779
- Reyes, G. S., & Johnston, P. (2013). *El declive de las abejas: Peligros para los polinizadores y la agricultura de Europa*. https://docplayer.es/4186-El-declive-de-las-abejas.html
- Rodríguez Balam, E., & Pinkus Rendón, M. (2015). Apicultura, entorno y modernidad en localidades de Yucatán, México. *Biotemas*, *28*(3), 143. https://doi.org/10.5007/2175-7925.2015v28n3p143
- Santos, A. C. C., Cristaldo, P. F., Araújo, A. P. A., Melo, C. R., Lima, A. P. S., Santana, E. D. R., de Oliveira, B. M. S., Oliveira, J. W. S., Vieira, J. S., Blank, A. F., & Bacci, L. (2018). Apis mellifera (Insecta: Hymenoptera) in the target of neonicotinoids: A one-way ticket? Bioinsecticides can be an alternative. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.048
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2018). Atlas Agroalimentario 20212-2018. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Simon, G., Huxdorff, C., Santillo, D., & Johnston, P. (2013). Gotas de veneno para las abejas. http://archivoes.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/Agriculturaecologica/gp_informe_plaguicidas_agua_gutacion_abejas.pdf
- Siviter, H., Brown, M. J. F., & Leadbeater, E. (2018). Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. In *Nature* (Vol. 561, Issue 7721, pp. 109– 112). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0430-6
- Siviter, H., Scott, A., Pasquier, G., Pull, C. D., Brown, M. J. F., & Leadbeater, E. (2019). No evidence for negative impacts of acute sulfoxaflor exposure on

bee olfactory conditioning or working memory. *PeerJ*, 2019(8). https://doi.org/10.7717/peerj.7208

- Smallman, B. N., & Mansingh, A. (1969). The cholinergic system in insect development. *Annual Review Entomology*, *14*, 387–408. https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.002131
- Smith, D. B., Arce, A. N., Ramos Rodrigues, A., Bischoff, P. H., Burris, D., Ahmed, F., & Gill, R. J. (2020). Insecticide exposure during brood or early-adult development reduces brain growth and impairs adult learning in bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1922), 20192442. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2442
- Sparks, T. C., DeBoer, G. J., Wang, N. X., Hasler, J. M., Loso, M. R., & Watson, G. B. (2012). Differential metabolism of sulfoximine and neonicotinoid insecticides by Drosophila melanogaster monooxygenase CYP6G1. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(3), 159–165. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.006
- Steffan-Dewenter, I., & Tscharntke, T. (1999). Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia*, *121*(3), 432–440. https://doi.org/10.1007/s004420050949
- Suasnávar, M., De León, G., & Guzman, M. A. (2015). *Manual de apicultura*. https://coba.com.gt/wp-content/uploads/2015/07/MANUAL-BASICO-DE-APICULTURA-I.pdf
- Tan, K., Wang, C., Dong, S., Li, X., & Nieh, J. C. (2017). The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (Apis cerana) exposed as larvae or as adults. *Scientific Reports*, 7(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-18060-z
- Thompson, H. M., & Maus, C. (2007). The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Management Science*, *63*(11), 1058–1061. https://doi.org/10.1002/ps.1458
- Tosi, S., & Nieh, J. C. (2019). Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto[®]), on honeybees. *Proceedings* of the Royal Society B: Biological Sciences, 286(1900), 20190433. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433
- Tranque, P., Hu, M. C. Y., Edelman, G. M., & Mauro, V. P. (1998). rRNA complementarity within mRNAs: A possible basis for mRNA-ribosome interactions and translational control. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America, 95(21), 12238–12243. https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12238
- U. S. Environmental protection agency (USEPA). (2014). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960). https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2013-0226-0010

- Valdés, P. (2013). Situación mundial del Síndrome de Colapso de las Abejas. www.agrimundo.cl
- van dame, R., Meled, M., Colin, M.-E., & Belzunces, L. P. (1995). Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. Exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *14*(5), 855–860. https://doi.org/10.1002/etc.5620140517
- Vanbergen, A. J., Garratt, M. P., Baude, M., Biesmeijer, J. C., Britton, N. F., Brown, M. J. F., Brown, M., Bryden, J., Budge, G. E., Bull, J. C., Carvell, C., Challinor, A. J., Connolly, C. N., Evans, D. J., Feil, E. J., Garratt, M. P., Greco, M. K., Heard, M. S., Jansen, V. A. A., ... Wright, G. A. (2013). Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. In *Frontiers in Ecology and the Environment* (Vol. 11, Issue 5, pp. 251–259). Wiley Blackwell. https://doi.org/10.1890/120126
- Vanengelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M., Caron, D., & Pettis, J. (2011). A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), 1–10. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01
- Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., & Socha, R. (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 172(1), 77–84. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.009
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., Robertson, H. M., Weaver, D. B., Beye, M., Bork, P., Elsik, C. G., Hartfelder, K., Hunt, G. J., Zdobnov, E. M., Amdam, G. V., Bitondi, M. M. G., Collins, A. M., Cristino, A. S., Lattorff, H. M. G., ... Wright, R. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera. *Nature*, 443(7114), 931–949. https://doi.org/10.1038/nature05260
- Williamson, S. M., & Wright, G. A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1799–1807. https://doi.org/10.1242/jeb.083931
- Yang, E. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. L., & Chang, L. H. (2008). Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(6), 1743–1748. https://doi.org/10.1603/0022-0493-101.6.1743
- Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. *PLoS ONE*, 9(1), e77547. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547
- Zhu, Y., Loso, M. R., Watson, G. B., Sparks, T. C., Rogers, R. B., Huang, J. X., Gerwick, B. C., Babcock, J. M., Kelley, D., Hegde, V. B., Nugent, B. M.,

Renga, J. M., Denholm, I., Gorman, K., Deboer, G. J., Hasler, J., Meade, T., & Thomas, J. D. (2011). Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(7), 2950–2957. https://doi.org/10.1021/jf102765x

3 DETECCION DE VARIACION EN LA EXPRESION GÉNICA EN ABEJAS MELIFERAS EXPUESTAS A FLUPYRADIFURONA

DETECTION OF VARIATION IN GENE EXPRESSION IN HONEY BEES EXPOSED TO FLUPYRADIFURONE

3.1 Resumen

La flupyradifurona, el ingrediente activo del insecticida SivantoTM, es un butenólido que representa una nueva herramienta para el manejo de plagas actuando como un agonista del receptor nicotínico de acetilcolina del insecto. Su ingrediente activo imita la acetilcolina y sin poder ser activado por su enzima respectiva, causa excitación al nervio de la célula lo cual ocasiona un desorden del sistema nervioso del insecto y su subsecuente colapso. Un estudio ha demostrado que este producto no afecta a los polinizadores; sin embargo, otros estudios indican efectos negativos a diferentes niveles fisiológicos en insectos benéficos. Dado que los posibles efectos a nivel génico no se detectan mediante evaluaciones ecotoxicológicas estándar, en el presente estudio se comparó la expresión de genes mediante la técnica de despliegue diferencial en abejas tratadas y no tratadas con flupyradifurona. El análisis de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) se utilizó como herramienta para detectar la variación en la expresión génica. Se recolectaron individuos adultos de edades mixtas y se expusieron a través de ingestión durante única vez a una dosis subletal del insecticida (645 ng/abeja) y se evaluaron a las 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas tras la exposición. Se examinaron dos iniciadores para RAPDs que revelaron polimorfismos significativos y puntuales. Los resultados indicaron diferencias en la expresión génica de las abejas tras la exposición al insecticida. Se concluye que el insecticida alteró la expresión de los genes en los tiempos evaluados. Es importante ampliar la comprensión sobre las alteraciones génicas y posibles efectos negativos de éstos en las poblaciones de abejas melíferas debido a la implicación de los insecticidas en la salud de los polinizadores.

3.2 Abstract

Flupyradifurone, the active ingredient in Sivanto[™] insecticide, is a butenolide that represents a new tool for pest management by acting as an agonist of the insect's nicotinic acetylcholine receptor. Its active ingredient imitates acetylcholine and, without being able to be activated by its respective enzyme, causes excitation to the nerve of the cell, which causes a disorder of the insect's nervous system and subsequent collapse. A study has shown that this product doesn't affect pollinators; however, other studies indicate negative effects at different physiological levels in beneficial insects. Since possible effects at the gene level aren't detected by standard ecotoxicological evaluations, the present study compared gene expression using the differential display technique in bees treated and not treated with the flupyradifurone. Analysis of randomly amplified polymorphic DNA by polymerase chain reaction (RAPD-PCR) was used as a tool to detect variation in gene expression. Mixed-age adults were collected and exposed through singletime ingestion to a sublethal dose of the insecticide (645 ng/bee) and were evaluated at 0.5, 1, 3, 6, and 24 hours after exposure. Two primers for RAPDs were examined which revealed significant and point polymorphisms. The results indicated differences in the gene expression of bees after exposure to the insecticide. It's concluded that the insecticide altered the expression of the genes in the evaluated times. It's important to broaden the understanding of gene alterations and possible negative effects of these in honey bee populations due to the implication of insecticides in the health of pollinators.

3.3 Introducción

El uso intensivo de agroquímicos es la base del trastorno del colapso de las colonias de *Apis mellifera*. Esto representa un fenómeno que pone en riesgo la sobrevivencia de estos insectos y su nicho clave para la biodiversidad del planeta (Diaz Meraz, 2015). Los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en los insecticidas causan daños fisiológicos al absorberse o adherirse a los componentes celulares teniendo diversos impactos, incluidos las alteraciones genéticas en los organismos (Dix, 1981). Los marcadores de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) pueden ser una herramienta muy eficiente para verificar la diversidad genética en estudios genotóxicos porque producen múltiples fragmentos con pocos experimentos (Pozdnyakov et al., 2000; Rocco et al., 2014). Un gran número de reportes han citado con anterioridad diferencias a nivel genómico en abejas basados en estudios realizados con RAPDs (Chakrabarti et al., 2018; Suazo et al., 1998; Yogesh & Khan, 2014).

Flupyradifurona, el insecticida insignia de los butenolidos, es catalogado por USEPA (2014) como relativamente "seguro para las abejas"; no obstante, diversos estudios han demostrado efectos adversos en las abejas, los ensayos mostraron una disminución en la capacidad de respuesta a la sacarosa y el rendimiento en las actividades de acondicionamiento en la colmena (Al Naggar & Baer, 2019; Chakrabarti et al., 2020; Hesselbach & Scheiner, 2018, 2019; Tosi & Nieh, 2019). Los estudios sobre este producto han evaluado principalmente la alteración en el comportamiento de las abejas. Diversos estudios realizados al evaluar otros insecticidas han demostrado que éstas alteran no solo su comportamiento, sino también la expresión génica tras la exposición a patógenos o xenobióticos y que éstos están asociados con el trastorno del colapso de colmenas (Dainat et al., 2012; Tranque et al., 1998). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de alteración en la expresión de los genes de abejas melíferas tras la exposición a una dosis subletal de flupyradifurona.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Colonias de A. mellifera

Para el desarrollo del estudio se obtuvieron dos colonias de 200 abejas cada una de *A. mellifera* provenientes del municipio de Texcoco de Mora, Estado de México, separadas entre sí por aproximadamente 3 km (Figura 2). La población 1 fue recolectada en un predio del Molino de las flores (Latitud: 19.514114, Longitud: -98.844139) y la población 2 en el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (Latitud: 19.495449, Longitud: -98.876366). Las abejas se mantuvieron bajo condiciones de cautiverio en el laboratorio. El protocolo para su mantenimiento durante el ensayo fue tomado de la guía para evaluar los efectos secundarios de los productos fitosanitarios en las abejas (European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP, 2010). Las abejas recolectadas fueron puestas en jaulas de madera y alimentadas con una solución de sacarosa 50%, se mantuvieron en completa oscuridad para simular las condiciones.



Figura 2. Origen de las poblaciones de abejas utilizadas en el presente estudio. El mapa corresponde al municipio de Texcoco de Mora; El color amarillo indica el lugar de origen de la población 1 (Molino de las flores). El color rojo indica el origen de la población 2 (Campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo).

3.4.2 Insecticida evaluado en obreras de A. mellifera

El producto químico fue obtenido en una tienda local de insumos agrícolas. La concentración utilizada se seleccionó con base en estudios ya reportados y la hoja de seguridad del producto. Al evaluar dosis subletales las concentraciones deben estar muy por debajo de la toxicidad aguda; por esto, ésta fue al menos 10 veces más baja que las DL₅₀ por exposición oral (alimento contaminado) publicadas. La concentración usada durante este experimento fue de 645 ng/abeja de FPF, similar a la reportada por Al Naggar & Baer (2019).

3.4.3 Bioensayo: Pruebas de alimentación.

El método de tratamiento de alimentación fue utilizado para simular la exposición alimentaria en las colmenas. Las poblaciones de abejas fueron separadas en dos grupos, el control (alimentado con sacarosa 50%) y el experimental (alimentado con sacarosa 50% adicionado con FPF 645 ng/abeja). Mediante pruebas de consumo de solución de sacarosa previas al inicio del bioensayo, se determinó el consumo promedio por abeja en 20 µL. Se mantuvieron en inanición durante 2 h antes de suministrar las soluciones para alimentación y posteriormente fueron expuestas a alimentación grupal, en donde las abejas compartieron la solución entre ellas, y por lo tanto recibieron dosis similares (Quiroga-Murcia et al., 2017). El grupo experimental fue alimentado por única vez durante 3 h con la solución respectiva. Luego del tratamiento de alimentación se proporcionó solución fresca de sacarosa ad libitum y se cambió al menos una vez durante el tiempo de evaluación. Las muestras para las mediciones respectivas de la expresión de los genes fueron tomadas en 5 tiempos: 0.5 horas, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas después de la alimentación, estuvieron conformadas por 3 individuos, se tomaron 3 repeticiones por cada tiempo y se conservaron en nitrógeno líquido para el análisis posterior.

3.4.4 Extracción de RNA

Se purificó RNA total en tres repeticiones biológicas de las abejas considerando el cuerpo completo en las dos poblaciones tanto para controles y tratadas en cada uno de los cinco tiempos: 0.5 horas, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas

después de la alimentación (2 poblaciones x 2 tratamientos x 3 repeticiones x 5 tiempos = 60 muestras totales) utilizando el kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, EUA). Cada muestra (repetición biológica) de RNA estaba conformada por tres individuos. Las muestras se maceraron con la ayuda de nitrógeno líquido en un mortero estéril. El polvo obtenido fue transferido a un tubo de microcentrífuga y se agregó un mL de buffer de lisis preparado con 0.2% de $2-\beta$ - mercaptoetanol. Los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron durante tres minutos a temperatura ambiente. Después, se mezclaron con ayuda de una micropipeta y posteriormente fueron centrifugados a 13,000 RPM durante dos minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregó un volumen de etanol 75% y se mezclaron con un pulso en vórtex. A continuación, se transfirieron 700 µL de la muestra al cartucho de centrifugado (con un tubo de recolección) y se centrifugó a 13,000 RPM durante 45 segundos a temperatura ambiente. El flujo se desechó y se repitió el paso anterior hasta terminar la muestra. Posteriormente, se agregaron 700 µL de buffer de lavado I al cartucho de centrifugado y se centrifugó a 13,000 RPM durante 35 segundos. Se agregaron 500 µL de buffer de lavado II al cartucho de centrifugado y se centrifugó a 13,000 RPM durante 35 segundos. El paso anterior fue repetido una vez más, y posteriormente los tubos de recolección fueron centrifugados a 13,000 RPM durante un minuto. Finalmente, se agregaron 50 µL de agua libre de RNasa al centro del tubo, se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos y se centrifugó durante un minuto a 13,000 RPM.

3.4.5 Determinación de la calidad y cantidad de RNAs

La cuantificación del RNA y cDNA se realizó por espectrofotometría con absorbancia de luz UV a una longitud de onda de 260 nm en un Espectrofotómetro NanoDrop® (ND 1000 V.3.5.2 Thermo Scientific, USA) utilizando 2 µL de la muestra stock.

3.4.6 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), una vez obtenido el RNA en cantidad y calidad adecuada, se utilizó el kit de Thermo Scientific (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit). En un tubo Eppendorf estéril libre de nucleasas se

preparó una mezcla con 1 µL del primer Oligo (dT) ₁₈ y 11 µL de RNA de cada muestra y se incubó a 65 °C por 5 min en un termoblock Labnet D - 1200. Despues se le añadieron 4 µL de Buffer Reaction (5X), 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U / µL), 2 µL de dNTP Mix (10 mM), 1 µL de RevertAid M - MuLV RT (200 U / µL) para un volumen final de 20 µL. Los tubos fueron incubados por 60 min a 45 °C en el termoblock y se terminó la reacción calentando a 70 °C durante 5 min. Se ajustó la concentración de las muestras de cDNA a 20 ng / µL en un volumen final de 100 µL.

3.4.7 Despliegue diferencial por RAPDs

Con el fin de observar de manera generalizada la posible alteración en la expresión génica a causa de la exposición al insecticida de las abejas, se llevó acabo un análisis de despliegue diferencial realizado con iniciadores aleatorios en el cDNA. Este análisis consiste en la amplificación aleatoria de fragmentos de los genes expresados (cDNA) reconocidos por los iniciadores que se utilicen. En este análisis exploratorio, solamente se utilizaron dos iniciadores tipo RAPDs indicados en el Cuadro 6. para realizar dicho despliegue diferencial. La mezcla de reacción para PCR fue preparada como se indica en el **Cuadro 5** y se llevó a cabo en un termociclador MaxyGene Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación (1 min a 94 °C para desnaturalización, 1 min a 40 °C para alineamiento y 1:30 min a 72 °C para extensión) concluyendo con un ciclo final a 72 °C durante 5 min para la extensión final. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C para sus posteriores análisis.

Reactivos	[Stock]	[Final]	Volumen Final x 1 reacción (µL)
GoTaq Buffer	5X	1x	5.0 µL
MgCl ₂	1mM	2.5 mM	2.5 μL
dNTPs	1mM	200 µM	5.0 µL
Iniciador RAPD	10pM	20 pM	2.0 µL
Go <i>Taq</i> DNApol	5U/µL	1.5U	0.3 µL

Cuadro 5. Composición de la mezcla de PCR para la amplificación de fragmentos de expresión diferencial en abejas expuestas a flupyradifurona

cDNA	20 ng/µL	80ng	4.0 µL
Agua HPLC	-	-	6.2 μL
Volumen total			25 µL

Cuadro 6. Iniciadores RAPDs utilizados para la amplificación de fragmentos de expresión diferencial en abejas melíferas expuestas a flupyradifurona

Serie	Iniciadores	Numero de bases
G02	GGC ACT GAG G	10
J20	AAG CGG CCT C	10

3.4.8 Separación de productos de PCR

Los productos de PCR amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida 6% preparado con las condiciones que se indican en el Cuadro 7 en una cámara dual C.B.S. (Scientific CO® modelo MVG-216-33), con buffer de corrida TBE 1x. Se utilizaron 3 μ L de muestra mezclados con 3 μ L de buffer de carga y se colocaron en cada pozo; el gel se corrió a 230 voltios por alrededor de 2 h. Posteriormente, los geles se tiñeron y se documentaron con una cámara fotográfica y un transiluminador de luz blanca.

Cuadro 7. Condiciones para la preparación del gel de poliacrilamida

Preparación del gel	1 gel	2 geles
Solución de acrilamida 30% (acrilamida –	13 mL	26 mL
bisacrilamida (29:1))		
Buffer TBE 5x	12 mL	24 mL
H ₂ O destilada estéril	35 mL	70 mL
APS 10% (Persulfato de amonio)	420 uL	840 uL
TEMED (N, N, N',N' – tetramethylethane-1-	35 uL	70 uL
2-diamine (Thermo Fisher Scientific))		

3.5 Resultados

3.5.1 Determinación de la calidad y cantidad de RNAs

El protocolo que se utilizó para la extracción del RNA de muestras de abejas melíferas fue efectivo, ya que permitió aislar exitosamente al RNA total. Los valores registrados con el NanoDrop (ND-1000) estuvieron en un rango entre

178.6 y 436 ng μ L⁻¹ (concentración de RNA) y absorbancia (A260/280) igual a 2.1. El RNAm de un grupo de muestras al azar se observó en un gel de agarosa 1% que permitió corroborar la presencia de este ácido nucleico.



Figura 3. Perfil de muestras de RNA. La línea en amarillo muestra el RNA correspondiente a la subunidad ribosomal 18S (1900 pb), corroborando la presencia de RNA en todas las muestras. RNA Control (C), RNA Tratado (T); Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) corresponde al marcador de peso molecular 1 kb.

3.5.2 Síntesis de cDNA

La cantidad de cDNA obtenida fue suficiente para permitir llevar acabo las amplificaciones mediante PCR punto final. Los valores registrados con el NanoDrop (ND-1000) estuvieron en un rango entre 303 y 1000 ng μ L-1 (concentración de cDNA) y absorbancia (A260/280) igual a 1.8. El cDNA de un grupo de muestras al azar se observó en un gel de agarosa 1% que permitió corroborar la presencia del ácido nucleico.



Figura 4. Productos de cDNA obtenidos con PCR de muestras al azar. Los barridos indican la presencia del ácido nucleico. C: Control; T: tratado; Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) corresponde al marcador de peso molecular 1 kb.

3.5.3 Despliegue diferencial por RAPDs

Se obtuvieron fragmentos de cDNA desde 0.1 hasta aproximadamente 2 kb usando ambos iniciadores de PCR (Cuadro 6), difiriendo en el tamaño y numero de productos RAPD entre población, muestras tratadas y muestras sin tratamiento. Esto confirma la considerable variabilidad en la expresión génica en las abejas melíferas tras la exposición al insecticida (Figura 5, Figura 6). A manera de resumen se hace mención al número de nuevos fragmentos que se visualizaron en los geles tras la exposición al insecticida en todos los tiempos muestreados para el iniciador J20 (Cuadro 8) y el G02 (Cuadro 9).



Figura 5. Perfiles de amplificación generados con el iniciador J20. En cada carril están los productos amplificados para las muestras de abejas en cada tiempo de evaluación. C: Control; T: tratado; Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) es el marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas muestran polimorfismos aleatorios; el color verde indica productos génicos presentes en el control que no están en la muestra tratada; y el color azul indica productos nuevos presentes en muestras tratadas pero ausentes en el control. Los productos en color rojo muestran fragmentos monomórficos presentes en ambas condiciones.

Población	T1	T2	Т3	T4	T5
1	6	7	6	-	5
2	6	8	6	3	3

Cuadro 8. Cuantificación de fragmentos detectados de novo tras la exposición al insecticida flupyradifurona de abejas melíferas evaluadas con el iniciador J20

-: Muestra ausente



Figura 6. Perfiles de amplificación generados con el iniciador G02. En cada carril están los productos amplificados para las muestras de abejas en cada tiempo de evaluación. C: Control; T: tratado; Tiempos de evaluación tras la exposición, 1: 0.5 h; 2: 1 h, 3: 3 h; 4: 6 h y 5: 24 h. (MM) es el marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas muestran polimorfismos aleatorios; el color verde indica productos génicos presentes en el control que no están en la muestra tratada; y el color azul indica productos nuevos presentes en muestras tratadas pero ausentes en el control. Los productos en color rojo muestran fragmentos monomórficos presentes en ambas condiciones.

Población	T1	T2	Т3	T4	T5
1	-	2	8	4	2
2	10	-	13	15	4

Cuadro 9. Cuantificación de fragmentos detectados de novo tras la exposición al insecticida flupyradifurona de abejas melíferas evaluadas con el iniciador G02

-: Muestra ausente

3.6 Discusión

El análisis de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) desarrollado por Williams et al., 1990, es una técnica que se puede utilizar para analizar y detectar las alteraciones del DNA, en este caso, a causa de productos químicos (Mahmoud & Kamel, 2019). Estudios han mostrado el uso de ésta para examinar y estimar la variación en el DNA en estudios de xenobióticos en un organismo marino (Rocco et al., 2014). Los agentes xenobióticos no solo alteran la integridad del genoma, sino que también pueden afectar directa o indirectamente la expresión de los genes (Shugart & Theodorakis, 1994) que se observan por los cambios en los perfiles de fragmentos; es decir, la huella "dactilar" del DNA, refleja dichas alteraciones (Atienzar et al., 2002).

Atienzar et al. (2002) plantean que los cambios que ocurren en los perfiles de expresión de RAPDs tras un tratamiento genotóxico incluyen variación en la intensidad del fragmento, así como ganancia o pérdida de estos; igual a lo que ocurrió en los resultados de este estudio, los cuales podrían estar causados por la alteración en la regulación de los genes expresados en los diferentes tiempos de evaluación. No obstante, la interpretación de los sucesos moleculares que originan las diferencias en los fragmentos de cDNA no es fácil, debido a que diferentes alteraciones (propias del metabolismo en el tiempo, xenobioticas y genotóxicas) pueden inducir cambios en la expresión. Un estudio reciente muestra nuevos hallazgos sobre el impacto en la fisiología de las abejas tras la exposición a dosis de flupyradifurona (FPF) debido al estrés que experimentan (Chakrabarti et al., 2020). El estrés oxidativo ocurre en los organismos cuando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) supera los mecanismos de defensa antioxidantes del cuerpo (Velki et al., 2011), lo que podría dar como resultado un daño en los sistemas biológicos. En consecuencia, lograrían manifestarse deficiencias fisiológicas y daños en macromoléculas importantes, incluido el DNA, interrumpiendo así procesos biológicos vitales (Harwell, 2007).

Los resultados aquí presentados, pueden sugerir la inducción de este tipo de estrés oxidativo a causa del FPF en las abejas melíferas evaluadas, ya que podría ser en parte causante de las alteraciones observadas en los perfiles amplificados por RAPDs. La presencia de fragmentos detectados de novo en comparación con el control desde el primer tiempo de evaluación (0.5 h), puede

indicar la activación de mecanismos de defensa inmediatos en el organismo tales como enzimas desintoxicantes, neurotransmisores y antioxidantes primarias, en respuesta a la presencia del genotóxico en su sistema. Los fragmentos que se observan de manera continua en muestras tratadas y en las no tratadas, son productos que tienen funciones en el metabolismo básico celular y se denominan genes constitutivos.

Los resultados variables en los fragmentos expresados entre poblaciones obtenidos en este estudio podrían también indicar modificaciones en el organismo de las abejas melíferas como consecuencia de la edad de las mismas, y de su propia genética porque durante el ensayo no fue un factor controlado. Esto se podría confirmar debido a estudios que demuestran como el metabolismo de insectos ha mostrado una fluctuación en la síntesis general de biomoléculas, producto del envejecimiento de los individuos dependiente de la especie de insecto y el tipo de molécula producida (Rockstein & Miquel, 1973).

Sin embargo, son necesarios estudios más específicos al menos para genes de respuestas primarias, con el fin de corroborar esta información. Esta evaluación soporta el uso de RAPD-PCR como una técnica preliminar útil para monitorear la variación y la regulación positiva o negativa en la expresión de los genes en insectos tras la exposición a un insecticida.

3.7 Conclusiones

La evaluación con la técnica RAPDs mostró variación en los perfiles de la expresión génica en adultos de edades mixtas de *A. mellifera* tras la exposición a una dosis subletal de flupyradifurona.

Dada la implicación de los insecticidas en la salud de las abejas, es importante ampliar la comprensión sobre las alteraciones génicas y posibles efectos negativos de éstos en las poblaciones de abejas melíferas.

3.8 Literatura citada

Al Naggar, Y., & Baer, B. (2019). Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival

and immunity in the honeybee (Apis mellifera). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56224-1

- Atienzar, F. A., Venier, P., Jha, A. N., & Depledge, M. H. (2002). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 521(1–2), 151–163. https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00216-4
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., & Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto[™] (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (Apis mellifera L.). *PLOS ONE*, *15*(5), e0233033. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233033
- Chakrabarti, P., Sarkar, S., & Basu, P. (2018). Field Populations of Wild Apis cerana Honey Bees Exhibit Increased Genetic Diversity Under Pesticide Stress Along an Agricultural Intensification Gradient in Eastern India. *Journal* of Insect Science, 18(3). https://doi.org/10.1093/JISESA/IEY042
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, 7(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151
- Diaz Meraz, R. A. (2015). Efecto de seis plaguicidas sobre mortalidad en dos especies de abejas: Apis mellifera y Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Apidae). Escuela Agrícola Panamericana.
- Dix, H. M. (1981). Environmental Pollution. *The Institute of Environmental Science Series*.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP. (2010). Efficacy evaluation of plant protection products: Side-effects on honeybees. *EPPO Bulletin*, 40(3), 313–319. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02418.x
- Harwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, *35*(5), 1147–1150. https://doi.org/10.1042/BST0351147
- Hesselbach, H., & Scheiner, R. (2018). Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23200-0
- Hesselbach, H., & Scheiner, R. (2019). The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology*, *28*(3), 354–366. https://doi.org/10.1007/s10646-019-02028-y
- Mahmoud, S. H., & Kamel, A. S. (2019). RAPD-PCR analysis and gene expression of Cytochrome P450 in Tribolium castaneum adults in response to different insecticides. In *CATRINA* (Vol. 19, Issue 1). Egyptian Society for Environmental Sciences. https://doi.org/10.12816/CAT.2019.47459

- Pozdnyakov, V. N., Kakpakov, V. T., Abramova, A. B., Borodachev, A. V, & Krivtsov, N. I. (2000). RAPD markers of three breeds of honeybee Apis mellifera. Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections, 372, 309–311. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10944732
- Quiroga-Murcia, D. E., Zotti, M. J., Zenner de Polanía, I., & Pech-Pech, E. E. (2017). Toxicity evaluation of two insecticides on tetragonisca angustula and scaptotrigona xanthotricha (Hymenoptera: Apidae). *Agronomia Colombiana*, *35*(3), 340–349. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.65447
- Rocco, L., Valentino, I. V., Scapigliati, G., & Stingo, V. (2014). RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from Dicentrarchus labrax. *Cytotechnology*, *66*(3), 383–393. https://doi.org/10.1007/s10616-013-9586-y
- Rockstein, M., & Miquel, J. (1973). AGING IN INSECTS. In *The Physiology of Insecta* (pp. 371–478). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-591601-1.50013-2
- Shugart, L., & Theodorakis, C. (1994). Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, *102*(suppl 12), 13–17. https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1213
- Suazo, A., McTiernan, R., & Hall, H. (1998). Differences between African and European honey bees (Apis mellifera L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Heredity*, 89(1), 32–36. https://doi.org/10.1093/jhered/89.1.32
- Tosi, S., & Nieh, J. C. (2019). Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto[®]), on honeybees. *Proceedings* of the Royal Society B: Biological Sciences, 286(1900), 20190433. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433
- Tranque, P., Hu, M. C. Y., Edelman, G. M., & Mauro, V. P. (1998). rRNA complementarity within mRNAs: A possible basis for mRNA-ribosome interactions and translational control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(21), 12238–12243. https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12238
- U. S. Environmental protection agency (USEPA). (2014). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960). https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2013-0226-0010
- Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., & Socha, R. (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 172(1), 77–84. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.009

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V.

(1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, *18*(22), 6531–6535. https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531

Yogesh, K., & Khan, M. S. (2014). Genetic variability of European honey bee, Apis mellifera in mid hills, plains and tarai region of India. *African Journal of Biotechnology*, *13*(8), 916–925. https://doi.org/10.5897/ajb2013.13142

4 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A FLUPYRADIFURONA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA EN ABEJAS MELIFERAS

EFFECT OF FLUPYRADIFURONE EXPOSURE ON RELATIVE GENE EXPRESSION IN HONEY BEES

4.1 Resumen

Los servicios ecosistémicos que llevan a cabo las abejas les hacen estar expuestas a xenobióticos naturales y sintéticos, incluidos los plaguicidas. Como respuesta la industria ha desarrollado compuestos más seguros, entre los que se encuentra la flupyradifurona. Sin embargo, investigaciones recientes proporcionan evidencia de los efectos de este y su posible influencia en el deterioro de la salud de los polinizadores. Durante el experimento, obreras de edades mixtas de Apis mellifera procedentes de dos poblaciones diferentes, fueron expuestas a una dosis subletal (645 ng/abeja) de Flupyradifurona y se evaluaron durante el primer día tras la exposición: 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas. Se determinó la alteración de la expresión génica con PCR en tiempo real, ocasionada tras la exposición y los cambios en la actividad enzimática relacionada con tres genes antioxidantes primarios (CAT, SOD1 y Trxr1), un gen de detoxificación (CYP9Q3) y un gen con actividad neuronal (AChE1), lo cual permitió estimar el impacto fisiológico de la respuesta a la exposición del insecticida. Los resultados indican que el insecticida causa alteración en la expresión relativa de los cinco genes objetivo, inhibiéndolos o sobre expresándolos causando una posible modificación en la respuesta metabólica. Se concluyó que la flupyradifurona causa alteración en la expresión de genes en individuos de abejas melíferas tras la exposición oral, lo cual podría causar a largo plazo un efecto adverso en la salud de las colmenas.

4.2 Abstract

The ecosystem services that bees carry out expose them to natural and synthetic xenobiotics, including pesticides. In response, industry has developed safer compounds, including flupyradifuron. However, recent research provides evidence of the effects of this and its possible influence on the deterioration of the health of pollinators. During the experiment, mixed-age workers of *Apis mellifera* from two different populations were exposed to a sublethal dose (645 ng / bee) of Flupyradifurone and were evaluated during the first day after exposure: 0.5, 1, 3, 6 and 24 hours. Alteration of gene expression was determined with real-time PCR, caused after exposure, and changes in enzyme activity related to three primary antioxidant genes (CAT, SOD1, and Trxr1), a detoxification gene (CYP9Q3), and a gene with neuronal activity (AChE1), which made it possible to estimate the physiological impact of the response to insecticide exposure. The results indicate that the insecticide causes alteration in the relative expression of the five target genes, inhibiting or overexpressing them causing a possible modification in the metabolic response. It was concluded that flupyradifuron causes alteration in the

expression of genes in individuals of honey bees after oral exposure, which could cause a long-term adverse effect on the health of hives.

4.3 Introducción

Los organismos vivos poseen diferentes mecanismos que se activan en respuesta a las efectos adversos de toxinas sin importan su origen (Rand et al., 2015). Los insectos pueden estar expuestos a agentes oxidantes endógenos y exógenos incluidos los insecticidas, capaces de alterar el sistema antioxidante celular y producir daños a las biomoléculas. Estos organismos controlan el impacto del estrés oxidativo mediante la activación de sistemas de protección que les permiten la adaptación al entorno (Maero & Anguiano, 2018).

Apis mellifera es una especie polinizadora ecológica y económicamente importante en el mundo (Rand et al., 2015). La disminución de sus poblaciones en los últimos años ha propiciado múltiples estudios sobre los factores que influyen en su sobrevivencia (Diaz Meraz, 2015; González-Varo et al., 2013; Vanbergen et al., 2013) y aunque no se ha identificado una causa única para la perdida de individuos, los insecticidas neurotóxicos sobresalen debido a su amplio uso en los sistemas agrícolas (Godfray et al., 2014; Macias et al., 2018).

Dentro de estos, se destacan los neonicotinoides, compuestos similares a la nicotina que actúan en forma sistémica y se pueden generar residuos en el néctar y el polen de flores exponiendo a las abejas que se alimentan de éstas (Blacquière et al., 2012). La exposición subletal a insecticidas de este tipo, puede provocar efectos en el comportamiento, la cognición y en general la salud de las abejas (Bryden et al., 2013; Gregorc et al., 2018; Hernandez et al., 2018; Williamson & Wright, 2013). En consecuencia, se ha propiciado el desarrollo de nuevas moléculas (Parkinson et al., 2020), compuestos como el flupyradifurona (FPF) se presenta como una alternativa más segura (Campbell et al., 2016). Pero dado que de forma similar a los neonicotinoides, FPF es un agonista del receptor nicotínico de acetilcolina (Nauen et al., 2015), se podrían prever efectos nocivos similares a los reportados para estos. Investigaciones recientes proporcionaron evidencia empírica de que episodios de exposición a dosis subletales de

insecticidas, alteran la expresión de varios genes inmunes y de desintoxicación, y en consecuencia conducen a la disminución generalizada en la salud de las abejas (Al Naggar & Baer, 2019).

Puesto que la incursión en el mercado de FPF es relativamente reciente, los datos existentes se centran principalmente en evaluar los efectos del mismo sobre la mortalidad y las capacidades cognitivas de las abejas (Al Naggar & Baer, 2019; Glaberman et al., 2014; Hesselbach & Scheiner, 2019; Tan et al., 2017; Tosi & Nieh, 2019). Por esta razón, el objetivo de este estudio fue medir la variación en la expresión génica de cinco genes específicos involucrados en diferentes actividades metabólicas en función del tiempo de exposición de individuos de *A. mellifera* a FPF.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Colonias de A. mellifera

Para el desarrollo del estudio se obtuvieron dos colonias de *A. mellifera* de 200 abejas cada una provenientes del municipio de Texcoco de Mora, Estado de México, separadas entre sí por aproximadamente 3 km (Figura 7). La población 1 fue recolectada en un predio del Molino de las flores (Latitud: 19.514114, Longitud: -98.844139) y la población 2 en el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (Latitud: 19.495449, Longitud: -98.876366). Las abejas se mantuvieron bajo condiciones de cautiverio en el laboratorio. El protocolo para su mantenimiento durante el ensayo fue tomado de la guía para evaluar los efectos secundarios de los productos fitosanitarios en las abejas (European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP, 2010). Las abejas recolectadas fueron puestas en jaulas de madera y alimentadas con una solución de sacarosa 50%, se mantuvieron en completa oscuridad para simular las condiciones.



Figura 7. Origen de las poblaciones de abejas utilizadas en el presente estudio. El mapa corresponde al municipio de Texcoco de Mora; El color amarillo indica el lugar de origen de la población 1 (Molino de las flores). El color rojo indica el origen de la población 2 (Campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo).

4.4.2 Insecticida evaluado en obreras de A. mellifera

El producto químico fue obtenido en una tienda local de insumos agrícolas. La concentración utilizada se seleccionó con base en estudios previos y la hoja de seguridad del producto. Al evaluar dosis subletales las concentraciones deben estar muy por debajo de la toxicidad aguda, por esto, esta fue al menos 10 veces más baja que las DL₅₀ por exposición oral (alimento contaminado) publicadas. La concentración usada durante este experimento fue de 645 ng / abeja de FPF, similar a la reportada por Al Naggar & Baer (2019).

4.4.3 Bioensayo: Pruebas de alimentación

El método de tratamiento de alimentación fue utilizado para simular la exposición alimentaria en las colmenas. Las poblaciones de abejas fueron separadas en dos grupos, el control (alimentado con sacarosa 50%) y el experimental (alimentado con sacarosa 50% y FPF 645 ng/abeja). Mediante pruebas de consumo de solución de sacarosa previas al inicio del bioensayo, se determinó el consumo promedio por abeja en 20 µL. Se mantuvieron en inanición durante 2 h antes de suministrar las soluciones para alimentación y posteriormente fueron expuestas a alimentación grupal, en donde las abejas compartieron la solución entre ellas,

y por lo tanto recibieron dosis similares (Quiroga-Murcia et al., 2017). El grupo experimental fue alimentado por única vez durante 3 h con la solución respectiva. Luego del tratamiento de alimentación se proporcionó solución fresca de sacarosa *ad libitum* y se cambió al menos una vez durante el tiempo de evaluación. Las muestras para las mediciones respectivas de los genes fueron tomadas en 5 tiempos: 0.5 horas, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas después de la alimentación y se conservaron en nitrógeno líquido para el análisis posterior.

4.5 Estimación de la expresión genética relativa en abejas melíferas

4.5.1 Extracción de RNA

Se purificó RNA total en tres repeticiones biológicas de las abejas considerando el cuerpo completo en las dos poblaciones, tanto para controles y tratadas en cada uno de los cinco tiempos: 0.5 horas, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas después de la alimentación (2 poblaciones x 2 tratamientos x 3 repeticiones x 5 tiempos = 60 muestras totales) utilizando el kit PureLink[™] RNA Mini Kit (Invitrogen, EUA). Cada muestra (repetición biológica) de RNA estaba conformada por tres individuos. Las muestras se maceraron con la ayuda de nitrógeno líquido en un mortero estéril. El polvo obtenido fue transferido a un tubo de microcentrífuga y se agregó un mL de buffer de lisis preparado con 0.2 % de 2-β- mercaptoetanol. Los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron durante tres minutos a temperatura ambiente. Después, se mezclaron con ayuda de una micropipeta y posteriormente fueron centrifugados a 13,000 RPM durante dos minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregó un volumen de etanol 75% y se mezclaron con un pulso en vórtex. A continuación, se transfirieron 700 µL de la muestra al cartucho de centrifugado (con un tubo de recolección) y se centrifugó a 13,000 RPM durante 45 segundos a temperatura ambiente. El flujo se desechó y se repitió el paso anterior hasta terminar la muestra. Posteriormente, se agregaron 700 µL de buffer de lavado I al cartucho de centrifugado y se centrifugó a 13,000 RPM durante 35 segundos. Se agregaron 500 µL de buffer de lavado II al cartucho de centrifugado y se centrifugó a 13,000 RPM durante 35 segundos. El paso anterior fue repetido una

vez más, y posteriormente los tubos de recolección fueron centrifugados a 13,000 RPM durante un minuto. Finalmente, se agregaron 50 µL de agua libre de RNasa al centro del tubo, se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos y se centrifugó durante un minuto a 13,000 RPM.

4.5.2 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), una vez obtenido el RNA en cantidad y calidad adecuada, se utilizó el kit de Thermo Scientific (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit). En un tubo Eppendorf estéril libre de nucleasas se preparó una mezcla con 1 μ L del iniciador Oligo (dT) ₁₈ y 11 μ L de RNA de cada muestra, y se incubó a 65 °C por cinco minutos en un termoblock Labnet D - 1200. Después se añadieron 4 μ L de Buffer Reaction (5X), 1 μ L de RiboLock RNase Inhibitor (20 U / μ L), 2 μ L de dNTP Mix (10 mM), 1 μ L de RevertAid M - MuLV RT (200 U / μ L) para un volumen final de 20 μ L. Los tubos fueron incubados por 60 minutos. Por último, se ajustó la concentración de las muestras de cDNA a 20 ng / μ L en un volumen final de 100 μ L.

4.5.3 Determinación de la calidad y cantidad de RNAs y cDNAs

La cuantificación del RNA y cDNA se realizó por espectrofotometría con absorbancia de luz UV a una longitud de onda de 260 nm en un Espectrofotómetro NanoDrop® (ND 1000 V.3.5.2 Thermo Scientific, USA), utilizando 2 µL de la muestra stock. Para observar la presencia e integridad de ambos ácidos nucleicos se utilizó un gel de agarosa 1%, en donde se colocaron muestras representativas de RNA y cDNA de los 5 tiempos a evaluar.

4.5.4 Determinación de la expresión génica asociada con la exposición a flupyradifurona

Se usó PCR cuantitativa de transcripción inversa de dos pasos (RT-qPCR) para cuantificar la expresión de los 5 genes de interés (Cuadro 6). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µL que contenía 5 µL SsoAdvancedTM Universal SYBR® Green Supermix, 1 µL de cada iniciador y 50 ng de cDNA. Las condiciones de termociclaje (CFX96 Deep Well, BioRad, EE.UU.) fueron las siguientes: 1 ciclo de 1.5 minutos a 95 °C, 39 ciclos (95 °C durante 15 segundos

para desnaturalización; una etapa de alineamiento y extensión de 60 °C durante 30 segundos). Para cada gen, se realizó el análisis de Melt-Curve usando los incrementos y tiempos prestablecidos en el equipo. Los genes objetivo se normalizaron en todas las ejecuciones de RT-qPCR utilizando el gen de referencia RPS18 (endógeno), este gen codifica la proteína ribosómica 18S del cual se conoce su estabilidad en los tejidos de abejas (Scharlaken et al., 2008).

Serie	Gen	Función	Proteína	Iniciador (Tiempo real)	Tam amp	año del licon
1	RPS18	Componente ribosomal 18S	Similar a la proteína ribosómica S18	F: GATTCCCGATTGGTTTTTGA R: CCCAATAATGACGCAAACCT	15 2	(Moon et al., 2018)
2	AChE 1	Actividad neuronal de las sinapsis colinérgicas	Acetilcolinesteras a	F: GACGCGAAGACCATATCCGT R: TCTGTGTCCTTGAAGTCCGC	15 0	(Alburak i et al., 2017)
3	CAT		Catalasa	F:TCCACTCATTCCTGTTGGTAAG R: GCCGGATCGAAGGCTATTT	87	(Gregor c et al., 2018)
4	SOD 1	Antioxidante s primarios	Superóxido dismutasa 1	F:CGTTCCGTGTAGTCGAGAAAT R: GGTACTCTCCGGTTGTTCAAA	10 1	/
5	Trxr1	6 F	Thioredoxin dismutasa	F: GCAAGTACTGTTGCCCAGGA R:GTGTTTGTCTATCTTTATCCACCC A	13 0	(Alburak i et al., 2019)
6	CYP9Q3	Metabolismo o desintoxicaci ón de toxinas (Li et al., 2007)	Citocromo P450	F: GTTCCGGGAAAATGACTAC R: GGTCAAAATGGTGGTGAC	10 7	(Mao et al., 2011)

Cuadro 10. Descripción de los genes utilizados en el presente estudio

4.5.5 Análisis de datos

Los datos de Cq (ciclos de amplificación) obtenidos a través de la qPCR fueron utilizados para calcular la expresión relativa de cada gen con la ecuación 1:

$$\Delta\Delta Ct = 2 - ((CqGOI - CqRef) Exp - (CqGOI objetivo - CqRef) Ctl)$$

(1)

Ecuación para el cálculo de la expresión relativa en la qPCR (1). Donde Ctl es el grupo control; Exp es el grupo de tratamiento experimental; GOI es el gen de interés y Ref es el gen de referencia.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con SAS 9.4 para Windows. Para ver los efectos de la exposición al insecticida en la expresión
génica, se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribuciones normales.

4.6 Resultados

4.6.1 Extracción de RNA y cDNA de las muestras

El protocolo que se utilizó para la extracción del RNA de muestras de abejas melíferas fue efectivo, ya que permitió aislar exitosamente al RNA total. La cantidad de cDNA obtenida fue suficiente para permitir llevar acabo las amplificaciones mediante q-PCR.

4.6.2 Determinación de la calidad del RNA y cDNA

Los valores registrados con el NanoDrop (ND-1000) estuvieron en un rango entre 178.6 y 436 ng μ L⁻¹ (concentración de RNA) y absorbancia (A260/280) igual a 2.1. Así como un rango entre 303 y 1000 ng μ L⁻¹ (concentración de cDNA) y absorbancia (A260/280) igual a 1.8. El RNAm y el correspondiente cDNA (Figura 9) de un grupo de muestras al azar se observó en un gel de agarosa 1 % que permitió corroborar la presencia de los ácidos nucleicos.



Figura 8. Perfil de muestras al azar de RNA. La línea en amarillo muestra el RNA correspondiente a la subunidad ribosomal 18S (1900 pb), corroborando la presencia de RNA en todas las muestras. RNA Control (C), RNA Tratado (T); Tiempos de evaluación tras la exposición, T1: 0.5 h; T2: 1 h, T3: 3 h; T4: 6 h y T5: 24 h. (MM) corresponde al marcador de peso molecular 1 kb.



Figura 9. Productos de cDNA obtenidos con PCR de muestras al azar. Los barridos indican la presencia del ácido nucleico. C: Control; T: tratado; Tiempos de evaluación tras la exposición, T1: 0.5 h; T2: 1 h, T3: 3 h; T4: 6 h y T5: 24 h. (MM) corresponde al marcador de peso molecular 1 kb.

4.6.3 Determinación de la expresión génica asociada con la exposición a flupyradifurona

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una técnica que permite cuantificar el número de copias que se están generando en cada ciclo de amplificación mediante un termociclador acoplado a un espectrofluorómetro; además, hace uso de un agente intercalante fluorescente (como el SYBR Green), cuya fluorescencia se aumenta proporcionalmente con el aumento en la cantidad de DNA (De Alba & Rueda, 2013). Los datos del Cq (Ciclo de cuantificación) se refieren al número de ciclos en los cuales se comienza a detectar las moléculas del gen objetivo en la muestra; valores de Cq más bajos significan números de copias iniciales más altos del gen de interés (Figura 10). Al terminar cada ciclo de prueba para cada gen objetivo, se realizó el análisis de Melt-Curve (curva de disociación) para confirmar la amplificación especifica de cada gen y la no formación visible de iniciador – dímero.

		Gen / Tipo							Cq				
		AChE		CAT		CYP913		SOD		Trxr			
Poblacion	Tiempo	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	18,90	29,00
P1	T1	27,20	26,60	24,60	24,00	19,90	19,50	21,60	21,20	24,10	23,70		
	T2	28,40	26,40	24,10		21,60	19,80	22,40	19,90		22,50		
	T3	27,90	26,00	25,30	23,80	23,60	20,50	22,30	20,90	25,30	23,30		
	T4	27,20	28,30	24,90	27,40	22,70	27,30	24,10	24,40	24,40	27,70		
	T5	27,20	28,30	25,50	22,80	19,80	20,49	20,80	20,80		21,90		
P2	T1	26,90	27,10	23,20	22,80	19,90	20,20	20,90	21,20	23,30	22,80		
	T2	27,00	25,20	22,30	21,30	20,20	18,90	20,50	19,90		20,90		
	T3	26,70	29,00	25,40	25,40	21,70	24,70	24,40	20,90		26,00		
	T4	27,50	28,40		25,40	22,60	24,90	23,60	24,40		27,60		
	T5	25,50	27,80	21,70		19,30	21,80	20,80	20,80	21,20	23,00		

Figura 10. Mapa de calor de los ciclos de amplificación para todas las muestras evaluadas durante el estudio, distribuidas por tipo de muestra (tratada / control), población y tiempo de muestreo. T1: 0.5 h; T2: 1 h; T3: 3 h; T4: 6 h; T5: 24 h después de exposición.

Previo al inicio de la cuantificación de los genes objetivo, los fragmentos correspondientes a los genes (amplicones) se amplificaron con PCR punto final y se separaron en un gel de poliacrilamida 6% para corroborar el tamaño del



amplicon de cada uno (Cuadro 10,

Figura 11).



Figura 11. Longitud del amplicon de los 5 genes en estudio y el gen endógeno. Los marcadores de peso molecular fueron de 1kb y 100 pb. *C: Control; *T: Tratado.

Para la cuantificación relativa de la expresión de los genes en estudio con qPCR, las muestras de RNA extraídas de tres réplicas biológicas se utilizaron como molde. Luego de obtener los Cq de todas las muestras para cada gen, se utilizó la fórmula 2 -ΔΔCt utilizando como normalizador el gen RPS18.

Para el primer tiempo de muestreo (0.5 h) luego de la exposición al insecticida para la población 1 (P1), los genes AChE1, CAT, Trxr1 y CYP9Q3 tuvieron una regulación positiva en 1.20, 1.42, 0.96 y 0.26 veces respectivamente; mientras que, el gen SOD1 fue regulado negativamente en - 0.14 veces (Figura 12a). En el segundo tiempo de muestreo (1 h) después de la exposición, AChE1, SOD1, Trxr1 y CYP9Q3 fueron sobre expresados 3.07, 0.98, 0.70 y 0.56 veces, entre tanto el gen CAT fue sub expresado - 1.83 veces (Figura 12b). Durante el tercer tiempo de muestreo (3 h) luego de la exposición todos los genes fueron regulados positivamente (Figura 12c). AChE1 3.13 veces, CAT 1.39 veces, SOD1 2.22 veces, Trxr1 3.09 veces y CYP9Q3 7.79 veces.

En el cuarto tiempo muestral, (6 h) después de exposición los genes CAT, SOD1, Trxr1 y CYP9Q3 fueron regulados negativamente en -3.23, -54.46, -7.18 y -15.22 veces, en tanto AChE1 fue regulado positivamente en 1.08 veces (Figura 12d). Para el último tiempo de muestreo (24 h), los genes SOD, Trxr1 y CYP9Q3 tuvieron una regulación positiva 0.67, 4.96 y 1.59 veces, mientras que AChE1 y CAT fueron regulados negativamente en -7.36 y - 9.84 veces (Figura 12e). El análisis estadístico usando medias ajustadas por mínimos cuadrados (Ismeans) para la población 1 (Figura 12), no muestran diferencia estadística significativa (p = 0.05) cuando se analiza el conjunto de genes en cada tiempo a excepción del gen CYP9Q3 evaluado a las 3 h y 6 h después de exposición.





Al analizar la expresión relativa de los genes en la P1, se observa una regulación génica positiva en todos los genes en estudio cuando se evaluaron las muestras luego de 3 h de exposición al insecticida. Entre tanto, una regulación negativa se hace presente en todos los genes excepto en el gen de la AChE1 cuando se estiman los valores luego de 6 h de exposición (Cuadro 11).

Gen	Función	Regulación (Positiva + / Negativa -)						
Cen	i diloion	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h		
AChE 1	Neurotransmisor	+	+	+	+	-		
CYP9Q3	Desintoxicación	+	+	+	-	+		
CAT	Antioxidante	+	-	+	-	-		
SOD 1	1 Antioxidante		+	+	-	+		
Trxr1	Antioxidante	+	+	+	-	+		

Cuadro 11.	Expresión génica	relativa en la	i población 1	de A.	mellifera	causada
por la expos	ición a la flupyradi	furona				

Para la población 2 (P2), en el primer tiempo de muestreo (0.5 h) después de la exposición al insecticida, los genes Trxr1 y SOD1 tuvieron una regulación positiva en 0.75 y 0.08 veces respectivamente, mientras que los genes AChE1, CAT y CYP9Q3 fueron regulados negativamente en -2.99, -3.06 y - 7.42 veces para cada gen (Figura 13.. Análisis de la expresión génica relativa para los genes en estudio durante cada tiempo muestreado luego de exposición a la flupyradifurona en la población 2. Los datos fueron calculados usando el método 2 -ΔΔCt (ΔCt gen objetivo - Δ Ct gen endógeno). Los tiempos a: 0.5 h después de exposición; b: 1 h después de exposición; c: 3 h después de exposición; 6 h después de exposición y e: 24 h después de exposición. Los datos fueron calculados usando el método 2 - AACt para comparar las muestras tratadas contra las no tratadas en cada tiempo de muestreo, utilizando el gen RPS18 como normalizador. Figura 13a). En el segundo tiempo de muestreo (1 h) después de la exposición los genes AChE1, CAT, Trxr1 y CYP9Q3 fueron sobre expresados 1.02, 0.53, 1.01 y 0.26 veces, en tanto el gen SOD1 fue sub expresado - 0.68 veces (Figura 13b). Para el tercer tiempo de muestreo (3 h) luego de la exposición, el gen CAT fue regulado positivamente 0.53 veces y el gen Trxr1 1.26 veces. La regulación negativa se presentó en los genes AChE1 -18.49 veces, SOD1 - 7.95 veces, y CYP9Q3 - 22.80 veces (Figura 13c). Los datos obtenidos para los genes AChE1, SOD1 y Trxr1 presentaron diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de medias ajustadas por mínimos cuadrados (Ismeans) (p = 0.05).

En el cuarto tiempo muestral (6 h) después de la exposición, todos los genes fueron regulados negativamente (Figura 13d). AChe1 -2.63 veces, CAT 1.35 veces, SOD1 - 4.35 veces, Trxr1 -73.94 veces y CYP9Q3 - 7.12 veces. De igual forma, para el último tiempo de muestreo (24 h) todos los genes se regularon negativamente. AChE1 - 1.95 veces, CAT -1.67 veces, SOD1 -0.84 veces, Trxr1 - 9.47 (Figura 13e).



Figura 13. Análisis de la expresión génica relativa para los genes en estudio durante cada tiempo muestreado luego de exposición a la flupyradifurona en la población 2. Los datos fueron calculados usando el método 2 - $\Delta\Delta$ Ct (Δ Ct gen objetivo - Δ Ct gen endógeno). Los tiempos a: 0.5 h después de exposición; b: 1 h después de exposición; c: 3 h después de exposición; 6 h después de exposición y e: 24 h después de exposición. Los datos fueron calculados usando el método 2 - $\Delta\Delta$ Ct para comparar las muestras tratadas contra las no tratadas en cada tiempo de muestreo, utilizando el gen RPS18 como normalizador.

El mismo análisis en la expresión relativa en la P2 (Cuadro 12), muestra una regulación génica positiva en todos los genes en estudio cuando se evaluaron las muestras luego de 1 h de exposición al insecticida y una regulación negativa

en todos los genes durante la evaluación después de 6 h de expuestas, similar a lo que ocurre en la P1 para el mismo tiempo.

Gen	Función	Regulación (Positiva + / Negativa -)						
Con	i diloion	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h		
AChE 1	Neurotransmisor	-	+	-	-	-		
CYP9Q3	Desintoxicación	-	+	-	-	-		
CAT	Antioxidante	-	+	+	-	-		
SOD 1	Antioxidante	+	-	-	-	-		
Trxr1	Antioxidante	+	+	+	-	-		

Cuadro 12. Expresión génica relativa de la población de estudio 2 de *A. mellifera* causada por la exposición a flupyradifurona

Al evaluar los datos obtenidos comparando las muestras tratadas contra el control inicial (T1) para cada gen, se muestran diferencias en la expresión génica relativa de estos (Figura 14). La expresión del gen neurotransmisor AChE1 (Figura 14a) mostró regulación positiva para las dos poblaciones luego de 1 h de exposición, siendo ésta de 0.7 veces y 1.5 veces para la P1 y la P2 respectivamente. El mismo gen se reguló negativamente en las dos poblaciones cuando se evaluó después de 0.5 h de exposición al insecticida, - 0.4 veces en P1 y - 1.5 veces en P2. Para las evaluaciones de 3 h y 6 h posteriores a la exposición, la P1 presentó una regulación negativa del gen sub expresándose - 5.0 y - 3.6 veces. Finalmente, en la P1 la evaluación a las 24 h luego de exposición tuvo una sub expresión del gen en - 0.16 veces y la P2 una sobre expresión en 0.8 veces.

El gen CYP9Q3 implicado en el metabolismo de desintoxicación, fue regulado positivamente 0.5 h y 24 h después de exposición en la P1 0.2 y 0.11. Entre tanto tuvo una regulación negativa para P1, 1 h, 3 h y 6 h posteriores a la exposición, en - 2.38, - 1.14 y - 44.55 veces. El gen en la P2 para todos los tiempos de

evaluación fue regulado negativamente en 0.5 h - 7.4 veces, 1 h - 1.5 veces, 3 h - 33.3 veces, 6 h -18.89 veces y 24 h -2.03 veces (Figura 14b).

El conjunto de genes antioxidantes primarios también presentó diferencias en su expresión a través de las dos poblaciones. El gen CAT se reguló positivamente en la P1 en todos los tiempos de muestreo: 0.5 h 1.4 veces, 1 h 1.4 veces, 3 h 0.86 veces, 6 h 1.67 veces y 24 h 6.5 veces. De igual forma el gen fue sobre expresado en la P2 cuando se evaluó 1 h luego de exposición en 1.5 veces. El resto de evaluación en la P2 presentó una regulación negativa: 0.5 h - 3.06 veces, 3 h - 4.5 veces, 6 h - 1.6 veces y 24 h -0.08 veces (Figura 14c)

El gen SOD1 presentó el mismo comportamiento en las dos poblaciones, aunque con valores de expresión diferentes (Figura 14d). El gen tuvo una regulación positiva durante la evaluación a 1 h, 3 h y 24 h, con 2.06, 1.62 y 2.84 en la P1, asimismo los valores de expresión se presentaron en la misma proporción con respecto a cada tiempo en la P2 en 2.11, 0.9 y 1.76 veces. La regulación negativa del gen se presentó 0.5 h y 6 h después de exposición con - 0.1 y - 1.4 veces para P1, así como -0.80 y -3.5 en P2.

De forma similar al gen SOD1, el gen Trxr1, aunque con valores de expresión diferente presentó el mismo comportamiento en las dos poblaciones (Figura 14e). Se sobre expresó al evaluar 0.5 h, 1 h, 3 h y 24 h posterior a la exposición en las dos poblaciones, 0. 95, 1.6 0.77 y 4.53 veces para P1 mientras que para P2 fue de 0.07, 2.4, 1.8 y 2.7 veces. El gen tuvo una regulación negativa para los datos obtenidos del muestreo luego de 6 h de exposición, con - 3.3 veces para P1 y - 27.9 veces para P2.



Figura 14. Análisis de la expresión génica relativa en individuos de dos poblaciones de *A. mellifera* con exposición oral a flupyradifurone luego de 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h. Los datos fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para comparar las muestras tratadas contra el control del tiempo 0 para cada gen, utilizando el gen RPS18 como normalizador. a: AChE1; b: CYP9Q3; c:CAT; d: SOD1 y e: Trxr1

4.7 Discusión

Las abejas llevan a cabo servicios ecosistémicos vitales al polinizar plantas silvestres y cultivos de importancia económica, pero al hacerlo están expuestas a una amplia variedad de xenobióticos naturales y sintéticos, incluidos los plaguicidas (Manjon et al., 2018). Compuestos como el flupyradifurona (FPF) han sido desarrollados como alternativas más seguras (Campbell et al., 2016); sin embargo, algunos estudios han mostrado los efectos subletales a nivel

fisiológico, cognitivo y genético en abejas melíferas después de la exposición (Al Naggar & Baer, 2019; Chakrabarti et al., 2020; Hesselbach & Scheiner, 2018, 2019). Con los resultados de este experimento se puede observar la modificación en la expresión génica relativa de algunos genes importantes en el metabolismo de las abejas. Este estudio informa unos de los primeros datos sobre los efectos moleculares subletales de FPF en abejas. Algunos estudios en los cuales se presenta diferencia en la expresión de diversos genes objetivo entre grupos de abejas en respuesta a otros insecticidas, se han reportado solo cuando las condiciones para los individuos varían entre experimentos en laboratorio y en campo (De Smet et al., 2017; Pettis et al., 2012), es por esto que se insinúa que los resultados diferentes aquí expuestos para cada población podrían sugerir que una de ellas en particular no induce eficazmente la respuesta metabólica hipotéticamente a causa de la edad o la composición genética dada por la distancia en las cuales fueron recolectadas.

La acetilicolinesterasa (AChE) hidroliza la acetilicolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas y por lo tanto juega un papel clave en el sistema nervioso central de los insectos (Toutant, 1989). Los butenólidos a diferencia de los piretroides y organofosforados, no se catalogan como inhibidores de la enzima AChE, pero algunos datos para insecticidas neonicotinoides que pertenecen al mismo grupo en la clasificación del IRAC, sugieren la capacidad de los agonistas del receptor nicotínico de acetilcolina para modular la actividad de la AChE (Gyori et al., 2017; Palmer et al., 2013). En la población 1 de abejas melíferas del estudio, la expresión relativa del gen AChE1 fue regulada positivamente sin diferencias estadísticas significativas (p > 0.05), contrario a lo que pasó en la población 2, que se reguló de forma negativa con diferencia estadística significativa (p=0.05) únicamente en la evaluación del gen AChE 3 h tras la exposición. Estudios en la cucaracha alemana tratada con un neonicotinoide muestran una inhibición significativa de la actividad de la AChE (Morakchi et al., 2005). En tanto, efectos opuestos fueron reportados en la aplicación de una molécula similar en abejas enjauladas elevando la actividad AChE (Boily et al., 2013). Para Gyori et al. (2017) los efectos indirectos de estos compuestos pueden contribuir al funcionamiento desequilibrado del sistema colinérgico, como consecuencia de que puede desencadenar algunos mecanismos compensatorios, incluida la modulación de la actividad AChE (Palmer et al., 2013). Los autores de un estudio en años anteriores, supusieron que debido a que los neonicotinoides ocupan el sitio de unión de la acetilcolina, este neurotransmisor se acumula en las sinapsis y estimula la enzima AChE (Gyori et al., 2017), lo cual pudo haber pasado para la población 1 en estudio luego de la exposición a FPF. De cualquier forma, la alteración y la interrupción de la señalización colinérgica por insecticidas puede alterar el funcionamiento neuromuscular y el comportamiento de las abejas, lo que perjudica el éxito de la búsqueda de alimentos que podría finalmente disminuir la salud de la colonia (Christen et al., 2019).

Las monooxigenasas del citocromo P450 catalizan una amplia diversidad de reacciones que contribuyen a la desintoxicación de xenobióticos naturales y sintéticos en insectos (Feyereisen, 2012). El clado CYP9 al cual pertenece el gen CYP9Q3 implicado en la desintoxicación metabólica, fue afectado por la dosis a baja concentración de FPF. La población 1 mostró inducción en la expresión del gen en respuesta a la exposición desde el primer tiempo de evaluación que fue 0.5 h después de la ingestión del insecticida, lo cual comprueba que la exposición a dosis subletales de un insecticida puede desencadenar una respuesta genética inmediata. Entre tanto, la población 2 tuvo una regulación a la baja luego de la exposición; estudios demuestran que la vulnerabilidad de individuos de A. mellifera a diferentes insecticidas, radica en que posee alrededor de la mitad de genes CYP que otros insectos modelo (Weinstock et al., 2006), lo cual podría sugerir que ésta a diferencia de la P1 fuera más susceptible a FPF. Las transcripciones diferenciales que inducen el CYP9 por algunos pesticidas es un atributo que las abejas comparten con otras especies de insectos (Mao et al., 2011). En Helicoverpa armigera, la deltametrina induce la transcripción de dos miembros de la subfamilia CYP9A, aunque aún no se han definido sus funciones (Zhou et al., 2010). Que CYP9Q3 en la abeja melífera sea inducido selectivamente por flupyradifurona significa que la transcripción de éste podría ser útil en el desarrollo de estrategias para el monitoreo de abejas expuestas a insecticidas, pero se necesitan más estudios.

Los insectos poseen un conjunto de enzimas antioxidantes y antioxidantes de pequeño peso molecular que pueden formar una respuesta frente la presencia de oxidantes exógenos y producidos de forma endógena (Felton & Summers, 1995). El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) potencialmente destructivas excede las propias defensas antioxidantes naturales del cuerpo, resultando en daño al organismo o incluso en su muerte (Pham-Huy et al., 2008). Si no se regula adecuadamente el exceso de ROS puede dañar los lípidos, las proteínas o el DNA de las células, inhibiendo sus funciones naturales (Velki et al., 2011). Es bien sabido que los pesticidas pueden inducir estrés oxidativo y generar ROS; sin embargo, las células tienen diferentes mecanismos para aliviar el estrés producido y reparar macromoléculas dañadas (Verma et al., 2007). Durante el estudio, la exposición a FPF provocó la sobre expresión de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y tioredoxin dismutasa (Trxr) durante algunos tiempos evaluados. Estas enzimas han demostrado ser significativamente afectadas por la exposición a plaguicidas (Verma et al., 2007). La regulación positiva de éstas denota: primero, que la FPF causa estrés oxidativo como respuesta específica a la toxina en concordancia con lo reportado por Chakrabarti et al. (2020). Y segundo, que el aumento en la expresión de éstas es consistente con lo que ocurre a nivel celular, puesto que su expresión alterada puede indicar la activación de mecanismos de protección involucrados en los procesos de reparación celular, debido a que estas enzimas son la primera línea de defensa para la eliminación de O_2 (Qi et al., 2018). El hecho de que la expresión relativa de estas enzimas mostrara una tendencia a una regulación a la baja 6 h después de la exposición, podría indicar la regulación interna del organismo tras la exposición y la respuesta compensatoria frente a esta.

4.8 Conclusiones

Los datos presentados muestran como la exposición de *A. mellifera* a FPF causa alteración en la expresión génica relativa suprimiendo o sobre expresando los genes en estudio.

El resultado de este estudio sugiere un uso seguro del insecticida en cultivos donde se usa *A. mellifera* para polinización o en áreas circundantes a donde se practica apicultura.

Para estudios futuros, el análisis de la expresión de los genes 3 h luego de exposición oral en individuos adultos de abejas melíferas podría aportar información importante sobre el metabolismo de estos.

4.9 Literatura citada

- Al Naggar, Y., & Baer, B. (2019). Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (Apis mellifera). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56224-1
- Alburaki, M., Smith, K. D., Adamczyk, J., & Karim, S. (2019). Interplay between Selenium, selenoprotein genes, and oxidative stress in honey bee Apis mellifera L. *Journal of Insect Physiology*, 117. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103891
- Alburaki, M., Steckel, S. J., Chen, D., McDermott, E., Weiss, M., Skinner, J. A., Kelly, H., Lorenz, G., Tarpy, D. R., Meikle, W. G., Adamczyk, J., & Stewart, S. D. (2017). Landscape and pesticide effects on honey bees: forager survival and expression of acetylcholinesterase and brain oxidative genes. *Apidologie*, 48(4), 556–571. https://doi.org/10.1007/s13592-017-0497-3
- Blacquière, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A. M., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. In *Ecotoxicology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 973–992). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (Apis mellifera) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5603–5614. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2
- Bryden, J., Gill, R. J., Mitton, R. A. A., Raine, N. E., & Jansen, V. A. A. (2013). Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecology Letters*, *16*(12),

1463–1469. https://doi.org/10.1111/ele.12188

- Campbell, J. W., Cabrera, A. R., Stanley-Stahr, C., & Ellis, J. D. (2016). An Evaluation of the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Safety Profile of a New Systemic Insecticide, Flupyradifurone, Under Field Conditions in Florida. *Journal of Economic Entomology*, 109(5), 1967–1972. https://doi.org/10.1093/jee/tow186
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., & Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto[™] (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (Apis mellifera L.). *PLOS ONE*, *15*(5), e0233033. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233033
- Christen, V., Joho, Y., Vogel, M., & Fent, K. (2019). Transcriptional and physiological effects of the pyrethroid deltamethrin and the organophosphate dimethoate in the brain of honey bees (Apis mellifera). *Environmental Pollution*, 244, 247–256. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.030
- De Alba, D., & Rueda, A. (2013). Problema bioquímico: Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Rev. Educ. Bioquím*, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952013000100006
- De Smet, L., Hatjina, F., Ioannidis, P., Hamamtzoglou, A., Schoonvaere, K., Francis, F., Meeus, I., Smagghe, G., & de Graaf, D. C. (2017). Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171529. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171529
- Diaz Meraz, R. A. (2015). Efecto de seis plaguicidas sobre mortalidad en dos especies de abejas: Apis mellifera y Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Apidae). Escuela Agrícola Panamericana.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization OEPP. (2010). Efficacy evaluation of plant protection products: Side-effects on honeybees. *EPPO Bulletin*, 40(3), 313–319. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02418.x
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives* of Insect Biochemistry and Physiology, 29(2), 187–197. https://doi.org/10.1002/arch.940290208
- Feyereisen, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes. In Insect MolecularBiologyandBiochemistry(pp. 236–316).Elsevier.https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10008-X
- Glaberman, S., White, K., Steeger, T., Carleton, J., & Winfield, S. (2014). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench,

and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960) Flupyradifurone.

- Godfray, H. C. J., Blacquière, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., Raine, N. E., Vanbergen, A. J., & McLean, A. R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 281, Issue 1786). Royal Society. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0558
- González-Varo, J. P., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Potts, S. G., Schweiger, O., Smith, H. G., Steffan-Dewenter, I., Szentgyörgyi, H., Woyciechowski, M., & Vilà, M. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 28, Issue 9, pp. 524–530). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.008
- Gregorc, A., Alburaki, M., Rinderer, N., Sampson, B., Knight, P. R., Karim, S., & Adamczyk, J. (2018). Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Scientific Reports*, 8(1), 15003. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33348-4
- Gyori, J., Farkas, A., Stolyar, O., Székács, A., Mörtl, M., & Vehovszky, Á. (2017). Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. Acta Biologica Hungarica, 68(4), 345–357. https://doi.org/10.1556/018.68.2017.4.1
- Hernandez, J., Volland, A., Leyshon, B. J., Juda, M., Ridlon, J. M., Johnson, R. W., & Steelman, A. J. (2018). Effect of imidacloprid ingestion on immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Sclentlflc RepoRts J*, *8*, 11615. https://doi.org/10.1038/s41598-018-30093-6
- Hesselbach, H., & Scheiner, R. (2018). Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23200-0
- Hesselbach, H., & Scheiner, R. (2019). The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology*, *28*(3), 354–366. https://doi.org/10.1007/s10646-019-02028-y
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review Entomology*, 52, 231–253.
- Macias, J. O., Tapia Gonzalez, J. M., Contreras Escareño, F., Guzman Novoa, E., Medina Flores, C. A., & De la Mora Peña, A. (2018). El efecto de los agroquimicos sobre las abejas meliferas (Apis mellifera) y su relación con el síndrome del colapso de las colonias.

Maero, E., & Anguiano, O. (2018). Efecto de la exposición al insecticida

clorantraniliprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo en adultos de Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae). *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 77(1).

https://www.redalyc.org/jatsRepo/3220/322053849002/html/index.html

- Manjon, C., Troczka, B. J., Zaworra, M., Beadle, K., Randall, E., Hertlein, G., Singh, K. S., Zimmer, C. T., Homem, R. A., Lueke, B., Reid, R., Kor, L., Kohler, M., Benting, J., Williamson, M. S., Davies, T. G. E., Field, L. M., Bass, C., & Nauen, R. (2018). Unravelling the Molecular Determinants of Bee Sensitivity to Neonicotinoid Insecticides. *Current Biology*, 28(7), 1137-1143.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.045
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (Apis mellifera). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12657–12662. https://doi.org/10.1073/pnas.1109535108
- Moon, K., Lee, S. H., & Kim, Y. H. (2018). Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate seasonal and labor-specific expression profiles of the honey bee abdomen. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *21*(4), 1350–1358. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.10.014
- Morakchi, S., Maiza, A., Farine, J. P., Aribi, N., & Soltan, N. (2005). Effects of a neonicotinoid insecticide Acetamiprid on acetylcholinesterase - Technische Informationsbibliothek (TIB). *International Symposium on Crop Protection*. https://www.tib.eu/en/search/id/BLCP%3ACN075969995/Effects-of-aneonicotinoid-insecticide-Acetamiprid/
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., & Raupach, G. (2015). Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71(6), 850–862. https://doi.org/10.1002/ps.3932
- Palmer, M. J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G. A., & Connolly, C. N. (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, 4(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/ncomms2648
- Parkinson, R. H., Zhang, S., & Gray, J. R. (2020). Neonicotinoid and sulfoximine pesticides differentially impair insect escape behavior and motion detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(10), 5510–5515. https://doi.org/10.1073/pnas.1916432117
- Pettis, J. S., Vanengelsdorp, D., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften*, 99(2), 153–158. https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. In *International Journal of Biomedical Science* (Vol. 4,

Issue 2, pp. 89–96). Master Publishing Group. www.ijbs.org

- Qi, S., Wang, D., Zhu, L., Teng, M., Wang, C., Xue, X., & Wu, L. (2018). Effects of a novel neonicotinoid insecticide cycloxaprid on earthworm, Eisenia fetida. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 14138–14147. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1624-z
- Quiroga-Murcia, D. E., Zotti, M. J., Zenner de Polanía, I., & Pech-Pech, E. E. (2017). Toxicity evaluation of two insecticides on tetragonisca angustula and scaptotrigona xanthotricha (Hymenoptera: Apidae). *Agronomia Colombiana*, *35*(3), 340–349. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.65447
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (Apis mellifera) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, *5*. https://doi.org/10.1038/srep11779
- Scharlaken, B., de Graaf, D. C., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. J., & Jacobs, F. J. (2008). Reference Gene Selection for Insect Expression Studies Using Quantitative Real-Time PCR: The Head of the Honeybee, *Apis mellifera*, After a Bacterial Challenge. *Journal of Insect Science*, 8(33), 1– 10. https://doi.org/10.1673/031.008.3301
- Tan, K., Wang, C., Dong, S., Li, X., & Nieh, J. C. (2017). The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (Apis cerana) exposed as larvae or as adults. *Scientific Reports*, 7(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-18060-z
- Tosi, S., & Nieh, J. C. (2019). Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto[®]), on honeybees. *Proceedings* of the Royal Society B: Biological Sciences, 286(1900), 20190433. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433
- Toutant, J. P. (1989). Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 32, Issue 5, pp. 423–446). Pergamon. https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90031-2
- Vanbergen, A. J., Garratt, M. P., Baude, M., Biesmeijer, J. C., Britton, N. F., Brown, M. J. F., Brown, M., Bryden, J., Budge, G. E., Bull, J. C., Carvell, C., Challinor, A. J., Connolly, C. N., Evans, D. J., Feil, E. J., Garratt, M. P., Greco, M. K., Heard, M. S., Jansen, V. A. A., ... Wright, G. A. (2013). Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. In *Frontiers in Ecology and the Environment* (Vol. 11, Issue 5, pp. 251–259). Wiley Blackwell. https://doi.org/10.1890/120126
- Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., & Socha, R. (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 172(1), 77–84. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.009

Verma, R. S., Mehta, A., & Srivastava, N. (2007). In vivo chlorpyrifos induced

oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *88*(2), 191–196. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.11.002

- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., Robertson, H. M., Weaver, D. B., Beye, M., Bork, P., Elsik, C. G., Hartfelder, K., Hunt, G. J., Zdobnov, E. M., Amdam, G. V., Bitondi, M. M. G., Collins, A. M., Cristino, A. S., Lattorff, H. M. G., ... Wright, R. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera. *Nature*, 443(7114), 931–949. https://doi.org/10.1038/nature05260
- Williamson, S. M., & Wright, G. A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1799–1807. https://doi.org/10.1242/jeb.083931
- Zhou, X., Ma, C., Li, M., Sheng, C., Liu, H., & Qiu, X. (2010). Cyp9a12 and cyp9a17 in the cotton bollworm, helicoverpa armigera: Sequence similarity, expression profile and xenobiotic response. *Pest Management Science*, 66(1), 65–73. https://doi.org/10.1002/ps.1832