



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA DEL POLEN  
CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA DE *APIS MELLIFERA* EN  
CONDICIONES SUBTROPICALES DE YUCATÁN

Tesis que presenta

DIEGO ALBERTO GARZA GONZÁLEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: *Opción Recursos Naturales*)

Mérida, Yucatán, México

2021



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Diego Alberto Garza González** titulado “**Análisis de diversidad de la microbiota del polen corbicular y del pan de abeja de *Apis mellifera* en condiciones tropicales**” fue realizado en la Unidad de Recursos Naturales, Servicios Ambientales de la Biodiversidad, Ecología y Evolución de las interacciones planta–animal del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del(a) Dr.(a) María Azucena Canto Aguilar, dentro de la opción de Recursos Naturales, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

**Atentamente**



---

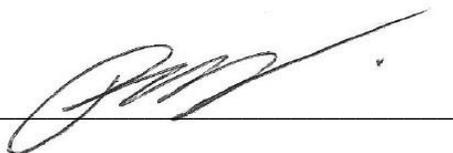
**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 7 de mayo de 2021

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 de Yucatán, 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: DIEGO ALBERTO GARZA GONZÁLEZ

Este trabajo se llevó a cabo en la **Unidad de Recursos Naturales** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado "Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de los aceites esenciales de la flora nativa y de levaduras simbióticas" (CONACYT 219922) bajo la dirección de la Dra. María Azucena Canto Aguilar y el apoyo técnico de Biol. María Rosalina Rodríguez Román.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al CONACYT por la beca otorgada, ya que fue un estímulo para seguir mi carrera profesional.
- Al CICY por brindarme las excelentes instalaciones y equipos, con los cuales puede llevar a cabo mi trabajo de investigación.
- A la Dra. María Azucena Canto Aguilar por la oportunidad de trabajar en su laboratorio bajo su dirección y tutoría.
- A las y los miembros de mi comité tutorial y de examen de grado: Dra. Blondy Beatriz Canto Chanche, Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez, Dr. Luis Medina, y la Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo. Por su tiempo y dedicación en revisar y comentar a favor de mi trabajo.
- A la técnico Biól. María Rosalina Rodríguez Román, por su apoyo en el campo y en el laboratorio.

## DEDICATORIAS

A Silvia, por darme la vida,  
a Diana y Ramón, por darme todo en la vida,  
a Gerardo, por enseñarme cómo vivir la vida,  
a Nayely, por acompañarme con amor en esta etapa de la vida,  
à Émile pour m'avoir appris que la vie est belle,  
à Laurent pour m'avoir appris qu'il n'y a pas qu'une seule façon de penser et de ressentir,  
a Salvador por ser un pilar en la familia,  
a Sandra por adoptarme en su familia,  
a Blody por impulsarme a continuar con esta empresa.

*“... yo estaba dispuesto a pensar en todos los caballos, pero no por la vastedad de mi intelecto, sino por la estrechez de mi intuición”.* — El nombre de la Rosa, Umberto Eco

*“ ... dudo de que el mundo tenga algún orden, me consuela descubrir, si no un orden, al menos una serie de relaciones en pequeñas parcelas del conjunto de los hechos que suceden en el mundo.”* — El nombre de la Rosa, Umberto Eco

*“La belleza del cosmos no procede sólo de una unidad en la variedad, sino también de la variedad en la unidad”* — El nombre de la Rosa, Umberto Eco

ÍNDICE

I.	LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	v
II	ABREVIATURAS .....	vii
III.	RESUMEN .....	2
IV.	ABSTRACT .....	1
1	INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL, OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....		
		7
2	ANTECEDENTES.....	7
2.1	DEFINICIÓN DE MICROBIOTA .....	7
2.2	RELACIÓN DEL POLEN FLORAL, CORBICULAR Y PAN DE ABEJA CON LA NUTRICIÓN DE ABEJAS .....	7
2.3	RELACIÓN DEL POLEN CORBICULAR Y PAN DE ABEJA CON LOS MICROORGANISMOS .....	9
2.4	MICROBIOTA ASOCIADA A LA ABEJA <i>A. MELLIFERA</i> .....	11
2.4.1	<i>BACTERIAS</i> .....	11
2.4.2	<i>REINO FUNGI</i> .....	11
2.4.3	<i>OTROS</i> .....	11
2.5	MICROBIOTA DEL POLEN FLORAL .....	12
2.6	MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR.....	13
2.6.1	<i>BACTERIAS</i> .....	13
2.6.2	<i>REINO FUNGI</i> .....	13
2.7	MICROBIOTA DEL PAN DE ABEJA.....	14
2.7.1	<i>BACTERIAS</i> .....	14
2.7.2	<i>REINO FUNGI</i> .....	15

---

---

<b>2.8</b>	<b>PRINCIPALES METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA .....</b>	<b>17</b>
2.8.1	<i>ESTUDIOS UTILIZANDO CULTIVOS IN VITRO Y SECUENCIACIÓN SANGER.....</i>	<i>17</i>
2.8.2	<i>ESTUDIOS UTILIZANDO SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.....</i>	<i>18</i>
<b>2.9</b>	<b>ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA.....</b>	<b>19</b>
2.9.1	<i>CONSIDERACIONES PARA ANALIZAR LOS DATOS DE DIVERSIDAD.....</i>	<i>20</i>
2.9.2	<i>EL PROBLEMA DE DEFINIR ESPECIE EN ECOLOGÍA MICROBIANA .....</i>	<i>21</i>
2.9.3	<i>DIVERSIDAD ALFA .....</i>	<i>22</i>
2.9.3.1	<i>ESTIMADORES DE RIQUEZA DE ESPECIES.....</i>	<i>23</i>
2.9.3.2	<i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD.....</i>	<i>25</i>
2.9.4	<i>DIVERSIDAD BETA .....</i>	<i>28</i>
<b>2.10</b>	<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS .....</b>	<b>30</b>
2.10.1	<i>INFERENCIA OTU'S Y DE ASV'S.....</i>	<i>30</i>
<b>2.11</b>	<b>UTILIDAD PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MICROBIOTA.....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>CAPITULO II .....</b>		<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>35</b>
<b>6.1</b>	<b>OBTENCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO.....</b>	<b>35</b>
6.1.1	<i>ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO .....</i>	<i>35</i>
6.1.2	<i>EXTRACCIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN.....</i>	<i>38</i>
<b>6.2</b>	<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA MICROBIOTA.....</b>	<b>40</b>
6.2.1	<i>ELIMINACIÓN DE DISTORSIÓN EN LAS SECUENCIAS, GENERACIÓN DE SECUENCIAS VARIANTES DE AMPLICÓN (ASV'S) .....</i>	<i>40</i>
6.2.2	<i>ASIGNACIÓN TAXONÓMICA.....</i>	<i>40</i>
<b>6.3</b>	<b>ANÁLISIS DE DIVERSIDAD .....</b>	<b>41</b>

---

---

6.3.1	<i>DIVERSIDAD ALFA</i> .....	41
6.3.2	<i>DIVERSIDAD BETA</i> .....	41
<b>6.4</b>	<b>ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD</b> .....	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS</b> .....		<b>43</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR</b> .....	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN ILLUMINA, CONTROL DE CALIDAD Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA</b> .....	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD</b> .....	<b>45</b>
<b>9.1</b>	<b>DIVERSIDAD ALFA</b> .....	<b>45</b>
9.1.1	<i>COMUNIDAD BACTERIANA</i> .....	45
9.1.1.1	POLEN CORBICULAR Y PAN DE ABEJA .....	46
9.1.1.2	UBICACIÓN .....	46
9.1.2	<i>COMUNIDAD FÚNGICA</i> .....	47
9.1.2.1	POLEN CORBICULAR Y PAN DE ABEJA .....	48
9.1.2.2	UBICACIÓN .....	49
9.1.2.3	TEMPORADA .....	49
<b>9.2</b>	<b>DIVERSIDAD BETA</b> .....	<b>50</b>
<b>9.3</b>	<b>ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA</b> .....	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN</b> .....		<b>53</b>
<b>10</b>	<b>LA MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA</b> .....	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>LA MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA SEGÚN LA VARIABLE DE SU UBICACIÓN</b> .....	<b>54</b>
<b>12</b>	<b>LA MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA SEGÚN LA VARIABLE DE TEMPORADA</b> .....	<b>54</b>
<b>13</b>	<b>LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD</b> .....	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....		<b>57</b>

---

---

14	CONCLUSIONES .....	57
15	PERSPECTIVAS.....	57

---

**I. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS**

**Figura 1.1.** Abeja forrajera de *A. mellifera* con polen en sus corbículas.

**Figura 1.2.** Abeja forrajera de *A. mellifera* depositando el polen corbicular en una celda .

**Figura 1.3.** Representación gráfica de la diversidad alfa, beta y gamma.

**Figura 2.4.** Mapa de las localidades Sierra Papacal y Ticopó

**Figura 2.5.** Imagen satelital de las ubicaciones de los apiarios

**Figura 2.6.** Trampa de polen

**Tabla 2.1.** Metadatos de las muestras colectadas

**Figura 3.7.** Gel de ADN extraído con el protocolo casero

**Figura 3.8.** Gel de productos de PCR del ADN extraído

**Tabla 3.2.** Datos numéricos del control de calidad de las secuencias

**Tabla 3.3.** Numero de secuencias clasificadas en los distintos niveles taxonómicos.

**Tabla 3.4.** Reporte de las estimaciones de diversidad para cada muestra de la comunidad bacteriana.

**Tabla 3.5.** Reporte de las estimaciones de diversidad para cada muestra de la comunidad fúngica

**Tabla 3.6.** Estimaciones de la diversidad beta

**Tabla 7.** Asignación taxonómica de ASV's de secuencias del gen ITS

**Tabla 8.** Asignación taxonómica de ASV's de secuencias del gen 16S

---



## II ABREVIATURAS

16S: El gen que codifica el componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas ARNr 16S

ASV: Son variantes de un amplicón (del inglés Amplicon Sequence Variant).

ITS: Espaciador transcrito interno (del inglés Internal transcribed spacer). Fragmento del genoma llamado ADN espaciador, situado entre el ADN ribosómico (ADNr) para la subunidad pequeña y el de la subunidad grande.

$N$ : Número total de individuos en un muestreo

NGS: Secuenciación de nueva generación (del inglés Next Generation Sequencing)

OTU: Unidades Taxonómicas Operacionales (del inglés Operational Taxonomic Units)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, (del en inglés polymerase chain reaction)

$q$ : Orden de la diversidad

$S$ : Riqueza de especies total

$\hat{S}$ : Riqueza de especies de la muestra

---



**III. RESUMEN**

Los microorganismos cumplen un papel importante en la biología de *Apis mellifera* a través de distintas interacciones benéficas y perjudiciales. Dentro de este marco está la interacción con los microorganismos de sus alimentos. A pesar de tener estrategias bien definidas para controlar la actividad microbiana en la miel; en el polen, esta relación no es del todo clara. Por un lado se postula que al igual que la miel, es un medio de conserva; y por el otro, evidencia indirecta de otros trabajos de investigación, muestran un posible papel benéfico de los microorganismos como parte de la dieta. En el presente trabajo, se emplean herramientas metagenómicas para analizar la diversidad de la microbiota del polen corbicular y pan de abeja de *A. mellifera*. Los resultados obtenidos apuntan a que no existe una disminución drástica de la diversidad de microorganismos en el pan de abeja en comparación con el polen corbicular. Estos resultados sirven como evidencia para exponer las interacciones ecológicas entre los microorganismos simbiotes de las plantas y de las abejas.

---



**IV. ABSTRACT**

Microorganisms play an important role in the biology of *A. mellifera* through different beneficial or negative relationships. In this framework lays the interaction with the microorganism of their food. Despite having well establish strategies for controlling the microbial activity in honey, in the pollen they eat this link is not well understood. On the other hand, it has been postulated that beebread is preservation environment just as honey; however, indirect evidence from other research work, shows that microorganisms may have possible beneficial role in diet. In the present work, metagenomic tools are employed to analyze the diversity in pollen carried by bees y beebread from *A. mellifera*. The results pin that there isn't a drastically reduction in diversity in beebread in comparison to pollen carried by bees. These results exposed the ecological interactions between microorganism symbionts of plants and the bees.



### 1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos cumplen un papel importante en la biología de la abeja *Apis mellifera* a través de distintas interacciones, benéficas o perjudiciales. Por ejemplo, si ocurren cambios en la microbiota autóctona del intestino, por elementos ambientales, se puede ocasionar una disbiosis en el intestino (Anderson y Ricigliano, 2017). La disbiosis es una condición que se describe como: el detrimento y disfuncionalidad de un sistema debido a cambios en la riqueza o abundancia de la microbiota autóctona o típica (Carding *et al.*, 2015). Una pieza clave es comprender el papel que cumplen los microorganismos ajenos a la microbiota autóctona de *A. mellifera*; principalmente, aquellos con los que tiene contacto a través de la alimentación.

En lo que respecta a sus alimentos, la miel es un recurso confeccionado para ser un medio astringente para el crecimiento de los microorganismos. Por consiguiente, la miel puede ser almacenada como un alimento de conserva durante largos periodos de tiempo. Por otro lado, la relación entre el polen que las abejas consumen como alimento y los microorganismos de este polen aún no es del todo entendida.

El polen provee de las proteínas y ácidos grasos necesarios para el correcto desarrollo de las larvas y las abejas obreras adultas. Un aspecto interesante es que, el polen colectado por las abejas y el polen que almacenan, presentan diferencias físicas y químicas (Wright, Nicolson y Shafir, 2017). Pero también existen diferencias en la respuesta fisiológica de *A. mellifera*, cuando se alimentan con el polen colectado y el almacenado (Alqarni, 2006; Cremonz, De Jong y Bitondi, 2015). Inclusive, se han reportado diferentes respuestas fisiológicas cuando el pan de abeja tiene diferente tiempo de almacenamiento (Maes *et al.*, 2016). Aún no son claros los procesos por los cuales existen estas diferencias.

Una hipótesis para explicar estos cambios es que, los microorganismos de la microbiota del tracto digestivo de *A. mellifera* “transforman” el polen corbicular en pan de abeja, mejorando así sus propiedades nutricionales (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Contrariamente, se ha planteado una hipótesis alternativa que considera que, el pan de abeja es un microambiente de conserva con la función de mantener una baja actividad microbiana al igual que la miel (Anderson *et al.*, 2014a). Esta hipótesis alternativa está en concordancia con la evidencia de una “reducción” de la comunidad microbiana descrita por otros autores en el pasado (Chevtchik, 1950; Pain y Maugenet, 1966; Gilliam 1979). No obstante, esta hipótesis se ha probado exclusivamente en la

microbiota intestinal autóctona bacteriana de *A. mellifera*; y no responde a la incógnita de las diferencias en la respuesta fisiológica.

Otra posible hipótesis alternativa es que, los microorganismos por su sola presencia aportan nutrientes al ser consumidos junto al polen, causando las diferencias en la respuesta fisiológica. Esta idea ya había sido postulada en el pasado, señalando a grupos de levaduras presentes en el polen como la fuente adicional de nutrientes (Chevtchik, 1950; Pain y Maugenet, 1966). Apoyando la noción anterior, recientemente se ha propuesto que algunos grupos de abejas, entre ellas *A. mellifera*, son omnívoras ya que, el polen no es la única fuente de proteínas que metabolizan, sino que también adquieren nutrientes de los microorganismos presentes en su alimento, particularmente de organismos fúngicos (Steffan *et al.*, 2019). Lo anterior ha sido comprobado en otras especies de abejas, donde se ha demostrado la fuerte influencia de los microorganismos fúngicos para el correcto desarrollo de las larvas; y viceversa, cómo su ausencia provoca estragos en la maduración de las abejas obreras en adultas (Paludo *et al.*, 2018; Dharampal *et al.*, 2019).

En síntesis, podemos identificar dos hipótesis sobre la función del pan de abeja y la microbiota del polen. La primera hipótesis es: que el proceso de ensilar el pan de abeja es para crear un medio de conserva, dedicado a reducir la actividad microbiológica de la microbiota que se acarrea al colectar el polen. La segunda hipótesis es: que la microbiota fúngica del polen floral tiene una función importante en la dieta, suministrando algunos nutrientes a las larvas y abejas jóvenes en desarrollo; lo cual puede explicar las diferencias en la respuesta fisiológica entre dietas según la presencia o ausencia de individuos fúngicos. No obstante, la primera hipótesis parece contradictoria con la segunda hipótesis. Pero, el punto en común de ambas es la variación en la diversidad de la microbiota, entre el polen corbicular y el pan de abeja.

Hay dos posibles alternativas que expliquen el vínculo entre el proceso de pan de abeja y los microorganismos. La primera es la hipótesis de que el pan de abeja es un medio de conserva, y en la microbiota del polen corbicular debe haber una reducción drástica de la diversidad al sufrir el proceso de transformación del polen corbicular a pan de abeja. Por el contrario, el pan de abeja puede ser un medio selectivamente astringente para bacterias, pero no para la microbiota fúngica benéfica.

Bajo este escenario, el presente trabajo de tesis analiza muestras de polen corbicular y pan de abeja de *A. mellifera* utilizando las herramientas bioinformáticas más actuales hasta el momento

para analizar la diversidad y estructura microbiana. Los resultados obtenidos sugieren que no existen cambios significativos en las medidas de diversidad evaluadas, en términos de número efectivo de especies, para la variable del tipo de muestra. No obstante, se halla una fuerte influencia de la variable de ubicación de donde se tomaron las muestras. Por otro lado, la estructura de la comunidad revela la presencia de microorganismos persistentes en todas las muestras como el hongo clasificado a nivel género como *Cladosporium*. Disayathanoowat *et al.* (2020) reportaron ambos géneros en todas sus muestras colectadas en China, de manera similar a lo encontrado en este trabajo. Tras el antecedente de que los microorganismos juegan un papel con su sola presencia en la dieta, se discute la posible función de *Cladosporium* en relación con la dieta de *A. mellifera*.



## **CAPÍTULO I: ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL, OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **2 ANTECEDENTES**

#### **2.1 DEFINICIÓN DE MICROBIOTA**

El término microbiota se refiere la comunidad de microorganismos presentes en un ambiente definido (Marchesi y Ravel, 2015). En este sentido, microbiota se refiere a más de un gremio de microorganismos; por lo que, si es necesario especificar una sola parte de la microbiota es preferible utilizar el término comunidad (por ejemplo, comunidad de levaduras, comunidad bacteriana, comunidad de microalgas, etc.). Así mismo, para disminuir ambigüedades, es importante especificar el ambiente (por ejemplo, microbiota de la piel, microbiota del intestino, microbiota del suelo).

Un término que se suele utilizar como sinónimo de microbiota es microbioma; sin embargo, el término microbioma hace referencia a un mayor nivel de organización que integra al ambiente y los microorganismos. Esta definición se basa en el sufijo *bioma*, que comprende los factores bióticos y abióticos de un ecosistema. El término microbioma se suele utilizar indistintamente con microbiota para referirse a una comunidad de microorganismos (por ejemplo, Donkersley *et al.*, 2018); no obstante, es de mayor aceptación emplear el término microbioma cuando, aparte de analizar el ensamblaje de microorganismos, se implementan más herramientas, por ejemplo metabolómica, metatranscriptómica y proteómica y se relacionan en conjunto con datos ambientales o clínicos del sistema estudiado (por ejemplo, Proctor *et al.*, 2019).

#### **2.2 RELACIÓN DEL POLEN FLORAL, CORBICULAR Y PAN DE ABEJA CON LA NUTRICIÓN DE ABEJAS**

Las abejas adultas y las larvas de *A. mellifera* poseen dos fuentes de alimentación de origen floral: el néctar y el polen. En el polen, los nutrientes que son aprovechables para las abejas están en el protoplasma, ya que las paredes protectoras externas del polen no son digeribles (Peng *et al.*, 1985).

Cuando una abeja forrajera visita una flor, el polen se adhiere a las vellosidades de su cuerpo. Acto seguido, la abeja humecta sus patas delanteras con una mezcla de saliva y néctar regurgitado, y de este modo amasa el polen y lo empaqueta en sus corbículas, formando pequeñas pelotas. A este polen se le conoce como polen corbicular (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1.** Abeja forrajera de *A. mellifera* con polen en sus corbículas. Fotografía del autor

La abeja forrajera, una vez que retorna a la colmena, deposita el polen corbicular en una celda hexagonal (**Figura 1.2**); posteriormente, otra abeja obrera se encargará de apelmazarla con más pelotas de polen hasta llenar la celda y, finalmente, sellarla con miel. A este polen almacenado se le conoce como pan de abeja.

El pan de abeja es la fuente de proteínas y lípidos tanto para las larvas, como para las abejas recién emergidas. La escasez de este recurso puede comprometer seriamente la crianza de nuevas abejas. Inclusive, la colmena puede llegar al extremo de canibalizar larvas para asegurar la ingesta de proteínas de crías más desarrolladas (Schmickl y Crailsheim, 2001). De continuar la escasez, la reina cesa la postura de huevos evitando la producción de más crías (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Existe controversia sobre el efecto que tiene el pan de abeja (y su proceso de elaboración) sobre la nutrición de *A. mellifera*. El planteamiento de esta idea proviene de los cambios físico-químicos que sufre el polen al ser empaquetado, almacenado y sellado (Wright, Nicolson y Shafir, 2017). Además, lo anterior se apoya de trabajos con bioensayos que demuestran diferencias positivas en la respuesta fisiológica y longevidad de abejas obreras recién emergidas de *A. mellifera* alimentadas con pan de abeja y en comparación con otras dietas (Cremonese *et al.*, 1998; Alqarni, 2006). Así mismo, el tiempo de almacenamiento parece también influir en la salud de las abejas, de acuerdo con Maes *et al.* (2016)



**Figura 1.2.** Abeja forrajera de *A. mellifera* depositando el polen corbicular en una celda. Fotografía de Gerardo Alejandro Díaz Duarte

que reportan una relación entre polen “añejo” (21 días almacenado) con una mayor mortalidad y un desarrollo desigual en las abejas en comparación con el polen fresco (14 días almacenado).

Contrario a como sucede con la miel (Park, 1925; Oertel *et al.* 1951), el polen no es “madurado” por las abejas; por lo que, los mecanismos detrás de las diferencias entre el polen que entra a la colmena (corbicular) y el polen almacenado (pan de abeja) aún no son esclarecidos.

### **2.3 RELACIÓN DEL POLEN CORBICULAR Y PAN DE ABEJA CON LOS MICROORGANISMOS**

Inicialmente se creyó que las diferencias entre el polen corbicular y el pan de abeja eran por un enriquecimiento o transformación (es decir, una “mejora”) del polen por la acción de microorganismos, principalmente *Lactobacillus* y levaduras (Chevtchik, 1950; Egorova, 1971; Foote, 1957; Gilliam, 1979; Gilliam, 1979b; Pain & Maugenet, 1966). Posteriormente, se hipotetizó que las bacterias ácido lácticas de la microbiota intestinal de *A. mellifera* eran las responsables de esta “mejora” (Vásquez & Olofsson, 2009). Sin embargo, se ha postulado que la presencia de la microbiota de *A. mellifera* en el pan de abeja es ocasional; y su posible contribución no es sustancial para llevar a cabo una transformación de los alimentos (Anderson *et al.*, 2013b, 2014b; Corby-Harris, Maes y Anderson, 2014).

También se ha propuesto que el pan de abeja es una forma de conservar los alimentos, y el proceso para almacenarlo, como ensilaje, reduce la actividad microbiológica (Anderson *et al.*, 2014b). No obstante, estos trabajos se enfocaban únicamente en establecer una relación entre el pan de abeja y la microbiota intestinal de *A. mellifera*. Esto dejó a un lado el posible papel de la microbiota fúngica, y además a la microbiota propia del polen. Por lo que no ha sido posible esclarecer las dinámicas en términos de la diversidad de la microbiota durante el proceso completo; que va desde el polen floral, pasando a empaquetarse en polen corbicular, hasta ensilarse en pan de abeja.

Recientemente, en estudios con otras especies de abejas, se ha descrito una importante relación entre el alimento y la microbiota asociada a ese alimento. Dharampal *et al.* (2019) reportaron que los microorganismos presentes en las reservas de polen de la abeja *Osmia ribifloris* afectan fuertemente la adecuación de las larvas. Su experimento consistió en evaluar los efectos de dietas esterilizadas a diferentes proporciones (100 %, 90 %, 80 % hasta 0 %). Las larvas alimentadas con la dieta completamente estéril (100 %) pesaban 5 veces menos y demoraban un 30% más tiempo en desarrollarse, en comparación con la sin esterilizar (0 %). Por otro lado, Paludo *et al.* (2018) demostraron que las larvas de *Scaptotrigona depilis* necesitan un esteroide para desarrollarse. Este esteroide lo obtienen de una levadura del género *Zygosaccharomyces*, que crece utilizando como sustrato la reserva de alimento provista en la celda. En su experimento, 71 % de las larvas que consumieron el micelio completaron su desarrollo hasta abejas adultas 40 días después; mientras que aquellas sin la levadura sólo tuvieron 8% de pupas, las se demoraron más en su desarrollo, y murieron a las 3 semanas, sin poder desarrollarse completamente en abejas adultas.

Ambos trabajos evidencian la importancia de la microbiota en la dieta de otras abejas; y demuestran que la ausencia de microorganismos impacta directamente en su desarrollo en abejas adultas. Con base en lo anterior, como primer paso para comprender el impacto de la microbiota del polen floral en la respuesta fisiológica de *A. mellifera* es necesario identificar a los microorganismos que componen esta microbiota y analizar los cambios que sufre durante este proceso.

---

## 2.4 MICROBIOTA ASOCIADA A LA ABEJA *A. MELLIFERA*

### 2.4.1 BACTERIAS

Las abejas obreras adultas de *A. mellifera* poseen una comunidad bacteriana autóctona a lo largo de su tracto digestivo, compuesta por cinco filotipos de bacterias. Los filotipos son una manera de clasificar a los organismos de acuerdo con similitud genética; en el caso de bacterias es del 97% de similitud en el gen ARNr 16S (Ellegaard *et al.*, 2020). Los cinco grupos están divididos en dos regiones del intestino posterior de *A. mellifera*. En el intestino posterior, en el íleon se encuentra *Snodgrassella alvi* formando una película densa; encima crece *Gilliamella apicola* forma otra película; descendiendo en el tracto digestivo, en el recto se encuentra la mayor densidad de bacterias del intestino, colonizados por los filotipos *Lactobacillus* Firm4, *Lactobacillus* Firm5 y *Bifidobacterium* (Moran *et al.*, 2012; Kwong y Moran, 2016).

También hay otras especies que no son consideradas como exclusivas, pero que se encuentran frecuentemente. En el buche melífero es común hallar *Lactobacillus kunkeei* y *Bombella apis* (Corby-Harris, Maes y Anderson, 2014). En la región del píloro se puede ubicar a *Frischella perrara*, un patógeno oportunista capaz de aumentar su abundancia en condiciones de disbiosis, causando cicatrización en el tejido adyacente (Maes *et al.*, 2016).

### 2.4.2 REINO FUNGI

Aún no se establece si existe una microbiota autóctona fúngica en *A. mellifera*. Lo que se conoce es que en el intestino de las abejas obreras, los organismos fúngicos presentes que dominan son del el filo de los *Ascomycetos* (>90%), seguido del filo *Basidiomicetos* (>6%), y otros grupos que representan menos del 1%. Al nivel de género en la mayoría de las abejas obreras domina el grupo de *Saccharomyces* (>97%), pero en las abejas forrajeras la abundancia relativa disminuye al 2% y se adquiere una microbiota fúngica más diversa, por lo que podría considerarse como cambiante y no exclusiva (Yun *et al.*, 2018).

### 2.4.3 OTROS

Otros microorganismos presentes pueden ser virus, algunos patógenos de abejas como los tripanosomátidos *Crithidia mellificae*. Los virus se consideran más bien de aparición esporádica, de acuerdo con un monitoreo de diez meses en veinte colonias migratorias. Se han detectado 69 virus de diversa taxonomía, entre ellos familias de *Dicistroviridae*, *Flaviridae*, y algunos sin clasificación (Runckel *et al.*, 2011). De la familia *Dicistroviridae* se encuentran los virus que

causan la parálisis aguda (CBPV), de celda de reina negra (BQCV); y de *Iflaviridae* los virus que causan alas deformes (DWV) y de la parálisis lenta de las abejas melíferas (SBPV) (Runckel *et al.*, 2011).

## **2.5 MICROBIOTA DEL POLEN FLORAL**

La mayoría de los estudios que trabajan con microorganismos presentes en la flor, se han enfocado al néctar o a la flor completa, pocos han sido los que se enfocan particularmente en el polen floral (Alekklett, Hart y Shade, 2014). Por lo que aún falta evidencia para establecer si el polen floral posee una microbiota exclusiva, posiblemente por la magnitud metodológica necesaria para realizar muestreos a través de las distintas especies de angiospermas, con sus respectivas réplicas.

Una aproximación cercana fue la de Manirajan *et al* (2018) considerando a los grupos compartidos que estuvieran presentes en muestras de polen de Abedul (*Betula pendula*), Centeno (*Secale cereale*), Canola (*Brassica napus*), Narciso de Otoño (*Colchicum autumnale*), Avellano de Bruja (*Corylus avellana*), Endrino (*Prunus spinosa*), Artemisa (*Artemisia vulgaris*) y Ciruelo rojo (*Prunus cerasifera*). Los 12 géneros de bacterias identificados más abundantes fueron dominados principalmente por *Pseudomonas*, *Rosenbergiella*, *Bradyrhizobium*, y en menor proporción *Propionibacterium*, *Caulobacter*, *Frigoribacterium*, *Solimonas*, *Corynebacterium*, *Acidisphaera*, *Steroidobacter*, *Acidibacter*, *Oligoflexus*. En un trabajo realizado por Junker & Keller (2015) dedicado a explorar la diversidad según el órgano floral, se reportó a la familia *Enterobacteriaceae* como dominante en los estambres de *Metrosideros polymorpha*. También hallaron especies de los géneros *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, *Mycoplana*, *Limmnobacter*, *Limnohabitans*, *Bdellovibro*, *Buchnera*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges* y *Lysobacter*. Heydenreich *et al.*, (2012) reportaron los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Corynebacterium*, *Oerskovia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Rahnella* y *Pseudomonas* en muestras de polen de la especie *Phleum pratense*.

Para el caso de la comunidad fúngica, Manirajan *et al.* (2018) enlistó 33 géneros fúngicos que se distribuían más equitativamente en comparación a la comunidad bacteriana, con *Cladosporium* como el más abundante seguido de *Aureobasidium*, *Leptosphaeria*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Phaeoramularia*, *Dothiorella*, *Gibberella*, *Cryptococcus*, *Oidium*, *Microstroma*, *Alternaria*, *Taphrina*, *Phoma*, *Mycosphaerella*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Sporobolomyces*, *Aspergillus*, *Zymoseptoria*, *Didymella*, *Phaeosphaeria*, *Cercophora*, *Boeremia*, *Filobasidium*, *Neosascochyta*, *Phomatodes*,

*Articulosphora*, *Scoliciosporum*, *Dioszegia*, *Bullera*, *Stagonospora* y *Vishniacozyma*. Mientras que Heydenreich *et al.* (2012) hallaron mediante medios de cultivos los géneros *Penicillium* y *Botrytis* en polen de *Phleum sp.* Así mismo, utilizando medios de cultivo Pozo *et al.* (2012) hallaron los géneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Metschnikowia* en polen de *Digitalis obscura* y *Atropa baetica*.

En contraste con la microbiota de *A. mellifera*, la microbiota del polen floral tiene una mayor riqueza de especies. Un patrón importante de notar es que hay una mayor riqueza de géneros fúngicos en comparación con las bacterias. También, por los datos de abundancias relativas las comunidades bacterianas, parecen estar dominadas por un grupo de especies, mientras que las comunidad fúngica parece estar distribuida más equitativamente (Junker y Keller, 2015). Sin embargo, faltan datos de diversidad que puedan dar una medida cuantitativa a esta información, ya que la mayoría de la información presentada se reporta en gráficas de abundancia relativa.

## 2.6 MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR

### 2.6.1 BACTERIAS

Con el uso de la identificación genética mediante el gen ARNr 16S y aislamiento en medios de cultivo Vásquez y Olofsson (2009) describieron en el polen corbicular la presencia de bacterias del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y de la familia *Pasteurellaceae*. Los grupos identificados mediante métodos independientes de cultivo son: *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rosenbergiella* y *Acinetobacter* (Anderson *et al.*, 2014b; Corby-Harris, Maes y Anderson, 2014; Mauriello *et al.*, 2017; Disayathanoowat *et al.*, 2020). Se puede encontrar algunos microorganismos de la microbiota exclusiva del intestino de *A. mellifera*, pero su presencia es ocasional (Anderson *et al.*, 2014b; Corby-Harris, Maes y Anderson, 2014; Disayathanoowat *et al.*, 2020).

Hasta donde se ha descrito, de la microbiota del polen corbicular de *A. mellifera* no es una microbiota estable, sino que está sometida a cambios en su abundancia por factores ambientales (Anderson *et al.*, 2014b; Corby-Harris, Maes y Anderson, 2014). En general, la comunidad del polen corbicular es más similar a la microbiota del polen floral que a la microbiota de *A. mellifera*.

### 2.6.2 REINO FUNGI

La información disponible hasta el momento sobre la microbiota fúngica del polen corbicular en *A. melífera* es limitada. A través de medios de cultivo (Kačániová *et al.*, 2011) se han aislado

especies del género *Mucor*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Penicillium*. Recientemente, Disayathanoowat *et al* (2020) mediante métodos de NGS conocieron la proporción relativa de la comunidad fúngica. El grupo dominante es el género *Cladosporium* con una abundancia relativa promedio >50% en todas las muestras; seguido de grupos menos abundantes como *Botrytis* (6.21%), un grupo no identificado de la familia *Sclerotiniaceae* (4.49%), un grupo del orden *Trichosphaeriales* (3.19%), *Penicillium* (2.55%), *Aspergillus* (2%) y *Alternaria* (1.93%). En este caso también la comunidad de polen corbicular es similar al polen floral en comparación con la microbiota de *A. mellifera*.

## 2.7 MICROBIOTA DEL PAN DE ABEJA

### 2.7.1 BACTERIAS

En los primeros trabajos de bioprospección microbiológica, los microorganismos eran aislados empleando medios de cultivo y se identificaban mediante morfología y respuestas bioquímicas (Wickerham 1951, Gordon *et al* 1973). Con esta metodología, las comunidades bacterianas del pan de abeja producido por *A. mellifera* se identificaron representativamente por dos grupos: *Lactobacillus* y *Pseudomonas* (Chevtchik, 1950; Egorova, 1971; Foote, 1957; Gilliam, 1979a; Pain & Maugenet, 1966). Con el uso de herramientas moleculares para la identificación genética, como la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, Vásquez y Olofsson (2009) detectaron especies de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y de la familia *Pasteurellaceae*. Por su parte, Anderson *et al.* (2013b) aislaron del pan de abeja *Lactobacillus*, *Acinetobacteria*, *Firmicutes*, *Halomonadaceae*, *Clostridium*, *Parasaccharibacter*, *Xanthomonadales*, *Bacterioidetes*, *Enterobacteriaceae* y *Betaproteobacteria*.

Los estudios que utilizan “metodologías independientes de medios de cultivo”, es decir que omiten el cultivo de microorganismos y extraen directamente el ADN, reportan algunos géneros en común; pero pueden tener, por variaciones metodológicas, distintas proporciones relativas además de otros taxones nuevos. Anderson *et al.* (2014) reportaron la comunidad bacteriana identificada en muestras de pan de abeja producido por *A. mellifera* en distintas estaciones del año. En sus resultados hallaron especies pertenecientes a: *Acetobacteraceae*, *Actinobacteria*, *Parasaccharibacter*, *Bacilliales*, *Bacterioidetes*, *Burkholderiales*, *Enterobacteriales*, *Lactobacillales*, *Lactobacillus kunkeei*, *Pseudomonadales*, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*, *Xanthomonadales*. Por otro lado, en el estudio de Donkersley *et al.* (2018) hallaron especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Arsenophonus*, *Orbus*,

*Lactobacillus*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Saccharibacter*, *Raoultella*, *Tatumella*, *Massilia* y *Sphingomonas*. Recientemente, Disayathanoowat *et al.* (2020) detectaron la presencia de especies pertenecientes a los géneros *Rosenbergiella*, *Paracoccus*, *Pantoea*, *Buttiauxella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia-Shigella* y especies de la microbiota autóctona del tracto digestivo de *A. mellifera*.

En cuanto a la composición de las comunidades bacterianas del pan de abeja en comparación con el polen corbicular; Anderson *et al.* (2014) concluyeron que no existen diferencias. Mientras que Disayathanoowat *et al.* (2020) encontraron que las comunidades sí son distintas en cuanto a las proporciones relativas, pero no encontraron diferencias significativas en los análisis de diversidad en las comunidades de ambos tipos de polen.

### 2.7.2 REINO FUNGI

Mediante el uso de medios de cultivo se han aislado levaduras y hongos del pan de abeja. En 1979 Gilliam realizó el trabajo de resumir, junto con sus resultados, los géneros encontrados hasta ese momento mediante el uso de aislamiento en medios de cultivo, los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Torulopsis* y *Zygosaccharomyces* (Gilliam, 1979). Recientemente, Portillo (2016) identificó a las levaduras *Candida*, *Kodamaea*, *Metschnikowia* y *Zygosaccharomyces* mediante la combinación de los métodos de genética y aislamiento en medios de cultivo.

Hasta este momento, existe un estudio que empleando el método independiente de cultivo, ha identificado y analizado la diversidad de la comunidad fúngica (Disayathanoowat *et al.*, 2020) asociada al el pan de abeja producido por *A. mellifera*; en este trabajo se reportó a *Cladosporium* como género dominante, seguido por *Botrytis*, *Rhodosporidium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*.

En general, se puede observar que las comunidades del polen corbicular y el pan de abeja son similares a las comunidades descritas en el polen floral. Sin embargo, es importante resaltar que, aunque se han catalogado los géneros microbianos presentes, la mayoría de los estudios no profundiza en analizar la estructura de la comunidad y algunos pasan por alto los análisis de diversidad.

Aún falta por describir más a fondo los cambios que puedan existir las dos comunidades de estas dos etapas del polen, dado que parecen similares, pero por el cambio de un sistema abierto (en

la flor, expuesta a más insectos) a un sistema cerrado (como lo es una colmena), se esperaría que estas comunidades tengan cambios que, aun no han sido descritos en su totalidad.

---

## 2.8 PRINCIPALES METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA

Generalmente, los estudios que requieren analizar la microbiota presente en una muestra lo hacen mediante la extracción del ADN, seguido de la amplificación y secuenciación de genes específicos. Por último, con herramientas bioinformáticas se identifican a los organismos comparando las secuencias obtenidas contra la información de una base de datos de referencia.

Existen dos aproximaciones que varían dependiendo de la proveniencia del ADN extraído. La primera, se conoce como secuenciación Sanger (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977) y trabaja con muestras de ADN que son extraídas de, lo que se presume es, una sola especie aislada en un cultivo *in vitro*. Por otro lado, la segunda emplea la secuenciación de nueva generación (NGS: por sus singlas en inglés) que se conoce como secuenciación dirigida (en inglés: *amplicon sequencing, targeted sequencing, marker sequencing*), y trabaja muestras complejas conteniendo ADN de múltiples especies. Los genes más utilizados para ambas aproximaciones son el 16S ARNr para bacterias y la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) para el reino fungi (Goodrich *et al.*, 2014).

### 2.8.1 ESTUDIOS UTILIZANDO CULTIVOS IN VITRO Y SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación Sanger (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977) es aún vigente según los objetivos y alcances de cada estudio. Para este flujo de trabajo, el ADN debe provenir de una sola fuente, por lo que los microorganismos deben ser aislados del ambiente y separados por especies. Para lograrlo, la muestra se cultiva en medios enriquecidos; posteriormente, se realizan cultivos puros mediante resiembras, y se extrae el ADN para amplificar un gen (16S o ITS) para identificar a la especie incógnita. Así, cada especie aislada requiere su propia resiembra, extracción e identificación.

Una ventaja de la secuenciación Sanger es el amplio fragmento que puede secuenciarse, de hasta >1,000 pb con menos del 1% de error (Shokralla *et al.*, 2012); además, el organismo aislado puede ser mantenido en cultivos para posteriores análisis.

La mayor desventaja de esta metodología es que los medios de cultivo pueden, por diferencias al ambiente en donde se obtuvo la muestra, cambiar la estructura de la microbiota al beneficiar o desfavorecer a ciertos grupos. Las diferencias pueden ser de distinta naturaleza, por ejemplo: en requerimientos nutricionales específicos, la presencia o ausencia de oxígeno, activando o exacerbando antagonismo por competencia por nutrientes disponibles en el medio,

desarticulando relaciones mutualistas, por mencionar algunos de los factores. Por ende, no todos los microorganismos presentes en una muestra son cultivables (Shade *et al.*, 2012); bajo este esquema, los datos se ciñen a aquellos microorganismos que se logren cultivar. Otra desventaja es la escalabilidad, debido a que una muestra puede contener de cientos a miles de especies; tener que realizar todo el flujo de trabajo individualmente por cada especie puede ser costoso en tiempo y recursos (Hajibabaei *et al.*, 2011). Una alternativa para masificar este procedimiento es el uso de la secuenciación de nueva generación (NGS).

### 2.8.2 ESTUDIOS UTILIZANDO SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

Con la llegada de las NGS fue posible secuenciar con ADN directamente de la muestra (shotgun sequencing) o de productos de PCR (amplicon sequencing). En resumen, la mayor ventaja de esta tecnología es el poder secuenciar en paralelo desde miles, hasta decenas de millones de secuencias por muestra; lo cual permite capturar una imagen más cercana de la estructura de la microbiota en su ambiente.

Sin embargo, las tecnologías NGS no están exentas de desventajas; la mayor es que la diversidad captada puede estar sesgada, debido a que los pasos del flujo de trabajo (extracción de ADN, amplificación por PCR) se inclinan algunos grupos taxonómicos sobre otros (McLaren, Willis y Callahan, 2019) o por los errores con los que operan los secuenciadores (errores de secuenciación, composicionalidad y variación en tamaño de librerías, es decir, el número total de lecturas por muestra).

De los pasos en el flujo de trabajo, el que mayor puede causar variación en la diversidad captada es el protocolo de extracción de ADN (Costea *et al.*, 2017). Un factor importante es que las membranas de algunos grupos son fácilmente lisadas, mientras que otros requieren de mayor fuerza mecánica o química (Bürgmann *et al.*, 2001); fallar en la lisis puede hacer más o menos eficiente el rendimiento de ADN obtenido (Carrigg *et al.*, 2007). Se ha demostrado que estas diferencias pueden influir en los resultados de la secuenciación (Temperton *et al.*, 2009). Además, la adherencia de los microorganismos a relieves o porosidades (como sucede con el polen) puede dificultar la accesibilidad a las células para ser lisadas (Nunan *et al.* 2003).

Los cebadores elegidos para amplificar el gen seleccionado son otra fuente de variación, debido a que suelen ser más afines a ciertos grupos; lo cual puede llevar a no representar completamente (incluso excluir) a algunos grupos específicos (Hamady y Knight, 2009). También, durante la amplificación por PCR se pueden formar quimeras, cuando un fragmento de

una secuencia incompleta durante la etapa de extensión, funciona como cebador en el siguiente ciclo formando una secuencia artificial sin sentido biológico (Haas *et al.*, 2011). A su vez, los errores de secuenciación pueden generar quimeras (Kunin *et al.*, 2010). En los primeros reportes estas secuencias quiméricas eran difíciles de distinguir de la verdadera variación biológica (Brown *et al.*, 2015; Tedersoo *et al.*, 2010), por lo que se interpretaban erróneamente como nuevas especies, alterando las estimaciones de la diversidad (Dickie, 2010). Afortunadamente, se han desarrollado herramientas bioinformáticas que ahora pueden detectar y eliminar adecuadamente la mayoría de las quimeras (Callahan *et al.*, 2016).

Otra fuente de variación radica en el número de copias que poseen los microorganismos del gen de interés amplificado. Por lo que, cierta variación calculada en la abundancia relativa puede explicarse tanto por los organismos en sí, como por la variación en el número de copias que poseen del gen secuenciado (Kembel *et al.*, 2012).

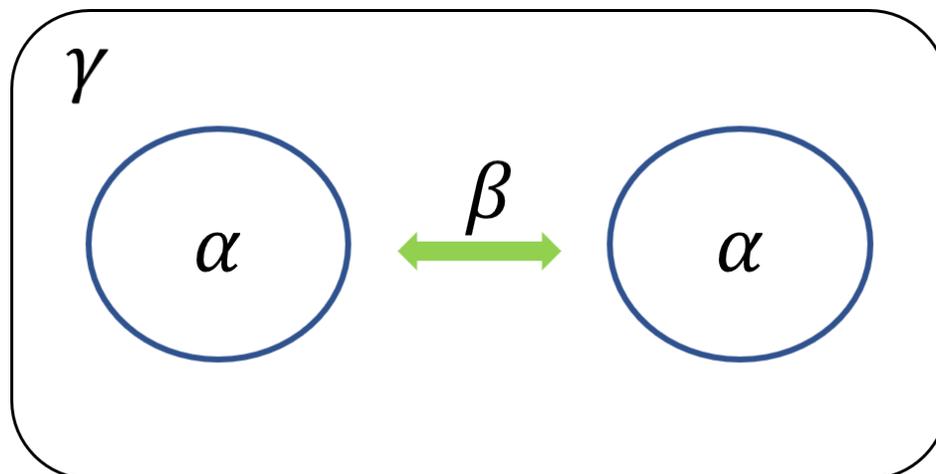
Adicional a los factores mencionados, la variación en resultados también puede deberse a que el secuenciador genera datos composicionales (Gloor *et al.*, 2016). Los datos composicionales son aquellos que por su naturaleza son proporciones y están sujetos a sumar un valor constante; lo relevante es que únicamente informan de la magnitud relativa de las partes que componen el conjunto de datos (Aitchison, 1994); a continuación se explica con más detalle. Para el caso de los datos NGS, el secuenciador tiene un total predefinido de secuenciones a realizar (es decir, número de lecturas fijo). Entonces, el número de lecturas de cada taxón/OTU/ASV corresponde a: su proporción multiplicada por el valor constante del número total de lecturas realizadas por el secuenciador para esa muestra. Así, las secuencias del taxón/OTU/ASV de la muestra original pierden relación con su valor absoluto; y el número de lecturas asignado representa un numerador arbitrario con denominador impuesto por el secuenciador para esa muestra. En este sentido, el número de lecturas asignadas a un taxón/OTU/ASV no es relevante biológicamente. A pesar de estas desventajas, las NGS son un gran avance para la exploración de la diversidad, al tener mayor alcance para capturar la presencia de microorganismos no cultivables (Shade *et al.*, 2012). Actualmente existen análisis estadísticos (Jiang *et al.*, 2019) y técnicas (Harrison *et al.*, 2020; Jian *et al.*, 2020) para corregir los problemas causados por la composicionalidad.

## 2.9 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA

Conceptualmente la diversidad integra tres componentes: riqueza, equidad y disparidad (Daly, Baetens y De Baets, 2018). La riqueza ( $S$ ) es el número total de especies presentes en un

ambiente. La equidad es una medida de uniformidad en la distribución de las abundancias de las especies; mientras más homogénea, más equitativa es la comunidad. La disparidad es una medida de que tan similares son las especies; se refiere por ejemplo a que una comunidad de seis especies de distinta clase taxonómica es más diversa que una comunidad de seis especies del mismo género. La diversidad, no posee un valor absoluto que pueda atribuírsele y puede medirse con cualquier formulación que considere uno o varios aspectos de una comunidad (Shade, 2017). Por lo tanto, la diversidad que se reporta es relativa y sujeta al método con el que se mide; por lo cual, es importante precisar que métricas se emplean a fin de evitar malinterpretaciones en las conclusiones alcanzadas sobre la comunidad estudiada (Shade, 2017).

En general, los cambios en la microbiota se evalúan midiendo cambios en su diversidad alfa ( $\alpha$ ) y diversidad beta ( $\beta$ ) (**Figura 3**); utilizando AVS's/OTU's como un aproximado a especies. La diversidad alfa mide la diversidad entre muestras y puede ser comparada por grupos; por ejemplo comparando S en grupos control contra tratamiento. La diversidad beta se refiere a la medida de disimilitud entre dos o más muestras y se suele presentar mediante gráficos; pero también existen estimaciones cuantitativas.



**Figura 1.3.** Representación gráfica de la diversidad alfa, beta y gamma. La diversidad alfa se limita a un ambiente definido. La diversidad beta, es la disimilitud que existe entre dos ambientes. La diversidad gama es la diversidad global.

### 2.9.1 CONSIDERACIONES PARA ANALIZAR LOS DATOS DE DIVERSIDAD

Para las estimaciones de la riqueza de especies ( $S$ ) se utilizan dos tipos de datos: datos de incidencia y datos de abundancia (Gotelli y Colwell, 2011). A partir de esta información se

generan matrices de datos, en el caso de ecología microbiana se conocen como tablas de abundancia de OTU's. Las consecuencias de este esquema tienen implicaciones profundas en los supuestos con los que se estiman las métricas de diversidad (Gotelli y Colwell, 2011). Por ejemplo, los datos de abundancia asumen que los muestreos son con remplazo, es decir: los individuos son observados de la población sin ser removidos o colectados, de otra forma si son colectados o removidos sus proporciones en la muestra original no cambian. Este es un escenario poco realista si se considera la composicionalidad de los datos NGS, donde las proporciones siempre están sujetas a cambio.

### 2.9.2 EL PROBLEMA DE DEFINIR ESPECIE EN ECOLOGÍA MICROBIANA

Stackebrandt & Goebel (1994) propusieron que una "especie" bacteriana se define con base en la identidad molecular del 97% en el gen ARNr 16S. Poco después, con los avances en la secuenciación fue necesaria una definición taxonómica de lo que aún no estaba identificado, para poder realizar comparaciones entre distintos estudios. Fue así que comenzaron a definirse las unidades operaciones taxonómicas o OTU's (por sus siglas en inglés) a principios del año 2000 (Bohannon y Hughes, 2003). Así, los OTU's fueron la entrada de la microbiología a los análisis de diversidad con el supuesto de que un OTU es considerado como un nivel taxonómico cercano a "especie" (Hughes *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2003).

Poco después, con la pyrosecuenciación 454 fue posible explorar con más profundidad las comunidades microbianas; sin embargo, el costo de este avance fue alto para las estimaciones de diversidad, ya que por los errores de secuenciación se inferían hasta seis veces más OTU's, sobre estimando la diversidad real. Posteriormente, se reportó que había un factor de error del 0.2% introducido por la PCR; y la agrupación de OTU's al 97% "absorbía" la mayoría de los errores mejorando así los datos y resultados del análisis de la diversidad (Kunin *et al.*, 2010). De tal forma que continuaron los reportes con enormes estimaciones de riqueza (S) de OTU's con curvas de rarefacción proyectando aún más riqueza no capturada; y así fue que se concluyó que existía una "biósfera rara" (Welch y Huse, 2011). No obstante, la crítica aterrizó sobre los análisis de diversidad, con demostraciones en errores de hasta un orden de magnitud en la estimación de la riqueza (S) utilizando curvas de rarefacción y estimadores no-paramétricos; se ligó el problema, de nuevo, a los OTU's raros (Dickie, 2010; Haegeman *et al.*, 2013).

El problema recae en clasificar las secuencias únicas (llamadas *singletons*) en: OTU's raros con sentido biológico o en secuencias artificiales (Tedersoo *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015). Aunado

al problema anterior, los OTU's cambian según los diferentes programas de agrupación (Sun *et al.*, 2012), agregando más incertidumbre a la estimación de la riqueza según el número de OTU's agrupados. Los algoritmos de agrupación de OTU's podían tener diferencias de hasta dos órdenes de magnitud para la misma base de datos (Kopylova *et al.*, 2014). Sin una resolución de "especie", que además estaba en constante cambio según la metodología empleada, los análisis de diversidad carecían de sentido comparativo y reproducibilidad.

Para que los resultados de diversidad reflejen un sentido biológico y no ser un resultado artificial, es importante: a) eliminar los errores de secuenciación, b) que la agrupación sea lo más fiel posible a la verdadera variación biológica y no sujeta a la similitud de los datos.

### 2.9.3 DIVERSIDAD ALFA

Medir la diversidad cobra sentido ecológico cuando está en un contexto comparativo, por ejemplo, en los cambios de una comunidad a través de una perturbación o gradiente (Shade, 2017). Un primer paso para evaluar los cambios o diferencias entre comunidades es analizar la diversidad alfa. Para ello, se utilizan métricas que reflejan aspectos de riqueza y equidad.

En general, las métricas se clasifican en estimadores de riqueza de especies e índices de diversidad basados en las abundancias proporcionales de las especies; estos últimos pueden ser subdivididos según si son mayormente influenciados por dominancia o por equidad (Magurran, 2004). La mayoría de estas métricas fueron adoptadas de la macroecología (Hill *et al.*, 2003), y tienen problemas al ejecutarse bajo la estructura de datos de la NGS. A pesar de ello, siguen empleándose indistintamente al estar integradas por defecto en paquetes estadísticos o de análisis de datos (Willis & Martin, 2020).

Una noción importante es que los índices de diversidad no son sinónimo del concepto de diversidad; más bien son abstracciones de una propiedad de la diversidad que se reflejan en un valor, el cual puede estar dado en escalas y magnitudes únicas para ese índice. Por ejemplo, el índice de diversidad Shannon (Shannon, 1948) es una medida de entropía y el índice Simpson (Simpson, 1949) representa una probabilidad. En este sentido, entre ellos no son comparables ni representan lo mismo; aunque por lo general, se recomienda utilizar el promedio de los valores obtenidos de cada muestra (Knight *et al.*, 2018).

Otro problema relacionado con los índices es que no tienen linealidad con las abundancias de las especies. Por ejemplo, si un investigador mide el efecto de un antibiótico de amplio

espectro sobre una comunidad de 100 OTU's en igual abundancia. Como efecto del tratamiento se eliminan el 50% OTU's sin afectar sus proporciones. Si el investigador utilizara el índice Gini-Simpson como referencia del antes y después de aplicar el tratamiento, el resultado es que el valor cambia de 0.99 a 0.98. Los resultados obtenidos en el ejemplo pueden llevar a concluir al investigador que los tratamientos no tuvieron un efecto significativo; por esta razón, es importante seleccionar un índice de diversidad adecuado que refleje las suposiciones o condiciones que se desean estudiar de la comunidad (Morris *et al.*, 2014).

Una forma para resolver este problema de interpretación y linealidad es el uso del número efectivo de especies, o conocido como: los números de Hill (Hill, 1973). Los números de Hill proveen una medida en unidades de especies, y la sensibilidad a las especies raras puede ser modulada a través del parámetro  $q$  que se conoce como "orden de la diversidad" (Jost, 2006). El valor  $q = 0$  es la riqueza de especies, y no considera abundancias; el nivel  $q = 1$  es el exponente de la entropía de Shannon y mide a todas las especies por su abundancia sin favorecer a raras o dominantes; por último el valor  $q = 2$  es el equivalente al índice Gini-Simpson y pone más peso sobre las especies abundantes. La interpretación de un valor de número efectivo de especies es: el número de OTU's igualmente abundantes que se necesitarían para el mismo valor de diversidad.

Así mismo, es importante considerar que cuando un investigador realiza un muestreo de  $N$  individuos, puede no capturar todas las especies presentes en el ambiente (es decir, la riqueza  $S$ ), y lo que obtiene es grupo de especies observadas ( $\hat{S}$ ). Calcular de manera directa índices de diversidad sobre  $\hat{S}$  como si se tratase de  $S$ , lleva consigo un sesgo, aunque pocas veces se considera (Willis, 2019b).

### 2.9.3.1 ESTIMADORES DE RIQUEZA DE ESPECIES

La riqueza ( $S$ ) es la métrica más simple de los componentes de diversidad, y se define como el número total de diferentes taxones (del mismo nivel) presentes en un ambiente. La riqueza, a pesar de ser la métrica más simple, tampoco es un sinónimo de diversidad ya que no toma en cuenta la equidad. Como consecuencia, la riqueza es inconcreta como estimador de diversidad porque asume que todas las especies tienen la misma abundancia. Para ilustrar lo anterior pensemos que: un OTU con una abundancia de 5 individuos se espera contribuya menos al ecosistema, que uno con 10,000 individuos.

Como se mencionó al final de la sección anterior, pocas veces obtenemos toda la riqueza y por ello es necesario estimarla con los datos que se tienen disponibles. Es decir,  $S = f_0 + f_1 + f_2 + f_3 + f_4 \dots f_x$  donde  $f_1$  = OTU's observados una vez o *singletons*,  $f_2$  = OTU's observados dos veces o *doubletons* y así sucesivamente; de tal modo que se busca predecir  $f_0$  = los OTU's no observados a partir de  $\hat{S} = f_1 + f_2 + f_3 + f_4 \dots f_x$ .

En macroecología existen varias métricas para de estimar la riqueza de especies (Gotelli y Colwell, 2011); y se dividen en estimadores paramétricos y no-paramétricos. Las principales métricas adoptadas en microbiología fueron: el estimador no-paramétrico Chao1 de Chao (1984) y las curvas de rarefacción propuestas por Sanders (1968) (Hughes *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2003; Lozupone y Knight, 2008; Hamady y Knight, 2009; Engel *et al.*, 2013; Bálint *et al.*, 2016).

Sin embargo, la estimación de la riqueza también está sujeta a los errores relacionados con el manejo de datos de NGS. Uno de los principales problemas es que existe una correlación positiva entre la profundidad de secuenciación ( $N$ ) y la riqueza de especies observadas ( $\hat{S}$ ) (Haegeman *et al.*, 2013; Paulson *et al.*, 2013). No obstante, contrario a lo que sucede en la naturaleza, esta relación es artificial y tiene explicación por la generación de errores (en su mayoría *singletons*) conforme aumenta la profundidad de secuenciación (Dickie, 2010; Chiu y Chao, 2016). El verdadero número de OTU's "raros" debe disminuir conforme se aumenta el muestreo, no aumentar como sucede con los datos de secuenciación (Chiu & Chao, 2016). Lo anterior supone un problema para determinar si la presencia de muchos OTU's "raros" es por un muestreo incompleto o un artificio del proceso de secuenciación. De modo que, en metodologías de NGS's el concepto de rareza depende del muestreo (número de lecturas de una secuencia), en contraste al concepto ecológico de rareza que es independiente del tamaño de muestra (Haegeman *et al.*, 2013; Willis, 2016).

Los estimadores no-paramétricos para estimar la riqueza ( $S$ ), como el Chao1 (Chao, 1984), se emplean para no depender del tamaño de muestra o número de lecturas ( $N$ ) ya que consideran únicamente los datos observados ( $\hat{S}$ ) de la comunidad. Sin embargo, los estimadores no-paramétricos se calculan bajo el supuesto de que las especies tienen abundancias homogéneas y por lo tanto, sufren de un sesgo si este supuesto no se cumple. Por esta razón se les conoce como estimadores del límite inferior de la riqueza ( $S$ ) (Bunge, Willis y Walsh, 2014). El problema con estos estimadores surge de su dependencia de los *singletons* en su formulación; por ejemplo, el estimador Chao1 (Chao, 1984) en su fórmula  $= \hat{S} + f_1^2 / (2 f_2)$ . Por ende, pueden sobreestimar la riqueza a causa de *singletons* (Dickie, 2010; Haegeman *et al.*, 2013; Chiu y Chao, 2016).

El programa *breakaway* (Willis & Bunge, 2015) es una alternativa conceptual en la estimación paramétrica; ya que no se modelan los resultados, si no la forma en la que son generados mediante relaciones de frecuencia. Rocchetti *et al.* (2011) demostraron que cuando se grafican las relaciones de frecuencia como función de frecuencia, los datos con estructura de observaciones y frecuencia siguen una estructura que se puede ajustar un modelo de regresión lineal; entonces, se puede obtener estimado con intervalos de confianza de los OTU's no observados. Además *breakaway* tiene las ventajas de utilizar todos los datos de frecuencia, y también genera intervalos de confianza. No obstante, también es sensible a la frecuencia de los *singletons*.

La forma de trabajar con *singletons* es compleja por las razones mencionadas. Idealmente se deberían corregir desde su creación o realizar ajustes estadísticos. Por ejemplo, el software de DADA2 (Callahan *et al.* 2016) filtra los *singletons* y se mantienen solo si logran un consenso entre múltiples muestras, además reemplaza a los OTU's por variantes de secuencia del amplicón (ASV's por sus siglas en ingles); los cuales son más precisos al determinar especies. Chiu & Chao, (2016) desarrollaron un estimador de  $f_1$  a partir de  $f_2$ ,  $f_3$ , y  $f_4$ . Mientras que *breakaway* tiene una opción para predecir  $f_1$  a partir de  $f_2$  (Willis, 2016b). La selección del método de riqueza no es trivial, y requiere comprender conceptualmente la diversidad así como también las limitantes inherentes al manejo de datos NGS.

### 2.9.3.2 ÍNDICES DE DIVERSIDAD

Además de la riqueza ( $S$ ), la equidad es un componente importante de la diversidad. La equidad es la métrica que mide la uniformidad en la distribución de las abundancias de las especies. Reiterando el ejemplo antes mencionado; se espera que un AVS's/OTU's con una abundancia de 5 individuos contribuya menos al ecosistema, que uno con 10,000 individuos. Los índices de diversidad integran la riqueza ( $S$ ) y la equidad. Esta última se emplea en forma de abundancias relativas  $p = (p_1, p_2, \dots, p_s)$ . A continuación se presentan los índices más comunes utilizados en ecología microbiana (Engel *et al.*, 2013; Nelson *et al.*, 2014; Jo, Oh y Park, 2020)

Entre los índices más comunes en los estudios de diversidad microbiana está el índice de diversidad Shannon ( $H'$ ) (Shannon, 1948). Es una medida de entropía (por eso también llamado entropía de Shannon) que expresa qué tan desordenado es un sistema, y da peso a los elementos más comunes que a los raros (Daly, Baetens y De Baets, 2018). Otra forma de interpretarlo es como la medida de incertidumbre en un muestreo: es más difícil predecir la

presencia de una especie en un sistema diverso que en un sistema más simple. Su fórmula es la siguiente:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln(p_i)$$

El índice de Simpson (Simpson, 1949) es una medida de probabilidad y toma valores en un intervalo 0 a 1. El índice expresa la probabilidad de que en un muestreo con remplazo de  $N$ , dos individuos representen la misma especie. Su fórmula es la siguiente:

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Sin embargo, no es un índice muy intuitivo ya que los mayores valores representan menor diversidad. Por ello, se han derivado otras formulaciones que también son comúnmente utilizadas. La más común es el índice de diversidad Gini-Simpson ( $D_1$ ) o la probabilidad de encuentro interespecífico (PIE por sus siglas en inglés). Y es el complemento de la formulación original, y por tanto expresa la probabilidad que dos individuos representen diferentes especies. Su fórmula es la siguiente:

$$D_1 = 1 - D$$

También otra forma común es el índice Simpson de dominancia ( $D_2$ ), que es el recíproco de la fórmula original y pone más peso en las especies comunes que en las raras. Su fórmula es la siguiente:

$$D_2 = \frac{1}{D}$$

Es común encontrar el nombre “índice Simpson” para estas distintas formas de la ecuación original, y es importante señalar cual es la que se está empleando, pues su interpretación es distinta. El índice de Simpson ( $D_1$ ) ocasionalmente es utilizado como una medida de equidad (Daly, Baetens y De Baets, 2018). Sin embargo, para que esto se cumpla se debe eliminar la dimensión de la riqueza  $S$ .

Menos frecuente en uso, pero también muy informativo es la diversidad filogenética de Faith (en inglés: *Faith's PD*). La diversidad filogenética de Faith (Faith, 1992) es el único índice que

incorpora una medida de disparidad. En esencia, es la suma de las longitudes de las ramas de un árbol filogenético que conecta a todas las especies de una comunidad (Faith, 1992). Esta medida provee de la noción de que tan distantes o cercanos están los grupos; ya que los índices anteriores no dan idea de si son grupos cercanos, por ejemplo, pertenecientes al mismo género. Así, comunidades con grupos menos semejantes se consideran más diversos. Sin embargo, no es tan preciso cuando se utiliza con secuencias de ITS debido a la alta variabilidad en tamaño que esta región tiene entre especies; como consecuencia puede llevar a un árbol filogenético impreciso.

Abordando el problema de linealidad e interpretación, a continuación se presentan las fórmulas para transformar los índices de diversidad en números efectivos de especies o números de Hill. Ya que los índices de diversidad comparten similar estructura en su fórmula, se puede explotar característica para conjuntarlas según se ajuste el parámetro  $q$ . Esta familia de índices está dada por:

$${}^qD = \left( \sum_{i=1}^S p_i^q \right)^{1/(1-q)}$$

Para  $q = 0$  la ecuación es equivalente a la riqueza ( $S$ ), y pone énfasis en las especies raras al mediarlas por igual. La fórmula es:

$${}^0D = \sum_{i=1}^S p_i^0 = S$$

Mientras que para  $q = 2$  la ecuación representa el índice Simpson de dominancia ( $D_2$ ), y pone énfasis en las especies más comunes. La fórmula es:

$${}^2D = 1 / \left( \sum_{i=1}^S p_i^2 \right) = D_2$$

El punto relevante es en  $q = 1$ , que es equivalente al índice de Shannon y mide el desorden de un sistema, por lo tanto, está más inclinado a las especies comunes que las raras; pero al transformar a su exponencial provee de una medida sin énfasis en ningún grupo en particular y puede entonces medir a las especies de acuerdo con su abundancia, sin ningún sesgo (Daly, Baetens y De Baets, 2018). La fórmula es:

$${}^1D = \exp\left(-\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i\right) = \log(H')$$

Con estas transformaciones es posible hacer comparaciones más adecuadas de los cambios que tiene la microbiota en el gradiente, en términos de cambios en  ${}^qD$  de los AVS's/OTU's.

Sin embargo, las estimaciones de los índices de diversidad están sesgadas por la riqueza de especies no observadas en las muestras, de las cuales se cuenta con las abundancias relativas. Además de la varianza entre las muestras. Existen dos formas de resolver este problema; la primera es construir curvas de rarefacción (rarificar), para igualar el esfuerzo de muestreo ( $N$ ) con sus problemas anexos (McMurdie y Holmes, 2014; Amy D. Willis, 2019).

La segunda forma es ajustar el efecto de la varianza según  $N$  y también estimar las especies no observadas ( $f_0$ ) para precisar las estimaciones de los índices. Lo anterior se puede lograr con programas dedicados a la estimación de la diversidad. Otra alternativa es calcular los índices de diversidad a partir de una red ecológica con el programa DivNet (Willis y Martin, 2020). En síntesis, el programa permite que las muestras compartan información, y por tanto puedan describir la diversidad a un nivel de “ambiente”. Así, las réplicas experimentales u observaciones independientes del mismo ambiente contribuyen a la diversidad del *ambiente*. Con este modelo se determina qué tanto la variable independiente predice un resultado y el efecto de las covariables sobre la varianza. Para el caso de este trabajo, se pueden hacer dos modelos para el efecto del almacenamiento (pan de abeja) con la hipótesis nula de homogeneidad en la diversidad de la microbiota ( $H_0: {}^qD_{\text{Polen Corbicular}} = {}^qD_{\text{Pan de abeja}}$ ).

#### 2.9.4 DIVERSIDAD BETA

Cuando la diversidad se proyecta a un espacio o conjunto, se pueden diferenciar o determinar distintas comunidades. Por ejemplo, en la microbiota intestinal de *A. mellifera*; la comunidad del buche es diferente a la comunidad del intestino posterior. Para tal caso, se puede medir la diversidad alfa de estos dos ambientes, y en conjunto, estos dos ambientes forman una entidad con una diversidad total conocida como: diversidad gama ( $\gamma$ ); para este caso, la diversidad del tracto digestivo de *A. mellifera*. La relación entre la diversidad del tracto digestivo (gama) y la diversidad del intestino posterior (alfa), son las diferencias entre la diversidad (alfa) de la comunidad del buche. Estas diferencias, son la diversidad beta, o la diversidad entre comunidades (**Figura 1.3**) (Daly, Baetens y De Baets, 2018).

Generalmente, las diferencias se miden a través de matrices de disimilitud entre las muestras, y son la base de los análisis subsecuentes. Hay dos formas de calcular las matrices; la primera es conocida como UniFrac e integra información filogenética, con o sin datos de abundancia (weighted/unweighted) (Lozupone *et al.*, 2011). No obstante se ha reportado como poco precisa cuando los datos son rarificados (Wong, Wu y Gloor, 2016) ya que cambian drásticamente por la ausencia o presencia de taxones raros. Por otro lado, cuando se utilizan datos sin normalizar la diferenciación esta sesgada por la abundancia y no la filogenia, esto debido a que ignora los cambios en las proporciones de ASV's/OTU's si no son abundantes, y por el contrario cambia si están en alta proporción independientemente de las diferencias entre las dos comunidades (Gorvitovskaia, Holmes y Huse, 2016; Wong, Wu y Gloor, 2016). Por último, comparte las dificultades del estimador de diversidad filogenética de Faith respecto a las secuencias ITS.

La segunda forma de crear matrices de disimilitud es mediante un coeficiente de asociación, el cual calcula la similitud o disimilitud entre objetos o variables (Ramette, 2007). Existen más de quince coeficientes de asociación para medir la diversidad beta y generalmente se les puede dividir por dos propiedades: a) si son binarios (presencia/ausencia) o incorporan abundancias, b) si incluyen el número de especies ausentes entre ambas comunidades (se denota como  $e$ ) (Anderson *et al.*, 2011). Los coeficientes de asociación más populares en estudios de ecología microbiana son Bray-Curtis, Jaccard, distancia Euclidiana y Jensen-Shannon (Kuczynski *et al.*, 2010; Hugerth y Andersson, 2017). Sin embargo, la mayoría de los coeficientes de asociación no contemplan los problemas de trabajar con las tablas de ASV's/OTU's, principalmente por la composicionalidad de los datos y las matrices dispersas, y deben ser adaptados para funcionar de manera óptima (Gloor *et al.*, 2017).

Cada uno de los coeficiente de asociación tiene su propia formulación y enfatiza distintos aspectos de la comunidad, al igual que como sucede con los índices de diversidad. Las dos características son el primer paso conceptual para definir cuál aporta más información respecto a los fines de cada estudio. La primera característica es considerar si elegir un coeficiente de asociación que incluya abundancias. Como principio, la abundancia puede no ser fundamental cuando se quiere discriminar entre sitios para conservación donde la riqueza de especies raras es de interés. No obstante, la abundancia es un importante aspecto de la diversidad y por ende, es importante detectar sus cambios cuando existe una variación por una perturbación. Por ejemplo, donde la microbiota pasa de un sistema abierto (en el polen corbicular) a uno restringido (en el pan de abeja).

La segunda característica denota si el comportamiento del coeficiente de asociación considera  $e$  (Anderson *et al.*, 2011). Los coeficientes de asociación que no consideran  $e$ , solo son influenciados por especies únicas de cada comunidad y las que comparten. Estos coeficientes de asociación son útiles para medir gradientes por ejemplo; en el intestino de *A. mellifera*, la comunidad del buche y del intestino posterior no aumentan su disimilitud por  $e$ , porque estas especies pudieran encontrarse en el intestino medio. Por otro lado, los coeficientes de asociación que consideran  $e$ , aumentan su disimilitud si ambas comunidades carecen de ciertas especies. En estos casos, el factor  $e$  es útil cuando la desaparición de especies y los cambios en la abundancia total ( $N$ ) son relevantes. Por ejemplo, donde se espera que la microbiota cambie por un efecto ambiental inducido por el ensilaje.

También la diversidad beta puede ser medida a partir de los números de Hill donde  $D_\gamma = D_\beta \times D_\alpha$  entonces  $D_\beta = D_\gamma / D_\alpha$  (Jost, 2007). Con este modelo la diversidad alfa y beta son independientes; por lo que  $D_\beta$  es un cociente, es decir, un valor sin unidad que cuantifica cuantas veces un ambiente tiene más ASV's/OTU's respecto a la muestra. Por ejemplo, si el tracto digestivo ( $D_\gamma$ ) de *A. mellifera* tiene 40 especies efectivas; y el buche tiene 6 especies efectivas ( $D_\alpha$ ) y si el intestino posterior tiene 22 especies efectivas. El tracto digestivo tiene 6.6 y 1.8 más especies efectivas que el buche y el intestino posterior respectivamente.

Los estimadores de riqueza y diversidad deben ser ponderados de acuerdo con su definición y aplicación según el contexto de la comunidad estudiada. No obstante, es recomendado utilizar en conjunto varias métricas para capturar aspectos de la comunidad que pueden ser omitidos por las limitantes de cada estimador.

## 2.10 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

### 2.10.1 INFERENCIA OTU'S Y DE ASV'S

Ya que los análisis de diversidad dependen de una unidad que sea similar a especie, pueden ser distorsionados por secuencias sospechosas inferidas como un especie rara llevando a resultados discutibles (Dickie, 2010; Haegeman *et al.*, 2013; Chiu y Chao, 2016). La mayoría de estas secuencias sospechosas son *singletons* artificiales; y son difíciles de diferenciar de verdaderos OTU's raros con sentido biológico (Tedersoo *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015). Las variaciones biológicas a nivel cepas tienen importancia clínica y ecológica; no obstante, esta resolución es encubierta por la agrupación de OTU's (Callahan *et al.*, 2017). La elección del programa de

agrupación podía también llevar a distintos OTU's, es decir, diferentes especies observadas (Sun *et al.*, 2012; Kopylova *et al.*, 2014).

Las herramientas bioinformáticas de control de calidad se crearon para informar sobre la naturaleza de estas secuencias sospechosas, y no solo “redondear” los errores. El programa DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) aborda los problemas de agrupación y mejora de calidad mediante la “eliminación de distorsión” de las secuencias. Además integra una herramienta para eliminar quimeras. Aunque su característica más destacable es la inferencia de secuencias variantes del amplicón o ASV's (por sus siglas en inglés).

Los ASV's son secuencias que se diferencian del resto por hasta un nucleótido, y al no estar sujetas a una agrupación (por ejemplo 97%), se pueden mantener como verdaderas variantes, independiente mente del número de lecturas que se tengan. Esto tiene como ventajas una mejor resolución taxonómica que conserva la variabilidad biológica (Glassman y Martiny, 2018). Los ASV's son inferidos con la premisa de que habrá más secuencias con variación biológica que secuencias generadas a partir de errores, de aquí que su objetivo sea la “eliminación de la distorsión” (Callahan, McMurdie y Holmes, 2017). Para que un ASV sea inferido se necesitan dos secuencias libres de errores. En este sentido, los ASV's no son generados a partir de una secuencia, si no a partir de una muestra. Además de que sus propiedades no dependen del tamaño del conjunto de datos, si no de la variación biológica real de la secuencia.

### 2.11 UTILIDAD PARA LA CONSERVACIÓN DE LA MICROBIOTA

Con el avance de las tecnologías NGS nos hemos acercado cada vez más a conocer la diversidad de procariontes y eucariontes que existen dentro y alrededor nuestro. Al conocer esta diversidad podemos encontrar patrones que reflejen funciones o la estabilidad de ciertos ecosistemas; o para comprender cómo y por qué cambia esta diversidad en el espacio y tiempo. Las herramientas expuestas tienen como finalidad ayudar a responder preguntas de investigación, al comparar o explorar estos sistemas, y así poder plantear hipótesis del por qué acontecen estos cambios.

Los cambios en la estructura de una comunidad microbiana pueden ser un signo de disbiosis. Como se mencionó previamente, la disbiosis es el detrimento y disfuncionalidad de un sistema debido a cambios en la riqueza o abundancia de la microbiota exclusiva o típica (Carding *et al.*, 2015). En algunos casos, la disbiosis puede ocurrir por la interacción entre la dieta y la microbiota autóctona, como sucede en el intestino humano donde los cambios en la dieta explican más de

la mitad de la variación estructural en la microbiota autóctona del intestino humano (Brown *et al.*, 2012). El caso de las abejas no es una excepción; las modificaciones en su dieta o las propiedades de éstas, tienen un gran impacto en su bienestar como se ha mencionado previamente (Maes *et al.*, 2016; Dharampal *et al.*, 2019). El fin último es lograr, en medida de lo posible, catalogarla diversidad de microorganismos, sus interacciones y sus dinámicas; a fin de poder mantener el equilibrio en los sistemas biológicos, ya sea que se trate de un intestino, o de un alimento.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El polen corbicular se apelmaza y sella con miel en las celdas como si se tratase de un ensilaje; este proceso modifica al polen fisicoquímicamente y como resultado se obtiene pan de abeja (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2016; Wright, Nicolson y Shafir, 2017). Existe una tendencia a creer que una dieta de pan de abeja es más benéfica que basada en polen corbicular (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Los bioensayos con abejas *A. mellifera* obreras recién emergidas de reportan diferencias en la respuesta fisiología cuando se alimenta con pan de abeja y otras dietas básicas (Cremonz, De Jong y Bitondi, 1998; Alqarni, 2006; Almeida-Dias *et al.*, 2018). El tiempo de almacenamiento del pan de abeja también puede provocar cambios en la microbiota intestinal de *A. mellifera* (Maes *et al.*, 2016). No obstante, los mecanismos que expliquen estos cambios aún no son del todo comprendidos.

Para contribuir a explicar las diferencias que existen entre el polen corbicular y el pan de abeja; este trabajo de tesis tiene como fin analizar la variación en la diversidad de la microbiota del polen corbicular cuando es almacenado y convertido en pan de abeja en las condiciones tropicales locales. Con estos datos podemos acercamos a explicar las dinámicas entre las abejas y los microorganismos de su dieta. El fin último de esta línea de investigación es explicar los mecanismos detrás de las diferencias entre el polen corbicular y el pan de abeja, y contribuir a entender la respuesta fisiológica de *A. mellifera* y describir desde una perspectiva ecológica los cambios de la microbiota entre estos dos ambientes.

### 4 HIPÓTESIS

La microbiota del polen corbicular debe sufrir cambios cuando se almacena en el llamado pan de abeja, por lo que se espera encontrar una disminución en la diversidad de las comunidades microbianas en el pan de abeja en comparación con el polen corbicular.

**5 OBJETIVO GENERAL**

Analizar y comparar la diversidad de la microbiota del polen colectado y almacenado por las abejas con las variables de: tipo de muestra (polen corbicular o pan de abeja), ubicación donde fue colectada la muestra (Sierra Papacal o Ticopó) y temporada (Secas y Lluvias).

**6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Obtener secuencias que cumplan criterios de alta calidad y obtener asignaciones taxonómicas actualizadas mediante herramientas bioinformáticas actuales.

Identificar los cambios en las comunidades analizadas mediante índices de diversidad.



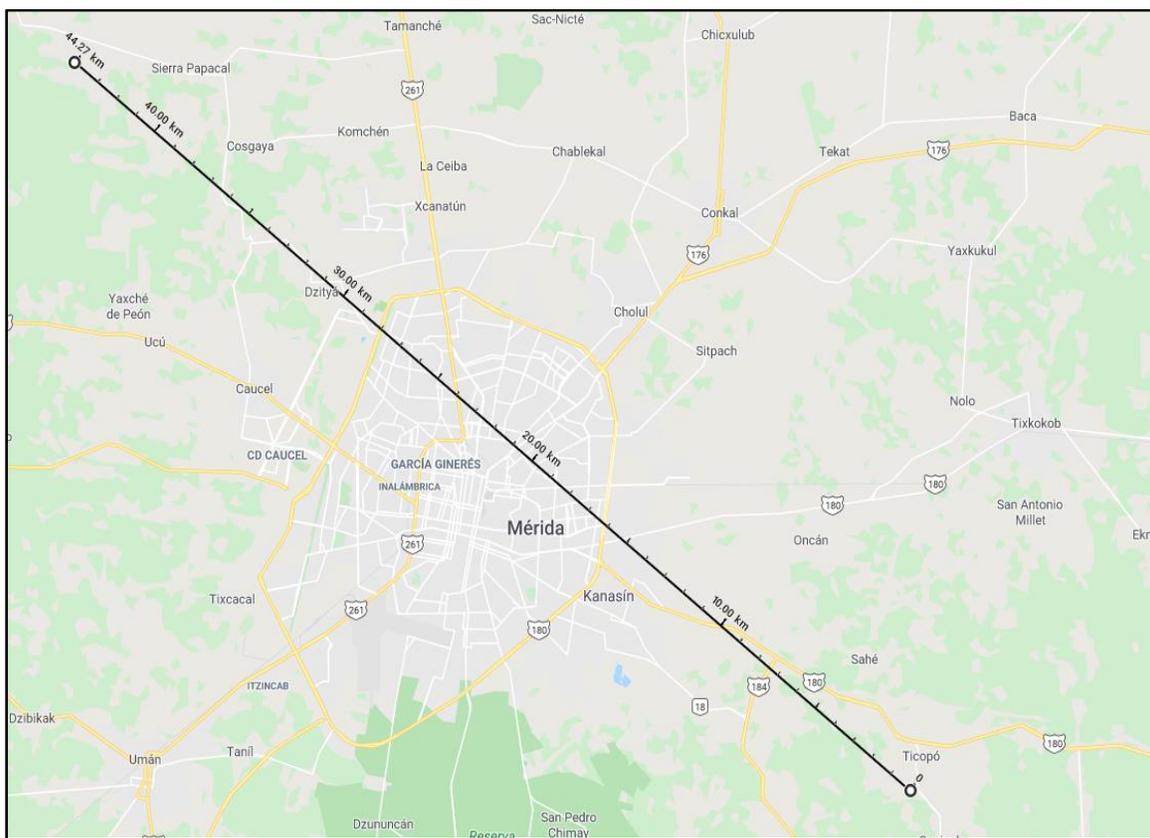
## CAPITULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO

##### 6.1.1 ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO

Las muestras se colectaron en año 2019, en colonias de Apis mellifera establecidas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) localizado en Sierra Papacal, Yucatán ( $21^{\circ}07'34''N$   $89^{\circ}46'34''W$ ), durante el mes abril que corresponde a la temporada de secas, y en septiembre del mismo año, correspondiente a la temporada de lluvias (**Figura 2.4**). Y también se realizaron colectas en un apiario privado en la localidad de Ticopó, Yucatán ( $20^{\circ}52'37.2''N$   $89^{\circ}26'38.0''W$ ) en octubre, correspondiente a la temporada de lluvias (**Figura 2.4**) (**Tabla 2.1**). Aunque la distancia entre los apiarios era de 44 km; en ambos, la flora circundante es característica Selva Baja Caducifolia (Rzedowski y Huerta, 1994).



**Figura 2.4.** Mapa de las localidades Sierra Papacal y Ticopó. Como punto de referencia está la ciudad de Mérida.



**Figura 2.5.** Imagen satelital de las ubicaciones de los apiarios. Se puede ver la proximidad de los apiarios a las localidades **A)** Sierra Papacal **B)** Ticopó.

Todo el material para transportar y manipular las muestras fue lavado con etanol al 70% y colocado en radiación UV por 20 minutos. Para coleccionar el polen corbicular se utilizaron trampas de polen comerciales (**Figura 2.5**) y redes entomológicas. Con las redes entomológicas se capturaban abejas que transportaran polen; y posteriormente se iban colocando en tubos de centrífuga de 1.5mL. Los tubos se mantuvieron dentro de una hielera con compresas térmicas frías a fin de adormecerlas y reducir la actividad biológica de los microorganismos. Ya en el laboratorio, el polen fue retirado con un bisturí y colocado en otro tubo de centrífuga de 1.5 mL. Debido al tiempo de transporte, algunos paquetes de polen corbicular perdieron su conformación, por lo que se en esos casos se seccionó la pata completa y se colocó en congelación para retirar íntegramente el polen corbicular al momento de hacer la extracción de ADN. El polen se coleccionó de la canasta receptora de las trampas de polen y se transferido a frascos de muestras clínicas de 100mL. Todas las muestras fueron etiquetadas y colocadas a -90°C hasta la extracción de ADN.



**Figura 2.6.** Trampa de polen. Se puede observar cómo hay abejas arribando y entrando.

Para el pan de abeja, después de inspeccionar y cerciorarse de la presencia de polen almacenado (pan de abeja) se retiró un cuadro con panal y se transportó en una caja de plástico cerrada. Una vez en el laboratorio, se colocó en un perímetro de mecheros de alcohol.

Aproximadamente 15g fueron extraídos de múltiples celdas, a fin de generar una muestra compuesta, con ayuda de espátulas de pedicura. Se tuvo precaución de no extraer pan de abeja adyacente a celdas con miel para evitar que fueran perforadas.

**Tabla 2.1.** Metadatos de las muestras colectadas

Etiqueta	Zona de colecta	Temporada	Fecha de colecta	Tipo de muestra	Método de colecta (polen corbicular)	Gen amplificado	Concentración de ADN (ng/uL)
SP1	Sierra Papacal	Secas	Abril	Pan de Abeja		16S	76.4
SP2	Sierra Papacal	Secas	Abril	Pan de Abeja		ITS2	59.8
SP3	Sierra Papacal	Secas	Abril	Polen Corbicular	Trampa	16S	39.8
SP4	Sierra Papacal	Secas	Abril	Polen Corbicular	Trampa	ITS2	64.8
SP5	Sierra Papacal	Lluvias	Septiembre	Pan de Abeja		16S	63.6
SP6	Sierra Papacal	Lluvias	Septiembre	Pan de Abeja		ITS2	177
SP7	Sierra Papacal	Lluvias	Septiembre	Polen Corbicular	Red entomológica	ITS2	12.8
SP7	Sierra Papacal	Lluvias	Septiembre	Polen Corbicular	Red entomológica	16S	12.8
T9	Ticopó	Lluvias	Octubre	Pan de Abeja		16S	151
T10	Ticopó	Lluvias	Octubre	Pan de Abeja		ITS2	103
T11	Ticopó	Lluvias	Octubre	Polen Corbicular	Trampa	16S	115
T12	Ticopó	Lluvias	Octubre	Polen Corbicular	Trampa	ITS2	182

### 6.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN

La extracción de ADN se realizó con un protocolo diseñado en nuestro laboratorio, debido a que el polen es una muestra compleja compuesto de ceras, carbohidratos, pigmentos, entre otros (Waiblinger *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2015). Además, que su presencia y

concentración cambia entre distintas especies. Aunado a lo anterior se deben considerar los aspectos físicos del polen, ya que en las rugosidades y patrones de la exina se pueden albergar microorganismos. Por lo anterior, se ideó un protocolo para extraer microorganismos y material vegetal, con el fin de extraer el ADN de todos los posibles microorganismos adheridos o embebidos en el polen.

La ruptura celular y extracción de ácidos nucleicos se logró al combinar métodos mecánicos y químicos. Se congela en nitrógeno líquido y se maceran con mortero, el polvo del macerado se depositó en un tubo de 2 mL y se agrega 500 uL de Buffer CTAB 2% (TRIS-HCl 0.2 M, EDTA 0.05 M, NaCl 4m , CTAB 2% pH 7.7) 500 uL de Buffer SDS 10% (SDS: Tris-HCl 20nM, EDTA 2mM, SDS 10%), 20uL de Proteinasa K. Se deja incubando durante 1 hora a 65°C, mezclando por inversión cada 15 minutos. El CTAB y el SDS deben formar una turbidez con aspecto de nubosidad. Posteriormente, para la limpieza se agregó 600uL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando por inversión gentil, hasta hacer emulsión. Se centrifuga a 13,000 g por 10 minutos para precipitar contaminantes y se retira el sobrenadante a un nuevo tubo de 2mL, este nuevo contenido sufre el mismo procedimiento de limpieza 4 veces. En el primer lavado, es posible encontrar una película amarilla la cual debe evitarse ya se presume que son las ceras que recubren al polen.

La precipitación de ácidos nucleicos se completa con la adición de 700 uL de isopropanol frío (4°C) y 50 uL acetato de sodio 3M, y se deja a -20°C durante 48 horas. Los ácidos nucleicos son concertados centrifugando a 13,000 g con temperatura de 4°C por 15 minutos. Debe ser visible una pastilla en el fondo del tubo, aunque en algunos casos no es tan evidente. El isopropanol es decantado y se agregan 500uL de etanol al 70% mezclando gentilmente hasta lograr desprender la pastilla. Este procedimiento de limpieza se repite 2 veces. Posteriormente, se centrifuga a 13,000 g 4°C, por 2 minutos. Después, se decanta el etanol y se deja secar por 10 minutos. Por último, los ácidos nucleicos son suspendidos en 40 uL de agua ultra pura estéril.

Para finalizar, las muestras fueron tratadas con RNasa incubando a 37°C por 20 minutos. La concentración de ADN fue medida con fluorómetro Qubit® 2.0 (INVITROGEN) (**Tabla 2.1**).

Para amplificación de la región ITS de hongos se seleccionaron los cebadores ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'), ITS2r (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), ya que estudios previos han reportado amplificar tanto hongos como levaduras en reservas de polen en otras especies de abejas (McFrederick y Rehan, 2019). Para el caso de bacterias se utilizaron

---

los cebadores 357wF (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') correspondientes a la región V3-V4 del gen ARNr 16S. Esta región fue seleccionada en base a los análisis de Bukin *et al* (2019) que indican una mejor precisión en la resolución taxonómica de bacterias. Las reacciones de PCR y secuenciación se llevaron a cabo por la compañía “Research and Testing Laboratory (RTL)” (Lubbock, Texas, USA), utilizando MiSeq-Illumina PE 2x300.

## 6.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA MICROBIOTA

### 6.2.1 ELIMINACIÓN DE DISTORSIÓN EN LAS SECUENCIAS, GENERACIÓN DE SECUENCIAS VARIANTES DE AMPLICÓN (ASV'S)

Para el control de calidad y asignación taxonómica se utilizó el programa DADA2 versión 1.16 (Callahan *et al.*, 2016). Los datos del control de calidad se pueden consultar en la **Tabla 3.2**. El comando *dada* se ejecutó con el parámetro `pooling = TRUE` el cual permite mayor detección de secuencias raras, permitiendo mejorar las estimaciones de diversidad. Y con un `maxEE= (2,5)` a fin de ser menos estricto con las secuencias R2, ya que, comúnmente presentan una menor calidad. Finalmente, las secuencias fueron exportadas en el formato del programa phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) para poder trabajar en los programas de diversidad.

Para secuencias 16S se fijó el parámetro de truncado en las posiciones 270 forward y 190 reverse y se cortaron los primeros nucleótidos correspondientes a los cebadores en las posiciones 17 forward y 20 reverse. Debido a que las secuencias del gen ITS son altamente variables, se deben pre-procesar para eliminar los cebadores de ambos extremos; para ello se utilizó el programa cutadapt (Martin, 2011). Las secuencias ITS fueron procesadas sin parámetros de truncado.

### 6.2.2 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA

La asignación taxonómica para los genes 16S e ITS, fue con referencia a las bases de datos SILVA versión 138 de la subunidad menor de ácido ribonucleico (Quast *et al.*, 2013) y UNITE versión 8.2 (Nilsson *et al.*, 2019); respectivamente. Para ambos casos, el parámetro de confianza para asignar un taxon fue de `minboot = 50`; que es el número por defecto del algoritmo. El número de ASV's clasificados en los distintos niveles taxonómicos puede consultarse en la **Tabla 3.3**.

Las secuencias clasificadas taxonómicamente, fueron inspeccionadas y catalogadas en “no-objetivo” si estaban clasificadas a nivel de Orden como “Chloroplast” y a nivel familia como “Mitochondria”, y fueron filtradas mediante herramientas de tidyverse (Wickham *et al.*, 2019).

Después del filtrado, en la muestra SP1 todas las secuencias fueron filtradas; por lo que a todas las secuencias clasificadas como no-objetivo se les realizó una búsqueda de BLAST para confirmar que se tratasen de secuencias no-objetivo. Al tener una alineación del 99% y cobertura del 100% se confirmó su identidad como cloroplastos o mitocondrias. Como consecuencia, la muestra SP1 y la muestra complementaria SP3 fueron excluidas de los análisis subsecuentes; de modo que la variable de temporada no fue evaluada en bacterias.

### **6.3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD**

Todos los análisis de diversidad fueron realizados en R studio (RStudio Team, 2015) al nivel taxonómico de especie. Se utilizó el programa *beta* (Willis, Bunge y Whitman, 2017) para probar la hipótesis nula de homogeneidad para  ${}^0D$ ,  ${}^1D$  y  ${}^2D$ , de acuerdo a las covariables: a) tipo de muestra (polen corbicular o pan de abeja), b) ubicación (Sierra Papacal o Ticopó), c) temporada (lluvias o secas).

#### **6.3.1 DIVERSIDAD ALFA**

La estimación de la riqueza de especies ( $S = {}^0D$ ) fue realizada en el programa *breakaway* (Willis & Bunge, 2015). La estimación de los índices diversidad Shannon ( $H$ ) y Simpson ( $D$ ) se realizó con el programa *DivNet* (Willis & Martin, 2020) y fueron posteriormente transformados a  ${}^1D$  y  ${}^2D$ . La construcción de la red se hizo seleccionando los ASV's más abundantes y comunes entre todas las muestras. Para el caso de bacterias fue el "ASV9" y para fungi fue el "ASV1".

#### **6.3.2 DIVERSIDAD BETA**

Se estimó la diversidad beta usando la distancia Euclidiana, ya que es el coeficiente de asociación que cumple con los criterios de incluir la abundancia y  $e$ . Sin embargo, se ha reportado que necesita de gran cantidad de lecturas para discriminar adecuadamente y es sensible a las matrices dispersas (Legendre y Gallagher, 2001; Kuczynski *et al.*, 2010). Por esta razón, también se utilizó el coeficiente de asociación Bray-Curtis, que es más robusto respecto a las matrices dispersas y considera abundancias; sin embargo, no considera  $e$  (Hugerth y Andersson, 2017).

### **6.4 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD**

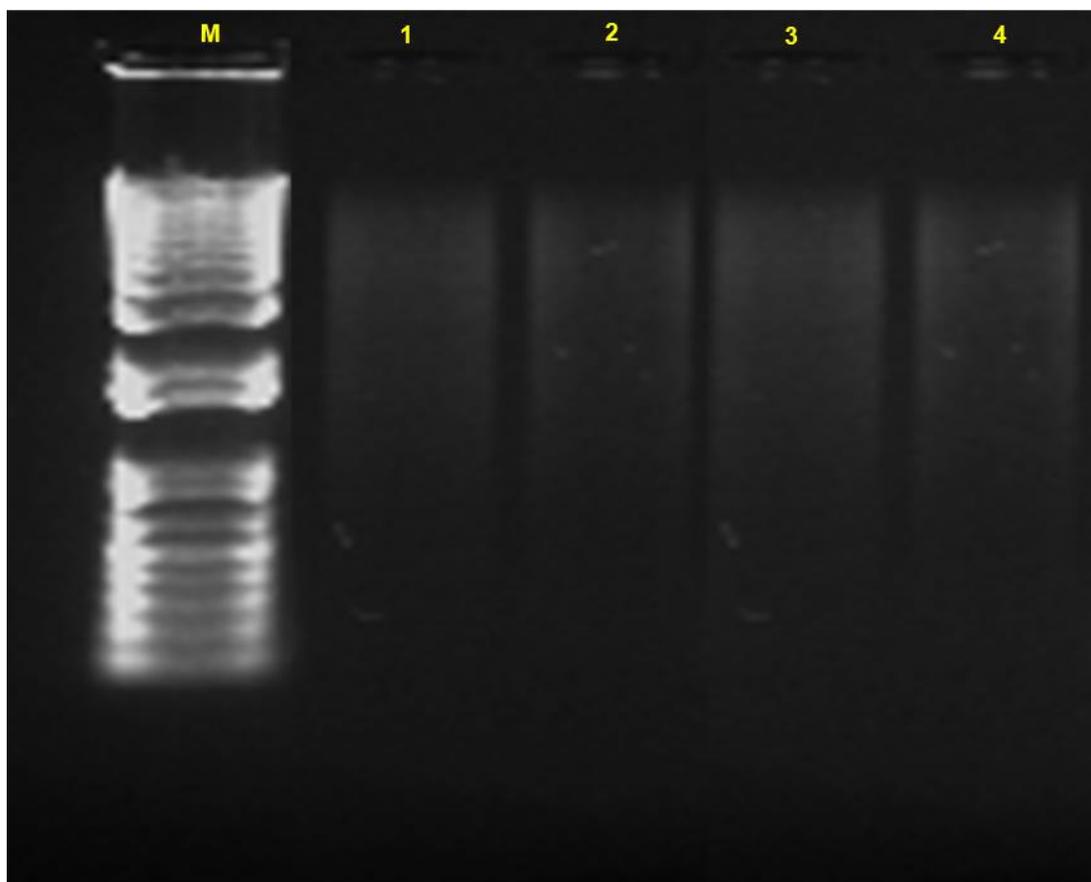
Mediante comandos de *tydverse* en Rstudio se generó una tabla de qué organismos estaban comunes entre: a) todas las muestras, b) en todas las muestras de pan de abeja c) en todas las muestras de polen corbicular.



---

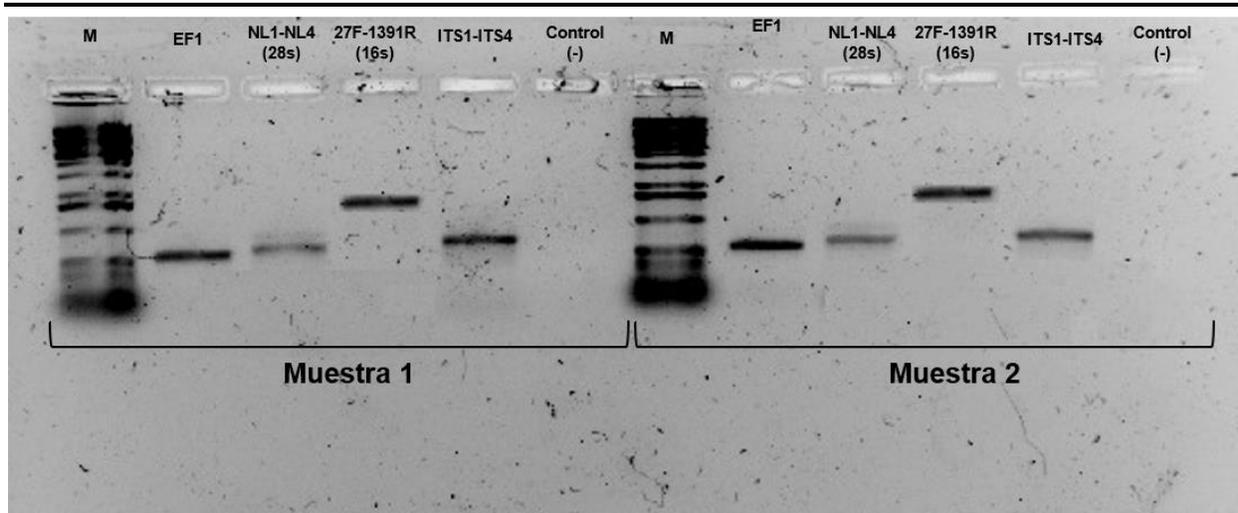
**CAPÍTULO III: RESULTADOS****7 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR**

La extracción de ADN fue exitosa para todas las muestras, aunque no fue posible una banda en gel de agarosa al 1%, incluso utilizando una columna de purificación DNeasy Mini Spin (QIAGEN®), sí fue posible visualizar ADN (**Figura 3.7**) y realizar la amplificación por PCR (**Figura 3.8**). La cuantificación de ADN con fluorómetro Qubit® 2.0 (INVITROGEN) mostró que la concentración más baja fue de 12.8 ng/uL y la más alta de 182 ng/uL cantidades suficientes para llevar a cabo las reacciones de PCR.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico extraído mediante el método CTAB casero. Se presentan 3 diferentes muestras de polen. Carril M: Marcador de peso molecular de ADN (1 Kb), Carriles 1-3: ADN de diferentes muestras de polen, Carril 4: ADN muestra de polen purificada con la columna DNeasy Mini Spin de QIAGEN®.

## RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN ILLUMINA, CONTROL DE CALIDAD Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de genes EF1, NL1-NL4 (28S), 27F-1391R (16S), ITS1-ITS4. En el primer carril de puede observar el marcador de peso molecular de 1Kb. En los carriles siguientes se puede observar el producto de amplificación de los genes evaluados. En cada pozo se colocó 9  $\mu$ L de producto de PCR más 1  $\mu$ L de loading buffer. Control (-) representa el control negativo.

### 8 RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN ILLUMINA, CONTROL DE CALIDAD Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA

El tamaño promedio de las secuencias ARNr 16S fue de 403 pb con un tamaño mínimo de 253 pb y un tamaño máximo de 409 pb, y se generaron 393 ASV'S. Después del filtrado de secuencias de ARNr 16S no objetivo, se mantuvieron un total de 91 ASV's (23.15 %). Todos los 91 ASV's fueron clasificados hasta el nivel taxonómico de Clase. Los otros niveles taxonómicos pueden consultarse en la **Tabla 3.3**. La asignación taxonómica para cada ASV se encuentra en la **Tabla 8** en anexos.

Por otro lado, para las secuencias ITS el tamaño promedio fue de 228 pb con un tamaño mínimo de 139 pb y un tamaño máximo de 431 pb, y se generaron 344 ASV'S. La asignación taxonómica para cada ASV se encuentra en la **Tabla 7** en anexos.

**Tabla 3.2.** Datos numéricos del control de calidad de las secuencias. Se muestra el número de secuencias según cada paso del preprocesamiento para el control de calidad. Seq = secuencias

Secuencias de 16S						
Muestra	Seq. Importadas	Seq. después del filtrado	Seq. forward después del denoising	Seq. reverse después del denoising	Seq. unidas	Secuencias después de eliminar quimeras

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD

SP1	66,681	57,700	57,677	57,680	57,553	54,862
SP3	76,166	65,292	65,072	65,193	63,007	49,948
SP5	52,827	45,646	45,395	45,529	41,606	36,959
SP7	58,325	49,606	49,421	49,516	44,969	41,454
T11	87,422	75,989	75,754	75,853	70,278	69,186
T9	79,858	68,882	68,537	68,498	61,008	58,452
Total	421,279	363,115	361,856	362,269	338,421	310,861
Secuencias de ITS						
SP2	11,283	10,865	10,831	10,776	8,660	8,660
SP4	19,240	18,624	18,583	18,545	15,784	15,784
SP6	10,889	10,057	9,885	9,893	7,932	7,926
SP7	22,858	21,801	21,592	21,482	16,755	16,748
T10	23,674	21,164	20,873	20,702	17,005	16,606
T12	30,150	27,804	27,419	27,320	22,348	21,972
Total	118,094	110,315	109,183	108,718	88,484	87,696

**Tabla 3.3** Numero de secuencias clasificadas en los distintos niveles taxonómicos.

	Secuencias Importadas	clasificadas Reino	clasificadas Filo	clasificadas Clase	clasificadas Orden	clasificadas Familia	clasificadas Genero
16S	96	96	96	96	93	89	70
ITS	344	342	335	293	270	238	204

## 9 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD

### 9.1 DIVERSIDAD ALFA

#### 9.1.1 COMUNIDAD BACTERIANA

Para la microbiota bacteriana a nivel de especie en la **Tabla 3.4** está la diversidad 0D, 1D y 2D observada.

**Tabla 3.4.** Reporte de las estimaciones de diversidad para cada muestra de la comunidad bacteriana. Se muestran los valores obtenidos y los números de Hill que representan.

	Muestra	Ubicación	Tipo de muestra	Estimado	Error Estándar	Límite inferior	Límite Superior
0D (Riqueza)	SP5	S. Papacal	Pan de Abeja	26.33	12.47	17.34	275.53
	SP7	S. Papacal	Polen Corbicular	19.19	0.48	19.03	20.10
	T11	Ticopó	Pan de Abeja	35.93	6.52	31.26	125.03
	T9	Ticopó	Polen Corbicular	38.72	1.01	38.11	42.57

Números de Hill

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD

								Estima do	Límite inferior	Límite Superior
1D (Shannon)	SP5	S. Papacal	Pan de Abeja	2.49	0.10	2.30	2.68	12.00	9.93	14.52
	SP7	S. Papacal	Polen Corbicul ar	2.05	0.03	1.98	2.11	7.74	7.27	8.25
	T11	Ticopó	Pan de Abeja	2.58	0.04	2.50	2.67	13.25	12.21	14.38
	T9	Ticopó	Polen Corbicul ar	3.08	0.02	3.03	3.13	21.74	20.74	22.80
2D (Simpson)	SP5	S. Papacal	Pan de Abeja	0.13	0.02	0.10	0.17	7.50	9.96	6.02
	SP7	S. Papacal	Polen Corbicul ar	0.18	0.01	0.17	0.20	5.47	5.85	5.14
	T11	Ticopó	Pan de Abeja	0.10	0.01	0.09	0.11	9.87	10.86	9.05
	T9	Ticopó	Polen Corbicul ar	0.06	0.00	0.06	0.07	16.31	18.31	14.70

### 9.1.1.1 POLEN CORBICULAR Y PAN DE ABEJA

La diversidad  ${}^0D$  en el pan de abeja, se estimaron 0.63 especies (SE = 5.78) menos que en el polen corbicular. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^0D_{\text{Polen Corbicular}} = {}^0D_{\text{Pan de abeja}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.91$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en el pan de abeja y el polen corbicular las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies raras.

La diversidad  ${}^1D$  en el pan de abeja, se estimaron 0.95 especies (SE = 1.40) menos que en el polen corbicular. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^1D_{\text{Polen Corbicular}} = {}^1D_{\text{Pan de abeja}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.87$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en el pan de abeja y el polen corbicular las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies comunes.

La diversidad  ${}^2D$  en el pan de abeja, se estimaron 0.51 especies (SE = 29.12) más que en el polen corbicular. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^2D_{\text{Polen Corbicular}} = {}^2D_{\text{Pan de abeja}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.92$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en el pan de abeja y el polen corbicular las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies dominantes.

### 9.1.1.2 UBICACIÓN

La diversidad  ${}^0D$  en Sierra Papacal, se estimaron 19.47 especies (SE = 18.94) menos que en Ticopó. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^0D_{\text{Ticopó}} = {}^0D_{\text{Sierra Papacal}}$ , se obtuvo un valor de  $p = < 0.001$ :

por lo que se puede rechazar la hipótesis nula que en Ticopó y en Sierra Papacal las comunidades son homogéneas, y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies raras.

La diversidad  ${}^1D$  en Sierra Papacal, se estimaron 7.71 especies (SE = 1.40) menos que en Ticopó. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^1D_{\text{Ticopó}} = {}^1D_{\text{Sierra Papacal}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.09$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en Ticopó y en Sierra Papacal las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies comunes.

La diversidad  ${}^2D$  en Sierra Papacal, se estimaron 5.68 especies (SE = 28.36) menos que en Ticopó. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^2D_{\text{Ticopó}} = {}^2D_{\text{Sierra Papacal}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.03$ : por lo que se puede rechazar la hipótesis que en Ticopó y en Sierra Papacal las comunidades son homogéneas y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies dominantes.

### 9.1.2 COMUNIDAD FÚNGICA

Para la microbiota bacteriana a nivel de especie en la **Tabla 3.5** está la diversidad 0D, 1D y 2D observada.

**Tabla 3.5.** Reporte de las estimaciones de diversidad para cada muestra de la comunidad fúngica. Se muestran los valores obtenidos y los números de Hill que representan.

	Muestra	Ubicación	Tipo de muestra	Temporada	Estimado	Error Estándar	Límite inferior	Límite Superior	Números de Hill		
									Estimado	Límite inferior	Límite Superior
0D (Riqueza)	SP2	S. Papacal	Pan de Abeja	secas	60.10	5.54	54.44	138.48			
	SP4	S. Papacal	Polen Corbicular	secas	89.72	18.75	86.06	330.51			
	SP6	S. Papacal	Pan de Abeja	lluvias	125.13	24.30	90.32	1079.13			
	SP7	S. Papacal	Polen Corbicular	lluvias	100.37	3.24	96.50	134.16			
	T10	Ticopó	Pan de Abeja	lluvias	136.84	5.51	128.81	224.75			
	T12	Ticopó	Polen Corbicular	lluvias	189.21	67.94	130.98	3691.14			
	SP2	S. Papacal	Pan de Abeja	secas	1.77	0.02	1.74	1.81	5.90	5.70	6.11

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD

1D (Shannon)	SP4	S. Papacal	Polen Corbicular	secas	2.62	0.01	2.59	2.65	13.70	13.30	14.12
	SP6	S. Papacal	Pan de Abeja	lluvias	2.05	0.02	2.02	2.08	7.78	7.54	8.03
	SP7	S. Papacal	Polen Corbicular	lluvias	1.54	0.01	1.53	1.55	4.66	4.60	4.73
	T10	Ticopó	Pan de Abeja	lluvias	3.13	0.01	3.11	3.15	22.85	22.45	23.27
	T12	Ticopó	Polen Corbicular	lluvias	2.53	0.01	2.51	2.55	12.52	12.30	12.75
2D (Simpson)	SP2	S. Papacal	Pan de Abeja	secas	0.27	0.004	0.27	0.28	3.66	3.76	3.57
	SP4	S. Papacal	Polen Corbicular	secas	0.14	0.002	0.14	0.15	6.90	7.06	6.75
	SP6	S. Papacal	Pan de Abeja	lluvias	0.21	0.003	0.21	0.22	4.67	4.81	4.54
	SP7	S. Papacal	Polen Corbicular	lluvias	0.46	0.003	0.45	0.46	2.18	2.21	2.15
	T10	Ticopó	Pan de Abeja	lluvias	0.08	0.001	0.08	0.08	12.30	12.48	12.11
	T12	Ticopó	Polen Corbicular	lluvias	0.19	0.001	0.18	0.19	5.40	5.47	5.32

### 9.1.2.1 POLEN CORBICULAR Y PAN DE ABEJA

La diversidad  ${}^0D$  en el pan de abeja, se estimaron 9.65 especies (SE = 12.67) menos que en el polen corbicular. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^0D_{\text{Polen Corbicular}} = {}^0D_{\text{Pan de abeja}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.45$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en el pan de abeja y el polen corbicular las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies raras.

La diversidad  ${}^1D$  en el pan de abeja, se estimaron 0.54 especies (SE = 1.39) más que en el polen corbicular. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^1D_{\text{Polen Corbicular}} = {}^1D_{\text{Pan de abeja}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.79$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en el pan de abeja y el polen corbicular las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies comunes.

La diversidad  ${}^2D$  en el pan de abeja, se estimaron 0.66 especies (SE = 13.03) más que en el polen corbicular. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^2D_{\text{Polen Corbicular}} = {}^2D_{\text{Pan de abeja}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.34$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula que en el pan de abeja y el polen corbicular las comunidades son homogéneas, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies dominantes.

---

### 9.1.2.2 UBICACIÓN

La diversidad  ${}^0D$  en Sierra Papacal, se estimaron 39.61 especies (SE = 18.94) más que en Ticopó. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^0D_{\text{Ticopó}} = {}^0D_{\text{Sierra Papacal}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.04$ : por lo que se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies raras.

La diversidad  ${}^1D$  en Sierra Papacal, se estimaron 10.41 especies (SE = 1.50) más que en Ticopó. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^1D_{\text{Ticopó}} = {}^1D_{\text{Sierra Papacal}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.01$ : por lo que se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies comunes.

La diversidad  ${}^2D$  en Sierra Papacal, se estimaron 3.20 especies (SE = 10.64) menos que en Ticopó. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^2D_{\text{Ticopó}} = {}^2D_{\text{Sierra Papacal}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.03$ : por lo que se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies dominantes.

### 9.1.2.3 TEMPORADA

La diversidad  ${}^0D$  en la temporada de secas, se estimaron 33.16 especies (SE = 15.82) menos que en la temporada de lluvias. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^0D_{\text{Secas}} = {}^0D_{\text{Lluvias}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.04$ : por lo que se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies raras.

La diversidad  ${}^1D$  en la temporada de secas, se estimaron 2.84 especies (SE = 1.50) más que en la temporada de lluvias. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^1D_{\text{Secas}} = {}^1D_{\text{Lluvias}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.32$ : por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, y por ende no pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies comunes.

La diversidad  ${}^2D$  en la temporada de secas, se estimaron 1.39 especies (SE = 10.64) menos que en la temporada de lluvias. Para la prueba de hipótesis  $H_0: {}^2D_{\text{Secas}} = {}^2D_{\text{Lluvias}}$ , se obtuvo un valor de  $p = 0.18$ : por lo que se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, y por ende pueden considerarse comunidades heterogéneas en términos de especies dominantes.

## 9.2 DIVERSIDAD BETA

Las estimaciones completas de la diversidad beta se encuentran en la **Tabla 3.6**. En la microbiota bacteriana, a nivel de especie, los coeficientes de Bray-Curtis y distancia Euclidiana fueron menores a 0.50, lo que indica que son ambientes similares. Mientras que el coeficiente de Bray-Curtis para la variable de ubicación fue de 0.60; lo que indica una ligera heterogeneidad. Por otro lado, en la microbiota fúngica, a nivel de especie, la distancia Euclidiana fue solo menor a 0.50 para las variables de tipo de muestra y temporada. La mayor heterogeneidad fue estimada en el coeficiente de Bray-Curtis, con 0.76 para la variable de ubicación.

**Tabla 3.6.** Estimaciones de la diversidad beta

Coeficiente de distancia	Variable	Estimado	Error estándar
<b>Comunidad bacteriana</b>			
Euclidiana	tipo.muestra	0.29	0.06
Bray-Curtis	tipo.muestra	0.48	0.05
Euclidiana	ubicacion	0.36	0.04
Bray-Curtis	ubicacion	0.60	0.03
<b>Comunidad fúngica</b>			
Euclidiana	tipo.muestra	0.42	0.06
Bray-Curtis	tipo.muestra	0.57	0.08
Euclidiana	ubicacion	0.51	0.04
Bray-Curtis	ubicacion	0.76	0.02
Euclidiana	temporada	0.47	0.03
Bray-Curtis	temporada	0.66	0.05

## 9.3 ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA

Para la comunidad bacteriana se hallaron 13 especies en común en todas las muestras analizadas, es decir, tanto en polen corbicular como en pan de abeja; las cuales son: ASV1 *Acinetobacter apis*, ASV3 (*Enterobacterales*), ASV4 *Pseudomonas psychrotolerans*, ASV6 *Bombella spp.*, ASV10 *Lactobacillus apinorum*, ASV11 *Sphingomonas phyllosphaerae*, ASV13 (*Erwiniaceae*), ASV16 *Pantoea spp.*, ASV26 *Sphingomonas yunnanensis*, ASV32 *Sphingomonas spp.*, ASV37 *Asaia bogorensis*, ASV40 *Aureimonas spp.*, ASV49 *Rosenbergiella nectarea*.

Además de las 13 especies en común, se hallaron 3 especies exclusivas para el polen corbicular: ASV17 *Methylobacterium aerolatum*, ASV21 *M. brachiatum*, ASV28 *Methylobacterium currus*.

Por otro lado, para el pan de abeja se hallaron 4 especies exclusivas, las cuales son: ASV8 (*Orbaceae*), ASV9 *Gilliamella spp.*, ASV12 *Acinetobacter spp.*, ASV14 (*Gammaproteobacteria*).

Para el caso de la comunidad fúngica se hallaron 19 especies en común en todas las muestras analizadas; las cuales son: ASV1 *Cladosporium delicatulum*, ASV3 (*Ascomycota*) , ASV4 *Cladosporium spp.*, ASV5 *Septoria cretae*, ASV6 (*Nectriaceae*), ASV8 *Penicillium citrinum*, ASV9 *Gibberella intricans*, ASV11 *Papiliotrema leoncinii* , ASV12 (*Pleosporales*), ASV16 *Papiliotrema siamensis*, ASV23 *Periconia byssoides*, ASV24 *Penicillium rolfsii*, ASV36 *Pestalotiopsis coffeae-arabicae*, ASV44 *Alternaria tenuissima*, ASV47 *Cladosporium exasperatum*, ASV58 *Paracercosporidium tiliae*, ASV97 *Recurvomyces mirabilis*, ASV111 (*Sordariomycetes*), ASV112 *Lasiodiplodia jatrophiicola*.

Además de las 19 especies en común, se hallaron 26 especies exclusivas para el polen corbicular: ASV14 *Papiliotrema spp*, ASV15 *Corynespora torulosa*, ASV17 *Hanspella siamensis*, ASV28 *Nigrospora oryzae*, ASV42 *Vishniacozyma taibaiensis*, ASV55 (*Mycosphaerellaceae*), ASV64 (*Didymosphaeriaceae*), ASV68 *Sirobasidium brefeldianum*, ASV69 *Cladosporium sphaerospermum*, ASV70 *Vuilleminia cystidiata*, ASV80 *Neodevriesia modesta*, ASV88 *Debaryomyces robertsiae*, ASV90 *Peniophora albobadia*, ASV92 *Gloeophyllum striatum*, ASV93 *Clonostachys miodochialis*, ASV95 *Hanspella oryzae*, ASV100 *Metschnikowia cibodasensis*, ASV115 *Neodevriesia spp*, ASV118 (*Agaricomycetes*), ASV135 *Heterochaete shearii*, ASV147 *Cladosporium dominicanum*, ASV157 (*Fungi*), ASV181 *Curvularia ellisi*, ASV187 (*Hypocreales*), ASV198 *Symmetrospora vermiculata*, ASV227 (*Capnodiales*).

Por otro lado, se hallaron 10 especies exclusivas en el pan de abeja; las cuales son: ASV25 (*Xylariales*), ASV40 (*Teratosphaeriaceae*), ASV46 (*Didymellaceae*), ASV56 *Epicoccum dendrobii*, ASV60 *Kodamaea ohmeri*, ASV66 *Strelitziana africana*, ASV73 *Toxicocladosporium irritans*, ASV84 *Wallemia tropicalis*, ASV114 (*Basidiomycota*), ASV188 *Schizophyllum commune*.



## CAPITULO IV: DISCUSIÓN

### 10 LA MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA

Los resultados de la diversidad alfa en términos de  ${}^0D$ ,  ${}^1D$  y  ${}^2D$  señalan que la microbiota del polen corbicular no sufre grandes cambios al ser sometida al proceso de conversión en pan de abeja, para ambas comunidades estudiadas (bacterias y hongos). Así mismo, los resultados de la diversidad beta, que mide la disimilitud entre comunidades, muestran que los cambios no son suficientes para que el polen corbicular y el pan de abeja se consideren dos comunidades distintas. Estos resultados son concordantes con los reportados por Disayathanoowat *et al.* (2020); donde tampoco hallaron relaciones positivas o negativas entre polen corbicular y pan de abeja con los índices de diversidad que calcularon.

En conjunto, estos resultados no apoyan la hipótesis de que el pan de abeja es un medio de conserva (Anderson *et al.*, 2014a). Ya que, al no poderse rechazar la hipótesis nula de que el polen corbicular y el pan de abeja sean ambientes homogéneos, (y por lo tanto, no son heterogéneos), se dirige a la conclusión de que no es evidente un efecto reductor sobre la diversidad de la microbiota. Sin embargo, los resultados tampoco la invalidan la hipótesis, ya que no se probó que las comunidades incrementen en abundancia.

Los resultados obtenidos si apoyan la hipótesis que postula que las abejas son omnívoras al integrar en su dieta la biomasa de los microorganismos que consumen junto al polen (Steffan *et al.*, 2019). Si bien, una de las premisas de la hipótesis de pan de abeja como medio conservación, es que las abejas prefieren consumir el pan de abeja y el polen corbicular frescos (Anderson *et al.*, 2014a). Esta premisa apoya a esta hipótesis, si como los resultados muestran, las comunidades microbianas del polen que almacenan; no son distintas de aquellas que colectan originalmente. Por otro lado, la mayor crítica a esta hipótesis es la biomasa necesaria de microorganismos presentes en el polen (Anderson *et al.*, 2014a); habrá que reevaluar esta variable, considerando los resultados que muestran una mayor riqueza de especies de la comunidad fúngica en comparación con la bacteriana. Tampoco es, necesariamente, que exista un mecanismo de simbiosis tan estricto entre las abejas y los microorganismos que están presentes en sus alimentos, como se ha probado en otras abejas sin aguijón (Paludo *et al.*, 2018). Pero, el aporte nutricional que supone la microbiota merece atención para experimentos de bioensayos como se ha realizado en otras especies de abejas (Dharampal *et al.*, 2019).

---

## 11 LA MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA SEGÚN LA VARIABLE DE SU UBICACIÓN

Los resultados de este trabajo apuntan a la variable de ubicación de las colmenas como un factor que influye en la diversidad en la microbiota, ya que para esta variable se hallaron diferencias estadísticas entre los dos sitios de muestreo (Ticopó y Sierra Papacal). La relación de la microbiota del polen y el espacio geográfico ha sido ya también reportada en abejas sin aguijón (McFrederick y Rehan, 2018). Dentro de esta variable de ubicación, no se define si las diferencias son por distancia entre apiarios, vegetación circundante, o por la cercanía de la urbanización. Ya que el fin de este trabajo no fue explorar los efectos de la ubicación de las colmenas, no es posible adentrarse a más conclusiones. No obstante, estos resultados son un referente para estudiar variables geográficas que influyan sobre los microorganismos en la dieta de las abejas.

## 12 LA MICROBIOTA DEL POLEN CORBICULAR Y DEL PAN DE ABEJA SEGÚN LA VARIABLE DE TEMPORADA

Los resultados muestran que para la comunidad fúngica, a un nivel de especie  $^0D$ , la riqueza aumenta en temporada de lluvias. Esto puede deberse a que una mayor humedad facilita el desarrollo de especies incidentales. No obstante, es necesario hacer estudios con mayor detalle sobre otras variables que en este trabajo no fueron evaluadas, como por ejemplo: precipitación, humedad relativa, y temperatura. Para las especies a nivel de especies comunes  $^1D$  y dominantes  $^2D$ , no se hallaron cambios significativos. Lo cual, puede indicar que solo especies incidentales son las que aumentan la diversidad en temporadas de lluvias.

## 13 LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD

En general, en la microbiota del polen corbicular y del pan de abeja la comunidad fúngica sobresale por su riqueza. Particularmente, en gran abundancia, respecto con otros miembros de la comunidad, se encuentra el ASV1 clasificado a nivel de género como *Cladosporium*; mismo que fue el más abundante en otro trabajo que estudió a la comunidad fúngica (Disayathanoowat *et al.*, 2020). Este microorganismo también se puede hallar en estudios del polen floral (Manirajan *et al.*, 2018)

Además, se ha reportado que las abejas lo colectan este hongo cuando existe escases de recursos florales para obtener polen (Modro *et al.*, 2009).

La estructura de la comunidad revela la presencia de taxones ya descritos en el ambiente del polen corbicular y el pan de abeja; pero también destacan especies de especial interés. Por ejemplo, (ASV60) *Kodamaea ohmeri* se halló únicamente en muestras de pan de abeja; esta especie se ha reportado como simbionte de *Aethina tumida* (Benda *et al.*, 2008) un escarabajo que es afecta a las colmenas y es perjudicial para la apicultura. En las muestras de polen corbicular y en pan de abeja de Ticopó se halló, *Gardnerella vaginalis*; una especie patógena de la vagina humana (Schwebke, Muzny y Josey, 2014). Este último hallazgo es ilustrativo del efecto que puede tener la cercanía de la urbanización.



## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 14 CONCLUSIONES

- Los análisis de diversidad alfa y beta no permiten concluir que existen cambios en la diversidad entre el polen corbicular y el pan de abeja.
- La riqueza de especies fúngicas es mayor para ambos tipos de polen en comparación con la riqueza de especies bacterianas.
- La variable de ubicación o zona geográfica puede ser un factor determinante para el estatus de la diversidad de las muestras de polen corbicular y pan de abeja.

### 15 PERSPECTIVAS

- Analizar la microbiota del polen floral.
- Establecer como variable categórica el grado de impacto ambiental de la zona donde está la colmena.
- Utilizar cebadores que sean menos sensibles a secuencias no objetivo (mitocondrias y cloroplastos).
- Ampliar el tamaño de muestreo para concretar los microorganismos persistentes; y explorar de estos últimos su posible papel.
- Mantener en cultivos *in vivo* a microorganismos aislados de ambos tipos de muestra para corroborar su identidad taxonómica

## ANEXOS

Tabla 7. Asignación taxonómica de ASV's de secuencias del gen ITS

AS V	King dom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
AS V1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	delicatulum
AS V2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	steviae
AS V3	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	NA
AS V5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Septoria	cretae
AS V6	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
AS V7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	NA
AS V8	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium	citrinum
AS V9	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Gibberella	intricans
AS V10	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	euphorbiicola
AS V11	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V12	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	leoncinii
AS V13	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Coremiopassalora	leptophlebae
AS V14	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Zygosaccharomyces	siamensis
AS V15	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Corynesporascaceae	Corynespora	torulosa
AS V16	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	NA
AS V17	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	siamensis
AS V18	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	siamensis
AS V19	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	Claviceps	chloridicola
AS V20	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Corynesporascaceae	Corynespora	NA
AS V21	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Periconiaceae	Periconia	byssoides
AS V22	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium	rolfsii
AS V23	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	Yamadazyma	NA
AS V24	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V25	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Zygosaccharomyces	siamensis

AS V26	Fun gi	Ascom ycota	Saccharom ycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Zygosaccharomyces	siamensis
AS V27	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Xylariales	NA	NA	NA
AS V28	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	NA
AS V29	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Gibberella	intricans
AS V30	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora	oryzae
AS V31	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Hypocreales	Stachybotryaceae	NA	NA
AS V32	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	plantarum
AS V33	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Corynesporascaceae	Corynespora	torulosa
AS V34	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	leoncinii
AS V35	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	NA
AS V36	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	siamensis
AS V37	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Xylariales	Sporocadaceae	Pestalotiopsis	coffea-arabicae
AS V38	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	NA	NA	NA
AS V39	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora	oryzae
AS V40	Fun gi	Ascom ycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V41	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V42	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
AS V43	Fun gi	Ascom ycota	Saccharom ycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Zygosaccharomyces	siamensis
AS V44	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	tenuissima
AS V45	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	rajasthanensis
AS V46	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Vishniacozyma	taibaiensis
AS V47	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Capnodiaceae	Capnodium	coffea
AS V48	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora	oryzae
AS V49	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Didymellaceae	NA	NA
AS V50	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	exasperatum
AS V51	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V52	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Periconiaceae	Periconia	byssoides
AS V53	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Nothophoma	NA
AS V54	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V55	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Vishniacozyma	taibaiensis

AS V56	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremata ceae	Papiliotre ma	rajasthanen sis
AS V57	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V58	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Rhynchogastremata ceae	Papiliotre ma	wisconsine nsis
AS V59	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Epicoccum	dendrobii
AS V60	Fun gi	Ascom ycota	Eurotiomyc etes	Chaetothyriales	Chaetothyriales_fam _Incertae_sedis	Strelitzian a	africana
AS V61	Fun gi	Ascom ycota	Eurotiomyc etes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus	pseudodefl ectus
AS V62	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
AS V63	Fun gi	Ascom ycota	Saccharom ycetes	Saccharomycetales	Metschnikowiaceae	Kodamaea	ohmeri
AS V64	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	siamensis
AS V65	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V66	Fun gi	Ascom ycota	Sordariom ycetes	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora	oryzae
AS V67	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Camptome riphila	leucaenae
AS V68	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Corynesporascacea e	Corynespo ra	NA
AS V69	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladospori um	sphaerospe rrum
AS V70	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Sirobasidiaceae	Sirobasidi um	brefeldianu m
AS V71	Fun gi	Ascom ycota	Saccharom ycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	Debaryom yces	NA
AS V72	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V73	Fun gi	Basidio mycota	Agaricomyc etes	Corticiales	Vuilleminiaceae	Vuilleminia	cystidiata
AS V74	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Vishniacoz yma	heimaeyens is
AS V75	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Toxicoclad osporium	irritans
AS V76	Fun gi	Ascom ycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V77	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	pagnoccae
AS V78	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevrie sia	modesta
AS V79	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Curvularia	NA
AS V80	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Trimorphomycetace ae	Saitozyma	NA
AS V81	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V82	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V83	Fun gi	Basidio mycota	Tremellom ycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	siamensis
AS V84	Fun gi	Ascom ycota	Dothideom ycetes	Pleosporales	Periconiaceae	Periconia	NA
AS V85	Fun gi	Ascom ycota	Saccharom ycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	Meyerozy ma	guilliermond ii

AS V86	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	tenuissima
AS V87	Fungi	Basidiomycota	Wallemiomycetes	Wallemiales	Wallemiaceae	Wallemia	tropicalis
AS V88	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulales	Peniophoraceae	Peniophora	albobadia
AS V89	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	leoncinii
AS V90	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Metschnikowiaceae	Metschnikowia	cibodasensis
AS V91	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Recurvomycetes	mirabilis
AS V92	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	sinensis
AS V93	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales_fam_Incertae_sedis	Acremonium	persicinum
AS V94	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Periconiaceae	Periconia	byssoides
AS V95	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulales	Peniophoraceae	Peniophora	albobadia
AS V96	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Stachybotryaceae	Stachybotrys	aloeticola
AS V97	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Cuniculitremaeae	Kockovaella	NA
AS V98	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Gloeophyllales	Gloeophyllaceae	Gloeophyllum	striatum
AS V99	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	Clonostachys	miodochialis
AS V100	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevriesia	modesta
AS V101	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Corticiales	Corticaceae	Laetisaria	arvalis
AS V102	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V103	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	oryzae
AS V104	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	NA	NA
AS V105	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V106	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Capnodiaceae	Leptoxyphium	glochidion
AS V107	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Trichosporonales	Trichosporonaceae	Trichosporon	NA
AS V108	Fungi	Ascomycota	Orbiliomycetes	Orbiliales	Orbiliaceae	Dactylella	arnaudii
AS V109	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V110	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevriesia	NA

AS V11 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevriesia	NA
AS V11 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Capnodiales_fam_Incertae_sedis	Diatractium	NA
AS V11 3	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V11 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	NA
AS V11 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	Lasiodiplodia	jatrophiicola
AS V11 6	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V11 7	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Metschnikowiaceae	Kodamaea	ohmeri
AS V11 8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevriesia	NA
AS V11 9	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V12 0	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	odontotermis
AS V12 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Montagnulaceae	NA	NA
AS V12 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymosphaeriaceae	NA	NA
AS V12 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	NA
AS V12 4	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
AS V12 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Curvularia	lunata
AS V12 6	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae	Phlebiopsis	NA
AS V12 7	Fungi	Basidiomycota	Wallemiomycetes	Wallemiales	Wallemiaceae	Wallemia	sebi
AS V12 8	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Hannaella	kunmingensis
AS V12 9	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Auriculariales	Exidiaceae	Heterochaete	shearii
AS V13 0	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Stachybotryaceae	Memnoniella	ellipsoidea

AS V13 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V13 2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Cryptococcus	aspenensis
AS V13 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Morosphaeriaceae	Acrocalyma	NA
AS V13 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Stagonosporopsis	NA
AS V13 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V13 6	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	NA	NA	NA
AS V13 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V13 8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Phaeosphaeriaceae	NA	NA
AS V13 9	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	NA
AS V14 0	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	Pseudolophiostoma	NA
AS V14 1	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	Gibellulopsis	chrysanthemii
AS V14 2	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V14 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Teratoramularia	NA
AS V14 4	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Cryptococcus	dimennae
AS V14 5	Fungi	Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae	Rhodosporeidiobolus	odoratus
AS V14 6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V14 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Coremiopassalora	leptophlebae
AS V14 8	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V14 9	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus	stellatus
AS V15 0	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	dominicanum

AS V15 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Dissoconiaceae	Ramichloridium	apiculatum
AS V15 2	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	NA	NA	NA
AS V15 3	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	NA	NA	NA
AS V15 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Colletogloem	NA
AS V15 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V15 6	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Stachybotryaceae	Alfaria	terrestris
AS V15 7	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	Caliciales	Physciaceae	NA	NA
AS V15 8	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus	NA
AS V15 9	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V16 0	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V16 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V16 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Xenosond erhenia	syzygii
AS V16 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporales_fam_Incertae_sedis	Paradictyo arthrimum	tectonicola
AS V16 4	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V16 5	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V16 6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymosphaeriaceae	Pseudopit homyces	rosae
AS V16 7	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Cuniculitremaeae	Fellomyces	mexicanus
AS V16 8	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Corticiales	NA	NA	NA
AS V16 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V17 0	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA

AS V17 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideales	Aureobasidiaceae	Aureobasidium	namibiae
AS V17 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Dissoconiaceae	Uwebraunia	dekkeri
AS V17 3	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V17 4	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Auriculariales	Auriculariaceae	Auricularia	cornea
AS V17 5	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinopsis	NA
AS V17 6	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Hymenochaetaceae	Fuscoporia	NA
AS V17 7	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	NA	NA	NA
AS V17 8	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxylon	griseobrunneum
AS V17 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V18 0	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V18 1	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Helotiales_fam_Incertae_sedis	Amphobotrys	ricini
AS V18 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	Pseudolophiostoma	tropicum
AS V18 3	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V18 4	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Ganodermataceae	Perenniporia	NA
AS V18 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideomycetes_ord_Incertae_sedis	Dothideomycetes_fam_Incertae_sedis	Radulidium	epichloes
AS V18 6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Neoscocyta	rosicola
AS V18 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Epicoccum	NA
AS V18 8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	austrohemisphaericum
AS V18 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Periconiaceae	Periconia	pseudobyssoides
AS V19 0	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Bulleraceae	Bullera	penniseticola

AS V19 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymosphaeriaceae	Bimuria	novae-zelandiae
AS V19 2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Cryptococcus	dimennae
AS V19 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymosphaeriaceae	Paraconiotryum	estuarinum
AS V19 4	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	NA	NA	NA	NA
AS V19 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Curvularia	ellisii
AS V19 6	Fungi	Basidiomycota	Cystobasidiomycetes	Erythrobasidiales	Erythrobasidiaceae	Erythrobasidium	yunnanense
AS V19 7	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Auriculariales	Exidiaceae	NA	NA
AS V19 8	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
AS V19 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V20 0	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Schizophyllaceae	Schizophyllum	commune
AS V20 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Teratosphaeria	NA
AS V20 2	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V20 3	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales_fam_Incertae_sedis	Acremonium	roseolum
AS V20 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Colletogloeum	NA
AS V20 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Devriesia	NA
AS V20 6	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Xerochrysum	xerophilum
AS V20 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V20 8	Fungi	Basidiomycota	Cystobasidiomycetes	Cystobasidiomycetes_ord_Incertae_sedis	Symmetrosporaceae	Symmetrospora	vermiculata
AS V20 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V21 0	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Ganodermataceae	Ganoderma	lucidum

AS V21 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V21 2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V21 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevriesia	NA
AS V21 4	Fungi	Basidiomycota	Cystobasidiomycetes	Cystobasidiomycetes _ord_Incertae_sedis	Buckleyzymaceae	Buckleyzyma	aurantiaca
AS V21 5	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
AS V21 6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Zasmidium	queenslandicum
AS V21 7	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
AS V21 8	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	NA	NA	NA
AS V21 9	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V22 0	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Hyweljonesia	queenslandica
AS V22 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Torulaceae	Torula	NA
AS V22 2	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V22 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V22 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V22 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	NA	NA	NA
AS V22 6	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Carcinomycetaceae	Carcinomyces	nordestinensis
AS V22 7	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	NA	NA	NA	NA
AS V22 8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Phaeosphaeriaceae	Phaeodothis	winteri
AS V22 9	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V23 0	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Neodevriesiaceae	Neodevriesia	modesta

AS V23 1	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus	gracilis
AS V23 2	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Sclerotiniaceae	Sclerotinia	trifoliorum
AS V23 3	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V23 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	Barriopsis	NA
AS V23 5	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	NA	NA	NA
AS V23 6	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	NA	NA	NA	NA
AS V23 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Dictyosporiaceae	Neodendryphiella	mali
AS V23 8	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V23 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V24 0	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	Colletotrichum	theobromicola
AS V24 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	NA	NA	NA
AS V24 2	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V24 3	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Rhynchogastremataceae	Papiliotrema	NA
AS V24 4	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Bulleribasidiaceae	Vishniacozyma	dimennae
AS V24 5	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Auriculariales	Exidiaceae	Eichleriella	tenuicula
AS V24 6	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Helotiaceae	Tricladium	angustum
AS V24 7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V24 8	Fungi	Basidiomycota	Agaricostilbomycetes	Agaricostilbales	Agaricostilbaceae	Sterigmatomyces	halophilus
AS V24 9	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus	sydowii
AS V25 0	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA

AS V25 1	Fungi	Ascomycota	Leotiomyces	Helotiales	Helotiaceae	Articulospora	NA
AS V25 2	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	chlamydosporum
AS V25 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	NA	NA
AS V25 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Hysteriales	Hysteriaceae	Rhytidhysterion	rufulum
AS V25 5	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V25 6	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V25 7	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V25 8	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V25 9	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V26 0	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	NA	NA	NA
AS V26 1	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V26 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Leptosphaeriaceae	Plenodomus	NA
AS V26 3	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V26 4	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V26 5	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Valsaceae	Alloccryptovalsa	polyspora
AS V26 6	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V26 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Schizothyriaceae	Zygophiala	inaequalis
AS V26 8	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V26 9	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Typhulaceae	Typhula	micans
AS V27 0	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Stagonosporopsis	trachelii

AS V27 1	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Filobasidiales	Filobasidiaceae	Naganishiella	diffluens
AS V27 2	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V27 3	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	Lectera	longa
AS V27 4	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Cryptococcaceae	Kwoniella	NA
AS V27 5	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales_fam_Incertae_sedis	Acremonium	charticola
AS V27 6	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium	NA
AS V27 7	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V27 8	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae	Dacryobolus	sudans
AS V27 9	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Hymenochaetales_fam_Incertae_sedis	Resinicium	NA
AS V28 0	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V28 1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymosphaeriaceae	Spegazzinia	NA
AS V28 2	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	NA	NA	NA	NA
AS V28 3	Fungi	Basidiomycota	Cystobasidiomycetes	Erythrobasidiales	Erythrobasidiaceae	Erythrobasidium	NA
AS V28 4	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	NA	NA	NA	NA
AS V28 5	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	Caliciales	Caliciaceae	Dirinaria	NA
AS V28 6	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	Ostropales	Stictidaceae	Stictis	NA
AS V28 7	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V28 8	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V28 9	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V29 0	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Trichomeriaceae	Knufia	NA

AS V29 1	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V29 2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V29 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	Flabellascoma	cycadicola
AS V29 4	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	NA	NA	NA	NA
AS V29 5	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V29 6	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
AS V29 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	NA	NA	NA
AS V29 8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
AS V29 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	Toxicocladosporium	NA
AS V30 0	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Hyphodermataceae	Hyphoderma	NA
AS V30 1	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V30 2	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V30 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Sporormiaceae	Preussia	persica
AS V30 4	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V30 5	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V30 6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V30 7	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Myriangiales	Myriangiaceae	Myriangiium	NA
AS V30 8	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V30 9	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V31 0	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA

AS V31 1	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Auriculariales	Exidiaceae	Exidia	NA
AS V31 2	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Chaetomellaceae	Chaetomella	raphigera
AS V31 3	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V31 4	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V31 5	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Meruliaceae	Phlebia	NA
AS V31 6	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Myrmecridiales	Myrmecridiaceae	Myrmecridium	thailandicum
AS V31 7	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V31 8	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Myrmecridiales	Myrmecridiaceae	Myrmecridium	sorbicola
AS V31 9	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Metschnikowiaceae	Clavispora	NA
AS V32 0	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V32 1	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Ophiocordycipitaceae	NA	NA
AS V32 2	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Hymenochaetales	Schizoporaceae	Oxyporus	millavensis
AS V32 3	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V32 4	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	Parapyrenochaeta	acaciae
AS V32 5	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V32 6	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Podoscyphaceae	NA	NA
AS V32 7	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae	NA	NA
AS V32 8	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
AS V32 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Venturiales	Sympoventuriaceae	Ochroconis	NA
AS V33 0	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Auriculariales	Exidiaceae	NA	NA

AS V33 1	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V33 2	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	Ostropales	Stictidaceae	Cryptodiscus	epicladonia
AS V33 3	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	NA	NA
AS V33 4	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
AS V33 5	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V33 6	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
AS V33 7	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V33 8	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Graphiaceae	Graphium	NA
AS V33 9	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Periconiaceae	Periconia	NA
AS V34 0	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AS V34 1	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
AS V34 2	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V34 3	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	NA	NA	NA	NA
AS V34 4	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA

Tabla 8. Asignación taxonómica de ASV's de secuencias del gen 16S

ASV	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
ASV 1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	apis
ASV 2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	NA	NA	NA
ASV 3	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	paucimobilis
ASV 4	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	psychrotolerans

ASV 5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	NA	NA	NA
ASV 6	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Bombella	NA
ASV 7	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	psychrotolerans
ASV 8	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	NA	NA
ASV 9	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 10	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	apinorum
ASV 11	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	Gilliamella	NA
ASV 12	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	phyllosphaerae
ASV 13	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	apis
ASV 14	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	NA	NA	NA
ASV 15	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NA	NA	NA	NA
ASV 16	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 17	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 18	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	NA	NA
ASV 19	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 20	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 21	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylobacterium-Methylorubrum	aerolatum
ASV 22	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylobacterium-Methylorubrum	brachiatum
ASV 23	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Candidatus Profftella	NA
ASV 24	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Intrasporangiaceae	Knoellia	NA
ASV 25	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Candidatus Profftella	NA

ASV 26	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Morganellaceae	Arsenophonus	symbiont
ASV 27	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	apinorum
ASV 28	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Curtobacterium	NA
ASV 29	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Bombella	NA
ASV 30	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	NA	NA
ASV 31	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Micrococcus	luteus
ASV 32	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 33	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae (Subgroup 1)	Terriglobus	NA
ASV 34	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	NA	NA	NA
ASV 35	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	1174-901-12	NA
ASV 36	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	psychrotolerans
ASV 37	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylobacterium-Methylorubrum	currus
ASV 38	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	Gilliamella	NA
ASV 39	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	pseudosanguinis
ASV 40	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	1174-901-12	NA
ASV 41	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 42	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	apinorum
ASV 43	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	NA	NA
ASV 44	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	yunnanensis
ASV 45	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	NA
ASV 46	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Asaia	bogorensis
ASV 47	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	NA	NA

ASV 48	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	apinorum
ASV 49	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Candidatus Proffella	NA
ASV 50	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	Rosenbergiella	nectarea
ASV 51	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Bombella	NA
ASV 52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	Phaseolibacter	NA
ASV 53	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	adhaesiva
ASV 54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 55	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Morganellaceae	Arsenophonus	NA
ASV 57	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	NA
ASV 58	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	reptilivorus
ASV 59	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	NA	NA
ASV 60	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Commensalibacter	NA
ASV 61	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Aureimonas	NA
ASV 62	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	Gilliamella	NA
ASV 63	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	1174-901-12	NA
ASV 64	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV 65	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV 66	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Bombella	intestini
ASV 67	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	NA
ASV 68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	Orbus	NA
ASV 69	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	adhaesiva
ASV 70	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NA	NA	NA	NA

ASV 71	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Microtrichales	Ilumatobacteraceae	CL500-29 marine group	NA
ASV 72	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 73	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Aureimonas	ureilytica
ASV 74	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV 75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	NA	NA
ASV 76	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	NA
ASV 77	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Acetobacterales	Acetobacteraceae	Bombella	intestini
ASV 78	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 79	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 80	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 81	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 82	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	quenuiae
ASV 83	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Candidatus Proffella	NA
ASV 84	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylobacterium-Methylorubrum	NA
ASV 85	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	psychrotolerans
ASV 86	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 87	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Candidatus Proffella	NA
ASV 88	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	phyllosphaerae
ASV 89	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	endophytica
ASV 90	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV 91	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NA	NA	NA	NA
ASV 92	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA

ASV 93	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV 94	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	songnenensis
ASV 95	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV 96	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA

---

**BIBLIOGRAFIA**

Aitchison, J. (1994) "Principles of compositional data analysis," *Lecture Notes-Monograph Series*. JSTOR, pp. 73–81.

Aitchison, J. (2008) "The single principle of compositional data analysis, continuing fallacies, confusions y misunderstandings and some suggested remedies," *CoDaWork 2008*, pp. 1–28. Available at: <http://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/706>.

Aleklett, K., Hart, M. and Shade, A. (2014) "The microbial ecology of flowers: An emerging frontier in phyllosphere research1," *Botany*, 92(4), pp. 253–266. doi: 10.1139/cjb-2013-0166.

Almeida-Dias, J. M. *et al.* (2018) "Fermentation of a pollen substitute diet with beebread microorganisms increases diet consumption and hemolymph protein levels of honey bees (Hymenoptera: Apidae)," *Sociobiology*, 65(4), pp. 760–765. doi: 10.13102/sociobiology.v65i4.3293.

Alqarni, A. S. (2006) "Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers," *Journal of Biological Sciences*. doi: 10.3923/jbs.2006.734.737.

Anderson, K. E. *et al.* (2013a) "Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*)," *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0083125.

Anderson, K. E. *et al.* (2013b) "Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*)," *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0083125.

Anderson, K. E. *et al.* (2014a) "Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion," *Molecular Ecology*, 23(23), pp. 5904–5917. doi: 10.1111/mec.12966.

Anderson, K. E. *et al.* (2014b) "Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion," *Molecular Ecology*, 23(23), pp. 5904–5917. doi: 10.1111/mec.12966.

Anderson, K. E. and Ricigliano, V. A. (2017) "Honey bee gut dysbiosis: a novel context of disease

---

ecology,” *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc, 22, pp. 125–132. doi: 10.1016/j.cois.2017.05.020.

Anderson, M. J. *et al.* (2011) “Navigating the multiple meanings of  $\beta$  diversity: A roadmap for the practicing ecologist,” *Ecology Letters*, 14(1), pp. 19–28. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01552.x.

Badri, M. *et al.* (2018) “Shrinkage improves estimation of microbial associations under different normalization methods,” *bioRxiv*, (11), p. 406264. doi: 10.1101/406264.

Bálint, M. *et al.* (2016) “Millions of reads, thousands of taxa: Microbial community structure and associations analyzed via marker genes,” *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 686–700. doi: 10.1093/femsre/fuw017.

Benda, N. D. *et al.* (2008) “Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hives,” *Journal of Apicultural Research*. Taylor & Francis, 47(3), pp. 194–201.

Bohannan, B. J. M. and Hughes, J. (2003) “New approaches to analyzing microbial biodiversity data,” *Current Opinion in Microbiology*, pp. 282–287. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00055-9.

Botnen, S. S. *et al.* (2018) “Sequence clustering threshold has little effect on the recovery of microbial community structure,” *Molecular Ecology Resources*, 18(5), pp. 1064–1076. doi: 10.1111/1755-0998.12894.

Brodtschneider, R. and Crailsheim, K. (2010) “Nutrition and health in honey bees,” *Apidologie*, pp. 278–294. doi: 10.1051/apido/2010012.

Brown, K. *et al.* (2012) “Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease,” *Nutrients*, 4(8), pp. 1095–1119. doi: 10.3390/nu4081095.

Brown, S. P. *et al.* (2015) “Scraping the bottom of the barrel: Are rare high throughput sequences artifacts?,” *Fungal Ecology*. Elsevier Ltd, 13, pp. 221–225. doi: 10.1016/j.funeco.2014.08.006.

Bunge, J., Willis, A. and Walsh, F. (2014) “Estimating the Number of Species in Microbial Diversity Studies,” *Annual Review of Statistics and Its Application*, 1(1), pp. 427–445. doi: 10.1146/annurev-statistics-022513-115654.

Bürgmann, H. *et al.* (2001) “A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from

---

soil,” *Journal of Microbiological Methods*, 45(1), pp. 7–20. doi: 10.1016/S0167-7012(01)00213-5.

Callahan, B. J. *et al.* (2016) “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data,” *Nature Methods*. doi: 10.1038/nmeth.3869.

Callahan, B. J. *et al.* (2017) “Replication and refinement of a vaginal microbial signature of preterm birth in two racially distinct cohorts of US women,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(37), pp. 9966–9971. doi: 10.1073/pnas.1705899114.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J. and Holmes, S. P. (2017) “Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis,” *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 11(12), pp. 2639–2643. doi: 10.1038/ismej.2017.119.

Carding, S. *et al.* (2015) “Dysbiosis of the gut microbiota in disease,” *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0). doi: 10.3402/mehd.v26.26191.

Carrigg, C. *et al.* (2007) “DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), pp. 955–964. doi: 10.1007/s00253-007-1219-y.

Chao, A. *et al.* (2014) “Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies,” *Ecological Monographs*, 84(1), pp. 45–67. doi: 10.1890/13-0133.1.

CHAO, A. (1984) “Nonparametric estimation of the number of classes in a population,” *Scandinavian journal of statistics*.

Chao, A. and Jost, L. (2012) “Coverage-based rarefaction and extrapolation: Standardizing samples by completeness rather than size,” *Ecology*. doi: 10.1890/11-1952.1.

Chao, A., Wang, Y. T. and Jost, L. (2013) “Entropy and the species accumulation curve: A novel entropy estimator via discovery rates of new species,” *Methods in Ecology and Evolution*. doi: 10.1111/2041-210X.12108.

Chevtchik, V. (1950) “Mikrobiologie pyloveho kvaseni,” *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk*, 323, pp. 103–130.

---

Chiu, C. H. and Chao, A. (2016) “Estimating and comparing microbial diversity in the presence of sequencing errors,” *PeerJ*, 2016(2). doi: 10.7717/peerj.1634.

Corby-Harris, V., Maes, P. and Anderson, K. E. (2014) “The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers,” *PLoS ONE*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0095056.

Costea, P. I. *et al.* (2017) “Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies,” *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 35(11), pp. 1069–1076. doi: 10.1038/nbt.3960.

Cremonz, Tân. M., De Jong, D. and Bitondi, Már. M. G. (1998) “Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae),” *Journal of economic entomology*. Oxford University Press Oxford, UK, 91(6), pp. 1284–1289.

Cremonz, Tân. M., De Jong, D. and Bitondi, Már. M. G. (2015) “Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae),” *Journal of Economic Entomology*. doi: 10.1093/jee/91.6.1284.

Daly, A. J., Baetens, J. M. and De Baets, B. (2018) “Ecological diversity: Measuring the unmeasurable,” *Mathematics*, 6(7). doi: 10.3390/math6070119.

DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* (2016) “Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements,” *Apidologie*, 47(2), pp. 186–196. doi: 10.1007/s13592-015-0386-6.

Dharampal, P. S. *et al.* (2019) “Pollen-borne microbes shape bee fitness,” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1904). doi: 10.1098/rspb.2018.2894.

Dickie, I. A. (2010) “Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys,” *New Phytologist*, pp. 916–918. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03473.x.

Disayathanoowat, T. *et al.* (2020) “Diferentes dinámicas de bacterias y hongos Comunidades en pan de abeja almacenado en colmena y sus Posibles roles: un estudio de caso de dos comerciales Miel de abejas en China,” *Microorganisms*, 8(2), p. 264. doi: 10.3390/microorganisms8020264.

Donkersley, P. *et al.* (2018) “Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use,” *Ecology and Evolution*, 8(10), pp. 4743–4756. doi: 10.1002/ece3.3999.

- 
- E. H. SIMPSON (1949) "Measurement of Diversity," *Nature*.
- Egorova, A. I. (1971) "Preservative microflora in stored pollen," *Veterinariya*, 8, pp. 40–41.
- Ellegaard, K. M. *et al.* (2020) "Vast Differences in Strain-Level Diversity in the Gut Microbiota of Two Closely Related Honey Bee Species," *Current Biology*. Elsevier Ltd., 30(13), pp. 2520–2531.e7. doi: 10.1016/j.cub.2020.04.070.
- Engel, P. *et al.* (2013) "Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts," *Journal of Apicultural Research*. Taylor & Francis, pp. 1–24. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.07.
- Engel, P., Bartlett, K. D. and Moran, N. A. (2015) "The bacterium *frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host," *mBio*. doi: 10.1128/mBio.00193-15.
- Faith, D. P. (1992) "Conservation evaluation and phylogenetic diversity," *Biological Conservation*. doi: 10.1016/0006-3207(92)91201-3.
- Foote, H. L. (1957) "Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production," *Am Bee J*, 97(12), pp. 476–478.
- Gilliam, M. (1979) "Microbiología del polen y pan de abejas: the levaduras," *Apidología*.
- GILLIAM, M. (1979) "MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD: THE YEASTS," *Apidologie*. doi: 10.1051/apido:19790106.
- Glassman, S. I. and Martiny, J. B. H. (2018) "Broadscale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact," *mSphere*, 3(4), pp. e00148-18. doi: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18>.
- Gloor, G. B. *et al.* (2016) "It's all relative: analyzing microbiome data as compositions," *Annals of Epidemiology*. Elsevier Ltd, 26(5), pp. 322–329. doi: 10.1016/j.annepidem.2016.03.003.
- Gloor, G. B. *et al.* (2017) "Microbiome datasets are compositional: And this is not optional," *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), pp. 1–6. doi: 10.3389/fmicb.2017.02224.
- Goodrich, J. K. *et al.* (2014) "Conducting a microbiome study," *Cell*. Elsevier Inc., 158(2), pp. 250–262. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.037.
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P. and Huse, S. M. (2016) "Interpreting *prevotella* and *bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle," *Microbiome*. Microbiome, 4, pp. 1–12. doi: 10.1186/s40168-

---

016-0160-7.

Gotelli, N. J. and Colwell, R. K. (2011) "Biological diversity: frontiers in measurement and assessment," *Challenges*, pp. 39–54. Available at: <http://www.amazon.co.uk/dp/0199580677>.

Haas, B. J. *et al.* (2011) "Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons," *Genome Research*, 21(3), pp. 494–504. doi: 10.1101/gr.112730.110.

Haegeman, B. *et al.* (2013) "Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice," *ISME Journal*. doi: 10.1038/ismej.2013.10.

Hajibabaei, M. *et al.* (2011) "Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos," *PLoS ONE*, 6(4). doi: 10.1371/journal.pone.0017497.

Hamady, M. and Knight, R. (2009) "Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges," *Genome Research*, pp. 1141–1152. doi: 10.1101/gr.085464.108.

Harrison, J. G. *et al.* (2020) "The quest for absolute abundance: The use of internal standards for DNA-based community ecology," *Molecular Ecology Resources*, (August), pp. 1–14. doi: 10.1111/1755-0998.13247.

Hill M. O. (1973) "Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences," *Ecology*.

Hill, T. C. J. *et al.* (2003) "Using ecological diversity measures with bacterial communities," *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/S0168-6496(02)00449-X.

Hsieh, T. C., Ma, K. H. and Chao, A. (2016) "iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers)," *Methods in Ecology and Evolution*. doi: 10.1111/2041-210X.12613.

Hugerth, L. W. and Andersson, A. F. (2017) "Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing," *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), pp. 1–22. doi: 10.3389/fmicb.2017.01561.

Hughes, J. B. *et al.* (2001) "Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating

---

Microbial Diversity,” *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001.

Jain, S. A. *et al.* (2013) “Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification,” *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(4), pp. 753–756. doi: 10.1590/s0101-20612013000400022.

Jian, C. *et al.* (2020) “Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling,” *PLoS ONE*, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0227285.

Jiang, D. *et al.* (2019) “Microbiome Multi-Omics Network Analysis: Statistical Considerations, Limitations, and Opportunities,” *Frontiers in Genetics*, pp. 1–19. doi: 10.3389/fgene.2019.00995.

Jo, J., Oh, J. and Park, C. (2020) “Microbial community analysis using high-throughput sequencing technology: a beginner’s guide for microbiologists,” *Journal of Microbiology*, 58(3), pp. 176–192. doi: 10.1007/s12275-020-9525-5.

Jost, L. (2006) “Entropy and diversity,” *Oikos*, 113(2), pp. 363–375. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.

Jost, L. (2007) “Partitioning diversity into independent alpha and beta components,” *Ecology*, 88(10), pp. 2427–2439. doi: 10.1890/06-1736.1.

Junker, R. R. and Keller, A. (2015) “Microhabitat heterogeneity across leaves and flower organs promotes bacterial diversity,” *FEMS Microbiology Ecology*, 91(9), pp. 1–9. doi: 10.1093/femsec/fiv097.

Kačániová, M. *et al.* (2011) “Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia,” *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 46(7), pp. 623–629. doi: 10.1080/03601234.2011.589322.

Kembel, S. W. *et al.* (2012) “Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance,” *PLoS Computational Biology*, 8(10), pp. 16–18. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002743.

Knight, R. *et al.* (2018) “Best practices for analysing microbiomes,” *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 16(7), pp. 410–422. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.

---

Kopylova, E. *et al.* (2014) “Open-Source Sequence Clustering Methods Improve the State Of the Art,” 1(1), pp. 1–16. doi: 10.1128/mSystems.00003-15.Editor.

Kuczynski, J. *et al.* (2010) “Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns,” *Nature Methods*, 7(10), pp. 813–819. doi: 10.1038/nmeth.1499.

Kunin, V. *et al.* (2010) “Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates,” *Environmental Microbiology*, 12(1), pp. 118–123. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x.

Kwong, W. K. and Moran, N. A. (2016) “Gut microbial communities of social bees,” *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 14(6), pp. 374–384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43.

Legendre, P. and Gallagher, E. D. (2001) “Ecologically meaningful transformations for ordination of species data,” *Oecologia*, 129(2), pp. 271–280. doi: 10.1007/s004420100716.

Lovell, D. *et al.* (2015) “Proportionality: A Valid Alternative to Correlation for Relative Data,” *PLoS Computational Biology*, 11(3), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004075.

Lozupone, C. *et al.* (2011) “UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison,” *ISME Journal*. Nature Publishing Group, pp. 169–172. doi: 10.1038/ismej.2010.133.

Lozupone, C. A. and Knight, R. (2008) “Species divergence and the measurement of microbial diversity,” *FEMS Microbiology Reviews*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x.

Maes, P. W. *et al.* (2016) “Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*),” *Molecular Ecology*, 25(21), pp. 5439–5450. doi: 10.1111/mec.13862.

Magurran, A. E. (2004) *Measuring biological diversity. Edition Illustrated, Blackwell Publishing, Massachusetts*. doi: 10.2307/4126959.

Mandal, S. *et al.* (2015) “Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition,” *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26, pp. 1–7. doi: 10.3402/mehd.v26.27663.

---

Manirajan, B. A. *et al.* (2018) “Diversity, specificity, co-occurrence and hub taxa of the bacterial-fungal pollen microbiome,” *FEMS Microbiology Ecology*. Oxford University Press, 94(8), pp. 1–11. doi: 10.1093/femsec/fiy112.

Marchesi, J. R. and Ravel, J. (2015) “The vocabulary of microbiome research: a proposal,” *Microbiome*. *Microbiome*, 3(1), pp. 1–3. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5.

Martin, B. D., Witten, D. and Willis, A. D. (2020) “Modeling microbial abundances and dysbiosis with beta-binomial regression,” *Annals of Applied Statistics*, 14(1), pp. 94–115. doi: 10.1214/19-AOAS1283.

Martin, M. (2011) “Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads,” *EMBnet.journal*, 17(1), p. 10. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

Mauriello, G. *et al.* (2017) “Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps,” *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0183208.

McFrederick, Q. S. and Rehan, S. M. (2018) “Wild Bee Pollen Usage and Microbial Communities Co-vary Across Landscapes,” *Microbial Ecology*. *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-018-1232-y.

McFrederick, Q. S. and Rehan, S. M. (2019) “Wild Bee Pollen Usage and Microbial Communities Co-vary Across Landscapes,” *Microbial Ecology*. *Microbial Ecology*, 77(2), pp. 513–522. doi: 10.1007/s00248-018-1232-y.

McLaren, M. R., Willis, A. D. and Callahan, B. J. (2019) “Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments,” *eLife*, 8, pp. 1–31. doi: 10.7554/eLife.46923.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013) “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data,” *PLoS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061217.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2014) “Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible,” *PLoS Computational Biology*, 10(4). doi: 10.1371/journal.pcbi.1003531.

Moran, N. A. *et al.* (2012) “Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees,” *PLoS ONE*, 7(4), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0036393.

- 
- Morris, E. K. *et al.* (2014) "Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories," *Ecology and Evolution*, 4(18), pp. 3514–3524. doi: 10.1002/ece3.1155.
- Nelson, M. C. *et al.* (2014) "Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16s rRNA gene amplicon surveys," *PLoS ONE*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0094249.
- Nilsson, R. H. *et al.* (2019) "The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications," *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D259–D264. doi: 10.1093/nar/gky1022.
- Pain, J. and Maugenet, J. (1966) "Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles."
- Paludo, C. R. *et al.* (2018) "Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate," *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-19583-9.
- Paulson, J. N. *et al.* (2013) "Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys," *Nature Methods*, 10(12), pp. 1200–1202. doi: 10.1038/nmeth.2658.
- PENG, Y. -S *et al.* (1985) "The digestion of dandelion pollen by adult worker honeybees," *Physiological Entomology*, 10(1), pp. 75–82. doi: 10.1111/j.1365-3032.1985.tb00021.x.
- Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L. and Buchrieser, C. (2020) "Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses," *Microbial genomics*, 6(8). doi: 10.1099/mgen.0.000409.
- Pozo, M. I., Lachance, M. A. and Herrera, C. M. (2012) "Nectar yeasts of two southern Spanish plants: The roles of immigration and physiological traits in community assembly," *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2), pp. 281–293. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01286.x.
- Proctor, L. M. *et al.* (2019) "The Integrative Human Microbiome Project," *Nature*, 569(7758), pp. 641–648. doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.
- Quast, C. *et al.* (2013) "The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools," *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
-

---

Quince, C. *et al.* (2009) "Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data," *Nature Methods*. doi: 10.1038/nmeth.1361.

Ramette, A. (2007) "Multivariate analyses in microbial ecology," *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), pp. 142–160. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.

Rocchetti, I., Bunge, J. and Böhning, D. (2011) "Population size estimation based upon ratios of recapture probabilities," *Annals of Applied Statistics*, 5(2 B), pp. 1512–1533. doi: 10.1214/10-AOAS436.

Runckel, C. *et al.* (2011) "Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia," *PLoS ONE*, 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0020656.

Rzedowski, J. and Huerta, L. (1994) *vegetación de México*. Limusa, Noriega Editores México.

Sanders, H. L. (1968) "Marine Benthic Diversity: A Comparative Study," *The American Naturalist*, 102(925), pp. 243–282. doi: 10.1086/282541.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Schmickl, T. and Crailsheim, K. (2001) "Cannibalism and early capping: Strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages," *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 187(7), pp. 541–547. doi: 10.1007/s003590100226.

Schwebke, J. R., Muzny, C. A. and Josey, W. E. (2014) "Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: A conceptual model," *Journal of Infectious Diseases*, 210(3), pp. 338–343. doi: 10.1093/infdis/jiu089.

Segata, N. *et al.* (2012) "Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples.," *Genome biology*, 13(6). doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r42.

Shade, A. *et al.* (2012) "Culturing captures members of the soil rare biosphere," *Environmental Microbiology*, pp. 2247–2252. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02817.x.

---

Shade, A. (2017) "Diversity is the question, not the answer," *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 1–6. doi: 10.1038/ismej.2016.118.

Shannon, C. E. (1948) "A Mathematical Theory of Communication," *Bell System Technical Journal*. doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.

Shokralla, S. *et al.* (2012) "Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research," *Molecular Ecology*, 21(8), pp. 1794–1805. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.

Soares, S. *et al.* (2015) "Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification," *Food Control*. Elsevier Ltd, 48, pp. 130–136. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.02.035.

Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. (1994) "Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology," *International Journal of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1099/00207713-44-4-846.

Steffan, S. A. *et al.* (2019) "Omnivory in bees: Elevated trophic positions among all major bee families," *American Naturalist*, 194(3), pp. 414–421. doi: 10.1086/704281.

Sun, Y. *et al.* (2012) "A large-scale benchmark study of existing algorithms for taxonomy-independent microbial community analysis," *Briefings in Bioinformatics*, 13(1), pp. 107–121. doi: 10.1093/bib/bbr009.

Team, Rs. (2015) "RStudio: integrated development for R," *RStudio, Inc., Boston, MA URL* <http://www.rstudio.com>, 42, p. 14.

Tedersoo, L. *et al.* (2010) "454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases," *New Phytologist*, 188(1), pp. 291–301. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03373.x.

Temperton, B. *et al.* (2009) "Bias in assessments of marine microbial biodiversity in fosmid libraries as evaluated by pyrosequencing," *ISME Journal*, 3(7), pp. 792–796. doi: 10.1038/ismej.2009.32.

Tuomisto, H. (2012) "An updated consumer's guide to evenness and related indices," *Oikos*, 121(8), pp. 1203–1218. doi: 10.1111/j.1600-0706.2011.19897.x.

Vásquez, A. and Olofsson, T. C. (2009a) "The lactic acid bacteria involved in the production of

---

bee pollen and bee bread,” *Journal of Apicultural Research*, 48(3), pp. 189–195. doi: 10.3896/ibra.1.48.3.07.

Vásquez, A. and Olofsson, T. C. (2009b) “The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread,” *Journal of Apicultural Research*. doi: 10.3896/ibra.1.48.3.07.

Waiblinger, H. U. *et al.* (2012) “In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey,” *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. doi: 10.1007/s00003-012-0774-z.

Welch, D. B. M. and Huse, S. M. (2011) “Microbial Diversity in the Deep Sea and the Underexplored ‘Rare Biosphere,’” *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, (30), pp. 243–252. doi: 10.1002/9781118010549.ch24.

Wickham, H. *et al.* (2019) “Welcome to the Tidyverse,” *Journal of Open Source Software*, 4(43), p. 1686.

Willis, A. (2016a) “Extrapolating abundance curves has no predictive power for estimating microbial biodiversity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(35), p. E5096. doi: 10.1073/pnas.1608281113.

Willis, A. (2016b) “Species richness estimation with high diversity but spurious singletons,” *arXiv preprint arXiv:1604.02598*, 49(6), pp. 1984–1992.

Willis, A. and Bunge, J. (2015) “Estimating diversity via frequency ratios,” *Biometrics*, 71(4), pp. 1042–1049. doi: 10.1111/biom.12332.

Willis, A., Bunge, J. and Whitman, T. (2017) “Improved detection of changes in species richness in high diversity microbial communities,” *Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics*, 66(5), pp. 963–977. doi: 10.1111/rssc.12206.

Willis, Amy D. (2019) “Rarefaction, alpha diversity, and statistics,” *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2019.02407.

Willis, Amy D (2019) “Rigorous Statistical Methods for Rigorous Microbiome Science,” *mSystems*, 4(3), pp. 1–4. doi: 10.1128/msystems.00117-19.

Willis, A. D. and Martin, B. D. (2020) “Estimating diversity in networked ecological communities,”

*Biostatistics*, (1), pp. 1–23. doi: 10.1093/biostatistics/kxaa015.

Wong, R. G., Wu, J. R. and Gloor, G. B. (2016) “Expanding the UniFrac toolbox,” *PLoS ONE*, 11(9), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0161196.

Wright, G. A., Nicolson, S. W. and Shafir, S. (2017) “Annual Review of Entomology Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees.” doi: 10.1146/annurev-ento-020117.

Yun, J. H. *et al.* (2018) “Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee,” *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-19860-7.