



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**LEVADURAS ASOCIADAS A DOS ESPECIES DE  
ABEJAS SIN AGUIJÓN (APIDAE: MELIPONINI) Y A  
TRES ESPECIES DE LA FLORA NECTARÍFERA DE  
YUCATÁN**

Tesis que presenta

**BLANCA MAGDALENA LIZAMA CANTO**

En opción al título de  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Opción Recursos Naturales

Mérida, Yucatán a 1 de Junio de 2011



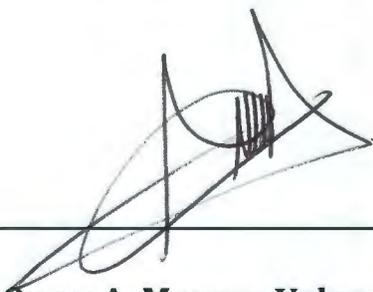


## RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán** fue realizado en los laboratorios de la **Unidad de Recursos Naturales y Biotecnología** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. **María Azucena Canto Aguilar**, dentro de la Opción **Recursos Naturales**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



---

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán, México; a 1 de Junio de 2011

### **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Nombre: \_\_\_\_\_

Blanca Magdalena Lizama Canto

## AGRADECIMIENTOS

A las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) por las facilidades brindadas, en especial a la Unidad de Recursos Naturales por facilitar el uso de equipo, material e instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, además del financiamiento de los proyectos (clave: 80031) y fiscal (clave: 1039300017).

A María Azucena Canto Aguilar por ser la directora de ésta tesis, además de ser una excelente maestra y una inspiración tanto en lo profesional como en lo personal.

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Medina por facilitar la manipulación de colonias de abejas sin aguijón, además de su tiempo y su paciencia para la revisión de este trabajo. Igualmente al Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la UADY, por las facilidades brindadas.

A la Dra. Ivón Ramírez y al Dr. Rafael Durán por el tiempo, dedicación y paciencia para la ardua revisión de éste documento, además de sus oportunos comentarios y observaciones. Al Dr. Carlos González por sus observaciones y comentarios sobre todo en la parte estadística

A las técnicas Rosalina Rodríguez y Atzelby López, por su enorme ayuda y paciencia tanto para el trabajo de campo como de laboratorio, además de brindarme su amistad.

A la Unidad de Biotecnología en especial a las Doctoras Rocío Borges y Marcela Gamboa, así como a las técnicas Mirbella Cáceres, Karlina García, Manuela Reyes y Leticia Medina por su ayuda y todas las facilidades brindadas. Al Dr. Felipe Barahona y al técnico Jorge Domínguez por las facilidades para el uso de material de laboratorio.

A la Profesora Rita Alfaro por su tiempo y sus enseñanzas sobre la identificación de polen. Igualmente al M. en C. Humberto Moo por su importante ayuda en la obtención de muestras de los nidos y de las abejas.

Al Dr. Carlos Herrera por sus consejos y sus observaciones para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: César Canche, Raymundo Ramírez, Ricardo Gaumer y Rene Garruña, por sus consejos, ayuda y amistad brindados.

A mis colegas y amigos Jorge Aguilar y Jeanett Escobedo por su ayuda incondicional.

A todos mis compañeros y amigos de parranda tanto del CICY como de otros rumbos, gracias por los momentos de relax y locura, ustedes saben quiénes son.

A todas las personas que directa o indirectamente me ayudaron y me apoyaron en esta etapa de de mi vida.

*A mi madre, porque siempre me ha apoyado incondicionalmente.*

*A mi familia: Elías, Karla, Marina Oldi, Marifer, Tony y mi papá.*

*Ustedes me inspiran a seguir adelante*

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>CAPITULO I</b>	5
<b>INTRODUCCION</b> .....	5
<b>ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	5
LAS LEVADURAS: SU RELACIÓN CON EL NÉCTAR Y EL POLEN.....	5
LAS LEVADURAS: SU RELACIÓN CON LAS ABEJAS.....	7
GENERALIDADES DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN.....	8
<b>HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	11
<b>SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO</b> .....	12
ABEJAS.....	12
PLANTAS.....	13
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	17
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	18
<b>CAPITULO II</b>	23
<b>PRESENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN LAS FUENTES DE ORIGEN: NÉCTAR, ABEJAS NATIVAS SIN AGUIJÓN Y SUS NIDOS</b> .....	23
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.....	25
CONTEOS DE CÉLULAS DE LEVADURAS Y GRANOS DE POLEN.....	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	29
FRECUENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN EL NECTAR.....	29
FRECUENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN LAS ABEJAS SEGÚN SU ESTRUCTURA DE COLECTA.....	30
FRECUENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN LOS NIDOS DE LAS ABEJAS.....	31
COMPARACIÓN ENTRE LAS TRES FUENTES DE LEVADURAS: NECTAR, ABEJAS Y NIDOS.....	34
FRECUENCIA Y DENSIDAD DE POLEN EN LAS ABEJAS Y SUS NIDOS.....	34
ABEJAS.....	34
NIDOS.....	35
<b>DISCUSIÓN</b> .....	37
NÉCTAR.....	37
ABEJAS.....	39
NIDOS.....	40
FUENTE PRINCIPAL DE LEVADURAS.....	41
POLEN.....	42
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	43

<b>CAPITULO III.</b>	47
<b>RIQUEZA DE CEPAS Y DIVERSIDAD DE CÉLULAS DE LEVADURAS ENCONTRADAS EN LAS FUENTES DE ESTUDIO: NÉCTAR, ABEJAS NATIVAS SIN AGUIJÓN Y SUS NIDOS.....</b>	47
<b>INTRODUCCION.....</b>	47
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	49
SIEMBRAS, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	49
SIEMBRAS.....	49
AISLAMIENTO.....	50
CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	50
CARACTERIZACIÓN DE FROTIS DE CÉLULAS DE LEVADURAS.....	51
CARACTERIZACIÓN DE GRANOS DE POLEN.....	52
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	52
<b>RESULTADOS.....</b>	54
CRECIMIENTO DE CEPAS.....	54
CARACTERIZACIÓN DE FROTIS.....	55
COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS.....	57
NÉCTAR.....	58
ABEJAS.....	59
NIDOS.....	60
IDENTIFICACIÓN DE GRANOS DE POLEN.....	63
<b>DISCUSIÓN.....</b>	63
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	67
<b>CAPITULO IV</b>	71
DISCUSIÓN GENERAL.....	71
CONCLUSIONES.....	71
PERSPECTIVAS.....	72
<b>ANEXOS.....</b>	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Área de forrajeo de diferentes especies de abejas según Quezada (2005) utilizada para ejemplificar la metodología de Greenleaf <i>et al.</i> (2007).....	12
2	Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para las tres fuentes de estudio (plantas, nidos y abejas) basado en similitud de Bray-Curtis ( <i>estrés</i> =0.13).....	55
3	Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para las especies de estudio tanto de plantas como de abejas, basado en similitud de Bray-Curtis ( <i>estrés</i> =0.09).....	57
4	Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para las estructuras de transporte de las dos especies de abejas estudiadas, basado en similitud de Bray-Curtis. 1 ( <i>estrés</i> =0.12) y 2 ( <i>estrés</i> =0.1).....	59
5	Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para los nidos de las dos especies de abejas estudiadas, basado en similitud de Bray-Curtis. 1 ( <i>estrés</i> =0.1) y 2 ( <i>estrés</i> =0.14).....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Frecuencia de levaduras en las estructuras analizadas de las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.....	28
2	Densidad promedio $\pm$ E.E. de levaduras en las estructuras analizadas de las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.....	29
3	Frecuencia de levaduras en cada uno de los nidos de las dos especies de abejas sin aguijón estudiadas.....	30
4	Frecuencia de levaduras en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.....	30
5	Densidad promedio $\pm$ E.E. de levaduras en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.....	31
6	Frecuencia de granos de polen en las estructuras analizadas para las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.....	33
7	Densidad promedio $\pm$ E.E. de granos de polen en las estructuras analizadas de las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.....	33
8	Frecuencia de granos de polen en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.....	34
9	Densidad promedio $\pm$ E.E. de granos de polen en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.....	34
10	Morfotipos de células de levaduras encontradas en cada una de las fuentes de estudio.....	54

## RESUMEN

Comúnmente clasificadas dentro del mundo de los hongos, las levaduras son microorganismos eucariotas especializados en el desdoblamiento y consumo de compuestos orgánicos, principalmente azúcares. Dentro de la amplia gama de especies, las levaduras que están asociadas a las recompensas florales, revisten especial interés por el vínculo ecológico y evolutivo que une microorganismos y plantas nectaríferas con insectos como las abejas. En Yucatán, existe un grupo de abejas sociales que pertenecen a la tribu Meliponini o abejas sin aguijón, las cuales obtienen su alimento (néctar y polen), directamente de la flora nectarífera regional, llamada comúnmente flora melífera. Dos especies en particular, *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis* son de amplia distribución en la Península de Yucatán y también componentes esenciales en la meliponicultura. Ambas han sido domesticadas y/o procuradas desde las épocas ancestrales mayas. La relación de estas abejas con la flora melífera, no se puede entender completamente si no se realiza una evaluación que incluya el papel de las levaduras dentro de la interacción entre abejas y plantas. El presente trabajo de tesis constituye un primer esfuerzo en la comprensión del vínculo néctar-levaduras-abeja a través del análisis de la frecuencia y densidad de levaduras en diversos componentes de esta relación tripartita. De esta forma, se analizó la presencia de levaduras en (1) el néctar de flores de *Gymnopodium floribundum*, *Piscidia piscipula* y *Tecoma stans*; (2) en el polen y néctar recolectado y transportado por las abejas; y (3) en el aprovisionamiento de alimento en sus nidos, incluyendo el alimento larvario. Asimismo, se realizó un análisis morfológico de las diferentes células de levaduras encontradas en los componentes para indagar en la diversidad de morfo especies aisladas. Los principales resultados señalaron claramente que los cuerpos de las abejas son los principales reservorios de levaduras, seguidos de los aprovisionamientos de alimento dentro de los nidos y por último, del néctar de las plantas estudiadas. La mayor riqueza de tipos de células se encontró en el cuerpo de las abejas y la menor en el néctar de las flores y en los nidos. Estos resultados subrayan la importancia de las levaduras en la interacción entre plantas y abejas y sus implicaciones en campos como la meliponicultura regional.



## ABSTRACT

Yeasts are unicellular organisms classified as fungi with the ability to hydrolyze and to consume organic components, mainly sugars. Yeast associated to flower rewards are a relatively unknown group that might modify the output of plant-pollinator interactions. In Yucatan yeasts linked to nectariferous plants and native stingless bees are particularly important for the local apiculture practices. In particular, stingless bees are used by the mayan beekeepers to obtain high valued honey, and the production and harvesting of this type of honey heavily depends on the flowers around the beehives and nectar availability. In this context, the presence of nectarivorous yeasts in the nectar of flowers is practically disregarded. This thesis analyzed frequency and density of this group of yeast in the nectar of flowers of *Gymnopodium floribundum*, *Piscidia piscipula*, and *Tecoma stans* plants surrounding hives of *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis*, two species highly appreciated by local beekeepers. Samples of several sources were aseptically collected (flower nectar, stomachic content of bee workers, pollen on the corbicula, pollen and nectar stored within bee hives, larval food from bee brood cells) and analyzed in the lab. Additionally, yeasts found in the samples were cultured and isolated strains were characterized and stored. Results indicated the bee body as the main reservoir of yeasts, with a high frequency and density of yeast cells in the stomach and corbicula samples, followed by larval food and then by flower nectar; furthermore, the highest strains richness was found in the bee samples followed by the flower nectar and then by samples within the bee hives. This thesis not only showed the high frequency and density of yeasts intervening between flowers and bees interactions, but also highlighted the potential role that this type of microorganisms might have on the local beekeeping.



1

120-00

1

08

100

01

10

200

00

## INTRODUCCIÓN

La interacción entre plantas y animales ha dado lugar a una gran diversidad de formas, diferentes grados de especialización, además de diversas asociaciones químicas-nutricionales (Herrera y Pellmyr, 2002). Un ejemplo de esta interacción entre plantas y animales, es la relación recíproca entre las angiospermas y sus polinizadores, debido a que las plantas al necesitar servicios de polinización ofrecen recompensas florales a los polinizadores con alto valor nutritivo, como el néctar y el polen (Grimaldi, 1999 y Bronstein, 2001).

Las angiospermas y los insectos asociados a las flores, tienen el mismo tiempo de aparición que los microorganismos fermentadores de azúcares, por lo que podríamos estar hablando de una interacción tripartita en la cual las plantas, las levaduras nectarívoras y los insectos nectarívoros, han evolucionado y diversificado a lo largo del tiempo (Ganter, 2006). Un ejemplo de lo anterior es la asociación que hay entre la flora nectarífera, las levaduras y las abejas, ya que se han encontrado a estos microorganismos en el néctar de estas plantas, así como en los aprovisionamientos de alimento de estos insectos (Brysch-Herzberg, 2004).

## ANTECEDENTES GENERALES

### LAS LEVADURAS: SU RELACIÓN CON EL NÉCTAR Y EL POLEN

El néctar floral es considerado hábitat ideal para ciertas levaduras, debido a la habilidad fermentativa de estos microorganismos (Brysch-Herzberg 2004; Canto *et al.*, 2007; Manson *et al.*, 2007; Canto *et al.*, 2008; Herrera 2008; Herrera *et al.*, 2008), ya que la energía para su metabolismo la obtienen de los hidratos de carbono, azúcares contenidos en esta sustancia (Mushtaq *et al.*, 2006; Herrera, 2008).

La concentración de azúcares en el néctar puede modificarse dependiendo de varios factores fisiológicos y bioquímicos internos de la planta o por factores externos como los polinizadores (Nicholson, 1998). En particular, Herrera *et al.* (2008) y Canto *et al.* (2008) encontraron que en el néctar de *Helleborus foetidus* L., *Aquilegia vulgaris* L. y

*Aquilegia pyrenaica* DC. (Ranunculaceae) hay una anomalía de las hexosas o azúcares monosacáridos debido a que las levaduras están consumiendo o transformando estos azúcares. Esto podría jugar un papel ecológico importante por el efecto que los cambios en la concentración y composición de azúcares en el néctar pueden tener sobre la recompensa a los polinizadores y el comportamiento de forrajeo de los mismos.

El valor nutritivo del néctar radica en que se compone de agua y azúcares como la sacarosa y dos hexosas que son glucosa y fructosa principalmente, pero también contiene iones inorgánicos, aminoácidos, proteínas y otros constituyentes como lípidos, ácidos orgánicos, fenoles, alcaloides, terpenoides y otros metabolitos secundarios (Percival 1961; Baker y Baker 1982; Nicholson y Thournburg 2007; Park y Thournburg 2009).

La presencia de levaduras ha sido documentada en el néctar de diferentes especies de plantas, como por ejemplo en *Bombax ceiba* L. (Bombacaceae), *Canna indica* L. (Cannaceae), *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae), *Ixora coccinea* L. (Rubiaceae), *Malvaviscus arboreus* Cav. (Malvaceae), *Pancratium biflorum* Roxb. (Amaryllidaceae) (Mushtaq *et al.*, 2006; Mushtaq *et al.*, 2007; Mushtaq *et al.*, 2008), *Ruellia sp.* (Acanthaceae) (Saluja y Prasad, 2008) por mencionar sólo algunas e incluso en el néctar de plantas venenosas como *Carolina jessamine* (L.) J.St.-Hill. (Loganiaceae) (Manson *et al.*, 2007).

Al respecto, una pregunta que surge es ¿cómo llegan las levaduras al néctar floral? Se ha señalado a los insectos, particularmente escarabajos, moscas y abejas, como vectores específicos de comunidades de levaduras (Lachance *et al.*, 2001). En particular, se considera que las abejas son el grupo principal porque distribuyen a estos microorganismos en las flores durante sus pecoreos; además de que se ha reportado que las abejas portan a las levaduras en sus aparatos bucales e intestinos (Brysch-Herzberg 2004; Ganter 2006; Canto *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2008).

Las abejas regularmente al recolectar el néctar, también recolectan polen del cual se conocen ampliamente sus propiedades nutricionales, sin embargo, puede ser invadido por microorganismos que los transforman químicamente. Se cree que el polen puede llegar a estar "contaminado" con levaduras cuando las abejas forrajeadoras lo recolectan, lo cubren con néctar y lo empaquetan utilizando su lengua (Gilliam, 1979).

Diversos microorganismos como hongos filamentosos, bacterias y levaduras están comúnmente asociados con el polen (Snodow y Clive, 1996). Durante la interacción con las abejas estos microorganismos juegan un papel bioquímicamente importante en la

conversión y preservación del polen, haciéndolo fácilmente digerible, además de que dentro de los nidos ayudan a conservar este alimento (Da-Silva y Serrao, 2000).

Un grano de polen es una célula rodeada por una membrana compleja, en conjunto los granos de polen están contenidos en sacos polínicos de la antera de la flor y constituyen los gametos fecundantes masculinos en las plantas superiores. El polen es una fuente importante de lípidos, proteínas, vitaminas, minerales e hidratos de carbono, lo que lo hace un alimento importante para las abejas, las cuales lo colectan de las flores con sus patas y cerdas corporales, con la lengua lo humedecen con néctar, dándole forma de pequeñas bolas las cuales son colocadas en estructuras en forma de canasta que se encuentran en la tibia del tercer par de patas llamadas corbículas (Domínguez, 1994); finalmente estas pelotitas de polen son transportadas a sus nidos para su uso y almacenamiento (Zucoloto 1975 y 1977; Dafni 1992; Polaino 2006).

#### LAS LEVADURAS: SU RELACIÓN CON LAS ABEJAS

La relación entre las levaduras y las abejas ha sido ampliamente reportada; estudios como los de Pimentel *et al.* (2005) señalan la relación de dos especies de levaduras pertenecientes al género *Candida* encontradas en los nidos de las abejas solitarias *Megachile sp.* y *Centris tarsata* Smith F. en un bosque lluvioso de Brasil. Igualmente, Brysch-Herzberg, (2004) reportó diversas especies de levaduras asociadas a plantas polinizadas por abejorros del género *Bombus*.

Por otra parte, se ha encontrado que la abeja *Apis mellifera* L. tiene asociadas sus propias levaduras y éstas se encuentran principalmente en sus colmenas (Gilliam 1997; Gilliam y Taber 1991). Burnside (1930) publicó una lista de microorganismos entre los cuales menciona a *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen, *S. cerevisiae* Hansen, *S. apiculatus* Ress, *Torula sp.* y hongos miceliales aislados del contenido intestinal de abejas adultas, lo que sugiere una estrecha relación de los microorganismos tanto en los nidos como en el interior de estos insectos.

Un grupo de abejas consideradas un buen modelo de estudio para conocer la direccionalidad en este tipo de asociación, son las pertenecientes a la tribu Meliponini o abejas nativas sin aguijón. Estos insectos se alimentan, transportan y almacenan los recursos de la flora nectarífera y polinífera para realizar sus cosechas de miel, teniendo asociados sus propios microorganismos durante esta interacción (Gilliam *et al.*, 1985; Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003).

## Capítulo I

---

Además son escasos los estudios que señalan la relación con las levaduras, entre ellos están los de Rosa *et al.* (2003) y Teixeira *et al.* (2003), en Brasil y Costa Rica respectivamente, quienes han descrito las comunidades de levaduras asociadas a las abejas sin aguijón. Específicamente estudiaron los aprovisionamientos de miel, polen, propóleo y buches melíferos de individuos forrajeadores, enfocándose particularmente a las especies *Frieseomelitta varia* Lapeletier, *Tetragonisca angustula* Latreille, *Melipona quadrifasciata* Lapeletier, *Melipona rufiventris* Lapeletier y *Trigona fulviventris* Guérin.

En Mesoamérica, una de las culturas que aprovechó a las abejas sin aguijón fue la cultura Maya, quienes obtenían la miel para su uso como alimento, medicina y para sus ceremonias religiosas (Dardón y Enríquez, 2008). En México, estas abejas son importantes productoras de miel, jalea real, pan de polen, propóleo, cera entre otros, sin embargo se ha minimizado su importancia debido a la producción de miel y derivados provenientes de la especie *Apis mellifera* (CONABIO 2008; Echazarreta 1997).

### GENERALIDADES DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN

Las abejas sin aguijón se distribuyen únicamente en las regiones tropicales del planeta; en cuanto a su diversidad se conocen a nivel mundial actualmente 400 especies, en México están presentes 46 de esas especies (Wille 1976; Michener 2000) y específicamente para el Estado de Yucatán se han reportado 17 especies (Ayala, 1999).

Se consideran insectos sociales que viven en colonias, presentan una estructura bastante uniforme en sus nidos y una estructura social definida. Sus nidos presentan básicamente un tubo de acceso, ánforas de alimento en los cuales almacenan sus recursos y panales o cámaras de cría donde se desarrollan las larvas; en el interior del nido se encuentra una reina, las obreras y los zánganos. Sin embargo estas características pueden variar dependiendo de la especie (Quezada, 2005).

Estas abejas acopian varios recursos de la flora como lo es el néctar y el polen, entonces existe una diferencia importante en las recolectoras de sus colonias. Las que llegan con néctar buscan a otras abejas para hacer un intercambio de la carga por medio de sus probocides o lenguas, en un proceso llamado trofolaxis, lo cual realizan antes de que el alimento sea almacenado, a diferencia de las abejas que llegan con polen, donde la misma abeja es la que almacena el polen que trae en las patas (Hart, 2001).

Las abejas sin aguijón poseen un buche melífero en el cual transportan el néctar, esta estructura se encuentra alojada dentro del estómago, posee músculos que la

expanden o contraen y que permite a las abejas transportar y regurgitar el contenido de néctar. Dependiendo del tamaño de la abeja, es la cantidad de alimento que ellas transportan; su máxima capacidad es de 0.1ml (Gary y Lorenzen, 1976). El polen es recolectado y humedecido con néctar y saliva dándole la forma de pequeñas bolas las cuales colocan en estructuras en forma de canasta llamadas corbículas que se encuentran en su tercer par de patas (Reyes y Cano, 2000).

El rango de forrajeo o de vuelo también está estrechamente relacionado con el tamaño corporal de los individuos. Por ejemplo, especies que miden 5 mm abarcan áreas de 600m, a diferencia de especies más grandes que pueden llegar a alcanzar 2, 400m (Nieuwstadt y Ruano-Iraheta, 1996). En cuanto a su actividad de pecoreo, estas abejas primeramente salen a coleccionar polen, lo cual realizan aproximadamente entre 06:00 a 09:00 am; el néctar lo coleccionan posteriormente, de 10:00 am a 13:00 pm (Roubik y Buchmann, 1984). Su actividad de pecoreo se relaciona con factores como la edad de los individuos, el estado de la colonia, la diversidad de la floración, competidores potenciales y factores meteorológicos (Wilms *et al.*, 1996).

Se sabe acerca de la asociación de las abejas sin aguijón con las levaduras, sin embargo se desconocen estudios de esta asociación específicamente en la región. En este contexto, la presente tesis constituye un primer esfuerzo para estudiar la presencia y densidad de levaduras, además de señalar cuál es la fuente principal de estos microorganismos durante la interacción entre la flora nectarífera y las abejas nativas sin aguijón en Yucatán. Suponiendo que la fuente principal pudiera ser el néctar desde donde las abejas introducen a las levaduras a sus nidos, ó posiblemente sean los nidos donde almacenan su alimento; inclusive el propio cuerpo de las abejas pudiera ser el reservorio principal de dichos microorganismos.

## HIPÓTESIS

Debido a la relación documentada entre las levaduras y el néctar, así como la interacción entre las abejas sin aguijón y la flora nectarífera, en la presente tesis se plantean las siguientes hipótesis:

1. Existen levaduras en el néctar en las especies de la flora melífera en Yucatán.
2. Si las levaduras son transportadas por las abejas a través del néctar y el polen que colectan, entonces, es de esperar que existan levaduras dentro del nido de las abejas y sean particularmente abundantes en las estructuras de almacenamiento de alimento.
3. Por otra parte, si ocurre un transporte de alimento y por lo tanto de levaduras, entre el néctar de la flora melífera y nidos de las abejas, entonces, las levaduras deberían encontrarse en el cuerpo de las abejas pecoreadoras, particularmente, en el tracto digestivo y en las corbículas.
4. Si durante ésta interacción tripartita la abundancia de levaduras es la base para saber su fuente de origen, entonces la fuente principal será aquella en la cual exista una mayor densidad de levaduras.
5. Se espera que la riqueza de formas de levaduras encontradas sea mayor en la fuente donde las levaduras son más abundantes.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la frecuencia, densidad y formas (morfoespecies) de levaduras en tres fuentes de estudio: en las abejas, en sus nidos y en el néctar de especies selectas la flora melífera circundante a los nidos de las abejas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estimar la frecuencia y densidad de levaduras en tres especies de plantas: *Tecoma stans*, *Piscidia piscipula* y *Gymnopodium floribundum* cercanas a los nidos de dos especies de abejas sin aguijón: *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis*.

Asimismo, estimar la frecuencia y densidad de estos microorganismos, tanto en el cuerpo de las especies de abejas en estudio, como en los aprovisionamientos de alimentos de sus nidos.

Analizar la comunidad de levaduras presentes en los tres componentes estudiados (néctar, abejas y nidos) en función de las morfoespecies encontradas.

## SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

### ABEJAS

1) *Melipona beecheii* Bennet, es la abeja más importante en la meliponicultura de Yucatán, se considera de fácil manejo y es la abeja sin aguijón de mayor tamaño en la Península de Yucatán. La longitud de su cuerpo es de 10-11 mm, presenta en el tórax una velloidad blanca, el abdomen es negro con cinco anillos transversales color amarillo verdoso, la forma de su cuerpo es más o menos redondeada y los ojos son de un color gris verdoso traslucido (González, 2008).

Su respuesta defensiva es baja ya que son abejas de carácter dócil, sus colonias pueden tener de 800 a 1,200 abejas (Quezada 2005; González 2008). Habitan de forma natural en parches de selva primaria. La entrada a su nido asemeja a la forma de un sol o más o menos radiada hasta simplemente redondeada hecha con resina, barro o fragmentos de cal.

La entrada de sus nidos está siempre vigilada por una abeja guardiana; en el interior del nido, sus ánforas de alimento varían de entre 20 a 200, tienen una altura de 2.8 a 3 cm y un ancho de 1.5 a 2.0 cm; son de color café oscuro, fabricados de cera y se encuentran dispuestos de manera compacta; por lo general se ubican a los lados de las cámaras de cría, aunque en ocasiones se encuentran por debajo y encima de las mismas. Las cámaras de cría están compuestas por 8 a 12 panales horizontales de los cuales el 40% son celdas nuevas, es decir con el huevo recién depositado y el alimento larval sin consumir, el otro 60% son celdas de capullo en las cuales el individuo se encuentra en alguna etapa de su desarrollo. Una colonia sana está conformada regularmente de 1,000 a 1,200 individuos (Quezada, 2005 y González, 2008). De acuerdo a su tamaño pueden alcanzar distancias durante sus pecoreos de 2,400 m (Quezada, 2005).

2) *Scaptotrigona pectoralis* Dalla Torre, otra de las abejas de importancia en la meliponicultura en Yucatán, la cual es una abeja de tamaño mediano de 5 mm de longitud, presenta un color amarillo-naranja, poco pubescentes o con escasa velloidad. Su respuesta defensiva es alta, ya que defienden fieramente sus nidos liberando al momento del ataque una feromona producto de sus glándulas mandibulares con un fuerte olor a coco rancio (González, 2008).

La estructura de la entrada al nido es tubular hecha de cerumen (mezcla de cera y resinas), vigilada por 8 a 12 abejas dispuestas a la defensa. Sus poblaciones son

grandes, de entre 5,000 a 8,000 individuos en una colonia bien desarrollada. No se sabe cuántas ánforas de alimento hay por nido, pero su tamaño va de 2 a 2.7 cm de alto y de 1.9 a 2 cm de ancho (Chuc-Ramayo, 2005). El color de las ánforas es de color café oscuro a rojizo hasta un color casi negro según la edad de los mismos; su forma es ovoide y sus límites externos son muy difíciles de precisar ya que son muy compactos; se les puede encontrar principalmente junto a la cámara de cría. La cámara de cría está compuesta por panales que van de 12 cm de largo por 7 cm de ancho en promedio. De acuerdo a su tamaño pueden recorrer distancias de 600 m durante sus actividades de forrajeo (Quezada, 2005).

## PLANTAS

Para la selección de las especies de plantas que se analizaron en este estudio, se tomó en cuenta la metodología empleada por Greenleaf *et al.* (2007) (Figura 1), la cual considera el tamaño del cuerpo de la abeja para determinar cuál será su distancia de forrajeo. De esta manera, según el tamaño de *Melipona beecheii* y de *Scaptotrigona pectoralis*, se determinó cuál sería su rango hipotético de forrajeo para entonces seleccionar a las especies de plantas nectaríferas que estuvieran presentes dentro de este rango, partiendo de los nidos de estas abejas.

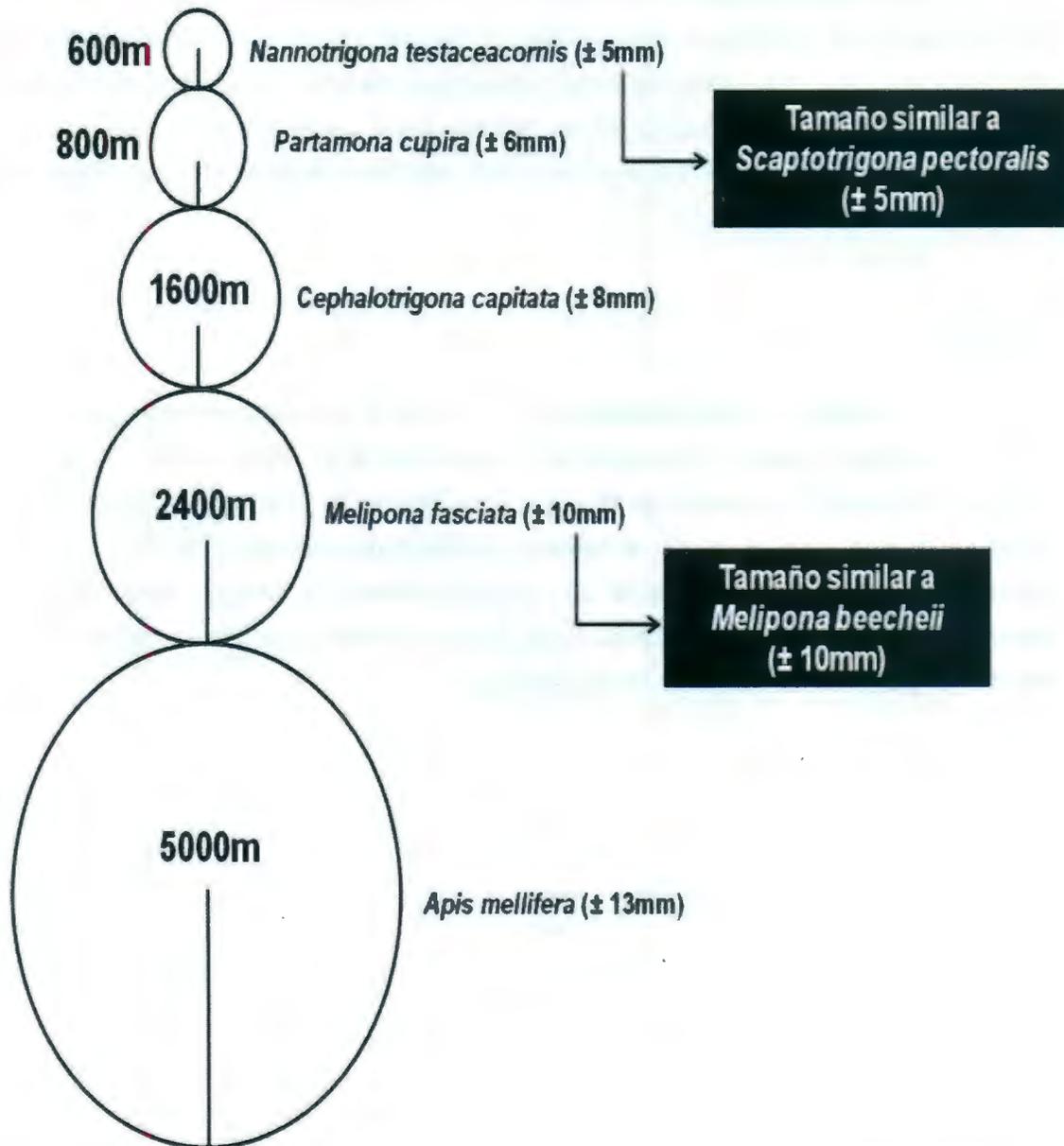


Figura 1. Área de forrajeo de diferentes especies de abejas según Quezada (2005) utilizada para ejemplificar la metodología de Greenleaf *et al.* (2007).

Una vez determinados los rangos hipotéticos de forrajeo de ambas abejas, se seleccionaron tres especies de plantas cuyos individuos estuvieron dentro del área de forrajeo de cada especie de abeja. Las plantas seleccionadas fueron:

1) ***Gymnopodium floribundum*** Rolfe (Polygonaceae), es una especie cuya importancia radica en las propiedades que su néctar le confiere a la miel, la cual es considerada de alta calidad por su sabor y aroma (CONABIO 2008 y González 2008). Su distribución abarca las selvas altas perennifolias y subperennifolias, selvas medianas y bajas caducifolias y caducifolias espinosas (Villegas *et al.*, 1998). Es muy común en las primeras etapas sucesionales de la vegetación. Su floración es masiva y va de febrero a mayo y en años con buena lluvia puede tener hasta dos floraciones. Conocida localmente como ts'iits'ilche', es un árbol pequeño o arbusto nativo que crece hasta 12 m de alto, con ramas flexuosas o torcidas, corteza parda, hojas obovadas a ovadas, pubescentes cuando jóvenes; los frutos numerosos pequeños encerrados entre cubiertas florales cafés persistentes en forma de corazón; sus flores duran aproximadamente entre dos y tres días de vida, son actinomorfas fasciculadas dispuestas en racimos de color verde-amarillento, presentan de 5 a 7 estambres y sus nectarios internos producen en promedio entre 15 a 17  $\mu$ l de néctar (observación personal).

2) ***Piscidia piscipula*** (L.) Sarg. (Fabaceae), es otra de las especies seleccionadas, la cual es importante productora de néctar de gran valor apícola; se distribuye en selvas altas perennifolias y subperennifolias, selvas medianas, selvas bajas caducifolias y subcaducifolias y caducifolia espinosa. Su floración es masiva entre los meses de febrero a mayo y se conoce localmente como ja'bín (Gentry, 1992). Es un árbol que alcanza hasta 20 m de altura, su tronco llega a tener un diámetro de hasta 50 cm, recto, con ramas ascendentes, copa densa, corteza fisurada desprendiéndose en escamas; las hojas ovadas dispuestas en espiral, imparipinnadas, compuestas de 7 a 9 foliolos opuestos, elípticos a oblongos, lanceolados con el margen entero, color verde amarillento y finamente pubescentes en el envés con pelos adpresos; los frutos en forma de vaina con alas de color café y alargados, que son quebradizos al madurar; sus flores duran aproximadamente entre dos y tres días de vida, son actinomorfas dispuestas en panículas, ligeramente perfumadas, cáliz de color gris-plateado o guinda grisáceo, pétalos rosados o ligeramente morados, nectarios internos y cada flor produce en promedio de 15 a 20  $\mu$ l de néctar (observación personal).

3) ***Tecoma stans*** (L.) Juss. (Bignoniaceae), considerada una planta melífera muy usada en la apicultura, es muy común en ambientes rudelares y se distribuye en Centro

## Capítulo I

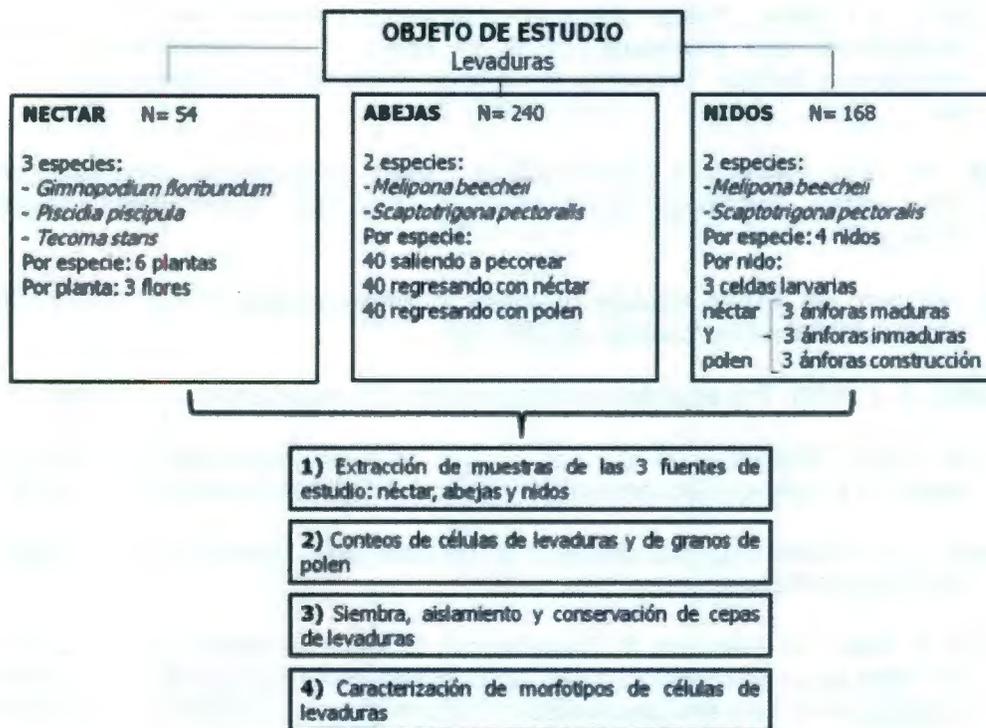
---

América y Sudamérica. Su floración es larga y va de septiembre a mayo o incluso puede durar todo el año (Souza *et al.*, 1981). Llamada localmente xk'anlool, puede presentarse en forma de arbusto o incluso árbol de pequeña talla, con hojas imparipinnadas, de 3 a 9 folíolos serrados y lanceolados, ápice agudo a acuminado y puberulentos al menos a lo largo del nervio principal del haz y del envés, a veces sobre toda la superficie del envés. El fruto en cápsula linear, subterete cuando fresco, de 7 a 21 cm de largo y de 5 a 7 mm de ancho, con agujeros, a veces liso; las semillas aladas hialino-membranáceas; presenta una inflorescencia en racimo terminal de hasta 20 flores amarillas débilmente fragantes que pueden durar de 3 a 5 días de vida, cáliz cupular, regularmente dentado, dientes poco pronunciados de 3-7 mm de largo, corola tubular-campanulada sobre un tubo basal angosto de 3.5 a 6 cm de largo (Stevens *et al.*, 2001), los nectarios son internos y producen en promedio entre 20-30  $\mu$ l de néctar (observación personal).

Cabe señalar que las tres especies son visitadas por las dos especies de abejas sin aguijón descritas en este estudio, pero además se observó la visita de otras especies de abejas sin aguijón como *Nannotrigona perilampoides*, *Trigona nigra*, así como por *Apis mellifera* e incluso por ciertos escarabajos y mariposas.

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

En el siguiente esquema se puede observar de manera general el diseño de muestreo empleado en esta tesis:



Se empleo la siguiente metodología: se extrajeron las muestras de las respectivas fuentes como néctar, abejas y nidos, teniendo la mayor sanidad posible al momento de tomarlas. Se verificó la presencia de levaduras en las mismas por medio de observaciones al microscopio y de técnicas de tinción (descritas más adelante). Se realizaron los conteos de las células de levaduras por medio de la técnica de la cámara de Neubauer para obtener la densidad de levaduras presentes en cada muestra.

Posteriormente se realizó la siembra de las muestras en un agar específico para el crecimiento de levaduras, una vez que las colonias crecieron exitosamente se procedió al aislamiento y descripción de las mismas; las cepas aisladas se conservaron, tanto en un medio líquido como en preparaciones fijas para microscopio y se realizó una caracterización morfológica de las células. Los métodos de conservación se explicaran detalladamente en capítulos posteriores.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106, 1-123.
- Baker, H. G., y I. Baker. (1982). Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In M. H. Nitecki (ed.), *Biochemical aspects of evolutionary biology*. University of Chicago Press. Chicago Illinois USA. 131-171 pp.
- Barnett, J.A., R.W. Payne y D. Yarrow. (2000). *Yeasts: characteristics and identification*. Third edition. Cambridge University Press. New York. United States of America. 1139 p.
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. *Microbiology Ecology*, 50, 87-100.
- Bronstein, J.L. (2001). The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters*, 4, 277–287.
- Brul, J.A. (1953). The influence of some organic acids on the alcoholic fermentation in yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Journal of Cellular Physiology*, 41, 23-36.
- Burnside, C. E. (1930). Fungous diseases of the honeybee. Department Agriculture U.S. *Techniques of conservation*, 149, 1-43.
- Canto, A; R. Pérez, M. Medrano, M. Castellanos y C. Herrera. (2007). Intra-plant variation in nectar sugar composition in two *Aquilegia* species (Ranunculaceae): contrasting patterns under field and glasshouse conditions. *Annals of Botany*, 99, 653-660.
- Canto, A., C. M. Herrera, M. Medrano, R. Pérez, and I. M. García. (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany*, 95, 315-320.
- Chuc-Ramayo, G. (2005). Uso de las aspiradoras en la meliponicultura moderna en Yucatán. *Memorias del XVIII Seminario Americano de Apicultura*. Villa Hermosa, Tabasco, México, 15-18 pp.
- CONABIO. (2008). *Mieles peninsulares y diversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad–Corredor Biológico Mesoamericano-México. México
- Dardón, M. y Enríquez E. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*, 33, 915-922.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology*. University of Haifa Israel Press, Oxford. 250 p.
- Da Silva, E., M. Borges; C. Medina, R. Piccoli y R. Schwan. (2004). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *Yeast Research*, 5, 859-865.

- Da Silva, F. y Serrao E. (2000). Nutritive value and apparent digestability of bee collected and bee stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Lart (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 31, 39-45.
- Dominguez, R. (1994). Taxonomia 3. "Stresiptera a Hymenoptera". Claves y diagnosis. Universidad Autónoma de Chapingo. Parasitología Agrícola. 200-295 pp.
- Echazarreta, M., J. Quezada, L. Medina and L. Pasteur. (1997). Beekeeping in the Yucatan Peninsula: development and current status. *Bee world*, 78, 115-127.
- Ganter, P. (2006). Yeast and Invertebrate Associations. Department of Biology, Tennessee State University, 3500 John Merritt Blvd, Nashville, TN 37209, USA. En C. A. Rosa y G. Peter (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. 2006. Springer, Hardcover. 580 p.
- Gary, N. E. y Lorenzen, K. (1976). A method for collecting the honey-sac contents from honey bees. *Journal Apiculture Research*, 15, 73-79.
- Gentry, A. (1992). *Flora Neotropica. Nova Genera et Species Plantarum*, 3, 144-1819.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the yeast. *Apidologie*, 10, 43-53.
- Gilliam, M; S. Buchmann y J. Lorenz. (1985). Microbiology of the larval provisions of the stingless bee *Trigona hypogea* an obligate necrophage. *Biotropica*, 17, 38-31.
- Gilliam, M. y S. Taber. (1991). Diseases, pests and normal microflora of honeybees, *Apis mellifera*, from feral colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58, 286-289.
- Gilliam, M. (1997). Identification and role of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *Microbiology Letters*, 155, 1-10.
- Grimaldi, D. (1999). The co-radiation of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86, 373-406.
- González, A. J. (2008). Cría y manejo de las abejas nativas sin aguijón en México. Universidad Autónoma de Yucatán. Secretaria de Fomento Agropecuario y Pesquero. Dirección Estatal de Apicultura. Gobierno del Estado de Yucatán. Planeta Impresores S.A. de C.V. Mérida, Yucatán, México. 177 p.
- Greenleaf, S., N. M. Williams, R. Winfree y C. Kremen. (2007). Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153, 589-596.
- Hart, A. (2001). Task-partioned nectar transfer in stingless bees. En Quezada-Euán, J.J.G; May-Itzá, W. de J; Moo-Valle, H. y Chab-Medina, J.C. (Eds.) *II Seminario Mexicano sobre abejas sin aguijón*, Mérida Yucatán, México. 79-87 pp.
- Herrera, C. M. (2008). Ladrones florales invisibles (un homenaje a Leeuwenhoek). *Quercus*, 269, 6-7.

## Capítulo I

---

- Herrera, C. M., I. M. García y R. Pérez. (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumblebee-pollinated plants. *Ecology*, 89, 2369-2376.
- Lachance, M. A, W. T. Starmer, C. A. Rosa, J. M. Bowles, J. S. Barker y D. H Janzen. (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *Yeast Research*, 1,1-8.
- Manson, J. S., M. A. Lachance y J. D. Thomson. (2007). *Candida gelsemii* sp. nov., a yeast of the Metschnikowiaceae clade isolated from nectar of the poisonous *Carolina jessamine*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 37-42.
- Michener, C.D. (2000). *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland USA. 913 p.
- Mushtaq, M; J. Ayesha y N. Sharfun. (2006). Biodiversity of yeast microflora in nectar of *Bombax ceiba* and *Canna indica* flower. *Pakistan Journal Botany*, 38, 1279-1288.
- Mushtaq, M; J. Ayesha y N. Sharfun. (2007). Biodiversity of yeast microflora in nectar of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ixora coccinea* flowers. *Pakistan Journal Botany*, 39, 1367-1376.
- Mushtaq, M; J. Ayesha y N. Sharfun. (2008). Biodiversity of yeast microflora in nectar of *Malvaviscus arboreus* and *Pancreatium biflorum* flowers. *Pakistan Journal Botany*, 40, 877-885.
- Nicolson, S. W. (1998). The Importance of osmosis in nectar secretion and its consumption by Insects. *American Zoologist*, 38, 418-425.
- Nicolson, S. W; y R. W. Thornburg. (2007). Nectar chemistry. En S. W. Nicolson, M. Nepi, and E. Pacini (eds.), *Nectaries and nectar*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 215-264 pp.
- Nieuwstadt, M.G. y Ruano-Iraheta , C.E. (1996). Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae) *Apidologie*, 27, 219-228.
- Park, S. y R. Thornburg. (2009). Biochemistry of nectar proteins. *Journal Plant Biologist*, 52, 27-34.
- Percival, M. S. (1961). Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist*, 60, 235-281.
- Pimentel, M. R; Y. Antonini, R. P. Martins, M. A. Lachance y C. A. Rosa. (2005). *Candida riococensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *Yeast Research*, 5, 875-879.
- Polaino, C. (2006). *Manual práctico del apicultor*. Grafillés Prind, Cultural, Madrid España. 509 p.
- Quezada, E; J. J. May y A. J. González. (2001). Meliponicultura en México: Problemas y perspectivas para el medio ambiente. *Bee World*, 82, 160-167.

- Quezada, E. (2005). Biología y uso de las abejas sin aguijón de la Península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini). Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 45 p.
- Reyes, J. y P. Cano. (2000). Manual de polinización apícola. Universidad Autónoma Antonio Narro. Unidad Laguna. Departamentos de Biología y Horticultura. Torreón, Coahuila, México. 52 p.
- Rosa, C. M; O. C. Lachance, A. Silva, M. Texeira, M. Marini, Y. Antonini and R. Martins. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *Yeast Research*, 4, 271-275.
- Roubik, D.W. y Buchmann, S.L. (1984). Nectar selection by *Melipona* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and the ecology of nectar intake by bee colonies in a tropical forest. *Oecologia*, 61, 1-10.
- Saluja, P. y Prasad G. (2008). *Candida ruelliae* sp. nov., novel yeast species isolated from flowers of *Ruellia* sp. (Acanthaceae). *Yeast Research*, 8, 660-666.
- Snowdon, J. y D. Cliver. (1996). Microorganisms in honey. *Food Microbiology*, 31, 26-29.
- Souza-Novelo, N; M. V. Molina y V. A. Barrera. (1981). Plantas melíferas y poliníferas de Yucatán. Fondo Editorial de Yucatán. México. 53 p.
- Stevens, W. D; C. Ulloa, A. Pool y O. M. Montiel. (2001). Flora de Nicaragua. Introducción Gimnospermas y Angiospermas. (Pandanaeae-Zygophyllaceae). Missouri Botanical Garden Press. Tomo III. 1911-2666 pp.
- Teixeira, P; M. Marin, J. R. Nicoli, Y. Antonini, R. P Martins, M. A. Lachance y C. A., Rosa. (2003). *Stammerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 339-343.
- Villegas, G; S. Cajero y A. Bolaños. (1998). Flora nectarífera y polinífera de la Península de Yucatán. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 126 p.
- Wille, A. (1976). Las abejas Jicotes del género *Melipona* (Apidae:Meliponini) de Costa Rica. *Review Biologist Tropical*, 24, 123-147.
- Wilms, W., V.L. Imperatriz-Fonseca y W. Engels. (1996). Resources partitioning between highly eusocial bees and posible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic forest. *Studies on neotropical fauna and environment*, 31, 137-151.
- Zucoloto, F. (1975). Valor nutritivo de polenes usados por diferentes especies de abejas para *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica* (Hymenoptera, Apoidea), *Revista Brasileña de Biología*, 35, 77-82.

## Capítulo I

---

Zucoloto, F. (1977). Nutritive value of some pollen substitutes for *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica*. Journal Apiculture Research, 16, 59-61.

## PRESENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN: NÉCTAR, ABEJAS Y NIDOS

### INTRODUCCIÓN

Las abejas melíferas aprovechan los recursos florales para la fabricación de miel, sin embargo, con la introducción a Mesoamérica de la abeja *Apis mellifera*, se ha minimizado la importancia comercial de otro tipo de abejas productoras de miel como son las pertenecientes a la tribu Meliponini o abejas sin aguijón (González, 2008), a pesar de que de ellas se obtienen productos como el pan de polen y la miel, los cuales son reconocidos popularmente en Latinoamérica por sus propiedades terapéuticas (Dardón y Enríquez, 2008).

La Península de Yucatán ha sido reconocida ampliamente como una zona importante en la producción de miel, siendo las comunidades Mayas las que vienen realizando esta práctica desde tiempos Pre-colombinos; esta larga tradición probablemente haya surgido debido al gran potencial polinífero y nectarífero de la flora regional (Toledo *et al.*, 2008). Entre los inventarios acerca de este tipo de flora en la Península de Yucatán, se conocen los de Souza-Novelo (1940), Villegas *et al.* (1998), los cuales mencionan aproximadamente 370 especies, de las cuales el 40% pertenecen a la familia Fabaceae (Flores, 2001).

En el estado de Yucatán la flora polinífera y nectarífera se clasifica como segunda categoría en importancia, solo después de la flora de uso medicinal (Toledo *et al.*, 2008), sin embargo, son prácticamente desconocidas sus características de sus néctares, así como su relación con microorganismos nectarívoros (levaduras). El único estudio conocido que señala la presencia de levaduras en el néctar de diferentes especies de la región, es el de Herrera *et al.* (2009), en el cual se reporta altas densidades de estos microorganismos en el néctar de plantas de tres regiones del mundo: sureste de España, sur de África y la Península de Yucatán. En esta última, se analizaron 37 especies pertenecientes a 44 familias taxonómicas como Boraginaceae, Convolvulaceae, Malvaceae y Bignoniaceae.

La presencia de levaduras en la miel y en el polen de las abejas sin aguijón ha sido documentada en países como Costa Rica y Brasil, siendo este último donde más estudios se tienen al respecto. En Brasil Rosa *et al.* (2003) aislaron 152 especies de

## Capítulo II

---

levaduras encontradas en los nidos, específicamente en la miel, polen, propóleo, cera y en pelotitas de materia fecal, de *Tetragonisca angustula* Latreille, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier y *Frieseomelitta varia* Lepeletier. Igualmente Teixeira *et al.* (2003) describieron a *Stamerella meliponinorum*, una nueva especie de levadura asociada íntimamente a las abejas sin aguijón *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* y *Trigona fulviventris*. A pesar de que se conoce la existencia de levaduras en los nidos de las abejas sin aguijón, no se conocen estudios acerca de la presencia de estos microorganismos en el interior de las abejas o en otras partes del cuerpo tales como las corbículas. En Puerto Rico, se ha reportado la presencia de levaduras en el contenido intestinal de individuos adultos, únicamente en la abeja *Apis mellifera*, siendo *Candida*, *Rhodotorula* y *Sacharomyces* los géneros de levaduras más comunes (Gilliam y Prest, 1972).

Es importante señalar que en México y específicamente en Yucatán, esta asociación entre abejas sin aguijón y levaduras es un campo prácticamente desconocido, aunque recientemente se ha registrado la presencia de levaduras en el néctar de varias especies nectaríferas en Yucatán (Herrera *et al.*, 2009), sugiriendo la importancia que la interacción entre néctar, microorganismos y abejas puede tener en esta región.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este capítulo es conocer, evaluar y analizar la densidad de levaduras que se encuentran en la interacción flor, abeja, nido; con el fin de poder dilucidar cuál es la posible fuente principal de estos microorganismos lo cual contribuiría a entender una de las interacciones más importantes de la naturaleza, no sólo desde un punto de vista económico sino también ecológico.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Esta parte del estudio se realizó en el Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), que está ubicada sobre la carretera Mérida-Xmatkuil en el Km 15.5. Cuenta con un meliponario moderno, con un número significativo de colonias establecidas en cajas de madera, las cuales se encuentran a espaldas del Departamento de Apicultura del Campus. Las colmenas están rodeadas por un parche de vegetación perturbada de selva baja caducifolia con árboles y arbustos de hasta 2 m de alto como *Piscidia piscipula* y *Gymnopodium floribundum*, además de vegetación secundaria, con especies como *Tecoma stans*. Estas tres especies fueron seleccionadas para el estudio, tanto por la cercanía de sus individuos a los nidos de las abejas como por su época de floración y su importancia como fuente de néctar para las abejas en el meliponario.

La época de cosecha de miel de las abejas nativas sin aguijón es a partir del mes de febrero y hasta el mes de mayo (CONABIO, 2008). Tomando en cuenta esto, los muestreos se realizaron a partir del mes de marzo hasta el mes de julio de 2009.

**Néctar.** Para las muestras de néctar, por cada individuo de cada especie se escogieron tres inflorescencias, las cuales estuviera en su máxima floración, éstas inflorescencias fueron tomadas y colocadas en recipientes con agua potable dentro de una nevera a una temperatura de 15-22 °C hasta su procesamiento. En el laboratorio se seleccionaron al azar tres flores por cada inflorescencia. Se extrajo el néctar de las flores y se procedió a la tinción y conteo de células de levaduras, metodología que se describirá más adelante

**Abejas.** Por cada nido, utilizando una red entomológica se atraparon 10 abejas obreras que estuviesen llegando al nido después de su incursión por alimento y que mostrasen signos de haber colectado polen (evidente por las pelotitas amarillas de polen empacadas en sus corbículas) y 10 abejas que también estuviesen llegando al nido pero con signos de haber colectado néctar; es decir, abejas sin polen en sus corbículas. A las abejas que regresaban al nido con corbículas con signos de polen acumulado, se les extrajo una muestra de dicho polen utilizando palillos de madera estériles. Esta muestra fue colocada en viales estériles para ser analizada posteriormente en el laboratorio. A las abejas que

## Capítulo II

---

llegaron con néctar se les indujo a regurgitarlo dentro de un vial estéril presionando suavemente su abdomen. Los viales conteniendo el néctar fueron almacenados en una nevera con hielo seco y llevados inmediatamente a condiciones controladas de laboratorio.

También se capturaron 10 abejas que salían del nido para iniciar su viaje de recolección de alimento, las cuales fueron colocadas en viales estériles y llevadas al laboratorio, en donde fueron disectadas para separar cuidadosamente el buche melífero del resto del aparato digestivo y poder extraer el néctar contenido. En este caso se tiñeron y contabilizaron tanto células de levaduras como de granos de polen que pudieron estar contenidas en las estructuras analizadas, lo anterior con el fin de conocer cuales especies vegetales están siendo visitadas por las abejas, además de las ya mencionadas en este estudio.

Este procedimiento se realizó de 10:00 a 13:00 horas, ya que según Roubik y Buchmann (1984), a estas horas se da una mayor actividad de forrajeo de los meliponinos.

**Nidos.** En los cuatro nidos seleccionados de *M. beecheii* y *S. pectoralis* se extrajeron muestras, tanto de las ánforas de polen, fácilmente reconocidas por su color más oscuro, como de néctar. Con el fin de comparar si el grado de madurez del alimento puede influir en la presencia y densidad de levaduras, ambos tipos de ánforas se sub-clasificaron de acuerdo a su grado de madurez en tres tipos o etapas: (1) en construcción, las cuales estaban vacías de alimento y con paredes incompletas, las abejas no las han terminado de formar; (2) inmaduras, porque las que las abejas ya les han colocando alimento; y (3) maduras, las cuales ya han sido plenamente llenadas de alimento y las han operculado, es decir, han puesto una porción de cerumen a manera de tapa, sellando el ánfora. Se seleccionaron tres ánforas por cada grado de madurez y tipo de alimento almacenado. Cada extracción de material se realizó por medio de palillos de madera esterilizados, los cuales fueron introducidos en las ánforas de alimento y colocados inmediatamente dentro de viales estériles para su posterior análisis en laboratorio; las ánforas maduras fueron desoperculadas justo antes de introducir el palillo estéril de madera. Para el caso de las ánforas en construcción, se extrajo una porción sólida del cerumen que formaba el piso de la estructura.

También se extrajeron muestras del alimento larvario en la sección de las celdas de cría dentro del nido. En cada nido se seleccionaron tres celdas que estuvieran en la

primera etapa de crianza; es decir, celdas abiertas que ya contenían su respectiva porción de alimento larvario más un huevo depositado encima. Se utilizó la misma metodología de extracción por medio de palillos estériles de madera.

#### CONTEOS DE CÉLULAS DE LEVADURAS Y GRANOS DE POLEN

Todas las muestras obtenidas se procesaron y analizaron en el laboratorio de Interacciones Planta-Animal del Centro de Investigación Científica de Yucatán, de la Unidad de Recursos Naturales. En condiciones de asepsia y utilizando microcapilares calibrados de vidrio, se procedió a medir los volúmenes extraídos de cada una de las muestras obtenidas del néctar de las flores, los buches melíferos, el polen de las corbículas, las ánforas de néctar, polen y de las celdas de cría.

Debido a que las muestras tomadas de las ánforas en construcción eran porciones de cerumen insoluble en agua se procedió a realizar un lavado de la muestra agregando 100 µl de agua purificada estéril dentro de vial estéril, en el cual se sumergió el cerumen y se agitó vigorosamente; posteriormente, se extrajo una alícuota del volumen de la muestra para su análisis.

Después de haber medido los volúmenes, se agregó a cada muestra un volumen conocido de tinte azul lactofenol el cual tiñe fácilmente el plasma celular y las paredes celulares, facilitando el reconocimiento de las células de las levaduras. Al realizar esta dilución se obtuvieron dos tipos de volúmenes por muestra, el inicial y el final después de la dilución con azul lactofenol. El volumen total de cada muestra fue colocado en un hematocitómetro o cámara de Neubauer siguiendo la metodología sugerida por Kearns e Inouye (1993). Posteriormente, se observó la muestra en un microscopio óptico Olympus cx31, a una magnificación de 400x y se contaron todos los microorganismos que se consideraron levaduras y granos de polen. Se consideraron células de levaduras si presentaban las características señaladas por Barnett *et al.* (2000) como son: (1) células que se puedan contar a una magnificación de 400x en el microscopio debido a que entre los microorganismos, las levaduras se consideran de tamaño grande; (2) células que se tiñan con azul lactofenol ya que es un tinte especial para hongos y microorganismos con gruesas paredes celulares; (3) células esféricas, ovoides y elipsoidales, cilíndricas hasta un poco alargadas; se distinguen de las bacterias porque con la tinción quedan más oscuras y (4) células que se estén dividiendo ya que generalmente estos microorganismos se reproducen por gemación o fisión.

## Capítulo II

---

La densidad de células de levadura y de granos de polen de cada muestra fue calculada de la siguiente manera: se realizó un conteo, replicado 16 veces, de todas las células encontradas dentro de áreas específicas de la superficie de la cámara de Neubauer ya que esta cuenta con diferentes cuadrículas con diferentes tamaños. Se obtuvo un promedio por cada muestra, el cual se multiplicó por el factor de dilución que es el volumen inicial entre el volumen final. El resultado de esta multiplicación, se dividió entre la multiplicación del área en la que se realizó el conteo por una constante de 0.1 que es la profundidad de la cámara; esto da como resultado la densidad de células por milímetro cúbico.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete SAS (Instituto de Carolina del Norte E.U. SAS 1988). Se analizó la frecuencia y la densidad de levaduras para los valores de  $\text{cel}/\text{mm}^3$  obtenidos en los conteos de las muestras del néctar, las abejas y los nidos. Estos análisis se realizaron para cada una de las fuentes de estudio por separado y en conjunto, con el fin de poder determinar dónde se presentan con mayor y menor frecuencia las levaduras y en qué cantidades, lo cual constituye un primer paso para poder establecer la posible fuente principal de levaduras. Estos análisis también se realizaron para los valores de granos de polen ( $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) en las muestras de nidos y las abejas obtenidos en los conteos. La frecuencia se analizó por medio de pruebas de independencia de chi-cuadrada, para ver si existe asociación estadística entre dos variables categóricas como son la presencia y ausencia de levaduras en las muestras.

Se seleccionaron únicamente los valores de presencia, es decir las muestras en donde sí se encontraron levaduras; estos valores se transformaron a  $\text{Log}_{10}$  para que se cumplan los supuestos de normalidad que exige una prueba estadística (ANOVA). Esta prueba estadística se realizó para ver si existían o no diferencias en la densidad de las levaduras de las muestras. En caso de encontrarse alguna diferencia, se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Posteriormente se realizaron modelos mixtos generalizados anidados (MIXED) con el procedimiento de máxima verosimilitud restringida (REML; Littell *et al.*, 1996). En el caso de las muestras de néctar, se anidó la variable planta dentro de la variable flor, es decir flor (planta), en tanto que para las abejas y sus nidos se anidó la variable especie

dentro de la variable nido, es decir nido (especie). Finalmente también se realizaron estadísticas descriptivas para comparar los resultados.

## RESULTADOS

### FRECUENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN EL NECTAR

Se analizaron un total de 71 flores para las tres especies de plantas estudiadas, este número es mayor al propuesto en la estrategia experimental, ya que en algunas flores no se pudo extraer de algunas flores el néctar, debido al daño durante el transporte o a la ausencia del mismo, por lo que se consideró elevar el número de flores por cada especie. La frecuencia de levaduras en las muestras del néctar de las tres especies estudiadas indicó que en *G. floribundum*, 17 de las 24 flores analizadas presentaron levaduras constituyendo un 71% de las muestras. Para *P. piscipula*, 15 de 27 flores, lo que constituye el 56% de sus muestras y para *T. stans*, 8 de 20 flores analizadas presentaron estos microorganismos, siendo un 40% de las muestras. No hubo diferencias significativas en la frecuencia de aparición de levaduras en las tres especies de plantas ( $\chi^2 = 3.35$ , g.l. = 2,  $P = 0.1873$ ), pudiéndose encontrar frecuentemente a estos microorganismos en el néctar de sus flores. El modelo de la variable planta anidado en el modelo flor no contribuyó significativamente ( $P > 0.05$ ), lo cual sugiere que no hay una gran variación para la densidad de levaduras a este nivel de anidamiento encontrándose un porcentaje de 0.04% de variación para cada nivel de anidación.

La densidad promedio de levaduras en el néctar de las flores de las tres especies estudiadas fue de 708.36 cel/mm<sup>3</sup>; para las 17 flores de *G. floribundum* se encontró un promedio de  $226.87 \pm 641.26$  E.E. de cel/mm<sup>3</sup>, en *P. piscipula* de 15 flores hay un promedio de  $553.91 \pm 454.24$  E.E. de cel/mm<sup>3</sup> y en *T. stans* de 8 flores hay  $1344.3 \pm 20644.62$  E.E. de cel/mm<sup>3</sup>. Se encontraron diferencias significativas en la densidad de levaduras entre las especies ( $F_{2,11} = 8.36$ ,  $P = 0.0062$ ). Al analizar cuáles de las especies mostraron diferencias con respecto a la densidad de levaduras, se observó que no hubo diferencias estadísticamente diferentes entre *T. stans* y *P. piscipula* no fueron estadísticamente diferentes ( $t = 0.76$ , g.l. = 11,  $P = 0.46$ ), pero entre *G. floribundum* y *T. stans* sí hubo diferencias significativas ( $t = 2.48$ , g.l. = 11,  $P = 0.0307$ ). Específicamente, entre *G. floribundum* y *T. stans* hay una gran diferencia en la densidad de levaduras presentes en el néctar de sus flores.

## Capítulo II

### FRECUENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN LAS ABEJAS SEGÚN SU ESTRUCTURA DE COLECTA

Para evaluar la frecuencia de levaduras en ambas especies se analizaron un total de 250 muestras de buches melíferos (entrada-salida) y de polen de las corbículas (entrada) para las dos especies de abejas sin aguijón. De manera general se encontró que, para *M. beecheii* de 129 muestras analizadas 121 presentaron levaduras, haciendo un 94% de las muestras en total. Por su parte, para *S. pectoralis* se encontró que de 121 muestras solo 76 presentaron levaduras haciendo un 63% del total de las muestras. La frecuencia de levaduras en las muestras entre las dos especies fue estadísticamente diferente ( $\chi^2 = 10.28$ , g.l. = 1, P = 0.0013), siendo en las muestras de *M. beecheii* en las que se observó mayor presencia de levaduras.

Con respecto a la frecuencia de levaduras entre las distintas muestras obtenidas directamente de las abejas, se observó que la mayor frecuencia la presentan las muestras del polen de las corbículas cuando la abeja llega al nido, ya que el 100% de éstas presentó levaduras. Las muestras en las que hubo menor frecuencia fueron las de los buches melíferos cuando la abeja salía del nido (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Frecuencia de levaduras en las estructuras analizadas de las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.

Parte del cuerpo	Tipo de muestra	Actividad	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
			Frecuencia (porcentaje)	N	Frecuencia (porcentaje)	N
Buche melífero	Néctar	Llegando al nido	39(98%)	40	26(65%)	40
		Saliendo del nido	54(89%)	61	10(24%)	41
Corbícula	Polen	Llegando al nido	28(100%)	28	40(100%)	40

El modelo de la variable especie anidado dentro de la variable nido, tampoco contribuyó significativamente (P > 0.05), por lo que no hay una gran variación de levaduras para este nivel de anidación, encontrándose un porcentaje de 0.003% de variación para cada nivel de anidación.

La densidad promedio de levaduras encontradas en las muestras de las distintas partes de las abejas forrajeras según su actividad se observa en el cuadro 2. Al analizar la densidad general de levaduras entre las dos especies de abejas, se encontraron

diferencias significativas ( $F_{1,6} = 9.17$ ,  $P = 0.0231$ ), siendo las muestras de *M. beecheii* las de mayor densidad promedio con respecto a *S. pectoralis*. Al comparar entre las muestras de los buches melíferos y el polen de las corbículas de ambas especies de abejas, se encontraron diferencias significativas ( $F_{2, 185} = 36.78$ ,  $P < 0.0001$ ) siendo las muestras de polen de las corbículas las que presentaron la mayor densidad de levaduras.

**Cuadro 2.** Densidad promedio  $\pm$  E.E. de levaduras en las estructuras analizadas de las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.

Parte del cuerpo	Tipo de muestra	Actividad	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
			Densidad (células/mm <sup>3</sup> )	N	Densidad (células/mm <sup>3</sup> )	N
Buche Melífero	Néctar	Llegando al nido	4346 $\pm$ 20406	39	15308 $\pm$ 21795	26
		Saliendo del nido	57159 $\pm$ 196494	54	12144 $\pm$ 11035	10
Corbícula	Polen	Llegando al nido	63775 $\pm$ 102606	28	53235 $\pm$ 186477	40

#### FRECUENCIA Y DENSIDAD DE LEVADURAS EN LOS NIDOS DE LAS ABEJAS

Se analizaron un total de 166 muestras en los ocho nidos de las dos especies abejas estudiadas, con 142 ánforas de alimento tanto de polen como de néctar y 24 celdas larvianas. De manera general, la frecuencia de levaduras en las muestras de *M. beecheii* fue de 54 muestras de 84, es decir un 70% y para *S. pectoralis* 66 muestras de 84 siendo un 79%. La frecuencia de levaduras para las muestras de las dos especies estudiadas no fue estadísticamente diferentes ( $\chi^2 = 0.39$ , g.l =1,  $P = 0.53$ ).

La frecuencia de levaduras en las muestras de los nidos fue de 33% a 100% (Cuadro 3) y no se observaron diferencias significativas ( $\chi^2 = 0.58$ , g.l. =1,  $P = 0.44$ ) entre ellos.

## Capítulo II

**Cuadro 3.** Frecuencia de levaduras en cada uno de los nidos de las dos especies de abejas sin aguijón estudiadas.

Nido	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
	Frecuencia de levaduras (porcentaje)	N	Frecuencia de levaduras (porcentaje)	N
1	7(33%)	21	5(24%)	21
2	11(52%)	21	19(90%)	21
3	21(100%)	21	21(100%)	21
4	20(95%)	21	21(100%)	21

Al observar las frecuencias de levaduras entre las distintas estructuras dentro de los nidos, se encontró que en muestras de las ánforas maduras de alimento, fue donde se presentó la mayor frecuencia y las de menor frecuencia fueron las muestras de las ánforas inmaduras (Cuadro 4). En las muestras de las celdas larvarias, se puede observar una mayor frecuencia en las muestras de la especie *S. pectoralis*. Se observaron diferencias significativas ( $\chi^2 = 14.23$ , g.l =3, P = 0.0026) entre los tipos de estructuras, de tal forma que las muestras que presentaron mayor frecuencia de levaduras fueron las de las ánforas maduras.

**Cuadro 4.** Frecuencia de levaduras en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.

Estructura	Estado	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
		Levaduras (porcentaje)	N	Levaduras (porcentaje)	N
Ánforas de néctar y polen	Construcción	19(79%)	24	20(83%)	24
	Inmadura	13(54%)	24	16(67%)	24
	Madura	21(88%)	24	21(88%)	24
Celdas larvarias		6(50%)	12	9(75%)	12

El modelo de la variable especie anidado dentro de la variable nido, tampoco contribuyó significativamente (P > 0.05), por lo que no hay una gran variación de levaduras para este nivel de anidación, encontrándose un porcentaje de 0% de variación para cada nivel de anidación en los nidos de estas especies.

En cuanto a la densidad de levaduras en las muestras de los nidos, se puede observar (Cuadro 5) que las que presentaron los valores más elevados, fueron las ánforas maduras, tanto de polen como de néctar para ambas especies de abejas y las muestras con menor densidad, fueron las de las ánforas en construcción. No se encontraron diferencias significativas entre las dos especies de abejas ( $F_{1,6} = 0.00$ ,  $P = 0.96$ ) y tampoco se encontraron diferencia en la densidad de levaduras entre las ánforas de néctar y las de polen ( $F_{1,99} = 2.85$ ,  $P = 0.09$ ). Sin embargo, en donde sí se reportaron diferencias fue en el estado de maduración que presentan las ánforas de polen y de néctar ( $F_{2,99} = 63.98$ ,  $P < 0.0001$ ; Cuadro 5). Al comparar entre los estados de maduración de las ánforas de néctar y polen, se encontraron diferencias significativas entre el estado maduro y los estados inmaduro y en construcción ( $t = 8.21$ , g.l. = 114,  $P < 0.0001$ ). De acuerdo a lo anterior las ánforas maduras presentaron una mayor densidad comparadas con las ánforas inmaduras y en construcción, las cuales tuvieron muy baja densidad de levaduras.

**Cuadro 5.** Densidad promedio  $\pm$  E.E. de levaduras en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.

Estructura	Estado	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
		Levaduras (células/mm <sup>3</sup> )	N	Levaduras (células/mm <sup>3</sup> )	N
Ánforas de néctar	Construcción	6.97 $\pm$ 1.75	9	6.25 $\pm$ 3.32	9
	Inmadura	67.94 $\pm$ 76.62	7	56.27 $\pm$ 21.64	7
	Madura	1505.23 $\pm$ 2935.00	10	883.71 $\pm$ 2266.09	9
Ánforas de polen	Construcción	5.31 $\pm$ 2.18	12	6.5 $\pm$ 2.28	12
	Inmadura	68.38 $\pm$ 34.88	6	124.31 $\pm$ 54.63	9
	Madura	8348.47 $\pm$ 24519.53	9	1715.83 $\pm$ 5156.17	11

La densidad de levaduras extraídas en las muestras del alimento depositado en las celdas larvarias para la especie *M. beecheii* fue de 2036.78  $\pm$  4527.55 cel / mm<sup>3</sup> (N=6) y para las muestras de *S. pectoralis* fue de 155.41  $\pm$  108.33 cel / mm<sup>3</sup> (N= 9). En las celdas larvarias de *M. beecheii* se encontró la mayor densidad de levaduras con respecto a la encontrada en las celdas de *S. pectoralis* ( $t = 4.3$ , g.l. = 8,  $P = 0.003$ ).

## Capítulo II

---

### COMPARACIÓN ENTRE LAS TRES FUENTES DE LEVADURAS: NÉCTAR, ABEJAS Y NIDOS

La frecuencia de levaduras en las muestras de las tres fuentes de estudio presentó diferencias significativas ( $\chi^2 = 102.37$ , g.l. = 2,  $P < 0.0001$ ); siendo en las muestras de las abejas (buches melíferos y corbículas) en donde se observó la mayor frecuencia con 197 de 250 muestras analizadas (78%), seguidas de las muestras extraídas de los nidos (ánforas de néctar, polen y celdas larvarias) con 125 muestras de 168 (74%) y por último las de las plantas (néctar) con 40 muestras de 71 (56%).

En cuanto a la densidad de levaduras en las tres fuentes estudiadas se encontró que para las abejas hay  $39039.19 \pm 139739.41$  cel /  $\text{mm}^3$  ( $N = 197$ ), para los nidos  $7709.93 \pm 11030.76$  ( $N = 125$ ) y para las plantas  $758.82 \pm 1399.33$  cel /  $\text{mm}^3$  ( $N = 40$ ). También se observaron diferencias significativas ( $F_{2, 359} = 46.90$ ,  $P < 0.0001$ ), por lo que de las tres fuentes estudiadas, son las corbículas en las que las abejas transportan su alimento las que presentaron una mayor frecuencia y densidad de levaduras.

Estos resultados indican que la mayor frecuencia y densidad de levaduras se encontró en los cuerpos de las abejas (buches melíferos y corbículas) pudiendo ser esta la fuente principal de levaduras.

### FRECUENCIA Y DENSIDAD DE POLEN EN LAS ABEJAS Y SUS NIDOS

#### ABEJAS

Se analizó la frecuencia de granos de polen en las muestras de las abejas pudiéndose observar (Cuadro 6) que para ambas especies, las muestras de las corbículas presentaron la mayor frecuencia de granos de polen, sin embargo para *M. beecheii*, el néctar del buche melífero cuando las abejas llegan al nido, presentó la menor frecuencia de granos de polen. En *S. pectoralis* fueron las muestras del néctar del buche melífero cuando las abejas estaban saliendo del nido, las que presentaron la más baja frecuencia de granos de polen. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes muestras analizadas ( $\chi^2 = 15.4$ , g.l. = 2,  $P = 0.0005$ ).

**Cuadro 6.** Frecuencia de granos de polen en las estructuras analizadas para las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.

Parte del cuerpo	Tipo de muestra	Actividad	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
			Polen (porcentaje)	N	Polen (porcentaje)	N
Buche melífero	Néctar	Llegando al nido	5(13%)	40	10(25%)	40
		Saliendo del nido	16(16%)	61	2(5%)	41
Corbícula	Polen	Llegando al nido	25(89%)	28	39(98%)	40

Como es lógico esperar, la mayor densidad de granos de polen se puede observar en las muestras de las corbículas, a diferencia de las muestras de los buches melíferos (Cuadro 7). Sí hubo diferencias significativas entre las muestras analizadas ( $F_{2,85} = 31.67$ ,  $P < 0.0001$ ). Por lo que para ambas especies de abejas sin aguijón, la principal entrada de polen a sus nidos son las cargas que las abejas transportan en las corbículas de sus patas.

**Cuadro 7.** Densidad promedio  $\pm$  E.E. de granos de polen en las estructuras analizadas de las dos especies estudiadas de abejas sin aguijón.

Parte del cuerpo	Tipo de muestra	Actividad	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
			Polen (células/mm <sup>3</sup> )	N	Polen (células/mm <sup>3</sup> )	N
Buche melífero	Néctar	Llegando al nido	34.42 $\pm$ 40.75	5	83.47 $\pm$ 88.42	10
		Saliendo del nido	750 $\pm$ 1340.18	16	86.46 $\pm$ 122.18	2
Corbícula	Polen	Llegando al nido	5037 $\pm$ 14270	25	30853 $\pm$ 40663	39

## NIDOS

En relación con la frecuencia de granos de polen en las muestras de las ánforas de alimento, no se encontraron diferencias significativas entre los diversos estados de maduración de las ánforas y tampoco entre las muestras de alimento de las celdas larvarias de ambas especies de abejas sin aguijón ( $\chi^2 = 3.62$ , g.l. = 3,  $P = 0.30$ ). Esto se puede observar en los valores del cuadro 8.

## Capítulo II

**Cuadro 8.** Frecuencia de granos de polen en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.

Estructura	Estado	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
		Polen (porcentaje)	N	Polen (porcentaje)	N
Ánforas de néctar y polen	Construcción	2(8%)	24	6(25%)	24
	Inmadura	6(25%)	24	11(46%)	24
	Madura	18(75%)	24	14(58%)	24
Celdas larvarias		6(50%)	12	6(50%)	12

En cuanto a la densidad de granos de polen en las ánforas de alimento en los nidos sí se encontraron diferencias entre las ánforas de néctar y polen ( $F_{2,57} = 11.74$ ,  $P < 0.0001$ ) y entre los estados de maduración ( $F_{3,55} = 4.96$ ,  $P = 0.0041$ ). La mayor densidad de granos de polen lo presentaron las ánforas de polen en estado maduro observándose una marcada diferencia con relación a las demás muestras (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Densidad promedio  $\pm$  E.E. de granos de polen en las ánforas de alimento en los diferentes estados de maduración.

Estructura	Estado	<i>Melipona beecheii</i>		<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	
		Polen (células/mm <sup>3</sup> )	N	Polen (células/mm <sup>3</sup> )	N
Ánforas de néctar	Construcción	0	0	11.5 $\pm$ 8.83	2
	Inmadura	1.7 $\pm$ 0	2	0.76 $\pm$ 0.14	3
	Madura	50.82 $\pm$ 141.34	9	16.36 $\pm$ 26.96	3
Ánforas de polen	Construcción	0.37 $\pm$ 0.17	2	1.56 $\pm$ 2.62	4
	Inmadura	91 $\pm$ 21.51	4	217.84 $\pm$ 162.73	8
	Madura	2203.75 $\pm$ 6140.19	9	2913.20 $\pm$ 5957.66	11

También se comparó la densidad de granos de polen entre muestras de las celdas larvarias de las dos especies de abejas sin aguijón no encontrando diferencias significativas entre las especies ( $t = 3.2$ , g.l. = 11,  $P = 0.008$ ). La mayor densidad de granos de polen fue observada en las muestras de *M. beecheii* 1967.63  $\pm$  4559.90 cel / mm<sup>3</sup> (N= 6) comparado con las muestras de *S. pectoralis* 43.62  $\pm$  47.20 cel / mm<sup>3</sup> (N= 6).

---

## DISCUSIÓN

### NÉCTAR

De los resultados obtenidos en las muestras de néctar de las flores de plantas melíferas se infiere que las levaduras ocurren regularmente en el néctar, alcanzando altas densidades dependiendo de la planta. Diversos factores podrían estar determinando la densidad de levaduras en el néctar de estas especies; por ejemplo, el tipo de polinizador que las visita (Sandhu y Waraichl, 1985), la química de su néctar (Herrera y Pellmyr, 2002) o incluso las características propias de la planta, como la morfología floral, duración de la floración y hasta el tiempo de vida de las flores (Nicholson, 1998).

Se ha descrito que los insectos polinizadores tienen asociadas sus propias especies de levaduras como es el caso de ciertos escarabajos pertenecientes a la familia Elateridae, Nitidulidae y Curculionidae (Suh *et al.*, 2008; Lachance *et al.*, 2003 y Lachance *et al.*, 2001), moscas como las pertenecientes a las familias Syrphidae y Drosophilidae, hormigas (Formicidae) y particularmente abejas (Ganter, 2006); quienes al ir a buscar su alimento están en contacto directo con las flores y con el néctar y polen ocurriendo así un intercambio de material entre flor y abeja. Las flores suministran néctar y polen a las abejas mientras que éstas al recoger tales recompensas, pueden estar dejando inóculos de microorganismos como las levaduras albergadas en sus partes bucales (Canto *et al.*, 2008). Así pues, una de las posibles razones de la variabilidad en la frecuencia y densidad de levaduras entre especies de plantas y entre sus flores, es la diversidad de polinizadores que las visitan y sus levaduras asociadas; sin embargo lo anterior explicaría la variación de levaduras externamente, pero una vez dentro del néctar otro factor que estaría provocando la variación de estos microorganismos es la química del néctar.

Herrera (2009) señala que el néctar floral puede ser un hábitat inhóspito y hasta mortífero para muchas levaduras, ya que está conformado principalmente por azúcares en concentraciones que pueden provocar una elevada presión osmótica, resultando en un estrés hídrico que generalmente es incompatible para la vida celular. Por esta razón para ciertos tipos de néctar, sólo pueden multiplicarse algunas especies de levaduras adaptadas a estas condiciones. Herrera *et al.* (2008) reportan como al tomar ciertas levaduras de la lengua de abejorros e introducirlas en el néctar de la especie *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae), se fue degradando el porcentaje de azúcares en el néctar,

siendo estos abejorros visitantes comunes de las flores de esta especie; por lo que muy posiblemente estos microorganismos pueden alterar este microhábitat.

En el caso de las tres especies de plantas de este estudio se desconoce la química de su néctar, pero se cuenta con la certeza de que las tres especies fueron visitadas por otro tipo de insectos además de las dos especies de abejas sin aguijón señaladas en este estudio. Entre los visitantes florales se observó a *Apis mellifera*, algunas mariposas, pequeños escarabajos, además de las dos especies de abejas mencionadas en este estudio, los cuales pueden estar llevando consigo una gran diversidad y densidad de levaduras variable para cada especie de planta visitada.

También se puede indagar sobre la morfología floral, el tiempo que dura la floración y hasta el tiempo de vida de la flor como posibles factores que provocan la variación de las levaduras. Según Gentry (1974) y Augspurger (1980 y 1983), en los trópicos existen dos patrones de floración en las plantas, el primero consiste en la producción de un número pequeño de flores durante un largo periodo de tiempo y el segundo consiste en la producción masiva de flores en un corto periodo de tiempo. Estos dos modos de floración constituyen dos tipos distintos de recursos para las abejas, las flores de vida más larga constituyen una fuente confiable de alimento aunque la abeja recorra distancias más largas para conseguir ese recurso, sin embargo las flores en grandes cantidades, constituyen una cosecha rápida de alimento en un solo viaje de forrajeo a pesar de que estas flores son de vida corta.

*Tecoma stans* fue la especie que presentó la menor frecuencia de levaduras en sus flores pero la mayor densidad de levaduras, lo cual podría relacionarse con que es una especie con floración larga además de que sus flores tienen un tiempo de vida de entre tres a cinco días aproximadamente, además presenta flores grandes de forma campanular las cuales señala Lachance *et al.* (2001), pueden ser la preferidas por ciertos polinizadores, ya que actúa como refugio a la hora de alimentarse. La menor frecuencia de levaduras podría deberse a que sus flores y por lo tanto el néctar, está disponible por más tiempo por lo que posiblemente la visita de polinizadores sea menor; sin embargo, la alta densidad de levaduras se podría deberse a que sus flores al tener un tiempo de vida más largo, las levaduras que se encuentran en su néctar podrían tener más tiempo para adaptarse a las condiciones químicas que presenta.

*Piscidia piscipula* y *Gymnopodium floribundum* son de floraciones cortas y masivas (Villegas *et al.*, 1998). En el estudio presentaron una alta frecuencia de levaduras en sus flores, esto puede deberse a que son varios los polinizadores que están visitando estas

plantas ya que es un recurso disponible por poco tiempo. Sin embargo la baja densidad de levaduras puede deberse a que su floración y tiempo de vida de sus flores es corto, lo que podría estar propiciando que las levaduras que se encuentran en el néctar de sus flores, solo estén temporalmente o bien, no se desarrollen exitosamente.

## ABEJAS

Los resultados de las muestras de las abejas (buches melíferos y corbículas) indican que las levaduras ocurren con frecuencia en las estructuras en las que transportan el néctar y polen. Sin embargo, esta frecuencia varía dependiendo de la especie y de la estructura de transporte; ocurriendo lo mismo con la densidad de levaduras.

En el caso de *M. beecheii* el buche melífero de las abejas cuando están saliendo del nido para iniciar su viaje en busca de alimento, presentó una alta densidad de levaduras comparado con las muestras de *S. pectoralis*, lo que podría indicar que no contraen el buche por completo al depositar el alimento en el nido y el contenido que les queda puede ser un reservorio donde las levaduras se están transportando. Para las muestras de losbuches melíferos entrando al nido, igualmente *M. beecheii* presentó mayor frecuencia y densidad de levaduras comparado con las muestras de *S. pectoralis*. Pero estos resultados pueden ser un simple efecto dependiendo del tamaño de la abeja, según Gary y Lorenzen (1976), según el tamaño de la abeja va a ser la cantidad de alimento que puede acumular en el buche. Pero al comparar los contenidos de losbuches de salida y de entrada entre la misma especie, la entrada de levaduras al nido está siendo mayor que la de losbuches de salida, teniendo en cuenta esto, losbuches que no están contraídos acarrear consigo mayor cantidad de alimento y por lo tanto una mayor cantidad de levaduras para ambas especies.

En cuanto al polen de las corbículas también se encontró una alta densidad de levaduras en ambas especies de abejas. Esto puede deberse a lo señalado anteriormente acerca de que la conducta de empaquetamiento del polen impregnado con néctar lleva consigo una inoculación con levaduras y así considerarse una fuente importante de estos microorganismos (Gillam, 1979). Según Reyes y Cano (2000) dependiendo del tamaño de la abeja es la carga polínica que transportan, por lo que podemos asumir que básicamente las diferencias entre la densidad de levaduras de ambas especies de abejas pudo haber sido el resultado de la simple variación en los tamaños de las abejas y de sus corbículas.

### NIDOS

Los resultados obtenidos en los nidos indican que es evidente que las levaduras estuvieron presentes en los aprovisionamientos de alimento de estas abejas y que ocurrieron regularmente en los ocho nidos de ambas especies de abejas estudiadas. Sin embargo, su frecuencia y la densidad varían dependiendo del tipo de ánfora de alimento y el grado de madurez de ésta. Las ánforas maduras de néctar y polen fueron las que presentaron la mayor densidad de levaduras. En el caso del néctar en ánforas maduras ya puede considerarse como miel. El polen igualmente en ánforas maduras es llamado pan de polen, ambos productos son el alimento principal de las colonias además de que es consumido y aprovechado por el ser humano (González, 2008).

De cierta manera todo producto animal tiene asociados sus propios microorganismos. En el caso de la miel de meliponinos se ha reportado la presencia de gran cantidad y diversidad de levaduras, bacterias y otro tipo de hongos (De Jong, 1999; Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003). Igualmente, el llamado pan de polen se forma por la acción de tres tipos de microorganismos: hongos del azúcar, levaduras y lactobacterias (Gilliam, 1979, Pérez *et al.*, 1990) que van transformando la materia prima a través la fermentación de ácido láctico. Por ello la alta densidad de levaduras y posiblemente otros microorganismos tanto en las ánforas maduras de néctar (miel) y polen (pan de polen) se podría deber, no solo a que son parte de la composición de las mismas, si no también al grado de maduración que conlleva a una acumulación de levaduras y microorganismos especializados en la explotación de este medio. Pero, posiblemente todo lo encontrado esté en estado latente y de ahí que tanto miel y pan de polen no fermenten a menos que las condiciones cambien.

En cuanto a las celdas larvarias, también fue evidente la presencia de levaduras, siendo la especie *M. beecheii* la que presentó la mayor densidad. Poco se sabe sobre la presencia de microorganismos en el alimento que le dan las abejas sin aguijón a sus crías por lo que su observación en el alimento larvario es un aporte importante de este trabajo de investigación. Gilliam *et al.* (1985) señalan que en las celdas larvarias de *Trigona hypogea* encontraron cinco especies del género *Bacillus*, los cuales secretan enzimas que tiene un papel metabólico en la conversión, fermentación y preservación de este alimento. Por lo que además de levaduras, también se podrían encontrar este tipo de microorganismos en el alimento larvario actuando como mutualistas durante esta etapa de vida de las abejas. Estos microorganismos podrían encontrarse en las celdas larvarias de

*S. pectoralis* que fue donde se presentó la menor densidad de levaduras. Sin embargo, estos resultados habría que corroborarlos con los de los cultivos de cepas para saber si en realidad son levaduras u otro tipo de microorganismos relacionados con el alimento larval.

#### FUENTE PRINCIPAL DE LEVADURAS

La presencia de levaduras es evidente en las tres fuentes estudiadas (néctar, nidos y abejas); sin embargo, dependiendo de la fuente es la frecuencia y la densidad de que se encuentre. De acuerdo a los resultados obtenidos, fueron las estructuras de transporte de las abejas las que presentaron una mayor frecuencia y densidad de levaduras de las tres fuentes estudiadas, lo cual podría indicar que estos insectos al estar en contacto constante con las flores y con sus nidos son los vectores que transportan a estos microorganismos, lo cual podría indicar que son la fuente principal.

Diversos autores señalan que factores como la temperatura, humedad, pH y el sustrato, son factores a los que son susceptibles las levaduras tanto en medios naturales como cultivados (Deak y Beuchat, 1996; Davidson, 1997; Abranches *et al.*, 1998 y Deak, 2004). En el caso de las plantas, ya se ha documentado cómo los néctares presentan características específicas que sólo levaduras adaptadas pueden sobrevivir en ellos (Herrera, 2008). En los nidos de las abejas sin aguijón existen condiciones muy específicas de humedad temperatura y acidez inclusive entre los nidos de diferentes especies (Engels *et al.*, 1995; Roubik, 2006 y López *et al.*, 2008), siendo estas condiciones aun más específicas dentro de los aprovisionamientos de alimento de los nidos como por ejemplo en la miel, ya que diversos estudios señalan las propiedades físicas y químicas muy específicas entre las mieles de diferentes abejas sin aguijón (Carvalho *et al.*, 2005; Enríquez *et al.*, 2008 y Catzin *et al.*, 2009).

Entonces se puede hablar de una cierta susceptibilidad de las levaduras, la cual se relaciona con la presencia, ausencia o cantidad de estos microorganismos encontrados en las fuentes de estudio, pudiendo señalar una cierta adaptación al tipo de fuente en la que se encontraron, posiblemente siendo exclusivas para vivir en estos medios con condiciones muy específicas.

POLEN

En cuanto a los resultados de la densidad de granos de polen, de manera general y como era de esperarse, la mayor densidad se presentó en las ánforas maduras de polen y en el polen de las corbículas de las abejas. Cabe señalar que estas muestras también presentaron una alta densidad de levaduras por lo que podemos suponer que el polen es un medio preferido, tanto por las levaduras como por las abejas, ya que también en el alimento larval se puede encontrar una alta frecuencia y densidad de polen. Gilliam (1979) menciona que el néctar es una fuente principal de carbohidratos pero que el polen provee de otros nutrientes como proteínas, lípidos, vitaminas y minerales indispensables para el desarrollo de las crías.

Se ha documentado que las abejas pueden cargar hasta cuatro millones de granos de polen en las corbículas de sus patas (Reyes y Cano, 2000), pero se desconoce prácticamente cuántas de estas células se pueden encontrar en las ánforas de alimento y en las celdas larvarias de las abejas sin aguijón, lo que hace difícil la comparación a cerca de la cantidad mínima o máxima de estas células en las distintas estructuras donde se encontraron.

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abranches, J; P. Valente, H. Nobrega, F. Fernández, L. Mendoncahagler y L. Hagler. (1998). Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. *Microbiology Ecology*, 26, 27-33.
- Augspurger, C.K. (1980). Mass-flowering of tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. *Evolution*, 34, 475-588.
- Augspurger, C.K. (1983). Phenology synchrony, and fruit set of six neotropical shrubs. *Biotropica*, 15, 257-267.
- Barnett, J.A., R.W. Payne y D. Yarrow. (2000). *Yeasts: characteristics and identification*. Third edition. Cambridge University Press. New York. United States of America. 1139 p.
- Canto, A., C. M. Herrera, M. Medrano, R. Pérez, and I. M. García. (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany*, 95, 315-320.
- Carvalho, C. A., B. Souza, G. Sodr e, L. Marchini y R. Alves. (2005). Mel de abelhas sem ferrao: contribuicao para a caracterizacao fisico-quimica. Serie meliponicultura No.04. Insecta-Nucleo de estudo dos insectos, Centro de Ciencias Agrarias Ambientales e Biológicas. Brasil. 32 p.
- Catzin, G., M. Delgado, L. Medina y R. Alfaro. (2009). Determinación del contenido polínico y actividad antimicrobiana en mieles de *Apis mellifera* L. y *Melipona beecheii* B. en el estado de Yucatán. En: del XXIII Seminario Americano de Apicultura. ONA, Gobierno del Estado de Tamaulipas México. 153-162 pp.
- CONABIO. (2008). Mieles peninsulares y diversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Corredor Biológico Mesoamericano-México. México.
- Dardón, M. y Enríquez E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*, 33(12), 915-922.
- Davidson, M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food microbiology. Fundamentals and frontiers*. Doyle M P. et al., (eds.). Press, Washington. 520 – 556 pp.
- Deak, T. (2004). Spoilage yeasts. en: Steale R. (eds.). *Understanding and measuring shelf-life of food*. Woodhead, Cambridge. 91–110 pp.
- Deak, T. y Beuchat R. (1996). *Handbook of food spoilage yeasts*. CRC, Boca Raton, Florida. 210 p.

## Capítulo II

---

- De Jong, H. (1999). Land of corn and Honey. The keeping of stingless bees (meliponiculture) in the ethno-ecological environment of Yucatán (México) and El Salvador. Universidad Utrecht, Holanda. 190 p.
- Engels, W; P. Rosenkranz y E. Engels. (1995). Thermoregulation in the nest of the Neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* and a hypothesis on the evolution of temperature homeostasis in highly eusocial bees. *Studies Neotropic Fauna Environmental*, 30, 193–205.
- Enríquez, E; C. Maldonado y M. Dardón. (2008). Caracterización de la miel de abejas sin aguijón (Apidade: Meliponini) de Guatemala. *Memorias del V Congreso Mesoamericano de Abejas sin Aguijón*. Mérida, Yucatán, México.
- Flores, J. (2001). Florística, ecología y etnobotánica de las leguminosas de la Península de Yucatán: Etnoflora Yucatanense 18. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 320 p.
- Ganter, P. (2006). Yeast and Invertebrate Associations. Department of Biology, Tennessee State University, 3500 John Merritt Blvd, Nashville, TN 37209, USA. En C. A. Rosa y G. Peter (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. 2006. Springer, Hardcover. 580 p.
- Gary, N.E. y Lorenzen, K. (1976). A method for collecting the honey-sac contents from honey bees. *Journal Apiculture Research*, 15, 73-79.
- Gentry, A.H. (1974). Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, 6(1), 64-68.
- Gilliam, M. y Prest D. (1972). Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera* L. *Journal Invertebrate Pathology*, 20, 101-103.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the yeast. *Apidologie*, 10), 43-53.
- Gilliam, M; S. Buchmann y J. Lorenz. (1985). Microbiology of the larval provisions of the stingless bee *Trigona hypogaea* an obligate necrophage. *Biotropica*, 17, 38-31.
- González, A. J. (2008). Cría y manejo de las abejas nativas sin aguijón en México. Universidad Autónoma de Yucatán. Secretaria de Fomento Agropecuario y Pesquero. Dirección Estatal de Apicultura. Gobierno del Estado de Yucatán. Planeta Impresores S.A. de C.V. Mérida, Yucatán, México. 177 p.
- Herrera, C. M., C. de Vega, A. Canto, and M. I. Pozo. (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany*, 103, 1415-1423.
- Herrera, C.M. (2009). Inhóspita dulzura. *Quercus*, 279,7.
- Herrera, C.M., I.M. García, R. Pérez. (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, 89, 2369–2376.

## Capítulo II

---

- Suh, S. O., N. H. Nguyen y M. Blackwell. (2008). Yeasts isolated from plant-associated beetles and others insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *Yeast Research*, 8, 88-102.
- Teixeira, P; M. Marin, J. R. Nicoli, Y. Antonini, R. P Martins, M. A. Lachance y C. A., Rosa. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 339-343.
- Toledo, V; N. Barrera, E. García y Alarcón P. (2008). Uno múltiple y biodiversidad entre los mayas yucatecos (México). *Interciencia*, 33, 345-352.
- Villegas, G; S. Cajero y A. Bolaños. (1998). Flora nectarífera y polinífera de la Península de Yucatán. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 126 p.

## RIQUEZA DE CEPAS Y DIVERSIDAD DE CÉLULAS DE LEVADURAS ENCONTRADAS EN NÉCTAR, ABEJAS NATIVAS SIN AGUIJÓN Y NIDOS.

### INTRODUCCION

Las levaduras son hongos que se caracterizan por el predominio de una fase unicelular en su ciclo de vida, por lo que se les clasifica dentro de la Clase Ascomycota, aunque también algunas especies son consideradas parcialmente en la Clase Basidiomycota (Barnett *et al.*, 2000). A las levaduras se les puede encontrar ampliamente difundidas en la naturaleza como por ejemplo, en el aire, en la piel, en el intestino de ciertos vertebrados, en algunos invertebrados, en el suelo, en frutos, granos, entre otros (Brul 1953; Da Silva *et al.*, 2004).

Las levaduras se diseminan por medios tanto bióticos como abióticos, pudiendo ser desde saprófitas hasta parásitas, por lo consiguiente dependen de plantas superiores y de animales para obtener su energía (Bridge y Matsuura, 1953). Estos microorganismos tienen una importante influencia en los ecosistemas naturales y la sociedad humana, ya que se les atribuye, entre otras cosas, la fermentación de vinos y licores, la fabricación de pan e incluso ser causantes de micosis y enfermedades (Boundy-Mills, 2006).

Las levaduras obtienen su energía por desasimilación oxidante aerobia o por fermentación anaerobia; este metabolismo se refiere a procesos anabólicos y catabólicos, los cuales son mediados por reacciones enzimáticas. Los caminos anabólicos incluyen los procesos reductores que llevan a la producción de nuevo material celular, mientras que los caminos catabólicos son los procesos oxidativos que quitan electrones de los substratos y que se utilizan para generar energía (Walker, 1997).

A pesar de la importancia de estos microorganismos, se estima que menos del 5% de la diversidad de levaduras ha sido descrita, ya que se cree que el número de levaduras, de manera general, puede exceder de las 1,000 especies (Lodder 1970; Kurtzman y Fell 1998; Barnett *et al.*, 2000).

Por lo general las levaduras son microorganismos unicelulares que se presentan en formas muy variadas, su estructura interna es compleja y se reproducen vegetativamente por gemación o por fisión y sexualmente por producción de esporas, presentan formas que van desde las esféricas, ovoides, elipsoidales, cilíndricas, muy

### Capítulo III

---

alargadas hasta filamentosas, las cuales pueden ser lo bastante características para ser base de su clasificación (Lundblad, 1991).

Varios son los factores que limitan la identificación de especies de levaduras, por ejemplo la falta de ecólogos, sistemáticos y taxónomos especializados en estos microorganismos (Staley *et al.*, 1997), además del uso de métodos que limitan el crecimiento de muchas especies, como el medio de cultivo adecuado, las condiciones correctas de humedad, temperatura, pH, nutrientes y el periodo de incubación (Shifrine y Phaff 1958; Deak 2006).

Según Barnett *et al.* (2000), para clasificar a las levaduras se usan ciertas características como (1) la apariencia microscópica de las células, (2) la forma de reproducción, (3) conocer con certeza de sus actividades fisiológicas, especialmente nutricionales, (4) conocer sus características bioquímicas y (5) secuencias de ADN, hibridación y comparación de secuencias de ARN/ADN. También el aspecto de la colonia tiene gran interés, ya que es característica de cada especie en los distintos medios, características como el color, olor y consistencia de la colonia, son complementarios para facilitar la identificación (Larone, 1995).

La identificación de especies de levaduras en el néctar, las abejas sin aguijón y sus nidos, ya ha sido reportada en diversos estudios; en el caso particular de este trabajo, la apariencia microscópica de las células y la descripción de sus colonias aisladas, puede ayudar conocer que tan parecidas son las características morfológicas de las levaduras encontradas entre las tres fuentes de estudio e individualmente, además de saber cuántas morfoespecies se pudieron encontrar.

El objetivo de este capítulo es describir las características morfológicas de las colonias de levaduras encontradas, al igual que la descripción de sus células conservadas en preparaciones microscópicas; esto el fin de complementar la información del capítulo II y así poder establecer la comparación entre las tres fuentes de estudio de las que fueron extraídas y señalar la posible fuente de origen de estos microorganismos con resultados cuantitativos y cualitativos.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SIEMBRAS, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

#### SIEMBRAS

Esta parte del estudio se realizó en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Se realizaron placas con un medio de cultivo compuesto de 1% glucosa, 0.5% peptona, 0.3% extracto de malta, 0.3% extracto de levaduras, 2% agar adicionado con 100 mg1-1 de cloranfenicol siguiendo la metodología de Rosa *et al.* (2003) y Herrera *et al.* (2009), controlando la acidificación con un pH de entre 5.0 y 6.0.

A cada una de las muestras extraídas: néctar, contenido de buches y corbículas, así como las estructuras de los nidos, después de haber realizado los conteos (capítulo II), colocadas en tubos ependorff, se les colocó 400 µl de agua purificada estéril y se agitó muy bien para que posteriormente con una micropipeta se tomaran 10 µl de muestra para la siembra. Se colocaron 10 µl de muestra en una caja petri y con la ayuda de un asa de siembra se deslizó cuidadosamente sobre el medio de cultivo utilizando el método de estrías y esparciendo uniformemente la muestra en el medio. En el caso de las muestras de los buches melíferos, se les introdujo el asa de siembra en el buche previamente disectado y se sembró de igual forma que las demás muestras. Para las flores se obtuvo otra muestra de néctar con los microcapilares deseados y con ayuda de una pequeña bomba de presión se expulsó el néctar en la caja petri sembrando de igual forma.

Una vez terminada la siembra se cerró la caja de petri y se le colocó una cinta selladora alrededor, para evitar cualquier tipo de contaminación. Todas las cajas petri se marcaron con los datos pertinentes y se colocaron en una incubadora monitoreando el crecimiento de colonias, en condiciones homogéneas de temperatura (32-34 °C aproximadamente), humedad del ambiente y luz natural.

Las cajas se revisaron periódicamente y en caso de contaminación por hongos o cualquier otro tipo de microorganismo, se procedía a hacer una resiembra; la cual consistió en sacar las colonias de levaduras que hubiesen crecido en esa caja, colocándolas en otra caja nueva con medio de cultivo estéril para que la colonia pueda crecer sin ningún daño. Las cajas se dejaban reposar un máximo de 15 días y si después de ese lapso de tiempo no había crecimiento de colonias, la caja era desechada.

### Capítulo III

---

#### AISLAMIENTO

Para poder estudiar un tipo de levadura específico es necesario realizar un aislamiento de las colonias o cepas que hayan crecido en una misma caja cuando la muestra se sembró por primera vez en la caja, por lo que si la siembra fue exitosa se procedió al aislamiento de las cepas.

Este procedimiento se realizó por cada placa sembrada, discriminando las distintas cepas que se hayan formado en las cajas petri. Según las consideraciones de Barnett *et al.* (2000), se observó el contorno, la forma tridimensional, el color y la textura aparente de las colonias crecidas. Las que se consideraban diferentes y que crecieron en una misma caja, se aislaron y sembraron en cajas diferentes con el fin de poder separar posibles especies distintas de levaduras.

#### CONSERVACIÓN DE CEPAS

Una vez que las colonias se aislaron y crecieron exitosamente, se conservaron. La conservación de células de las cepas se realizó tanto por medio líquido como por medio sólido.

Para el medio líquido se utilizaron tres tipos de soluciones: agua destilada estéril, glicerol al 80% y agua mili-q. Por cada caja petri se tomó una muestra de las colonias con ayuda de puntas de micropipetas estériles, la punta con la muestra se introdujo en viales con las distintas soluciones. Para cada caja petri se sacaron 6 ceparios en total quedando 3 viales con 1200 µl de agua destilada estéril, 2 viales con 1200 µl de glicerol al 80% y un vial con 1000 µl de agua mili-q. Los viales con glicerol se conservaron en una nevera a -5°C y los viales con agua destilada estéril y agua mili-q se conservaron a temperatura ambiente. A cada vial se le marcó en la tapa con los datos pertinentes.

Para el medio sólido se realizaron frotis de las cepas. Los frotis consisten en tomar una muestra de la colonia y extenderla sobre un portaobjetos para evitar en lo posible agrupamientos que dificulten posteriormente la observación de células al microscopio. Al portaobjetos se le colocó una gota de tinte azul lactofenol utilizado por D'Souza (1972) (Kearns y Inouye, 1993) para teñir las células, se fijó con el vidrio de un cubreobjetos y se les colocó un sellador transparente. Por cada cepa que creció exitosamente se le realizó un frotis para conservarlas en seco, marcándolos con los datos pertinentes.

---

## CARACTERIZACIÓN DE FROTIS DE CÉLULAS DE LEVADURAS

Esta parte del estudio se realizó en el microscopio óptico previamente calibrado del laboratorio de Biotecnología en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Se utilizó un microscopio óptico Axiostar Plus ZEISS calibrado con un micrómetro OB-M, 1/100 Olympus.

Los criterios morfológicos para la identificación de levaduras pueden ser tanto macro como microscópicos. El primero tiene en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en el medio de cultivo y la segunda puede ser desde pruebas muy específicas para cada especie de levadura, hasta descripciones de las células teñidas (Linares y Solís, 2001).

Para la descripción de las colonias se tomó en cuenta el color, la forma, la consistencia y la manera en la que crecían en la caja de cultivo.

Para la descripción de las células se consideraron 10 células en un mismo frotis (n=10 por frotis) y se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

1. Número de tipos de células: teniendo en cuenta que todas las células en el frotis son iguales ya que dependiendo de su modo de reproducción puede variar su morfología celular pudiendo encontrar más de una forma de célula en un mismo frotis.

2. Forma de las células: la forma de la levadura puede ser desde esférica a ovoide, en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada formando un verdadero micelio o un falso micelio.

3. Porcentaje teñido de la célula: dependiendo de la forma de la célula se estableció a simple vista su contorno teñido ya que gracias a la tinción se pueden distinguir estructuras internas de la misma.

4. Organelos visibles: son estructuras de la célula que se pudieron observar cuando se hizo la caracterización como son paredes celulares, vacuolas y otros cuerpos celulares.

5. Dimensiones: el tamaño de las levaduras es muy variable pero importante a la hora de hacer una caracterización, por lo que se midió el largo y el ancho de cada una de las células. También se midieron organelos que se hayan observado dentro de la célula como por ejemplo la vacuola.

Las características anteriores se consideraron en base a lo señalado por Linares y Solís (2001), Barnett *et al.* (2000), Deák (1992) y Kreguer-Van Rij (1984) en su descripción de células y colonias de levaduras.

#### CARACTERIZACIÓN DE GRANOS DE POLEN

Todas las muestras que presentaron granos de polen fueron fotografiadas con una cámara Lumenera Infinity 2.1 adaptada para microscopios, se realizaron preparaciones en portaobjetos (frotis) para posteriormente observarlos en el microscopio con la finalidad de identificar la familia botánica a la que pertenecen.

Los tipos de granos de polen se diferenciaron cuando se realizaron los conteos considerando que a cada tipo morfológicamente diferente se le asignó un número romano, además de que se les tomó fotografías.

Bajo la asesoría y colaboración de la Maestra Rita Alfaro Bates, la cual actualmente colabora en un proyecto sobre mieles de la Península del Departamento de Apicultura de la Universidad Autónoma de Yucatán, además de la revisión de claves palinológicas como las de Catzin *et al.* (2009), Gutiérrez y Quiroz (2007) y Palacios *et al.* (1991), se procedió a la identificación de los granos de polen encontrados en las muestras.

Se realizaron frotis de las muestras usando la técnica de glicerol-gelatina teñida con fucsina básica. Posteriormente se tomaron en cuenta características para la identificación de los granos de polen como por ejemplo la época de colecta o época de floración en que se tomó la muestra además de cualidades muy específicas del grano de polen como su tamaño, ornamentación, agrupación, forma y características de la exina. Con éstos datos se pudo conocer la familia botánica y los recursos florares de los cuales las abejas obtienen sus recursos.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Debido a que las variables que se consideraron para la descripción de las colonias y células de levaduras fueron tanto categóricas como numéricas, la prueba que mejor se ajustó a estos criterios, fue un Análisis de Similitud (analysis of similarities-ANOSIM PRIMER 5.0), esta técnica es análoga a ANOVA, la cual es utilizada para estadística univariada (análisis de varianza) (Clarke y Gorley, 2001 y Clarke y Walmirk, 2001). El valor de  $R_{ANOSIM}$  generado por ANOSIM PRIMER 5.0 es una medida relativa de los grupos definidos a priori y siempre se encontrará en un rango de (-1,1). Un valor de cero indica que no hay diferencias entre grupos, mientras que un valor de uno indica que todas las

muestras dentro de los grupos o de cada grupo son similares entre ellas que muestras provenientes de diferentes grupos.

Se realizaron mapas de ordenamiento multidimensional de similitud (MDS) utilizando el Índice de Bray-Curtis a partir de las matrices de similaridad, las cuales se utilizan para estandarizar los números absolutos y relativos sin necesidad de transformarlos. El índice de Bray-Curtis es usado para cuantificar la disimilaridad composicional entre dos grupos, esto es equivalente al número total de cepas que son únicas en un grupo divididas entre el número total de cepas en dos sitios, en otras palabras es la razón entre el recambio de especies entre dos grupos y el total de la riqueza de cepas en dos grupos. Se expresa en la siguiente fórmula:

$$\text{Bray-Curtis} = \frac{\sum |X_{ij} - X_{ik}|}{\sum (X_{ij} + X_{ik})}$$

El MDS arroja un nivel de estrés que es una medida de ajuste que incrementa con la reducción de la dimensionalidad de la ordenación y se puede interpretar como un coeficiente de correlación que mide la falta de ajuste de las dimensiones. Su fórmula es la siguiente:

$$\text{Stress} = \sqrt{\frac{\sum_j \sum_k (d_{jk} - \hat{d}_{jk})^2}{\sum_j \sum_k d_{jk}^2}}$$

Nota: donde  $\hat{d}_{jk}$  es la distancia predicha de la línea de regresión fijada que corresponde a la disimilitud  $d_{jk}$ . Si  $d_{jk} = \hat{d}_{jk}$  para todas las distancias  $n(n-1)/2$  en esta sumatoria, entonces el stress es cero. Al ser un análisis de dimensionalidad, las graficas que se obtuvieron no presentan ejes solo se delimitan con cuadrículas para establecer el tamaño de la dimensión en la cual se encuentran los grupos formados.

Por último se determinó el porcentaje de grupos (cepas) para conocer la contribución relativa al promedio de similitud dentro de los factores (grupos) y el promedio de disimilitud entre estos por medio de un SIMPER (SIMilarity PERcentages) con el PRIMER 5.0. Este análisis también señala cual característica o características descriptivas de las colonias y células de levaduras son las que está definiendo al grupo o grupos dependiendo del promedio de presencia que tenga la característica considerada. .

Para este trabajo el análisis considerado tiene como finalidad poder establecer de acuerdo a descripciones de colonias y células de las levaduras, cual es la fuente principal (néctar, abejas o nidos) de estos microorganismos durante ésta interacción, ya que al formarse grupos con todas las características descritas, permite comparar que tan

### Capítulo III

---

parecidas o no son estas morfoespecies, ya sean dentro de cada fuente estudiada o de manera general al agruparlas las tres

Con los análisis de frecuencia y densidad obtenidos en el (capítulo II) se pudo determinar en donde se encontraban y en qué cantidad estos microorganismos, ahora con los resultados de estos análisis se podrá establecer que tan parecidos son las morfoespecies encontradas y que tan relacionada esta la fuente principal con las otras fuentes con las que supuestamente esta interactuando.

## RESULTADOS

### CRECIMIENTO DE CEPAS

Se obtuvieron un total de 716 cepas para las tres fuentes de estudio (néctar, nidos y abejas). Específicamente para las muestras del néctar floral de las tres especies de plantas se realizaron 30 ceparios en total, de los cuales 18 fueron de *Tecoma stans*, nueve de *Piscidia piscipula* y tres para *Gymnopodium floribundum*. A las muestras de las estructuras en las que las abejas transportan su alimento (buche melífero y polen de las corbículas) se les realizaron en total 524 cepas para las dos especies de abejas sin aguijón. A las muestras de *Melipona beecheii* se les realizaron 271 cepas en total, de los cuales 84 ceparios se realizaron para las muestras del néctar del buche melífero cuando la abeja estaba llegando al nido, 85 cepas para las muestras del polen de las corbículas y 102 cepas para las muestras del contenido del buche melífero cuando la abeja salía del nido. De las muestras de *Scaptotrigona pectoralis* se obtuvieron 253 ceparios en total, de los cuales 75 cepas fueron para las muestras del néctar de su buche melífero cuando la abeja estaba llegando al nido, 111 ceparios para las muestras del polen de las corbículas y 67 cepas para las muestras del contenido del buche melífero cuando la abeja salía del nido.

Para los nidos, específicamente, para las muestras de las ánforas de alimento de los ocho nidos de las dos especies de abejas sin aguijón se obtuvieron un total de 162 cepas. Para las muestras de las ánforas de néctar y polen de *Melipona beecheii* se obtuvieron 50 cepas, pero en el caso de las muestras de las celdas larvarias no presentaron crecimiento de ninguna cepa por lo que no se realizaron ceparios para estas muestras. Para la especie *Scaptotrigona pectoralis* se obtuvieron 103 cepas de las muestras de ánforas de néctar y polen, además de nueve ceparios para las muestras de

las celdas larvarias. Cabe señalar que a las muestras pertenecientes a un nido de *Melipona beecheii* (ánforas de polen, néctar y celdas larvarias) no se obtuvo ningún cepa ya que estas muestras no presentaron crecimiento de ninguna colonia de levaduras por lo que los resultados que se presentan son de cuatro nidos de *Sacptotrigona pectoralis* y solamente de tres nidos de *Melipona beecheii*.

#### CARACTERIZACIÓN DE FROTIS

Morfológicamente se identificaron 20 tipos de células y 31 formas diferentes de colonias crecidas en todos los cultivos. Para las muestras de las tres especies de plantas estudiadas, se caracterizaron nueve morfotipos, para las muestras de las abejas 14 morfotipos y en el caso de los nidos fueron ocho morfotipos de células caracterizadas. Las células en forma circular fueron las que se presentaron en la mayoría de los frotis caracterizados (cuadro 10). Las características específicas de las células y las colonias encontradas se describen en el anexo 1.

**Cuadro 10.** Morfotipos de células de levaduras encontradas en cada una de las fuentes de estudio.

Tipo de células	<i>Melipona beechii</i>									<i>Scaptotrigona pectoralis</i>						
	Néctar			Nidos			Abejas			Nidos				Abejas		
	<i>Gimnopodium floribundum</i>	<i>Tecoma stans</i>	<i>Piscicia piscipula</i>	1	2	3	Buche salida	Buche entrada	Polen patas	1	2	3	4	Buche salida	Buche entrada	Polen patas
1		X				X		X	X	X						X
2	X		X													X
3		X	X													
4							X	X	X					X		X
5		X	X					X	X							
6									X							
7		X														
8			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9				X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10							X	X	X	X		X	X	X		X
11							X	X								
12																X
13					X	X	X	X	X	X	X		X			
14																
15	X															
16		X														
17								X		X						X
18								X								
19												X				
20										X			X		X	

**Tipo de células:** 1. Ovoide, 2. Ovoide morfo II, 3. Ovoide morfo III, 4. Ovoide-alargada, 5. Alargadas, 6. Alargada morfo I, 7. Alargada morfo II, 8. Circular, 9. Circular morfo II, 10. Circular morfo III, 11. Circular morfo IV, 12. Circular morfo V, 13. Circular-pentagonal, 14. Esférica, 15. Esférica morfo II, 16. Esférica morfo III, 17. Lineal, 18. Lineal-ovoide, 19. Limoniforme y 20. Semilla.

COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS

Al analizar las características de todas las cepas en las tres fuentes de estudio, se encontraron diferencias significativas  $R = 0.162$ ,  $P < 0.01$ . Al comparar las características de las fuentes por separado también se encontraron diferencias, quedando la comparación del néctar y los nidos  $R = 0.467$ ,  $P < 0.01$ , el néctar y las abejas  $R=0.507$ ,  $P<0.01$  y entre los nidos y las abejas  $R=0.079$   $P<0.05$ . Las características de los morfotipos de levaduras encontradas son diferentes tanto para las tres fuentes en general como dentro de la misma fuente en particular.

En el mapa de ordenamiento (MDS) realizado para las tres fuentes de estudio se puede observar (Figura 2) que el nivel de estrés es menor a 0.1, lo cual indica una buena ordenación según Clarke y Gorley (2001). En la Figura 2, se puede observar cómo el grupo de levaduras aisladas en el néctar se divide en dos grupos y a su vez se separa del grupo de las levaduras aisladas de los nidos. Este grupo se encuentra, a su vez, ligeramente separado del grupo de levaduras aisladas en las abejas. Sin embargo, debido al valor de significancia, las tres fuentes de estudio son diferentes entre ellas, por lo que posiblemente las levaduras aisladas son muy particulares en cada una de las fuentes (néctar, nidos y abejas) lo que hace que sean diferentes entre sí, al ser comparadas.



Figura 2. Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para las tres fuentes de estudio (plantas, nidos y abejas) basado en similitud de Bray-Curtis (estrés=0.13).

De acuerdo al porcentaje de similitud y disimilitud obtenido, se pudo observar que entre los grupos existe una mayor similitud, es decir dentro de cada fuente en particular, las características de los morfotipos de levaduras son tan parecidas lo que provoca que al comparar las tres fuentes en conjunto, existan diferencias formándose tres grupos. El grupo de las plantas presenta un promedio de 80.7% de similitud, los nidos un 83.4% y los nidos un 84.4%, sin embargo al comparar las plantas con los nidos hay un promedio de 24% de disimilitud, entre las plantas y las abejas un 23.6% y entre los nidos y las abejas un 16.8%.

La característica que presentó el mayor promedio de abundancia y que definió a los grupos fue el tipo de colonia, por encima de las demás características como forma de la célula o el porcentaje teñido.

## NÉCTAR

De manera separada, se compararon las características de las cepas encontradas en cada una de las fuentes estudiadas, en el caso del néctar de las tres especies de plantas, existieron diferencias entre las especies ( $R=0.609$ ,  $P<0.01$ ), a excepción de la comparación entre *P. piscipula* y *G. floribundum* la cual no fue significativa ( $R=0.425$ ,  $P>0.5$ ), por lo que al parecer estas dos especies comparten morfotipos de levaduras, a diferencia de la especie *T. stans* la cual presenta morfotipos propios. Estos resultados también se pueden observar en el mapa de ordenamiento (Figura 3).

Al igual que entre las fuentes de estudio, entre las especies también se observó mayor similitud dentro de los grupos que entre ellos. Para *T. stans* (84.5%), *G. floribundum* (89.5%), *P. piscipula* (91.9%), al comparar los grupos entre sí, el promedio de disimilitud fue de (11.3%) entre *G. floribundum* y *P. piscipula*. La colonia fue la característica que tuvo el mayor promedio de abundancia entre las especies, seguido por la forma de las células.

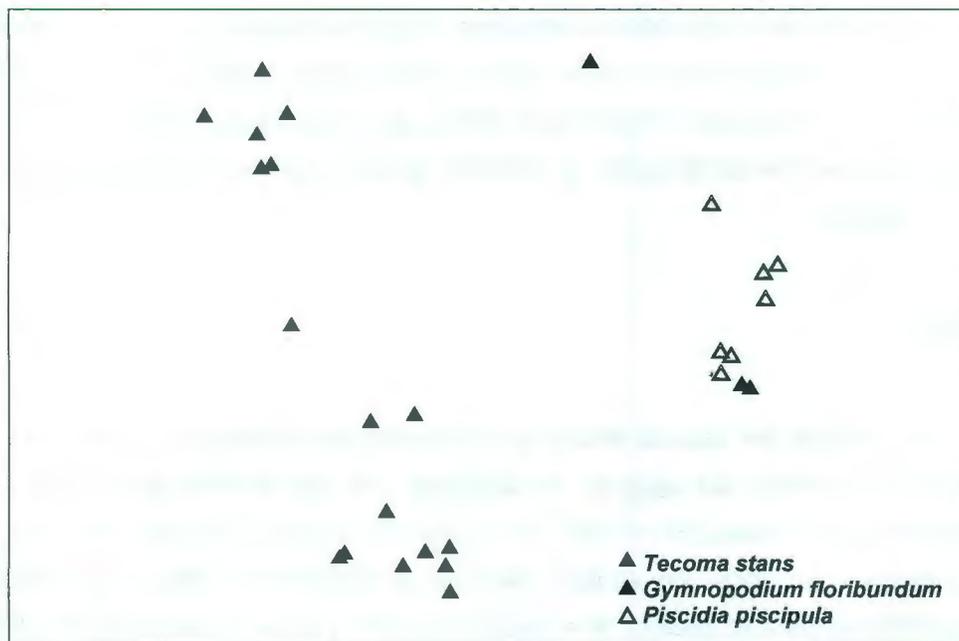


Figura 3. Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para las especies de estudio tanto de plantas como de abejas, basado en similitud de Bray-Curtis (estrés = 0.09).

## ABEJAS

Para las características de las levaduras aisladas en las estructuras (buches y corbículas) de las dos especies de abejas sin aguijón estudiadas, no se encontraron diferencias significativas ( $R = 0.013$ ,  $P > 0.05$ ); sin embargo, las levaduras aisladas en las estructuras de *M. beecheyi*, sí mostraron diferencias significativas ( $R = 0.037$ ,  $P < 0.01$ ), pero para *S. pectoralis* no se encontraron diferencias significativas ( $R = -0.006$ ,  $P > 0.05$ ).

De acuerdo a los mapas de ordenamiento (MDS) realizados para las levaduras aisladas en las estructuras de las abejas, se puede observar que para *M. beecheyi* (Figura 4-1) las levaduras aisladas en el buche de salida se separan ligeramente de las aisladas en el polen de las corbículas, pero para las levaduras aisladas en *S. pectoralis* (Figura 4-2), se formaron dos grupos, sin embargo ambos grupos posiblemente estén conformados por las mismas levaduras ya que no se encontraron diferencias.

En cuanto a los porcentajes de similitud y disimilitud, se encontró un porcentaje de similitud de 84.62% para las levaduras aisladas en las estructuras de transporte de alimento de ambas especies de abejas sin aguijón, pero al compararlas entre ellas, el porcentaje de disimilitud fue de 15.63%.

Al igual que en los análisis anteriores, las características que tuvieron un promedio mayor de abundancia y por lo tanto definieron los grupos, fueron la colonia, la forma de las células y el porcentaje teñido de la célula, por lo que estas características son muy importantes para la identificación *a posteriori* de las especies de levaduras encontradas en este estudio.

## NIDOS

Al analizar las características de las levaduras aisladas en los nidos de las dos especies de abejas sin aguijón, se encontró que de manera general sí existieron diferencias significativas ( $R = 0.389$ ,  $P < 0.01$ ). De manera particular, para los nidos de cada especie de abeja sin aguijón, también se encontraron diferencias significativas, presentándose para *M. beechii* ( $R = 0.423$ ,  $P < 0.01$ ) y para *S. pectoralis* ( $R = 0.357$ ,  $P < 0.01$ ).

De acuerdo a los mapas de ordenamiento (MDS) realizados para los nidos de ambas especies de abejas, se puede observar que en el caso de *M. beechii* (Figura 5-1), las levaduras aisladas en el nido uno fueron diferentes al resto de las aisladas en los otros dos nidos. Para los nidos de *S. pectoralis* se pudo observar (Figura 5-2) que las levaduras aisladas en el nido siete, forman dos grupos separados, al igual que las de los nidos cinco y seis aunque ligeramente. En cuanto a los porcentajes de similitud y disimilitud entre los nidos de estas dos especies, se encontró que para *M. beechii* hay un 91.53% de similitud entre las levaduras encontradas en sus nidos. Para *S. pectoralis* se encontró un (85.67%) de similitud. Sin embargo, al comparar las características de las levaduras para todos los nidos de ambas especies de abejas sin aguijón, se encontró un 19.11% de disimilitud, por lo que posiblemente las levaduras presentes en cada nido sean tan específicas, que al compararlas con las de los demás nidos se observen esas diferencias.

Entre las características que tuvieron un promedio mayor de abundancia y por lo tanto definieron los grupos, fueron la colonia, la forma de las células y el porcentaje teñido de la célula.

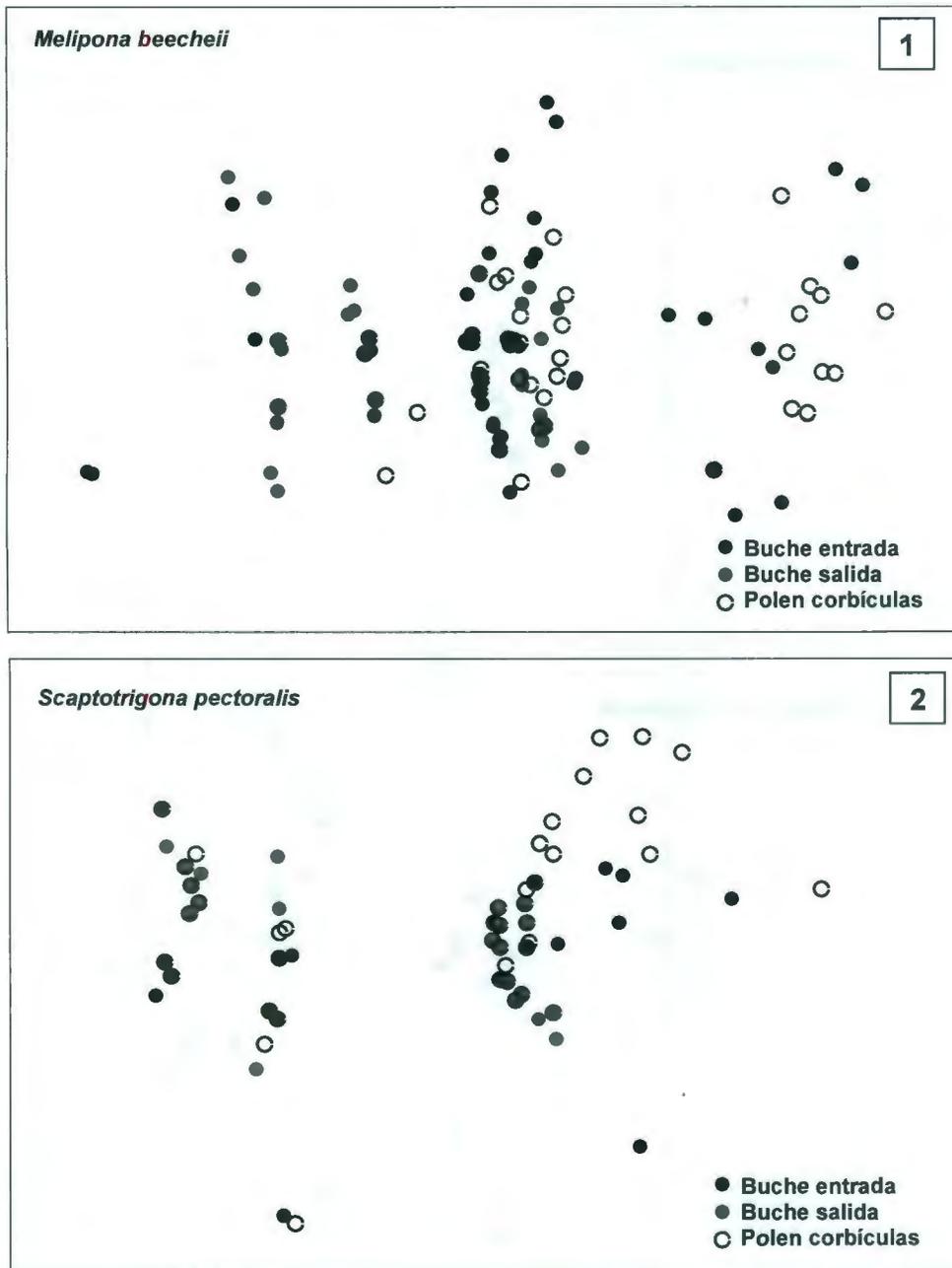
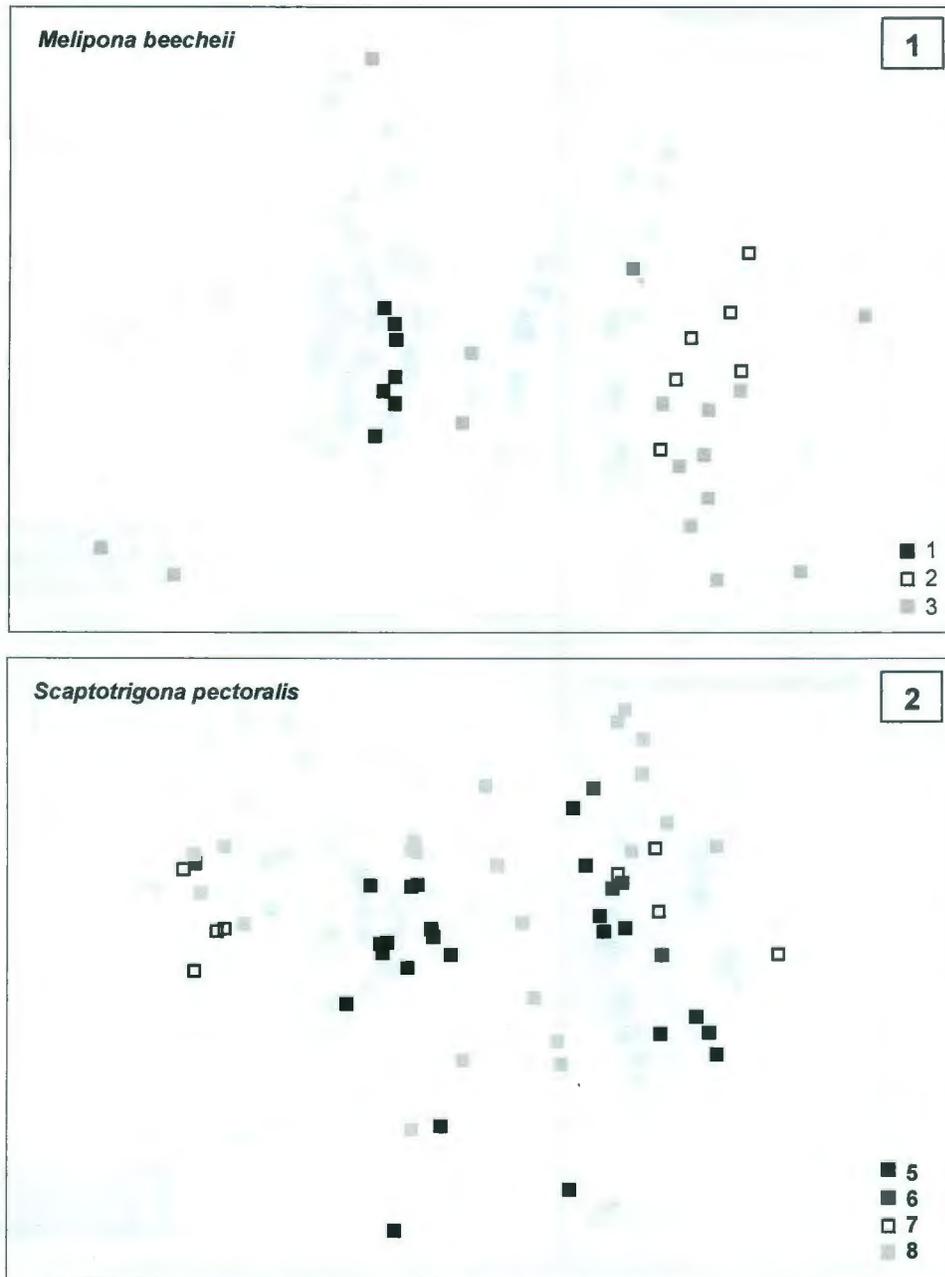


Figura 4. Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para las estructuras de transporte de las dos especies de abejas estudiadas, basado en similitud de Bray-Curtis.  
1 (estrés=0.12) y 2 (estrés=0.1).



**Figura 5.** Mapa de escalamiento multidimensional (MDS) para los nidos de las dos especies de abejas estudiadas, basado en similitud de Bray-Curtis. **1** (estrés=0.1) y **2** (estrés =0.14).

## IDENTIFICACIÓN DE GRANOS DE POLEN

Se encontraron un total de 16 tipos de granos de polen diferentes en todas las muestras. Para las ánforas de alimento de los nidos de *M. beecheii* se reconocieron cinco tipos diferentes y 12 tipos en las cargas de sus corbículas. En *S. pectoralis* se encontraron ocho tipos en las ánforas de sus nidos y nueve en las cargas de las corbículas.

Se lograron identificar ocho familias botánicas diferentes, la familia Fabaceae fue la que presentó el mayor número de tipos de polen con cinco tipos diferentes tanto para las ánforas de los nidos como para las cargas de las corbículas, dos tipos de granos de polen pertenecieron a la familia Arecaceae pero cabe señalar que estos solo se encontraron en el alimento de las celdas larvarias de los nidos. Los demás granos de polen identificados pertenecen a las familias Burseraceae, Asteraceae, Rubiaceae, Polygonaceae, Poaceae y Sapindaceae encontrados tanto en las ánforas de los nidos así como en las cargas de la corbícula. Sin embargo, hubo dos tipos de granos de polen que no se lograron identificar debido a que el material no se encontraba en buenas condiciones y en cantidad suficiente, además de que se necesitaran de otras técnicas para poder lograr su identificación.

El grano de polen más abundante en las muestras de los nidos y de las abejas pertenece a la familia Burseraceae con una alta posibilidad que fuera de la especie *Bursera simaruba* (L.)Sarg.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para crecimiento de colonias en las placas de cultivo del néctar floral, señalan que fueron las muestras del néctar de *T. stans* las que presentaron el mayor número de placas con crecimiento de colonias, seguidas por las muestras de *P. piscipula* y por último las de *G. floribundum*. Estos resultados corroboran que lo encontrado en los conteos, fueron levaduras y que posiblemente sean las levaduras que se presentan en el néctar de *T. stans* las más exitosas tanto por su densidad como por su desarrollo en condiciones artificiales.

Los resultados de las abejas y los nidos, muestran que se presentó un mayor crecimiento de colonias de levaduras de las muestras tomadas del buche de salida-entrada y polen de las corbículas de la especie de *M. beecheii*. Para el caso de las muestras provenientes de los nidos, el mayor número de placas con crecimiento de

colonias fueron las muestras tomadas de abeja *S. pectoralis*, específicamente de ánforas de néctar, polen y celdas larvarias.

Cabe señalar que estos resultados de crecimiento de colonias de las abejas y los nidos no se pueden comparar con los resultados de la densidad, debido a que hubo muestras a las que no se les pudo obtener un volumen inicial y final, como en el caso de las muestras del néctar. Lo anterior debido a que en el caso de las muestras de los buches de salida se les introdujo el asa de siembra aunque no hubiera un contenido dentro del mismo. Lo mismo ocurrió con las ánforas en construcción en las cuales se tuvo que hacer un lavado para obtener un volumen.

Tomando en cuenta que todas las muestras de las tres fuentes de estudio, fueron sembradas en un medio de cultivo especial para el crecimiento de levaduras, descrito anteriormente en la metodología, una posible explicación a la falta de crecimiento de colonias pudo ser hecho de que lo que se sembró en las placas no hayan sido levaduras si no otro tipo de microorganismos. Otro factor que pudo intervenir en el desarrollo de las levaduras fue la acidificación del medio de cultivo, ya que fue el único factor artificial que se controló.

La falta de crecimiento de colonias debido a la presencia de otros microorganismos se puede explicar para el caso de las muestras de las celdas larvarias, ya que para *M. beechii* no se presentó el crecimiento de ninguna colonia, pero para las muestras de *S. pectoralis* se presentó el crecimiento de colonias en nueve muestras. Según Machado (1971) en los aprovisionamientos larvales de las abejas sin aguijón pertenecientes a los géneros *Melipona*, *Plebeia*, *Trigona*, *Partamona*, *Frieseomelitta*, *Leurotrigona*, *Tetragona* y *Nannotrigona* se ha encontrado la presencia de *Bacillus sp.* Igualmente Gilliam *et al.* (1985) reportan haber encontrado únicamente cinco especies de estos microorganismos en los aprovisionamientos larvales de la abeja *Trygona hypogaea*. Lo anterior podría explicar la falta de crecimiento de colonias debido muy posiblemente al uso de cloranfenicol en el medio de cultivo, el cual inhibe la flora bacteriana que pudo estar presente en este tipo de muestras.

Otro de los factores que pudo haber regulado de cierta forma el crecimiento de colonias de levaduras, fue la acidificación del medio de cultivo, además de ser el único factor ambiental que fue controlado durante las siembras. Según Deak (2006), la mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4.5 a 6.5, sin embargo cada especie de levadura tiene una tolerancia diferente de pH, tal es el caso de la especie *Zygosaccharomyces rouxii* la cual se

desarrolla exitosamente en un medio con un pH de 1.5, las levaduras basidiomicéticas *Rhodotorula* y *Cryptococcus* son especialmente tolerantes a los medios alcalinos, mientras que *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Dekkera* no crecen a pH mayor de 8 (Déak y Beuchat, 1996). Por ello, posiblemente la sensibilidad de las levaduras a este factor pudo haber determinado su crecimiento o la muerte de las mismas en el medio de cultivo.

Para los resultados de los morfotipos, se encontró que posiblemente existe una diversidad importante de especies de levaduras en las fuentes de estudio, esto se puede observar en las distintas formas de las células y sus colonias que se expresaron. Al analizar los diversos morfotipos encontrados, se pudieron encontrar diferencias significativas en los análisis de similitud, por lo que podemos hablar de que ésta diversidad de levaduras está siendo específica para cada tipo de fuente de estudio y dentro de las mismas.

Al analizar los mapas MDS, para el caso de los néctares pudo observar gráficamente estas posibles diferencias entre los morfotipos de levaduras, además de que estas diferencias pueden ser fuertemente sustentadas con los resultados de la densidad y del crecimiento de las colonias, por lo que esta posible especificidad de levaduras va aunada a la especie de planta que se quiera analizar. Estudios como los de Mushtaq *et al.* (2006, 2007 y 2008) comparan distintas especies de plantas y las especies de levaduras encontradas y encuentran diferencias significativas entre las especies de plantas estudiadas.

Para los resultados de similitud de las estructuras de transporte se encontraron diferencias en las estructuras de *M. beccarii* por lo que posiblemente en esta especie, las estructuras de transporte de alimento presenten condiciones tan específicas para el desarrollo de ciertas levaduras, a diferencia de las estructuras de *S. pectoralis*, según Gillam y Prest (1972) pueden ser muy específicas en cuanto al recurso que consumen y hay otras que son más generalistas, por lo que en esta búsqueda de comida algunas abejas estén acarreado levaduras muy particulares.

En cuanto al resultado de los análisis de similitud para los nidos, también se encontraron diferencias significativas en los morfotipos de las levaduras, según señala González (2008) entre los nidos de las mismas especies de abejas sin aguijón pueden presentarse características físicas, químicas o incluso de higiene y salud del nido muy específicas, lo anterior podría estar dando lugar a condiciones que sean muy particulares para el desarrollo de ciertas levaduras. Sin embargo, se desconoce si estos

microorganismos pudieran ser indicadores de algún desorden en la colonia, pero según Gillam (1973) para el caso de *Apis mellifera*, las levaduras son indicadores de estrés en las colmenas, pero faltaría indagar al respecto en el caso de las abejas sin aguijón.

Los resultados de la identificación de granos de polen, señalan la importancia de las especies de la familia Fabaceae como un importante recurso alimenticio para las abejas sin aguijón, debido a la diversidad de especies presentes en la región de las que están obteniendo sus cosechas de néctar y polen, sin embargo la familia Burseraceae representa un recurso polinífero muy importante debido a la alta abundancia de granos de polen presentes en las muestras. Las plantas utilizadas para la apicultura se dividen en plantas poliníferas y nectaríferas dependiendo del recurso que obtengan las abejas; especies como *G. floribundum*, *P. piscipula* son consideradas preferentemente nectaríferas debido la calidad de las mieles que las abejas producen con estas especies (Souza-Novelo, 1940).

La ausencia de granos de polen de *T. stans* podría indicar que su polen es poco utilizado por las abejas, lo que podría deberse a la época del año en el que se realizaron las colectas, que era cuando estaban en floración las especies *G. floribundum* y *P. piscipula* que ofrecen una gran cantidad de recurso en poco tiempo, a diferencia de especies de la familia Bignoniaceae que presentan floraciones largas con baja producción de recurso Gentry (1974), por lo que posiblemente este recurso lo estén utilizando las abejas preferentemente en épocas de crisis de las colonias.

Souza-Novelo, N. (1940). Plantas melíferas y poliníferas de Yucatán. Fondo Editorial de Yucatán. México. 60 p.

Staley, T. R. Castenholz; R. Colwell; R. Holt; G. Kane; M., Pace, N. Salyers y A. Tiedje. (1997). The Microbial World: Foundation of the Biosphere. Report of the American Academy of Microbiology, American Society of Microbiology, 32 p.

Walker, G. (1997). Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, Chichester, 115 p.



## DISCUSION GENERAL

Los resultados presentados en este trabajo, señalan a las levaduras como un grupo de microorganismos presentes en una de las interacciones más importantes de la naturaleza, en éste caso la relación que existe entre las abejas sin aguijón y la flora melífera de la región. Sin embargo hay que señalar que la frecuencia, densidad y diversidad de formas de levaduras encontradas puede variar dependiendo de la fuente de origen.

En el capítulo 2 se discuten los factores físicos, químicos y biológicos que pudieron determinar la variación de la frecuencia y la densidad de levaduras, obtenidas directamente de las fuentes de origen.

La diversidad de formas de células y de las colonias de levaduras aisladas en condiciones artificiales, se discuten en el capítulo 3, así como tratar de establecer si las fuentes de origen podrían estar compartiendo o no, los morfotipos de levaduras encontrados.

Tomando en cuenta que todas las muestras del néctar, las abejas y los nidos, fueron tratadas de igual forma tanto para los conteos como para las siembras, se encontró que las estructuras de transporte de alimento de las abejas sin aguijón, son la posible fuente principal de levaduras durante ésta interacción, ya que presentaron la mayor densidad y diversidad de éstos microorganismos.

## CONCLUSIONES

La fuente de origen de las levaduras son las estructuras de transporte de alimento (buche melífero y polen de las corbículas) de las abejas sin aguijón, debido a que la mayor frecuencia, densidad, número de cepas y diversidad de células encontradas se presentó en éste tipo de muestras.

En relación a las fuentes florales, la especie *Gymnopodimun floribundum* presentó la mayor frecuencia de levaduras en su néctar, sin embargo fue *Tecoma stans* la que presentó la mayor densidad de estos microorganismos. Para las estructuras de transporte de alimento en las abejas, fue el polen de las corbículas de ambas especies que presentó la mayor frecuencia y densidad de levaduras. En los nidos las ánforas maduras de

## Capítulo IV

---

alimento tanto de polen como de néctar, fueron donde se encontraron las mayores frecuencias y densidades de levaduras, para ambas especies de abejas sin aguijón.

La diversidad de morfotipos de células de levaduras es diferente en cada una de las fuentes de estudio. Las levaduras se encuentran frecuentemente en las especies de plantas estudiadas, al igual que en las dos especies de abejas sin aguijón, específicamente en las estructuras en las que transportan su alimento, así como en sus nidos donde lo almacenan. Sin embargo dependiendo de la fuente de origen, será la densidad de levaduras presentes.

Las muestras del néctar de las flores de *Tecoma stans* presentaron el mayor número de cepas de levaduras y la mayor diversidad de células en las muestras. Para las estructuras de transporte, fueron las muestras de la especie *Melipona beecheii* en las que se presentó el mayor número de cepas, específicamente para las muestras del buche de salida. Para los nidos, se presentó mayor crecimiento de cepas para las muestras de la especie *Scaptotrigona pectoralis*, específicamente en los potes inmaduros de néctar y polen.

Las familias Fabaceae y Burseraceae, constituyen un importante recurso tanto nectarífero como polinífero para las abejas nativas sin aguijón, debido a la densidad y diversidad de granos de polen encontrados en las muestras de este estudio.

### PERSPECTIVAS

Las características morfológicas de las células y de las colonias de levaduras son importantes para complementar una posterior identificación genética de las cepas aisladas en este trabajo.

La caracterización de levaduras es vital para poder plantear experimentos *a posteriori* acerca de la importancia ecológica y económica de estos microorganismos.

Este trabajo da un paso en el conocimiento de las levaduras asociadas a la flora nectarífera de Yucatán y a las abejas nativas sin aguijón productoras de miel.

## ANEXOS

1. Descripción de las células de los morfotipos de levaduras encontradas en las tres fuentes de estudio (néctar, abejas y nidos). Esta tabla se menciona la forma más frecuente de aparición de cada cepa aislada; así también se puede observar la frecuencia de aparición, el tamaño promedio en micras ( $\mu\text{m}$ ), una breve descripción de las colonias de las que fueron extraídos y una imagen de la apariencia de las células teñidas con azul lactofenol y a una magnificación de 1000 x (100 x 10).

Forma	Frecuencia	Tamaño	Descripción de la colonia	Apariencia
1. Ovoide	19	6.1 x 4.4	Colonias de color blanco, crema, amarillo brillante o incluso rosado, creciendo en el agar en forma de círculos grandes y pequeños rugosos.	
2. Ovoide morfo 2	4	6.3 x 4.8	Colonias de color amarillo o verde, creciendo de manera homogénea en el agar y de consistencia pastosa.	
3. Ovoide morfo 3	7	6.7 x 4.4	Colonias de color blanco, amarillo y crema, creciendo de manera homogénea en el agar o formando círculos grandes rugosos.	
4. Ovoide-alargada	22	6.4 x 3.9 dos vacuolas: 2.0 x 1.9	Colonias de color rosa, café pálido, rosa brillante, crema y amarillo, de consistencia viscosa.	

<b>5. Alargada</b>	5	7.3 x 2.4	Colonias de color amarillo o verde, creciendo de manera homogénea en el agar y de consistencia pastosa.	
<b>6. Alargada morfo 2</b>	5	5.4 x 4.1	Colonias de color blanco o crema, creciendo en el agar de manera homogénea o arrugada y de consistencia pastosa.	
<b>7. Alargada morfo 3</b>	1	5.4 x 4.9	Colonias de color blanco y de forma arrugada.	
<b>8. Circular</b>	487	4.7 x 4.7	Colonias de color amarillo, crema, blanco y semitransparente, creciendo en el agar de manera homogénea, formando círculos grandes y pequeños o en forma de ondas. Algunas colonias presentaron consistencia viscosa.	
<b>9. Circular morfo 2</b>	94	2.7 x 2.7	Colonias de color crema, blanco y semitransparente, creciendo en el agar de manera homogénea, formando círculos grandes y muy pequeños o en forma de ondas. Algunas colonias presentaron consistencia viscosa.	

<b>10. Circular morfo 3</b>	22	7.1 x 7.1	Colonias de color blanco, semitransparente, crema o rosado, creciendo de manera homogénea en el agar, formando círculos o en forma de ondas.	
<b>11. Circular morfo 4</b>	9	0.7 x 0.7	Colonias de color amarillo o rosado pálido, formando ondas semitransparentes en el agar y de consistencia viscosa.	
<b>12. Circular morfo 5</b>	1	9.5 x 9.5	Colonias de color crema formando círculos en el agar.	
<b>13. Circular - pentagonal</b>	20	5.8 x 5.8	Colonias de color blanco o blanco perlado brillante, creciendo en el agar en forma de círculos o en ondas semitransparentes.	
<b>14. Esférica</b>	3	5.5 x 4.7	Colonias de color blanco, creciendo en forma de círculos arrugados en el agar.	

<b>15. Esférica morfo 2</b>	2	5.8 x 4.8	Colonias de color amarillo o blanco, creciendo en el agar de manera homogénea.	
<b>16. Esférica morfo 3</b>	2	7.9 x 7.0	Colonias de color blanco, creciendo en forma de círculos arrugados en el agar.	
<b>17. Lineal</b>	3	5.7 x 1.1	Colonias de color blanco semitransparente, creciendo en el agar en forma de círculos o de ondas.	
<b>18. Lineal – ovoide</b>	3	7.5 x 3.0	Colonias de color rosado semitransparente de consistencia viscosa.	
<b>19. Limoniforme</b>	1	5.2 x 2.3	Colonias de color blanco perlado brillante, creciendo en el agar en forma de círculos.	

---

**20. Semillita**

5

3.9 x 4.1

Colonias de color blanco o crema brillante, creciendo en el agar en forma de círculos.

