

**Efecto de tres tipos de polen en el desarrollo
ovárico de obreras del abejorro *Bombus
impatiens* Cresson (Hymenoptera: Apidae) en
condiciones de laboratorio**

Ana Cecilia Trabanino Pino

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto de tres tipos de polen en el desarrollo
ovárico de obreras del abejorro *Bombus
impatiens* Cresson (Hymenoptera: Apidae) en
condiciones de laboratorio**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
grado académico de licenciatura

Presentado por

Ana Cecilia Trabanino Pino

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Efecto de tres tipos de polen en el desarrollo ovárico de obreras del abejorro *Bombus impatiens* Cresson (Hymenoptera: Apidae) en condiciones de laboratorio

Ana Cecilia Trabanino Pino

Resumen. El desarrollo de órganos sexuales en insectos es un proceso en parte limitado por nutrientes. En abejorros del género *Bombus* Latreille, el desarrollo de dichos órganos está ligado directamente al consumo de polen, debido a que el polen es la fuente principal de proteína disponible para estos individuos en la naturaleza. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de tres tipos de polen (*Trifolium* spp., *Solidago* spp. y polen mixto) y el efecto de dietas con presencia y ausencia de polen en el desarrollo ovárico de obreras del abejorro *Bombus impatiens* Cresson. El estudio se realizó en la Universidad Estatal de Ohio, Estados Unidos. Se establecieron 12 microcolonias sin reina, con tres obreras de *B. impatiens* por microcolonia, durante cinco semanas. Durante el estudio, los abejorros fueron expuestos a cuatro tratamientos; 1. con polen de *Trifolium* spp., 2. con polen de *Solidago* spp., 3. con polen mixto sin identificar, y 4. sin polen; cada tratamiento tuvo tres repeticiones, teniendo en total 12 microcolonias. Al finalizar la quinta semana, los abejorros fueron congelados y posteriormente disectados para medir y evaluar los ovarios. La exposición a los tipos de polen no presentó ninguna diferencia en el desarrollo de los ovarios de los individuos. Al evaluar el efecto de dietas con presencia y ausencia de polen, los abejorros con dietas expuestas a polen tuvieron mayor desarrollo de los ovarios.

Palabras clave: Microcolonias, órganos sexuales, proteínas.

Abstract. Development of sexual organs in insects is a nutrient limited process. In bees belonging to the genus *Bombus* Latreille, the development of sexual organs is directly bounded to pollen consumption, being pollen the principal protein source available for bees in nature. The objective of the study was to determine the effect of different types of pollen (*Trifolium* spp., *Solidago* spp., and mixed pollen) and the effect of diets with presence and absence of pollen in the ovarian development of worker bumble bees *Bombus impatiens* Cresson. This study took place in the Reed Johnson laboratory, at The Ohio State University, United States. Queenless microcolonies were established with three worker bumble bees *B. impatiens* per microcolony, during a five-week period. During the study, the bumblebees were exposed to four different treatments; 1. *Trifolium* spp. pollen, 2. *Solidago* spp. pollen, 3. Mixed pollen and 4. No pollen, every treatment had three repetitions having a total of 12 microcolonies. After five weeks, the bumblebees were froze and dissected in order to measure and evaluate the ovaries of each bee. The exposure to different types of pollen did not demonstrate differences between the ovarian development in bees. When we evaluated the effect of diets with presence and with absence of pollen, bees feeding on diets with presence of pollen had the greatest ovarian development.

Key words: Microcolonies, protein, sexual organs.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros y figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4. CONCLUSIONES.....	11
5. RECOMENDACIONES.....	12
6. LITERATURA CITADA	13

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Evaluación del efecto de los tipos de polen en el desarrollo ovárico del abejorro <i>Bombus impatiens</i>	8
2. Evaluación del desarrollo ovárico en obreras de <i>Bombus impatiens</i> en dietas con presencia y ausencia de polen.	9

Figuras	Página
1. Sistema reproductivo de un insecto hembra.	2
2. Estructura de microcolonia, nido y comederos artificiales.....	4
3. Vista interna de la estructura de la microcolonia hacia el nido.	5
4. Vista interna de la microcolonia y los comederos artificiales	5
5. Ovarios no desarrollados y ovarios desarrollados con presencia de huevos en <i>Apis mellifera</i>	10

1. INTRODUCCIÓN

Los animales que viven en grupos, comúnmente, se especializan en diferentes tareas; en insectos, esta división de labores es característica en especies sociales del orden Hymenoptera (Nelson et al. 2007). La división de labores facilita la ejecución de varias actividades al mismo tiempo (Jandt et al. 2009). Entre todas las labores que lleva el grupo, las labores reproductivas son consideradas las más importantes (Wilson 1978).

Los insectos del género *Bombus* son abejorros eusociales, caracterizados por estar divididos en castas de miembros reproductivos y no reproductivos. Las labores reproductivas están a cargo de un solo miembro del grupo, en este caso, la reina es la responsable. Esta hembra dominante cumple con diversas labores para asegurar su futura descendencia, principalmente oviposita. Las obreras, hembras ayudantes estériles, se enfocan en el mantenimiento y conservación de la colonia y en forrajeo para obtención de alimentos (Human et al. 2007). Sin embargo, la reina no es la única dentro del grupo con capacidades reproductivas, en la mayoría de las especies, las obreras tienen ovarios funcionales y a la vez inhabilitados, debido a la producción de feromonas liberadas por la reina (Human et al. 2007).

Estudios anteriores por Duchateau y Velthuis 1989, revelan que la reina tiene dos efectos sobre la reproducción de sus obreras: 1) mediante supresión de los ovarios de estas durante los primeros días de dominancia de la reina en la colmena y 2) por medio de la prevención de oviposición de obreras a lo largo de su dominancia en la colmena. A pesar de los efectos que la reina tiene hacia sus obreras, existen varios factores que pueden influenciar el desarrollo ovárico y oviposición de una obrera; tamaño del grupo, tiempo expuestas a forrajeo, ausencia de la reina y nutrición del individuo (Duchateau y Velthuis 1989).

La nutrición es un factor determinante dado que el desarrollo ovárico así como la oogénesis, son procesos limitados por nutrientes e iniciados solamente cuando se tienen los recursos necesarios para el desarrollo de los huevos (Wheeler 1996). En términos nutricionales, el alimento de un abejorro consiste de polen y néctar/miel. El néctar/miel es un carbohidrato mientras que el polen es la fuente principal de proteína en el ciclo de vida de todas las especies de abejas y es una fuente esencial para el desarrollo normal y crecimiento de un individuo (Plowright y Pendrel 1977). Así mismo, el polen es considerado precursor del desarrollo de órganos sexuales y capacidades reproductivas de un individuo.

La reina y las obreras son anatómicamente iguales, solo se diferencian en tamaño, siendo la reina más grande. En respecto al sistema reproductivo (reina u obreras) consta de dos ovarios, dos oviductos laterales, un oviducto medio, un complejo de la espermateca, vagina, bursa copulatrix y abertura genital. Los ovarios se subdividen en pequeñas unidades

llamados ovariolas, en donde se lleva a cabo el proceso de oogenesis (producción de huevos). Todas las hembras de *Bombus impatiens* tienen ocho ovariolas, cuatro por ovario (Amsalem et al. 2015).

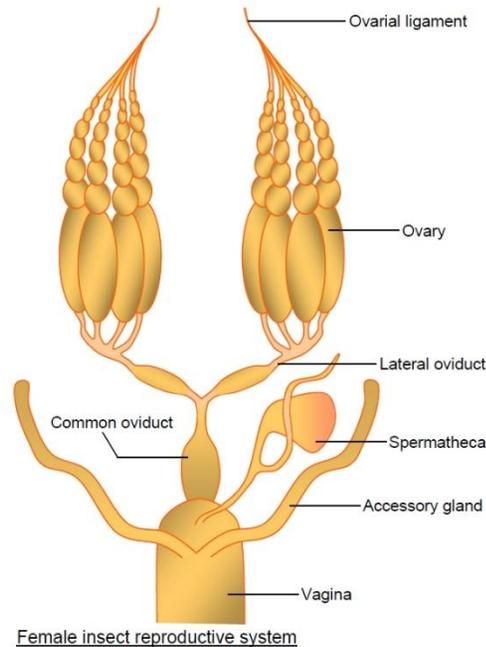


Figura 1. Sistema reproductivo de un insecto hembra

Fuente: http://cronodon.com/images/insect_female_reproductive_system_labeled.jpg

El polen es una fuente de proteína, lípidos, vitaminas y minerales y varía considerablemente en diferentes especies de plantas. De Groot (1953) determinó que los 10 amino ácidos esenciales para el desarrollo de una abeja son arginina, histidina, lisina, triptófano, fenilalanina, metionina, treonina, leucina, isoleucina y valina.

El polen es el gametofito masculino de las plantas, se encuentra en las anteras de las flores y es producido para fertilizar órganos femeninos. La disponibilidad de este producto para los abejorros es amplia, debido a que los abejorros son generalistas. Sin embargo, su disponibilidad depende de factores como la época de floración y la relación costo/beneficio que se pueden obtener del polen. Al momento de forrajeo, el individuo gasta energía, la cual debe ser compensada con calidad y cantidad de polen, esto es un factor determinante para definir si el abejorro volverá a la misma fuente por polen. La calidad de una fuente de polen puede variar ampliamente desde 2.5 – 61.0% de contenido proteico disponible (Roulston et al. 2000), por lo cual convierte el polen en alimento esencial en la dieta de los abejorros.

Este estudio se enfocó en determinar; 1. El efecto de los diferentes tipos de polen (*Solidago* spp., *Trifolium* spp., y polen mixto sin identificar), en el desarrollo ovárico de obreras *Bombus impatiens* y 2. El efecto de dietas con presencia y ausencia de polen en el desarrollo ovárico de las obreras *Bombus impatiens* en microcolonias sin reina, durante un periodo de cinco semanas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se estableció una colonia de abejorros *B. impatiens* obtenida de la empresa Koppert Biological Systems, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos. Esta colonia se ubicó en el cuarto no. 19, (5 × 5 m y 2 m de alto, a temperatura de 27 °C y humedad relativa de 65%), del invernadero tres de Thorne Hall, de la Universidad Estatal de Ohio, Estados Unidos. Aquí permanecieron nueve días, desde el 23 de enero hasta el 1 de febrero del 2016. En este lugar tuvieron alimento *ad libitum* a través de comedores artificiales.

Tratamientos. El estudio consistió en cuatro tratamientos, los cuales fueron:

1. Polen de *Trifolium* spp. y sirope de agua con azúcar 1:1.
2. Polen de *Solidago* spp. y sirope de agua con azúcar 1:1.
3. Polen mixto sin identificar y sirope de agua con azúcar 1:1.
4. Sirope de agua con azúcar 1:1.

Se utilizó específicamente polen de *Trifolium* spp., polen de *Solidago* spp., y polen mixto sin identificar, para el estudio debido a la disponibilidad de los mismos en el laboratorio. Todo el polen utilizado fue colectado por *Apis mellifera*.

Estructura de microcolonias. Las microcolonias fueron elaboradas en el laboratorio del Dr. Reed Johnson en la Universidad Estatal de Ohio y tenían una medida de 23 cm de largo × 15 cm de ancho y una altura de 18 cm. Estas estructuras fueron elaboradas usando madera en la parte inferior, superior, anterior y posterior y con tejido malla alambre de 10 mesh en las paredes laterales, el propósito de utilizar el tejido malla alambre fue facilitar la observación de las microcolonias. La pared anterior de la estructura fue diseñada con un orificio de 5.7 cm de diámetro, en el cual se introdujo el nido (Figura 2).

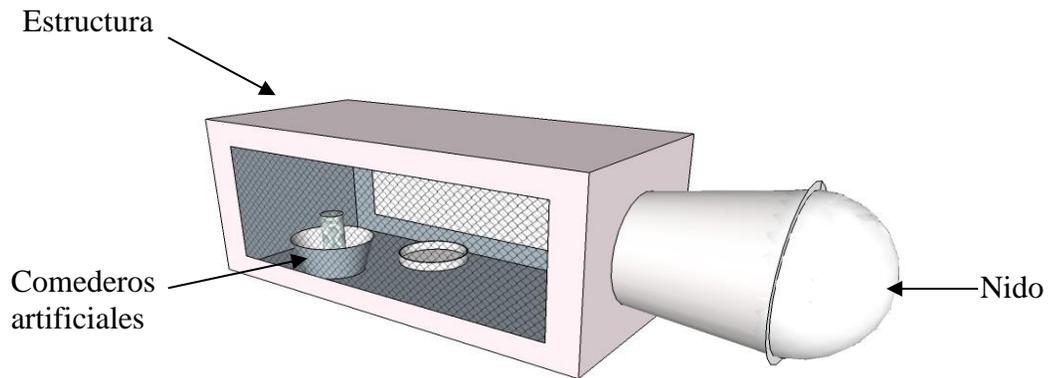


Figura 2. Estructura de microcolonia, nido y comederos artificiales.

Nido. Los nidos fueron elaborados usando vasos de poliestireno de 5.7 cm de diámetro inferior, 9.5 cm de diámetro superior y 12 cm de altura. La parte inferior del vaso fue sustituida por tejido malla alambre de 10 mesh, al cual se le hizo un agujero de 2 cm de diámetro como salida de vuelo.

En el interior del vaso se colocó una base de cartón de 10 cm de largo \times 8.5 cm de ancho de forma horizontal, paralela a la base de la estructura. Se preparó una celda artificial compuesta de cera de abeja y polen molido para estimular individuos a formar sus propias celdas, no obstante, dentro de la celda artificial se colocó alimento para los individuos en el periodo de anidación. Esta celda artificial fue colocada en la base de cartón junto con dos trozos de algodón de aproximadamente 2 cm de diámetro, para dar una simulación completa del nido en el cual fueron criadas. La parte superior del vaso, de 9.5 cm de diámetro, se cubrió con una tapadera de polietileno transparente de 9.5 cm de diámetro para poder observar el comportamiento de las obreras en el nido (Figura 3).



Figura 3. Vista interna de la estructura de la microcolonia hacia el nido.

Comederos artificiales. Se diseñaron comederos artificiales en las microcolonias para proveer alimento al insecto. El comedero para el sirope se hizo utilizando una copita de poliestireno, como reservorio, de 4 cm de altura y 3 cm de diámetro, con su respectiva tapadera de 3 cm de diámetro. En la tapadera se le hizo una cortadura en el centro, de 1 cm, con un bisturí y se colocó una varilla de algodón dental de 5 cm. Para el polen se utilizó un plato Petri plástico de 5 cm de diámetro y 0.5 cm de altura, en donde se proporcionó 3 g del respectivo polen.

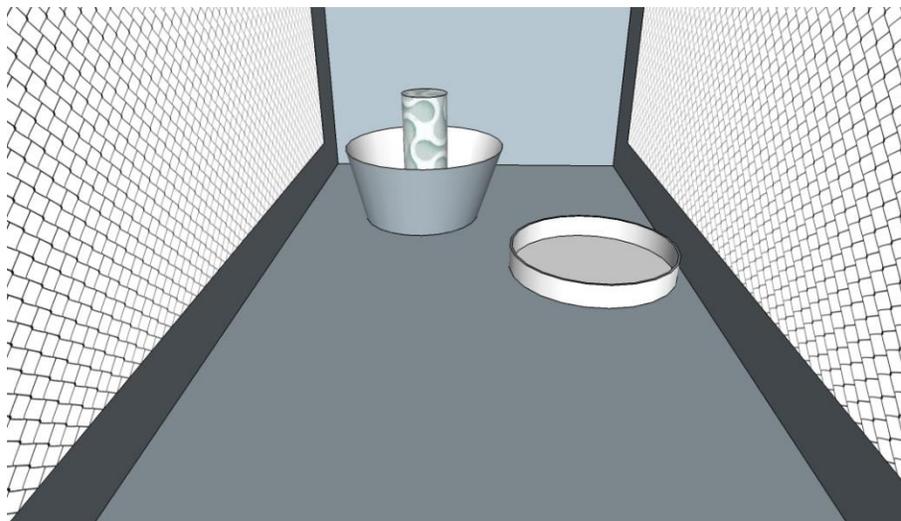


Figura 4. Vista interna de la microcolonia y los comederos artificiales.

Elaboración de microcolonias sin reina. Las obreras ubicadas en el cuarto del invernadero fueron colectadas usando un recipiente de poliestireno de 18 cm de altura y 13 cm de diámetro con su respectiva tapadera. Se colectaron 36 individuos y seguidamente fueron introducidos en las estructuras. Cada microcolonia constó de una estructura, nido, dos comederos artificiales para el sirope de agua y azúcar 1:1 y para el polen (a excepción de tres microcolonias las cuales no estaban expuestas a polen, por ende solo tenían un comedero) y tres obreras. Se elaboraron 12 microcolonias, de las cuales 9 fueron expuestas a diferentes tipos de polen y sirope, mientras que las tres restantes no fueron expuestas a polen, solamente a sirope.

Anidación. Se introdujeron tres individuos en el nido artificial y la salida de vuelo fue sellada por 48 horas con el fin de estimular el proceso de anidación. Se colocaron 0.5 g de polen en el cartón, y 1.5 g de sirope adentro de la celda artificial en el cartón para evitar estrés por falta de alimento. Todas las microcolonias fueron anidadas el mismo día, a temperatura de 26–28°C y humedad relativa de 65%.

Liberación en microcolonias. Después de las 48 horas del proceso de anidación, se removió el sello de la salida de vuelo para que las obreras pudiesen forrajear por su alimento, disponible en los comederos artificiales.

Desarrollo ovárico. Después de cinco semanas, los individuos fueron extraídos de las microcolonias, congelados a -20 °C, y almacenados a esta temperatura hasta la disección. Para esta, se utilizó un plato Petri de 10 cm de diámetro y 3 cm de alto, dos pinzas de acero inoxidable, BSA (Albúmina de suero bovina), solución Ringer y un estereoscopio con escala ocular. Para determinar el desarrollo ovárico, se cortó el abdomen por la parte dorsal, donde se removió el intestino para poder exponer los ovarios, en los cuales se midió el tamaño de cada uno en las siguientes medidas: ancho dilatado (parte superior), ancho no dilatado (parte inferior) y largo. También, se estimó un área total ovárica, la cual se obtuvo mediante el uso de la fórmula de área trapezoidal, siendo:

$$\text{Área} = \frac{((\text{base1} + \text{base2}) \times \text{largo})}{2} [1]$$

$$\text{Área ovárica total estimada} = \frac{((\text{ancho dilatado} + \text{ancho no dilatado}) \times \text{largo})}{2} [2]$$

Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones de cada tratamiento. El análisis de varianza se realizó usando el modelo lineal general en el programa Statistics Analysis System SAS® 9.4 2015 considerando cada microcolonia con tres individuos, una unidad experimental. Para la separación de medias se utilizó una prueba Duncan con un nivel de significancia exigido fue de $P \leq 0.05$. Una vez que se determinó que no existían diferencias significativas entre los tipos de polen se procedió a realizar un análisis de varianza del desarrollo ovárico en obreras del abejorro *B. impatiens* en dietas con polen y sin polen, tomando en cuenta todos los tipos de polen como un solo tratamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efecto de las diferentes especies de polen brindados en el desarrollo ovárico de las obreras del abejorro *B. impatiens*.

El cuadro 1 detalla los resultados de las disecciones de las obreras del abejorro en relación al ancho dilatado de los ovarios disectados. Los tratamientos con polen de *Trifolium* spp. y con polen mixto sin identificar, presentaron anchos dilatados significativamente mayores que las obreras alimentadas sin polen (sirope 1:1) mientras que los individuos alimentados con polen de *Solidago* spp. no presentaron diferencias significativas en el ancho dilatado en los individuos alimentados sin polen.

Al comparar el ancho no dilatado de los ovarios, las obreras alimentadas con *Trifolium* spp. presentaron el mayor ancho no dilatado, siendo este tratamiento el único significativamente mayor que las obreras alimentadas sin polen (sirope 1:1). Sin embargo, los tratamientos con polen de *Trifolium* spp., *Solidago* spp., y polen mixto sin identificar, no presentaron diferencias significativas entre sí.

En el largo de los ovarios, los tratamientos de polen mixto sin identificar y polen de *Trifolium* spp. fueron los más largos. Los tratamientos con polen de *Trifolium* spp. y *Solidago* spp., no presentaron diferencias significativas entre sí. No obstante, dichos tratamientos (*Trifolium* spp. y *Solidago* spp.) fueron significativamente superiores al tratamiento sin polen.

Con respecto al área total de los ovarios, no se encontraron diferencias significativas entre los abejorros alimentados con polen. Los tratamientos que presentaron mayor área fueron los de polen de *Trifolium* spp. y polen mixto sin identificar, los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos. Las obreras alimentadas con polen de *Trifolium* spp. y polen mixto sin identificar desarrollaron ovarios con mayor área total estimada significativamente al compararlo al tratamiento en el cual se alimentó sin polen con una probabilidad menor a 0.05

Cuadro 1. Evaluación del efecto de los tipos de polen en el desarrollo ovárico de obreras del abejorro *Bombus impatiens*

Tratamiento	Ancho dilatado (mm)	Ancho no dilatado (mm)	Largo (mm)	Área total (mm ²)
<i>Trifolium</i> spp.	1.36 a [‡]	0.61 ^{n.s.}	7.02 ab	7.07 a
Mixto sin identificar	1.19 a	0.58	7.57 a	6.94 a
<i>Solidago</i> spp.	1.06 ab	0.53	5.67 b	5.15 ab
Sin polen	0.67 b	0.39	3.87 c	2.24 b
Probabilidad	0.01	0.094	0.0007	0.0077
CV (%)	38.947	35.388	29.028	56.968

[‡] Medias seguidas en columnas con letra diferente son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$)

^{n.s.} No hay diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$)

CV% = Coeficiente de variación

No existen datos sobre desarrollo ovárico en obreras de *B. impatiens* en cuanto a medidas de largo, ancho dilatado, ancho no dilatado y área total estimada. Sin embargo, Fliszkiewicz (2002) y Fliszkiewicz et al. (2003) reportaron desarrollo ovárico, determinando el tamaño del ovario usando largo y ancho dilatado en reinas *B. terrestris*. Fliskiewicz (2002) utilizó el largo del ovario como indicador del desarrollo ovárico dado que, el largo del ovario no cambia durante el ciclo de vida del individuo, por ende, el largo del ovario puede ser utilizado como indicador de la preparación del individuo para emprender funciones reproductivas. Así mismo, utilizó el ancho del ovario como indicador del desarrollo fisiológico del insecto, ya que el ancho del ovario varía en diferentes periodos del ciclo del individuo. No obstante, Fliskiewicz (2002) confirmó que el ancho del ovario incrementaba a medida que los individuos se alimentaban intensivamente y empezaban a ovipositar.

Según Pernal y Currie (2000), el desarrollo de los ovarios en obreras de *Apis mellifera* está fuertemente relacionado con el contenido crudo de proteína en la dieta. Sin embargo, los resultados obtenidos en el desarrollo ovárico en obreras *B. impatiens*, no fueron los esperados al no encontrarse diferencia significativa entre tratamientos con presencia de polen. El contenido de proteína del polen usado para este estudio, varía de una especie de planta a otra en un 10% aproximadamente; según Pernal y Currie (2001) *Trifolium* spp. posee 23.54 – 25.36% de proteína por cada 100 g de polen, y *Solidago* spp. con 13.80%. Las diferencias no significativas entre tratamientos pueden ser atribuidas a varios factores como 1) desnaturalización de proteínas del polen debido a exposición al sol al momento de la cosecha, 2) pérdida del valor nutricional del polen debido a un periodo mayor a un año en un congelador a -10 °C, 3) a la posible digestibilidad limitada del polen por los individuos debido a la capa cerosa que contienen los granos de polen y/o 4) por falta de transformaciones bioquímicas necesarias para digerir los amino ácidos disponibles.

2. Desarrollo ovárico en relación a la dieta con presencia y ausencia de polen en las obreras de *Bombus impatiens*

Los individuos bajo tratamientos con presencia de polen, presentaron medidas significativamente superiores en el ancho dilatado, ancho no dilatado, largo y área total en los ovarios, en comparación a las obreras alimentadas sin polen (Cuadro 2). No obstante, se encontró un mínimo desarrollo ovárico en obreras alimentadas sin polen. Esto puede ser atribuido a la exposición de 10 días a polen que tuvieron al inicio del experimento, todos los individuos usados para el ensayo y a la capacidad que tienen estos insectos en almacenar proteína en sus cuerpos grasos como reservas.

Cuadro 2. Evaluación del desarrollo ovárico en obreras de *Bombus impatiens* en dietas con presencia y ausencia de polen.

Tratamiento	Ancho dilatado (mm)	Ancho no dilatado (mm)	Largo (mm)	Área total (mm ²)
Polen	1.21 a [‡]	0.57 a	6.72 a	6.36 a
Sin Polen	0.67 b	0.39 b	3.87 b	2.24 b
Probabilidad	0.0022	0.0162	0.0005	0.0012
CV (%)	39.293	39.392	32.231	56.991

[‡] Medias seguidas en columnas con letra diferente son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$)
CV (%) = Coeficiente de variación

Este estudio concuerda con Duchateau y Velthuis (1989), en dónde se encontró que la presencia de polen es esencial para el desarrollo de los órganos sexuales en *B. terrestris*, así como también con Lin y Winston (1998) y Pernal y Currie (2000) donde se describe un enlace directo entre la proteína disponible en la dieta y el desarrollo en los ovarios de abejas obreras *Apis mellifera*.

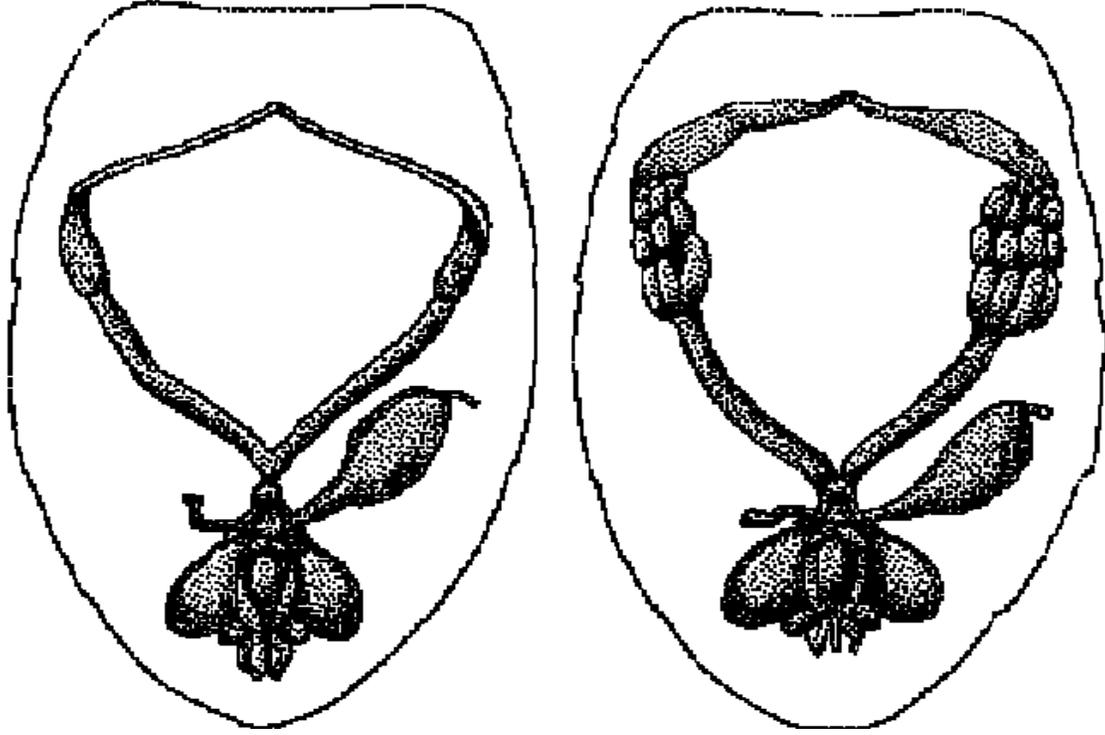


Figura 5. Ovarios no desarrollados y ovarios desarrollados con presencia de huevos en *Apis mellifera*.

Fuente: <http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/koning/bees.html>

4. CONCLUSIONES

- No hubo diferencias en el desarrollo ovárico de las obreras del abejorros *Bombus impatiens* usando diferentes tipos de polen (*Trifolium* spp., *Solidago* spp., y polen mixto), ya que los ovarios en todos los individuos presentaron medidas estadísticamente iguales.
- Las dietas con presencia de polen favorecen el desarrollo de los ovarios de las obreras *Bombus impatiens*, debido a que los abejorros alimentados con dietas en presencia de polen obtuvieron los ovarios con mayores anchos dilatados, anchos no dilatados, largos y área.

5. RECOMENDACIONES

- Investigar sobre el desarrollo ovárico utilizando individuos de la misma edad y tamaño, incluyendo más repeticiones por tratamiento.
- Investigar más sobre el valor nutricional de diferentes especies de polen a través de análisis químicos y bioquímicos de estos.
- Investigar sobre el desarrollo ovárico por medio de polen tomando en cuenta la edad, cosecha y el tiempo almacenado del mismo.
- Investigar más sobre el desarrollo ovárico utilizando diferentes metodologías; ej. tipos de medición (peso y/o cantidad de oocitos).
- Investigar la cantidad de polen consumida por microcolonia para determinar si existe una correlación entre la cantidad consumida y el desarrollo de los ovarios.
- Investigar por medio de diferentes concentraciones de sirope (1:1, 1:2 y 1:3) en la dieta de las obreras del abejorro *Bombus impatiens*, que rol juegan los carbohidratos en el desarrollo ovárico.

6. LITERATURA CITADA

- Amsalem E, Grozinger CM, Padilla M, Hefetz A. 2015. Bumble bee sociobiology: The physiological and genomic bases of bumble bee social behavior. *Genomics, physiology and behavior of social insects* (eds Zayed A, Kent C). 37-93. London, UK: AIPP, Academic Press.
- De Groot AP. 1953. Protein and amino acid requirement of The Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Physiol. Comp. Oecol.* 3: 197-285.
- Duchateau MJ, Velthuis HHW. 1989. Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris*. *Entomol. Exp. App.* 51: 199- 213.
- Fliszkiewicz M. 2002. Causes of the lack of diapause in bumble bee females (*Bombus latr.* Apoidea). *J. Apic. Sci.* 46 (1): 31-40.
- Fliszkiewicz M, Wilkaniec Z, Bilinski M. 2003. Size of the ovary, filling of the spermathecal, amount and fat content of the fat body in culture derived copulating and non-copulating bumble bee queens (*Bombus terrestris*). *J. Apic. Sci.* 47 (2): 109-116.
- Human H, Nicolson SW, Strauss K, Pirk CWW, Dretemann V. 2007. Influence of pollen quality on ovarian development on honey bee workers (*Apis mellifera scutellata*). *Jinphys.* 53: 649-655.
- Jandt JW, Huang E, Dornhaus A. 2009. Weak specialization of workers inside a Bumble bee (*Bombus impatiens*) nest. *BehavEcolSocioBiol.* 63. 1829- 1836.
- Lin H, Winston M. 1998. The role of nutrition and temperature of the worker honeybee (*Apis mellifera*). *Can. Entomol.* 130: 883- 891.
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE Jr, Amdam GV. 2007. The gene of vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 5(3): 0673- 0677.
- Pernal SF, Currie RW. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie.* 3: 387-409.
- Pernal SF, Currie RW. 2001. The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.) *BehaEcolSocioBiol.* 51. 53-68.
- Plowright RC, Pendrel BA. 1977. Larval growth in Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae). *Can. Entomol.* 109 (7): 967- 973.

- Roulston TH, Cane JH, Buchmann SL. 2000. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecol. Monogr.* 70: 617-643.
- Wheeler, D. 1996. The role of nourishment in oogenesis. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 407-431.
- Wilson EO. 1978. Division of labor in fire ants based on physical castes (Hymenoptera: Formicidae: *Solenopsis*). *J. Kans. Entomol. Soc.* 51(4): 615-636.