

# Efecto de la suplementación proteica *Apipromotor*<sup>®</sup> a distintos pH sobre los niveles de expresión de vitelogenina y proteínas totales en cuerpos grasos abdominales de *Apis mellifera*

---

[Evaluación del producto comercial *Apipromotor*<sup>®</sup> como sustituto de polen ]

Sarlo, E.<sup>1</sup>; Quintana, S.<sup>3</sup>; Medici, S.<sup>1,2,3</sup>; Eguaras, M.<sup>1,2</sup> Fey, M.<sup>4</sup>  
<sup>1</sup> Laboratorio de Artrópodos, Universidad Nacional de Mar del Plata  
<sup>2</sup> CONICET <sup>3</sup> Fares Taie Instituto de Análisis  
<sup>4</sup> Apifey SA

[Septiembre de 2011]

Investigación requerida por la empresa Apifey S.A. destinada a evaluar el efecto que produce el suministro del formulado comercial *Apipromotor*<sup>®</sup> en dos de los indicadores nutricionales de la abeja *Apis mellifera*.

## ***Efecto de la suplementación proteica Apipromotor® a distintos pH sobre los niveles de expresión de vitelogenina y proteínas totales en cuerpos grasos abdominales de *Apis mellifera****

### **Resumen**

Uno de los mecanismos que median el control de la organización social del trabajo de las abejas es la variación en la expresión del gen de la vitelogenina. El nivel de expresión o de otra manera, la cantidad de mensajero genético (ARNm) que la abeja obrera fabrica para que se sintetice Vitelogenina (Vg) en la etapa temprana de la vida, determinará su comportamiento posterior. La Vg resulta ser la proteína más abundante en la hemolinfa de *A. mellifera* L. y es sintetizada por las obreras los primeros 7 a 10 días de emergidas.

La expresión de vitelogenina en los primeros cuatro días de vida de la abeja determina la edad de inicio y destino del pecoreo (néctar o polen). La longevidad de las abejas, la cría, producción de miel y la resistencia a las enfermedades son parámetros que se reducen cuando la disponibilidad de proteínas es inadecuada. La producción de Vg es fuertemente dependiente de la disponibilidad de alimento proteico.

El manejo productivo de las colonias en Argentina sostiene un inicio temprano del desarrollo de la colonia con respecto a la floración. Sea cual sea el objetivo productivo, se expone a las colonias a una situación de dependencia de reservas nutricionales (pan de abeja o polen ya ensilado) que no siempre están presentes, por lo que resulta imprescindible suministrar alguna dieta de constatado valor nutricional si se desea mantener el flujo de proteínas dentro de las colonias y evitar los efectos adversos que produce su carencia.

El objetivo del presente trabajo fue comparar los niveles de expresión de Vg y proteínas totales presentes en los cuerpos grasos abdominales de abejas con disponibilidad y carencia de reservas polínicas versus el efecto del suministro a distintos pH del suplemento proteico Apipromotor®.

Los resultados obtenidos sugieren que el uso de un suplemento balanceado en aminoácidos libres tal como el compuesto Apipromotor® genera un efecto semejante al pan de abeja en *A. mellifera*, pudiendo usarse como sustituto de éste durante los períodos de carencia. La cuantificación de los niveles de expresión de Vg demostró ser un método objetivo para evaluar dietas proteicas.

## Introducción

La supervivencia de una colonia de abejas *Apis mellifera* L. se encuentra directamente ligada a su habilidad de recolectar cantidades suficientes de alimento para atender la cría y mantener los adultos (Pernal y Currie, 2002).

El grano de polen es la única fuente proteica en la dieta de las abejas. Junto a lípidos, vitaminas y minerales presentes también en esta célula masculina, resultan imprescindibles en el normal desarrollo de una colonia (Pernal y Currie, 2000).

No sólo la cantidad de proteínas, sino también la proporción de aminoácidos presentes en el polen recolectado, determina la calidad nutricional para las abejas (Kleinschmidt, 1990; Pernal y Currie, 2001).

Las abejas jóvenes, tras digerir el grano de polen, incorporan grandes cantidades de aminoácidos con el objeto de sintetizar nuevas proteínas tales como la Vitelogenina (Vg), una de las lipoproteínas VHDLs (Very High Density Lipoprotein; Otis y col. 2004). Estas proteínas serán luego almacenadas, en el caso de las abejas obreras, principalmente en los cuerpos grasos, hemolinfa y glándulas hipofaríngeas. (Amdam y Omholt 2002).

Particularmente los títulos de Vg han sido asociados al polen consumido en la dieta de obreras (Bitondi y Simões, 1996; Cremones et al., 1998) y resulta ser un buen indicador del estado de reservas proteicas de las mismas (Cremones *et al.* 1998, Amdam y Omholt 2002).

Esta casta presenta también niveles de expresión dinámicos no solo a lo largo de las actividades políeticas sino también según la temporada del año. (Toth et al, 2005).

El título de Vg en la abeja obrera se incrementa a partir de su emergencia hasta los 7-10 días de edad, para luego declinar en coincidencia con el inicio de las tareas de pecoreo (Campana y Moeller, 1977; Fluri et al., 1982; Amdam et al., 2006) permaneciendo presente en menor concentración hasta su muerte (Piulachs et al 2003.)

Los títulos de Vg a determinada edad se encuentran fuertemente influenciados por factores tales como el comienzo del pecoreo, la cantidad de cría (Fluri et al., 1982), la disponibilidad de polen (Bitondi y Simoes, 1996) y la presencia de parásitos (Amdam et al., 2006) entre otros.

Las proteínas del polen convertidas ya en jalea real por las nodrizas son suministradas a las larvas de todas las castas así como a obreras más viejas,

zánganos y reina. (Crailsheim 1991), distribuyendo de este modo los aminoácidos aportados por el polen a toda la colonia.

En preparación a la etapa invernal la abeja obrera consume mayor cantidad de polen incrementando sus niveles de Vg en hemolinfa (Adam et. al., 2005) y es probable que la proteína así almacenada sea crucial para su supervivencia durante este período (Maurizio 1950, Fluri et al.1982).

Ya en el año 1998, Cremonez y col., reportaron que los niveles de proteínas totales y vitelogenina más altos se correlacionan con las dietas nutricionalmente superiores.

En la actualidad, podemos ir más allá y asegurar que uno de los mecanismos que median el control de la organización social del trabajo de las abejas, es la variación en la expresión del gen de la Vitelogenina. El nivel de expresión o de otra manera, la cantidad de mensajero genético (ARNm) que la abeja produce para que se sintetice Vg en la etapa temprana de la vida de la obrera, determinará químicamente si resultará una pecoreadora de polen o néctar en el caso que sean altas o bajas cantidades respectivamente (Nelson et al 2007).

Por otro lado, la carencia de polen en la dieta conduce a títulos bajos de esta proteína en la abeja y son asociados a alteraciones en los procesos metabólicos esenciales tales como la síntesis de alimento para la cría, la regulación de la función inmune y la distribución bimodal de longevidad, todos factores que reducen la productividad de la colonia (Kleinschmidt, y Kondos, 1976)

Las colonias de abejas en climas templados comienzan a desarrollar la cría, antes de que los recursos florales estén disponibles. De esta manera, la proteína requerida para alimentar las primeras larvas de la nueva temporada proviene de las almacenadas en los cuerpos de abejas invernales (Otis et al 2004), desarrollada esta primer cohorte, se alimenta del polen almacenado en los panales o pan de abejas.

El manejo productivo de las colonias en Argentina sostiene un inicio temprano del desarrollo de la colonia. Sea cual sea el objetivo productivo, se expone a las colonias a una situación de dependencia de reservas de polen ensilado que no siempre están presente, por lo que resulta imprescindible suministrar alguna dieta de constatado valor nutricional si se desea mantener el flujo de proteínas dentro de las colonias y evitar los efectos adversos que produce su carencia.

Por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del suministro del suplemento proteico Apipromotor® a distintos pH sobre los niveles de expresión de Vitelogenina y proteínas totales presentes en los cuerpos grasos abdominales de *Apis mellifera*.

## Materiales y Métodos:

### Obtención del material vivo

Las 300 abejas implicadas en la presente investigación fueron obtenidas a partir de un panal de cría operculada proveniente de una colonia de *Apis mellifera* con una población de más de 10 marcos-panales con abeja, exceso de reservas nutritivas y libre de parasitosis.

Transportado al laboratorio, el panal fue incubado por 24 hs en una jaula a 34°C y 62% de HR hasta la emergencia de las abejas de sus celdas en forma natural. Seleccionados los individuos por sus condiciones morfológicas normales, se procedió en forma aleatoria a distribuirlos en contenedores con el objeto de conformar seis grupos. Las abejas de cada grupo fueron marcadas con una gota de pintura del color correspondiente en el tórax y sometidas a cada tratamiento experimental según se presenta en la Tabla 1 y Fig. 1.

	Nº de abejas	Polen	pH Jarabe	Concentración Apipromotor® ml/lit de jarabe
Grupo 1	50	+	7,48	0
Grupo 2	50	+	5,86	0
Grupo 3	50	-	7,48	0
Grupo 4	50	-	5,86	0
Grupo 5	50	-	7,48	7
Grupo 6	50	-	5,86	7

Tabla1. Conformación de los grupos y tratamiento administrado.

Las abejas correspondientes a cada grupo fueron divididas a la mitad (n=25) y alojadas en 2 colonias de tamaño reducido o unidades experimentales de campo (n=12) (Fig. 2 y 3)

Las unidades experimentales de campo (uec) receptoras de las abejas de los distintos grupos de tratamiento (Fig. 3 y 4) fueron seleccionadas por encontrarse libres de parasitosis, contar con no menos de 600 gramos de abeja, una abeja reina joven en postura y al menos 3 panales con cría en distintos estadios de desarrollo (Fig. 5).

Con el objetivo de evitar el acopio de polen en las uec destinadas a los grupos 3 a 6, fueron instalados con una anticipación de 10 días placas perforadas de 0,55 mm de diámetro en la piqueta de forma tal que al ingresar las abejas, las corbículas

pierdan el polen recolectado.

Cuatro días antes de la introducción de las abejas marcadas, se reemplazaron en los grupos 3 a 6 los panales con acopio de miel y polen por vacíos, mientras que en los uec correspondientes a los grupos 1 y 2 se reemplazaron por uno vacío y uno con polen ensilado (Fig. 6). Conjuntamente se administraron los tratamientos en alimentador interno a razón de 200 ml cada 2 días hasta concluir con el experimento (Fig. 7),

Las soluciones correspondientes a cada tratamiento se realizaron en base a jarabe de caña de azúcar al 66% en agua. A los grupos 5 y 6 se le agregó un volumen del complemento Apipromotor® a razón de 7 ml/ l según la recomendación de marbete.

Salvo para el caso del grupo 5 ya que el pH resultante de la solución de jarabe mas Apipromotor® es de 7,48, se procedió a acidificar con ácido acético glacial hasta obtener por peachímetro (Hannah digital) los valores del diseño experimental. El valor de pH de 5,86 experimentado en los grupos 2, 4 y 6 fue determinado por solicitud de la empresa y es el valor resultante de agregar un volumen de 1,5 ml/l de vinagre de alcohol al jarabe con Apipromotor®.

El trabajo de campo se realizó durante el mes de diciembre de 2010 bajo condiciones ambientales de temperatura media de 21.0°C, y humedad relativa media de 67.2%.

### **Obtención y procesado de las muestras**

A los 0, 5, 10 y 21 días de alojados los individuos, se recolectaron al azar 6 abejas vivas de cada grupo de tratamiento (3 por uec) (Fig. 8).

Las abejas obtenidas de cada grupo fueron transportadas al laboratorio para los estudios correspondientes.

### **Estudios de expresión génica**

#### **a-Extracción de ARN**

Los abdómenes de cada abeja fueron obtenidos por sección del propodeum. Los segmentos abdominales, junto con los cuerpos grasos adheridos a ellos por defecto, fueron colocados en tubos Eppendorf libres de RNasas. Posteriormente se les adicionó 500 µl de TriReagent (Ambion) y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento, para facilitar la lisis (Fig. 8, 9 y 10). La extracción se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante.

### **b-Digestión con ADNasa**

La solución de ARN obtenido fue digerido con ADNasa I (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) para eliminar ADN genómico contaminante en un volumen final de 20  $\mu$ l a partir de 5  $\mu$ l de ARN contaminado con ADN genómico (1/10 del volumen de extracción). Se colocaron 2  $\mu$ l de Buffer de ADNasa, 0,25  $\mu$ l de Inhibidor de Ribonucleasas Rnase Out (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 0,20  $\mu$ l ADNasa (0,5 unidades) y se llevó a un volumen de 18  $\mu$ l con agua libre de RNAsas. Se incubó 30 min a 37°C, se agregaron 2  $\mu$ l EDTA 25 mM y finalmente se incubó 5 minutos a 65°C para inactivar la ADNasa.

El ARN resultante fue cuantificado mediante el kit Quant-it RiboGreen RNA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

### **c-Retrotranscripción**

La retrotranscripción se realizó mediante la enzima MMLV (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) a partir de 1  $\mu$ g del ARN tratado previamente

Se incubó el ARN junto a los *random hexamers* a 70°C durante 10 minutos, se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 4  $\mu$ l de First Strand Buffer 5X (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 1  $\mu$ l de dNTPs 10mM y 0,5  $\mu$ l de Inhibidor de RNAsas RNase Out (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) dejándose la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se calentó a 42°C durante 2 minutos. Posteriormente se agregó 1  $\mu$ l de retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Se incubó a 42°C durante 50 minutos, durante 15 minutos a 70°C y finalmente a 4°C durante 10 minutos. El ADNc se conservó a -20 °C hasta su utilización en los ensayos.

En todas las reacciones de retrotranscripción se procesó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa.

### **d-Determinación de la expresión génica**

Se efectuaron por PCR en Tiempo Real curvas standard para cada par de primers, con el fin de calcular las eficiencias de amplificación. Se realizaron amplificaciones por duplicado de un ADNc (T0) y sus diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Todas las curvas tuvieron una pendiente entre -3,1 y -3,5 y entre los duplicados la desviación standard fue en todos los casos < 0,167 según lo recomendado para realizar estudios de expresión génica relativos (Pfaffl, 2001).

Las reacciones de PCR en tiempo Real se llevaron a cabo utilizando una

mezcla preformada y optimizada (EvaGreen, Biodynamics), exceptuando primers, ADNc-molde y agua, en un volumen final de 20  $\mu$ l y por duplicado. La detección del producto amplificado por aumento de la fluorescencia en el tiempo se registró en un equipo Rotor Gene.

El protocolo de amplificación de beta actina involucra 35 ciclos (10 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C). El protocolo de amplificación de vitelogenina involucra 35 ciclos (10 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C, 30 segundos a 72°C).

Todas las determinaciones realizadas se efectuaron con una dilución de ADNc 1:10 y con una concentración de primers de entre 600 a 800 mM.

El gen endógeno utilizado para el análisis de expresión génica fue beta actina, utilizándose ADNc de T0 como calibrador.

Con el fin de corroborar la amplificación del producto del peso molecular esperado, los productos de la PCR fueron corridos en geles de agarosa 2,5% y teñidos con una solución 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio en buffer TBE 1X y visualizados en un transiluminador U.V.

## **Determinación de Proteínas Totales en cuerpos grasos**

### **a-Extracción de proteínas totales**

Las proteínas totales fueron precipitadas del sobrenadante de fenol-cloroformo obtenido luego de la sedimentación del pellet de RNA. Luego de una serie de lavados en buffer, el pellet que contenía las proteínas fue solubilizado en SDS 10% y almacenado a -20°C hasta su uso (kit Tri-Reagent DNA/RNA/protein Isolation-Amibion).

### **b-Determinación de la concentración de proteínas totales**

Una alícuota de 1  $\mu$ l de proteína obtenida según lo descripto anteriormente, fue disuelta en 100  $\mu$ l de agua destilada. A la solución se le agregó 1ml de reactivo de Bradford (Bradford, 1976), se homogeneizó y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se procedió a la cuantificación proteica midiendo absorbancia a 595 nm.

Se realizó la curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina como proteína estándar. Las muestras fueron determinadas por duplicado.

## **Análisis estadísticos**



Los resultados del título y nivel de transcripción de vitelogenina obtenidos fueron analizados aplicando los test de ANOVA, Tuckey y Kruskal-Wallis con el paquete estadístico XLSTAT® (2011).

Para la determinación de los niveles relativos de expresión de vitelogenina se aplicó el método ddCT.

### **Resultados:**

Los negativos de retrotranscripción para los dos pares de primers de beta actina y Vg no presentaron producto de PCR y se obtuvo en todas las reacciones la amplificación del producto del peso molecular esperado.

Las curvas de disociación (melting) efectuadas en cada caso para corroborar la amplificación de los productos correctos y asegurarse que no se forman dímeros de primer que pudieran estar interfiriendo en la lectura de fluorescencia del termociclador se presentan en las Fig. 12 y 14.

Las eficiencias de amplificación fueron para ambos genes cercanas al 100% (Fig. 11 y 13).

El resultado de de la corrida electroforética en geles de agarosa (Fig. 15 y 16) corroboró la presencia de las bandas de los pesos moleculares esperados para cada gen en los productos amplificados.

Los niveles de expresión de Vg (Fig. 17) y proteína total (Fig. 18) correspondientes tiempo 1 no presentaron diferencias significativas entre los Grupos 1, 2, 5 y 6 (Expresión: ANOVA  $p < 0,01$ ,  $\alpha = 0,05$ ; proteína:  $p = 0,810$ ,  $\alpha = 0,05$ ), pero si resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en los Grupos 3 y 4 (expresión: ANOVA  $p = 0,671$ ,  $\alpha = 0,05$ ; proteína: Kruskal-Wallis  $k = 5,77$ ,  $p = 0,016$ ,  $\alpha = 0,05$ ).

Para el tiempo 2, los niveles de Vg de los grupos 3 y 4 resultaron superiores al resto de los grupos, si bien son estadísticamente diferentes a los grupos 5 y 6 ( $p < 0,001$   $\alpha = 0,05$ ), no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,022$   $\alpha = 0,05$ ) con los grupos 1 y 2, debido a la alta dispersión registrada por estos grupos en este tiempo de estudio. En contraposición a este resultado, los valores de proteína total para estos grupos fueron significativamente menores (Kruskal-Wallis  $p = 0,004$ ,  $\alpha = 0,05$ ) que en los grupos 1, 2, 5 y 6.

En el tiempo 3 los niveles tanto de Vg como de proteína total no presentaron diferencias significativas entre los grupos (expresión: ANOVA  $p = 0,111$ ,  $\alpha = 0,05$ ; proteína: Kruskal-Wallis  $P = 0,108$ ,  $\alpha = 0,05$ ).

## Discusión:

En base a los resultados obtenidos, se puede constatar que ante la disponibilidad de una fuente proteica, los niveles de proteínas totales, junto con la expresión génica de Vg presentan un máximo en la edad correspondiente a la obrera nodriza, para luego decrecer paulatinamente en concordancia con lo propuesto por numerosos autores (Fluri et al., 1982; Amdam et al., 2006)

Estos resultados se presentaron ante la disponibilidad *ad libitum* de una fuente proteica, ya sea natural (polen ensilado) o artificial como el compuesto Apipromotor® sin una diferencia significativa entre ambos.

De esto se desprende que el formulado nutricional para abejas Apipromotor® resulta capaz de suplir las demandas proteicas de la abeja nodriza, permitiendo en condiciones de carencia natural que la abeja cumpla con normalidad las distintas etapas de su desarrollo.

Esta conclusión se refuerza al analizar el comportamiento de los niveles de expresión de Vg en los grupos carentes de oferta proteica.

Bajo estas condiciones, los organismos presentaron el nivel de expresión génica máximo a los 10 días de emergidas mientras que en las abejas con disponibilidad de proteínas se presentó a los 5 días. Pese a este incremento tardío de ARNm los títulos de proteínas totales registrados no respondieron de igual forma debido a la carencia de materia prima.

En todos los casos, a los 21 días se registraron los niveles más bajos en ambos parámetros, demostrando que en presencia o ausencia de proteínas disponibles, la producción de ARNm para la síntesis de Vg disminuye, evidenciando el hecho de que la abeja no fabricará más Vg, pese a no haber logrado las reservas necesarias.

De esta forma podemos establecer que la disponibilidad de proteína natural (pan de abeja) o artificial (Apipromotor®) estimulan tempranamente en la vida de la obrera la producción de ARNm de Vg, y por ende, los títulos de proteínas totales necesarios para el normal desarrollo y longevidad del organismo.

## Conclusiones

El consumo del compuesto Apipromotor® genera en la abeja *A. mellifera* un efecto en los niveles de expresión génica y consecuente síntesis de vitelogenina similar al pan de abejas, por lo que puede ser utilizado en la industria apícola en reemplazo de polen cuando la oferta es escasa o nula.

El consumo del compuesto Apipromotor® genera en la abeja *A. mellifera* niveles de proteínas similares a los producidos por el consumo del pan de abejas, asegurando así la normal atención de la cría, la recolección de polen y longevidad de la abeja.

La expresión génica de vitelogenina ha demostrado ser un parámetro cuantificable válido al momento de comparar la eficacia de las dietas proteicas y es de esperar que también lo sea al evaluar la calidad nutricional de los distintos pólenes que recolecta la abeja.

## Bibliografía.

- Amdam, G. V.; Omholt, S. W. 2002. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J. Theor. Biol.* 216, 209-228
- Amdam, G. V.; Norberg, K.; Hagen, A.; Omholt S. W. 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1799-1802.
- Amdam, G. V.; Norberg, K.; Omholt, S. W.; Kryger, P.; Lourenço, A. P.; Bitondi M. M.; Simões, Z. L. 2005. Higher vitellogenin concentrations in honey bee workers may be an adaptation to life in temperate climates. *Insectes Sociaux* Volume 52, Number 4, 316-319
- Amdam, G. V., Norberg, K; Page, R; Erber, J; Scheiner, R. 2006. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behav. Brain Res.* 169:201-205.
- Bitondi M.M.; Simões Z .L.1996. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers, *J. Apic. Res* 35, 27–36.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-254
- Campana, B.; Moeller, F. E. 1977. Honey Bees: Preference for and Nutritive Value of Pollen from Five Plant Sources. *J. of Econ. Entomology.* Vol. 70, no. 1 - pg. 39-41
- Crailsheim, K. 1991. Interadult feeding of jelly in the honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Comp. Physiol. B* 161, 55-60.
- Cremonese, T. M.; De Jong D.; Bitondi, M. M. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast testing protein diets for honey bees (Hymenoptera:Apidae). *Journal of Economic Entomology.* 91: 1284-1289.
- Fluri, P., Luscher, M., Wille, H., Gerig, L. 1982. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology* 28, 61–68.
- Kleinschmidt, G. J.; Kondos, A. C. 1976. Influence of crude protein levels on colony production. *The Australasian Beekeeper*, Aug. 1976, Vol 78, pp 36–9.
- Kleinschmidt, G. J., 1990. The Parameters of Protein in Bee Biology. En: Report of the Honey Research Council Workshop. Review of Nutrition Work in Queensland and New South Wales. Australia. p. 7-12.

- Maurizio, A. 1950. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honey bee. *Bee World* 31: 9-12.
- Nelson, C. M.; Ihle, K. E.; Fondrk, M. K., Page, R. E.; Amdam, G. V. 2007. The gene *vitellogenin* has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol* 5(3): e62. doi:10.1371/journal.pbio.0050062
- Otis, G. W.; Wheeler, D. E.; Buck, N.; Mattila, H. R. 2004. Storage proteins in winter honey bees. *Apiacta*, 38; 352-357
- Pernal S. F.; Currie R. W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31 387-409
- Pernal S. F.; Currie R. W. 2002. Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, 63: 369-390
- Pernal S. F.; Currie R. W. ., 2001.- The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 51: 53-68.
- Piulachs, M. D.; Guidugli, K. R.; Barchuk, A. R. Cruz, J.; Simões, Z. L.P.; Bellés, X. 2003. The vitellogenin of the honeybee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* 33:459–465.
- Pfaffl, M.W., 2001. Método Pfaff, *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45
- Toth, A. L.; Kantarovich, S.; Meisel, A. F.; Robinson, G. E. 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees *The Journal of Experimental Biology* 208, 4641-4649