



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DIVERSIDAD POLÍNICA Y ABUNDANCIA DE
MICROORGANISMOS ENTRE PAN DE ABEJA, MIEL Y
APARATO DIGESTIVO DE *Melipona beecheii* (APIDAE:
MELIPONINI) EN YUCATÁN**

Tesis que presenta

ARMANDO ISMAEL BACAB PÉREZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Opción Recursos Naturales**)

Mérida, Yucatán, México
2024


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 Armando Ismael Bacab Pérez titulado **Diversidad polínica y abundancia de microorganismos entre pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini) en Yucatán**, fue realizado en la Unidad de Recursos Naturales, en la línea de investigación de Servicios Ambientales de la Biodiversidad, en los laboratorios de Laboratorio RNA023 de Microbiología y Química Aplicada a la Ecología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Azucena Canto Aguilar dentro de la opción de Recursos Nat, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro y la codirección de la Dra. Elia Ramírez Arriaga del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de noviembre de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, 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 Federal de Protección a 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 se regirán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Armando Ismael Bacab Pérez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Recursos Naturales, Laboratorio RNA023 de Laboratorio de Microbiología y Química Aplicada a la Ecología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la **Dra. María Azucena Canto Aguilar** y en el Laboratorio de Palinología: Paleopalinología y Actuopalinología del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con la codirección de la **Dra. Elia Ramírez Arriaga**.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONAHCYT por la beca otorgada con el número de apoyo 850354, el cual me permitió realizar el estudio del doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, en especial a la Unidad de Recursos Naturales por admitirme como estudiante y brindarme la posibilidad de continuar con mi formación.

Al Laboratorio de Paleopalinología: Paleopalinología y Actuopalinología del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por otorgarme la oportunidad y sus instalaciones para desarrollar parte de mi investigación de posgrado.

A la Dra. María Azucena Canto Aguilar, por aceptarme como estudiante y guiarme en mis estudios de doctorado, agradezco todo lo enseñado, por su paciencia, tiempo e innumerables consejos brindados, así como por apoyarme en mi tesis y trabajo de investigación.

A la Dra. Elia Ramírez Arriaga por sus innumerables consejos y valiosos aportes en mi formación de doctorado, así como por su paciencia, tiempo y esfuerzo en apoyarme en mi trabajo de tesis y en mi trabajo de investigación.

A los Doctores Luis A. Medina Medina y Aileen O'Connor Sánchez por el tiempo y esfuerzo dedicado en cada seguimiento y por las observaciones realizadas para mejorar mi documento de tesis.

A los Doctores José Luis Andrade Torres, Rodrigo Duno de Stefano, Mariana Chávez Pesqueira y Luciana Porter Bolland, por su tiempo y esfuerzo dedicado en la revisión de la tesis el cual permitió mejorar el trabajo final del escrito.

A la técnica de la Unidad de Recursos Naturales Rosalina Rodríguez por su apoyo en campo y en laboratorio para poder llevar a cabo mi investigación.

A la técnica Blanca por sus atenciones, consejos brindados y siempre estar al pendiente de nosotros durante mi estancia en el laboratorio de Paleopalinología: Paleopalinología y Actuopalinología del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A los meliponicultores del estado de Yucatán que me permitieron coleccionar muestras de polen y miel en sus meliponarios.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Recursos Naturales, y a los del seminario de abejas, por las observaciones y consejos brindados en este trayecto.

A mis padres José Pascual Bacab Chin y Hilda Margarita Pérez Montante† por apoyarme y darme ánimos para seguir adelante, el cual les debo todo lo que soy y por su apoyo incondicional.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículo

Artículo Científico: Bacab-Pérez, A.I., Ramírez-Arriaga, E., Canto, A. (2024). Melissopalynology of pot-pollen and pot-honey of the Mayan stingless bee *Melipona beecheii* Bennett, 1831 (Apidae, Meliponini) in Yucatan, Mexico. *Apidologie*, 55,22.

Artículo de Divulgación: Bacab Pérez. A. I. & Canto, A. (2020). La abeja melipona en la cultura maya. *Desde El Herbario CICY*, 12, 154-158.

Congresos

Ponencia “Análisis melisopalinológico del pan de abeja y mieles de *Melipona beecheii* colectados en meliponarios del estado de Yucatán” durante el seminario de divulgación-estudiantes URN 2023-I

Resumen en extenso “Análisis melisopalinológico de polen almacenados en potes de *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini) de cinco meliponarios del estado de Yucatán” en el 28 Congreso Internacional de Actualización Apícola Abejas: Expresión de la Biodiversidad.

Poster “Análisis melisopalinológico de polen almacenados en potes de *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini) de cinco meliponarios del estado de Yucatán” en el 28 Congreso Internacional de Actualización Apícola Abejas: Expresión de la Biodiversidad

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos por el apoyo incondicional a lo largo de estos años y haberme forjado como persona

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. VEGETACIÓN DEL ESTADO DE YUCATÁN.....	3
1.2. FLORA MELÍFERA Y DIVERSIDAD POLÍNICA DEL ESTADO DE YUCATÁN.....	4
1.3. INTERACCIÓN PLANTA-ABEJA.....	5
1.4. ESTUDIOS MELISOPALINOLÓGICOS.....	6
1.5. ÍNDICE DE DIVERSIDAD SHANNON Y WEAVER (1949) Y UNIFORMIDAD (PIELOU, 1977).....	9
1.6. MORFOLOGÍA DEL POLEN.....	10
1.7. MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LOS RECURSOS FLORALES Y A LAS ABEJAS.....	13
1.7.1. MICROORGANISMOS EN EL PAN DE ABEJA Y EN LA MIEL	13
1.7.2. MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL APARATO DIGESTIVO DE LAS ABEJAS	16
1.7.3. MICROORGANISMOS ASOCIADOS EN LOS NIDOS DE LAS ABEJAS	18
1.8. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN.....	19
1.9. IMPORTANCIA CULTURAL Y ECOLÓGICA DE <i>Melipona beecheii</i>	20
1.10. LA MELIPONICULTURA COMO ACTIVIDAD DE TRASPATIO.....	22
1.11. DISTRIBUCIÓN Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Melipona beecheii</i>	22
1.12. ORGANIZACIÓN DE LA COLONIA Y RECURSOS COLECTADOS POR <i>Melipona beecheii</i>	24
1.13. RETOS DE LA MELIPONICULTURA.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	26

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
CAPÍTULO II.....	31
MELISSOPALYNOLOGY OF POT-POLLEN AND POT-HONEY OF THE MAYAN STINGLESS BEE <i>Melipona beecheii</i> BENNETT,1831 (APIDAE, MELIPONINI) IN YUCATAN, MEXICO	
1. INTRODUCTION.....	31
2. MATERIALS AND METHODS.....	32
2.1. STUDY AREA.....	32
2.2. SAMPLE COLLECTION AND PROCESSING.....	33
2.3. QUALITATIVE POLLEN ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF HONEY.....	34
2.4. STATISTICAL ANALYSIS OF POLLEN SPECTRA.....	34
3. RESULTS.....	35
3.1. POT-POLLEN MELISSOPALYNOLOGICAL SPECTRUM.....	35
3.2. POT-HONEY MELISSOPALYNOLOGICAL SPECTRUM.....	37
3.3. COMPARATIVE STATISTICAL ANALYSIS BETWEEN THE POT-HONEY AND POT-POLLEN SPECTRA.....	40
3.4. BOTANICAL CHARACTERIZATION OF POT-HONEY SAMPLES.....	41
4. DISCUSSION.....	46
5. CONCLUSIONS.....	53
CAPÍTULO III.....	59

ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y LEVADURAS EN EL PAN DE ABEJA, MIEL Y APARATO DIGESTIVO DE *Melipona beecheii* BENNETT, 1831 (APIDAE: MELIPONINI) Y SU DEPENDENCIA CON LA COMPOSICIÓN Y ABUNDANCIA DEL POLEN COLECTADO

3.1. INTRODUCCIÓN.....	60
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.2.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	63
3.2.2. COLECTA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PAN DE ABEJA, MIEL Y ABEJAS DE <i>Melipona beecheii</i>	64
3.2.3. MICROSCOPÍA: TINCIÓN Y CONTEO DE MICROORGANISMOS	65
3.2.4. CONTEO DE GRANOS DE POLEN.....	67
3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67
3.3. RESULTADOS.....	69
3.3.1. PAN DE ABEJA Y MIEL DE POTES.....	69
3.3.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ESPECIES DE POLEN EN MUESTRAS.....	70
3.3.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	72
3.3.4. ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y LEVADURAS.....	74
3.3.5. ANÁLISIS DE REGRESIÓN BINOMIAL NEGATIVA	76
3.4. DISCUSIÓN.....	79
3.5. CONCLUSIÓN.....	84
CAPÍTULO IV.....	85
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	
4.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	85

4.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	88
4.3. PERSPECTIVAS.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1.** Capas de la pared de un grano de polen.....11
- Figura 1.2.** Distribución geográfica de *Melipona beecheii* en Mesoamérica y México.....23
- Figura 1.3.** Abeja adulta de *Melipona beecheii* en la entrada del nido.....24
- Figura 1.4.** Polen y néctar almacenados en potes de cera de *Melipona beecheii*.....25

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Map of the Yucatan Peninsula, Mexico, location of the traditional meliponaries and distance between them in secondary tropical deciduous forest and tropical semideciduous forest vegetation.....34
- Figure 2.** Percentages of the botanical families registered in the pot-pollen of *Melipona beecheii* collected in the backyard meliponaries in Yucatan, Mexico.....38
- Figure 3.** Melissopalynological spectrum of the pot-pollen samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.....38
- Figure 4.** Diversity (H') and evenness (J') indices in the pot-pollen and pot-honey samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.....39
- Figure 5.** PCA of the *Melipona beecheii* pot-pollen samples collected in Yucatan, Mexico.....40
- Figure 6.** Cluster analysis of the pot-pollen samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.....41
- Figure 7.** Percentages of the botanical families registered in the pot-honey of *Melipona beecheii* collected in the backyard meliponaries in Yucatan, Mexico.....44
- Figure 8.** Melissopalynological spectrum of the *Melipona beecheii* pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.....44
- Figure 9.** PCA of the *Melipona beecheii* pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.....45

Figure 10. Cluster analysis for the pot-honey samples from <i>Melipona beecheii</i> collected in Yucatan, Mexico.....	46
Figure 11. Comparative PCA between the <i>Melipona beecheii</i> pot-pollen and pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.....	47
Figure 12. Comparative cluster between the <i>Melipona beecheii</i> pot-pollen and pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.....	48
Figure 13. Melissopalynological spectrum of the nectariferous plants recovered from the pot-honey samples of <i>Melipona beecheii</i> collected in Yucatan, Mexico.....	51
Figure 14. Pollen grains acetolysed from the pot-pollen and pot-honey samples of <i>Melipona beecheii</i> in Yucatan, Mexico.....	52

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Meliponario de construcción tradicional con colonias de <i>Melipona beecheii</i> en cajas de madera de un meliponario de traspatio en Tekax, Yucatán, México.....	64
Figura 3.2. Dendrograma realizado con una matriz de disimilaridad de Bray-Curtis con datos de presencia-ausencia de especies de polen en las muestras.....	71
Figura 3.3. Análisis de Componentes Principales (PCA) para explorar la variación en la composición de especies de granos de polen en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de <i>Melipona beecheii</i> en meliponarios tradicionales del estado de Yucatán, México.....	73
Figura 3.4. Abundancia de microorganismos entre los tres ambientes: pan de abeja, miel e intestinos de <i>Melipona beecheii</i> . Se presentan datos observados más mediana y los cuartiles predichos: A) bacterias; B) levaduras.....	77
Figura 3.5. Coeficientes de regresión para abundancia de bacterias y levaduras contabilizadas en preparaciones fijas. Pan de abeja: valor numérico de referencia 0.0; PC1 Y PC2: composición y abundancia de granos de polen.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 1

Cuadro 1.1. Estudios melisopalinológicos en México.....	7
--	---

CAPÍTULO 2

Table I. List of towns where pot-pollen and pot-honey samples were collected in Yucatan, Mexico.....	33
---	----

Table II. Percentages of pollen spectra recorded in pot-pollen samples of <i>Melipona beecheii</i> in Yucatán.....	36
---	----

Table III. Principal component analysis (PCA) of the <i>Melipona beecheii</i> pot-pollen spectrum...39	
---	--

Table IV. Percentages of pollen spectra recorded in pot-honey samples of <i>Melipona beecheii</i> in Yucatan.....	42
--	----

Table V. Principal component analysis (PCA) of the <i>Melipona beecheii</i> pot-honey spectrum...45	
--	--

Table VI. Comparative principal component analysis (PCA) between the <i>Melipona beecheii</i> pot-pollen and pot-honey spectra.....	47
--	----

Table VII. Percentages of nectariferous plants recorded in pot-honey of <i>Melipona beecheii</i> samples in Yucatan.....	49
---	----

CAPÍTULO 3

Cuadro 3.1. Peso del pan de abeja y volumen de miel por pote en colonias de <i>Melipona beecheii</i> de meliponarios tradicionales en ocho localidades del estado de Yucatán. Los potes eran recién cerrados.....	69
--	----

Cuadro 3.2. Tipos polínicos registrados en las muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo de <i>Melipona beecheii</i> en meliponarios tradicionales de estado de Yucatán, México. En el cuadro, se muestra el número de granos de polen por especie de planta contabilizados en las preparaciones de microscopía.....	70
--	----

Cuadro 3.3. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los tipos polínicos encontrados en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* en Yucatán, México.....72

Cuadro 3.4. Estadística descriptiva de la abundancia observada de bacterias y levaduras por meliponarios en muestras de en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* en Yucatán, México.....75

Cuadro 3.5. Análisis de regresión binomial negativa para estimar diferencias en la abundancia de bacterias y levaduras entre los ambientes de pan de abeja, aparato digestivo y miel de potes cerrados en colonias de *Melipona beecheii* y la influencia de la composición de especies de polen y la abundancia de granos de polen contenidos en las muestras.....76

RESUMEN

La abeja sin aguijón *Melipona beecheii*, o abeja maya, ha sido utilizada desde la civilización Maya y continúa siendo importante en la actualidad. Se cría en pequeños cobertizos (meliponarios) que albergan colonias de abejas, una práctica conocida como meliponicultura. Esta práctica tradicional enfrenta desafíos por la reducción dramática de las áreas de vegetación restringiendo las fuentes de alimento para las abejas. La disminución de las fuentes de polen y néctar, así como la pérdida de interacciones poco consideradas como las que ocurren entre recursos florales, microorganismos, abejas y alimento almacenado, podrían conducir al colapso rápido de las colonias. En la península de Yucatán, se han identificado más de 900 especies de plantas importantes para la producción de miel, clasificadas en 81 familias y 332 géneros. Adicionalmente, se han encontrado microorganismos en el polen y néctar que visitan las abejas, en los intestinos de las abejas y en el alimento almacenado dentro de sus nidos. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre cuáles son las fuente de alimento de polen y néctar más importantes para las abejas es escaso y tampoco se entiende la relación entre la diversidad del polen con la abundancia de microorganismos presentes en distintos compartimientos esenciales para la alimentación de las abejas. El objetivo de esta tesis fue analizar mediante enfoques melisopolinológicos y microbiológicos, el comportamiento de recolección de polen y la relación entre la abundancia de bacterias y levaduras con la diversidad de polen entre el pan de abeja, miel e intestinos en muestras de ocho meliponarios en el estado de Yucatán. Los resultados mostraron que en el pan de abeja hubo 21 tipos de polen de 8 familias botánicas, en la miel 32 tipos de 16 familias y en los intestinos 5 tipos polínicos de 4 familias. Las especies más importantes fueron *Bursera simaruba*, *Bursera schlechtendalii*, *Cochlospermum vitifolium*, *Lonchocarpus punctatus* y *Senna racemosa* en pan de abeja; *Alternanthera ramosissima*, *B. simaruba*, *B. schlechtendalii*, *C. vitifolium*, *L. punctatus*, *Mimosa bahamensis*, *Psidium guajava*, *S. racemosa* y *Solanum americanum* en miel; y *S. racemosa*, seguida de *B. simaruba* y *A. ramosissima* en los intestinos. En cuanto a los microorganismos, el pan de abeja y los intestinos tuvieron la mayor abundancia de células microbianas. Las bacterias fueron más abundantes en el pan de abeja, mientras que las levaduras lo fueron en el intestino. La miel, por el contrario, presentó la menor abundancia de microorganismos. La relación general entre las células microbianas y la abundancia de polen para pan de abeja, miel e intestinos, es que la abundancia de polen influye positivamente en la abundancia de levaduras, pero negativamente, aunque ligeramente, en la abundancia de bacterias. Las especies que detonan esta relación son *A. ramosissima* y *B. simaruba*, promoviendo la abundancia de levaduras y, *S. racemosa* y *B. schlechtendalii* restringiendo la de bacterias. Los resultados son importantes para la conservación de la abeja maya y brindan información valiosa para la conservación de la meliponicultura.

ABSTRACT

The stingless bee, *Melipona beecheii*, also known as the Mayan bee, has been used since the time of the Mayan civilization and continues to be important today. It is farmed in small sheds (meliponaries) that house colonies of bees, a practice referred to as meliponiculture. This traditional practice is challenged by the significant loss of vegetation areas, restricting food sources for bees. Reduced availability of pollen and nectar, along with the loss of poorly understood interactions between floral resources, microorganisms, bees, and nest-stored food, could lead to rapid colony collapse. In the Yucatan Peninsula, over 900 plant species important for honey production have been identified, classified into 81 families and 332 genera. Microorganisms have been found in pollen and nectar that bees use, in the guts, of bees, and in food stored in bee nests. However, our understanding of which pollen types are most important to bees is limited, and the relationship between pollen and microorganisms in compartments essential for bee feeding remains unclear. The aim of this thesis was to analyze the diversity of pollen collected by *M. beecheii*, and to explore the relationship between the abundance of bacteria and yeasts and the diversity of pollen in beebread, honey, and bee guts. This analysis utilized melissopalynological and microbiological methods, with samples taken from eight meliponaries in the state of Yucatan. The study identified 21 types of pollen from 8 botanical families in beebread, 32 types from 16 families in honey, and 5 types of pollen from 4 families in guts. The most significant pollen species found in beebread included *Bursera simaruba*, *Bursera schlechtendalii*, *Cochlospermum vitifolium*, *Lonchocarpus punctatus* and *Senna racemosa*. In honey, key species included *Alternanthera ramosissima*, *B. simaruba*, *B. schlechtendalii*, *C. vitifolium*, *L. punctatus*, *Mimosa bahamensis*, *Psidium guajava*, *S. racemosa* and *Solanum americanum*. In the guts, *S. racemosa* was the most important, followed by *B. simaruba* and *A. ramosissima*. Regarding microorganisms, beebread and gut contents exhibited the highest abundance of microbial cells. Bacteria were more abundant in beebread, while yeasts were more prevalent in the gut. Honey, on the other hand, had the lowest abundance of microorganisms. The relationship between the abundance of microbial cells and pollen indicated that pollen positively influenced yeast abundance, but negatively affected bacteria. Pollen species that promoted yeast abundance included *A. ramosissima* and *B. simaruba*, while *S. racemosa* and *B. schlechtendalii* decreased bacteria abundance. These findings are meaningful for the conservation of the Maya bee and provide valuable insights for the preservation of meliponiculture.

INTRODUCCIÓN

En la península de Yucatán, se han identificado más de 900 especies de plantas consideradas melíferas, agrupadas en 81 familias y 332 géneros, aprovechadas por los polinizadores, entre ellos las abejas nativas sin aguijón. En general, se han reportado 17 especies de abejas sin aguijón en esta región (Ayala, 1999), e históricamente la especie *Melipona beecheii* ha sido aprovechada desde la civilización maya hasta la actualidad. Su aprovechamiento y crianza se centra en las comunidades rurales que les genera ingresos y fortalece su economía familiar (González-Acereto *et al.*, 2006).

En el estado de Yucatán, existen más de mil meliponicultores dedicados a esta actividad, combinada principalmente con la agricultura (González-Acereto *et al.*, 2006). La mayor cantidad de meliponarios con colonias de *M. beecheii* se encuentran dentro de las comunidades rurales rodeadas por remanentes de selva baja caducifolia y selva mediana subcaducifolia, así como de áreas de uso agrícola (González-Acereto *et al.*, 2008). Las abejas colectan polen y néctar de especies arbóreas, arbustivas y herbáceas. Antes de ser consumido, el polen almacenado por las abejas pasa por un proceso de transformación a pan de abeja y el néctar en miel. Las condiciones propias de sus nidos y la acción de diversos microorganismos se ven involucradas en dichos procesos, además, juegan un papel importante en la salud de la abeja y son fundamentales para su supervivencia (Olofsson y Vázquez, 2008; Gilliam, 1979).

Durante la transformación del polen a pan de abeja y del néctar a miel se ven involucradas diversas bacterias y levaduras, las cuales, de acuerdo con el tipo de ambiente presentan diferentes abundancias. Especies particulares de granos de polen podrían ser un factor que favorece la abundancia de estos microorganismos (Caycedo *et al.*, (2021; Power *et al.*, 2009). El estudio de los granos de polen a través de la melisopalinología permite determinar las especies vegetales de las cuales las abejas obtienen sus recursos. En Yucatán, existen más 900 especies vegetales de importancia apícola, sin embargo, debido a la creciente urbanización, el incremento de las áreas de monocultivo, el uso indiscriminado de agroquímicos y las sequías prolongadas han provocado la reducción de la vegetación natural, afectando la disponibilidad de recursos de polen y néctar para *M. beecheii*. Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron a) documentar la diversidad de tipos polínicos presentes en las muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii* y determinar cuáles son las especies que aportan polen y néctar a las colonias de abejas establecidas en meliponarios tradicionales del

estado de Yucatán, esto a través de los análisis melisopalinológicos; b) indicar a través de métricas de diversidad el comportamiento de colecta de polen y néctar de la abeja; c) analizar la composición y abundancia de los tipos polínicos contenidos en el pan de abeja, miel y aparato digestivo; d) estimar y comparar la abundancia de bacterias y levaduras en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii* en preparaciones fijas de microscopía; y e) analizar la relación entre la abundancia de bacterias y levaduras con la composición de especies de granos de polen presentes en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii*. Los resultados obtenidos permitirán ampliar lo que se sabe sobre las especies vegetales que visitan estas abejas para obtener polen y néctar en Yucatán, y permitirá a los meliponicultores cultivar y mantener las especies néctar-polinífera resultantes de los análisis del pan de abeja y mieles de sus meliponarios, para que les permita mantener el desarrollo y la sanidad de las colonias de *M. beecheii*. Por otro lado, los resultados sobre la relación de la composición y abundancia de polen con la abundancia microbiana, contribuirá al conocimiento para entender aspectos sobre la dinámica entre esta relación, y conocer cómo afectan las especies polínicas sobre los microorganismos asociados al pan de abeja, miel y aparato digestivo.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Vegetación del estado de Yucatán

La vegetación, es el conjunto de plantas que crecen en un área geográfica, incluyendo diversas formas de crecimiento y tamaños (árboles, arbustos, hierbas y trepadoras) (Trejo-Torres, 2014; Miranda, 1958). La vegetación natural de la península de Yucatán tiene selvas muy variadas desde muy bajas hasta muy altas y su verdor y desarrollo dependen de la disponibilidad de agua (Miranda 1958). Muchos árboles y arbustos tiran sus hojas para conservar agua durante la época de escases de lluvias. En general, el clima de la región varía de acuerdo con la frecuencia y la cantidad de agua que cae, y se distinguen dos periodos a lo largo del año: el primero corresponde a la temporada de lluvias que se da en los meses de mayo a septiembre, y el segundo a la temporada de sequía en los meses de octubre a abril (Trejo-torres, 2014; Miranda, 1958). Las características climáticas, edáficas y las especies vegetales de un área determinada, conforman las comunidades vegetales. En la región, se han descrito comunidades de selvas bajas caducifolias, pastizales, dunas costeras, manglares, selvas medianas subperennifolias y selvas medianas subcaducifolias, entre otras (Durán y Méndez, 2010; Flores *et al.*, 2010, Miranda, 1958).

De acuerdo con la clasificación climática de Köppen (1936), la península de Yucatán presenta un clima cálido subhúmedo (Aw) con una temperatura media anual superior a 22 °C y una precipitación anual que varía entre los 700 y 1500 mm, con lluvias durante la temporada de verano. Se presenta una riqueza taxonómica de plantas vasculares de 2,329 especies agrupadas en 956 géneros y 161 familias, donde las familias más importantes son las Fabaceae, Poaceae, Asteraceae, Orchidaceae y Euphorbiaceae con 230, 216, 147, 132 y 113 taxones, respectivamente (Duno *et al.*, 2018; Carnevali, *et al.*, 2010). En el estado de Yucatán, se han reportado aproximadamente 1,584 especies de plantas, siendo 11 endémicas (Villaseñor *et al.*, 2014). Son dominantes los tipos de vegetación de selva baja caducifolia y selva mediana subcaducifolia. La primera abarca una extensión aproximada de 20,000 km², responde a una precipitación promedio anual que va de 728 a 1000 mm y a una temperatura promedio que oscila entre 26 y 27.6 °C. Está conformada por árboles que no rebasan los 12 m de altura, se desarrolla sobre suelos calcáreos con afloramientos de rocas y con un estrato muy delgado con una profundidad promedio de 7 cm. Las especies abundantes son *Bucida buceras*

(L.) C. Wright, *Bursera simaruba* (L.) Sarg., *Calyptanthes pallens* Griseb., *Cenostigma gaumeri* (Greenm.) Gagnon & G. P. Lewis., *Coccothrinax readii* H. J. Quero, *Croton reflexifolius* Kunth, *Eugenia axillaris* (Sw.) Willd., *Gymnanthes lucida* Sw., *Gymnopodium floribundum* Rolfe, *Jatropha gaumeri* Greenm., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, ssp. *Leucocephala*, *Lonchocarpus rugosus* Benth., *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth, *Mimosa bahamensis* Benth., *Piscidia piscipula* (L.) Sarg., *Pithecellobium keyense* Britton, *Plumeria obtusa* L., *Plumeria rubra* L., entre otros. La selva mediana subcaducifolia presenta una extensión aproximada de 29,309 km², responde a una precipitación entre 1078 y 1220 mm al año y a una temperatura media anual de 25.9 a 26.6 °C. Presenta un estrato arbóreo cuya altura promedio oscila entre 10 y 15 m, y en la época de secas de 50 a 75 % de sus árboles dejan caer sus hojas. Se desarrolla sobre suelos pedregosos, pero que contienen una delgada capa de materia orgánica. Entre las especies características de esta selva se encuentran los árboles más corpulentos de la flora de Yucatán: *Enterolobium cyclocarpum* Griseb., *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn., y algunas especies de *Ficus*. Entre los más abundantes se encuentran *B. buceras*, *B. simaruba*, *Byrsonima bucidifolia* Standl., *C. gaumeri*, *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Spreng., *Coulteria cubensis* (Greenm.) Sotuyo & G. P. Lewis, *Cedrela odorata* L., *Coccothrinax readii*, *Cordia dodecandra* DC., *Gymnanthes lucida* Sw., *G. floribundum*, *Gliricidia maculata* (Kunth) Kunth ex Walp., *L. rugosus*, *L. latisiliquum*, *M. bahamensis*, *Manilkara zapota* (L.) P. Royen, *Mastichodendron foetidissimum* (Jacq.) H. J. Lam, *Metopium brownei* (Jacq.) Urb., *P. piscipula*, *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied., *Handroanthus chrysanthus* (Jacq.) S. O. Grose, *Vachellia cornígera* (L.) Seigler & Ebinger y *Vitex gaumeri* Greenm (Miranda, 1958). Diversas especies que conforman a estos tipos de vegetación han sido clasificadas como melíferas.

1.2. Flora melífera y diversidad polínica del estado de Yucatán

La flora melífera o apícola, es el conjunto de especies vegetales que producen elementos o sustancias que las abejas colectan para su alimentación (Velandia *et al.*, 2012). En la región, se han identificado más de 900 especies de plantas consideradas melíferas, agrupadas en 81 familias y 332 géneros (CONABIO, 2018). Esta flora ha sido clasificada como plantas poliníferas, nectaríferas y néctar-poliníferas con formas de crecimiento vegetal arbórea, arbustiva, herbácea y trepadora. Las poliníferas son aquellas que las abejas utilizan principalmente como fuentes de polen, las nectaríferas de las que obtienen el néctar y las néctar-polinífera son aquellas plantas que producen tanto polen y néctar que aprovechan las abejas (Reyes y Rodríguez, 2005). En su conjunto, favorece la diversidad de tipos polínicos presentes en el área. Algunas especies importantes son *B. simaruba*, *Cochlospermum*

vitifolium, *G. floribundum*, *P. piscipula*, *Senna racemosa* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby var. *racemosa*, *Viguiera dentata* (Cav.) Spreng. var. *dentata*, entre otros (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018). La familia más abundante y estudiada en la región es Fabaceae, con 236 especies y 78 géneros (Duno de Stefano *et al.*, 2018), la cual ha sido reportada como una de las familias más importantes en México que incluye plantas poliníferas y nectaríferas (Ortiz Reyes *et al.*, 2022; López-Roblero *et al.*, 2021; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018, 2016; Roubik y Villanueva-Gutiérrez, 2009; Martínez-Hernández *et al.*, 1993). Esta flora es fundamental para la apicultura. Esta actividad en México es una de las principales actividades económicas dentro del sector agropecuario, ya que se encuentra entre los diez países más importantes en producción de miel a nivel mundial, posicionándose en el noveno lugar en 2017 (Baena-Díaz *et al.*, 2022). Factores como el clima, suelo y el néctar de las plantas que colectan las abejas, hacen que la miel producida en la península de Yucatán presente características organolépticas superiores a las de otras regiones y destaque en el mercado internacional (Alfaro *et al.*, 2010).

1.3. Interacción planta-abeja

La interacción planta-polinizador es considerada como una de las interacciones más particulares y complejas que existen. Son cruciales para la conservación y el funcionamiento del ecosistema (Pacini *et al.*, 2008). La mayoría de las plantas dioicas necesitan de un agente polinizador para transportar el polen de una flor a otra, y las abejas son las especies idóneas ya que son muy activas y visitan un gran número de flores. A través de la historia, las plantas han desarrollado mecanismos de atracción (flores de colores llamativos, la forma, estructura y textura de la flor, aromas) y recompensa (polen, néctar y resinas) que ha permitido establecer una fuerte asociación con las abejas (Pacini *et al.*, 2008; Niemeyer y Teiller, 2007). A cambio, las abejas proveen de servicios de polinización que permite mantener la continuidad de las poblaciones de las plantas. Las abejas de la subfamilia Apinae, han desarrollado estructuras especializadas como la corbícula o canasta de polen que les sirven para colectar y transportar de manera más eficiente el polen a la colmena. De manera indirecta, parte del polen se queda adherido y es transportado hacia otras flores que visita la abeja, favoreciendo la polinización cruzada. Aproximadamente la mitad de los animales que polinizan las plantas son abejas que han establecido interdependencia simbiótica con la flora nativa (Proctor *et al.*, 1996; Martínez-Hernández *et al.*, 1993). Las abejas visitan determinadas especies y de acuerdo con los taxones y familias que visita, pueden ser clasificadas como monolético, oligolético y polilético. Monolético se refiere a las abejas que forrajea pocas especies de plantas dentro del mismo género para obtener polen y néctar; oligolético se aplica a abejas que se limitan a

unas pocas especies de plantas de diferentes géneros, pero de la misma familia, y polilético corresponde a las abejas que forrajean para obtener polen y néctar de diversas especies de plantas de diferentes familias botánicas (Proctor *et al.*, 1996). A través de los estudios melisopalinológicos, podemos conocer las especies de plantas que forrajean o visitan las abejas para obtener polen y néctar, y conocer el comportamiento de colecta de recursos de las abejas.

1.4. Estudios melisopalinológicos

La melisopalinología, es el área de la palinología que se encarga del estudio de los granos de polen contenido en las mieles, alimento larval, cargas de polen, propóleo y resinas; permite determinar la diversidad o la variedad de tipos polínicos contenidos en las muestras a través de la descripción de las características morfológicas de la pared del polen (Von Der Ohe *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2002). Los estudios melisopalinológicos son importantes ya que permiten conocer cuáles son las especies importantes que visitan las abejas, cómo cambian las especies dependiendo de la estación del año, del tipo de vegetación circundante al meliponario, vegetación secundaria, y presencia de cultivos; además, ayudan a calcular la riqueza, diversidad y su origen botánico (Castellanos-Potenciano, 2012; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2011; Martínez-Hernández *et al.*, 1993).

En México, los análisis melisopalinológicos se iniciaron en la década de los ochenta, y estuvieron centrados en la abeja *Apis mellifera* por su importancia en la actividad agropecuaria; a partir de la década de los noventa, se incrementaron notablemente estos estudios hacia abejas nativas. Se han realizado diversos estudios melisopalinológicos en el polen almacenado, mieles y cargas de polen de *A. mellifera* y abejas nativas, lo anterior, con la finalidad de conocer las especies de vegetales de las que obtienen polen y néctar. En el cuadro 1, se muestran algunos trabajos de melisopalinología realizados en distintos estados de México.

Cuadro 1.1. Estudios melisopalinológicos en México.

Estado	Abeja	Especies botánicas	
Chiapas	<i>Nannotrigona testaceicornis</i> , <i>Plebeia</i> sp., <i>Scaptotrigona mexicana</i> y <i>Trigona</i> (<i>Tetragonisca</i>) <i>angustula</i>	54 especies pertenecientes a 31 familias botánicas en mieles, cargas de polen y alimento larval durante un periodo anual. Taxa de importancia: <i>Ageratum houstonianum</i> Mill., <i>Alchornea latifolia</i> Sw., <i>Citrus limonia</i> (L.) Osbeck, <i>Coffea arabica</i> y <i>Trema micrantha</i> (L) Blume.	Martínez-Hernández <i>et al.</i> , 1993
Oaxaca	<i>Apis mellifera</i>	29 familias en mieles. Taxa de importancia: <i>Bursera simaruba</i> , <i>Clethra mexicana</i> DC., <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz & Pav.) Cham., <i>Lonchocarpus</i> sp., <i>Mangifera indica</i> L., <i>Miconia argentea</i> , <i>Orbignya cohune</i> (Mart.) Dahlgren ex Standl., <i>Quercus</i> sp., <i>Heliocarpus donnellsmithii</i> y <i>Ceiba</i> sp.	Ramírez-Arriaga <i>et al.</i> , 2011
Península de Yucatán	<i>A. mellifera</i>	Más de 40 tipos polínicos pertenecientes a más de 28 familias botánicas en mieles.	Ramos-Díaz <i>et al.</i> , 2015; Alfaro <i>et al.</i> , 2010
Puebla	<i>A. mellifera</i> y <i>S. mexicana</i>	14 especies botánicas en mieles <i>A. mellifera</i> y 24 especies en mieles de <i>Scaptotrigona mexicana</i> . Taxa de importancia: <i>Ageratum houstonianum</i> Mill. (Asteraceae), <i>Bursera</i> sp., <i>B. simaruba</i> . (Burseraceae), <i>Coffea arabica</i> L. (Rubiaceae), <i>Heliocarpus donnellsmithii</i> Rose (Tiliaceae, <i>Miconia argentea</i> (Sw.) DC. Melastomataceae, <i>Muntingia</i> spp. (Tiliaceae), <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr. (Myrtaceae, <i>Quercus</i> sp. Fagaceae y <i>Vernonia</i> sp. (Asteraceae).	Ramírez-Arriaga y Martínez-Hernández, 2007
Quintana Roo	<i>Melipona beecheii</i>	32 especies en polen almacenado. Familias importantes: Bixaceae, Burseraceae, Fabaceae, Myrtaceae y Solanaceae. Taxa de importancia: <i>B. simaruba</i> , <i>Cochlospermum vitifolium</i> , <i>Euphorbia</i> sp., <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp., <i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urb.,	Villanueva-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2018

		<p><i>Pouteria reticulata</i> (Engler) Eyma ssp. <i>reticulata</i>, <i>P. guajava</i>, <i>Solanum</i> sp., <i>Senna</i> sp., <i>Thrinax radiata</i> Lodd. ex Schult. & Schult. f. y <i>Viguiera dentata</i>.</p>	
Región Centro y Norte de Guerrero (Tixtla de Guerrero)	<i>A. mellifera</i>	<p>Región Centro: 30 especies pertenecientes a 20 familias botánicas en mieles y 17 especies pertenecientes a 13 familias en cargas de polen. Taxa de importancia: <i>Cosmos sulphureus</i> Cav., <i>Dyssodia papposa</i> (Vent.) Hitchc., <i>Heliocarpus donnellsmithii</i>, <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit, ssp. <i>Leucocephala</i>, <i>Paullinia</i> sp., <i>Tithonia tubaeformis</i> (Jacq.) Cass. y <i>Quercus</i> sp.</p> <p>En la región Norte: 24 especies pertenecientes a 14 familias botánicas en mieles. Taxa de importancia: <i>C. sulphureus</i>, <i>T. tubaeformis</i> y <i>Vernonia</i> sp.</p>	Ramírez-Arriaga et al., 2016
Tabasco	<i>A. mellifera</i>	<p>47 especies pertenecientes a 25 familias botánicas. Taxa de importancia: <i>Citrus</i> sp., <i>Cocos nucifera</i> L., <i>Mimosa</i> sp., <i>Mimosa orthocarpa</i> Spruce ex Benth., <i>Psidium guajava</i> L., <i>Acalypha</i> sp., <i>B. simaruba</i>, <i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol., <i>Celtis</i> sp., <i>Heliocarpus</i> sp., <i>Mimosa albida</i> Humb. & Bonpl. ex Willd., <i>Piper</i> sp. y <i>Quercus</i> sp.</p>	Córdova-Córdova et al., 2013

Para documentar cuales son las especies vegetales que forrajean las abejas, se realizan las identificaciones y conteos de los granos de polen contenidos en las muestras de pan de abeja, mieles, propóleo, entre otros, y de acuerdo con sus frecuencias se clasifican como polen predominante (cuando un tipo polínico presenta porcentajes igual o mayor al 45 % del total de los tipos polínicos encontrados en la muestra), polen secundario (16-45 %), polen de menor importancia (3-15 %) y polen menor (≤ 3 %) (Louveaux *et al.*,1978). Estas abundancias son importantes para determinar la importancia de las especies vegetales de las que obtienen polen y néctar, y poder caracterizar el origen botánico de las mieles. Las mieles son caracterizadas como miel monofloral (cuando en la miel un tipo polínico predomina presentando un porcentaje mayor o igual al 45 % del total de los tipos polínicos encontrados), bifloral (cuando dos tipos de polen tuvieron porcentajes secundarios 16-45 %) y multifloral (cuando tres o más tipos polínicos presentaron porcentajes mayores al 10 %) (NOM-004-SAG/GAN-2018).

1.5. Índice de diversidad Shannon y Weaver (1949) y uniformidad (Pielou, 1977)

En melisopalinología, los análisis de diversidad son importantes porque permiten conocer la composición de las especies vegetales y proporciona una medida cuantitativa, lo que es fundamental para entender la complejidad de la comunidad vegetal que pecorean las abejas para obtener polen y néctar. Permite evaluar cambios en la diversidad de especies vegetales y conocer las estrategias de pecoreo de la abeja. En los análisis melisopalinológicos se emplean los índices de diversidad de Shannon y Weaver (1949) y el índice de uniformidad (Pielou, 1977).

El índice de diversidad Shannon y Weaver (1949) (H') permite cuantificar la riqueza de los tipos polínicos presentes en las muestras de miel, polen almacenado, propóleo etc., considera la variedad de los tipos polínicos y la proporción en la que se presentan. Proporciona una información más clara sobre la complejidad vegetal, a través de la formula:

$$H' = -\sum_i^n p_i \cdot \ln \cdot p_i,$$

Donde:

n = número de individuos de todas las especies

$i = 1$

p_i = proporción de individuos de cada especie respecto al total

\ln = logaritmo natural

H' = resultado de la ecuación que normalmente varía entre 0.5 y 5. Menor a 2 es bajo y mayor a 3 es alto con relación a diversidad.

El índice de uniformidad (Pielou, 1977) (J'), mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada, sus valores van de 0 a 1, de forma que 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes. Nos indica el probable comportamiento de forrajeo, cuando los valores de J' son cercanos a cero indican un forrajeo heterogéneo (no todas las especies son igual de abundantes) o que obtuvieron sus recursos de diversas especies vegetales dentro de las cuales algunas son de mayor importancia, por el contrario, cercanos a 1 indican que los recursos se explotan de forma homogénea (todas las especies son igual de abundantes) o que forrajea de diversas especies siendo todas igual de importantes.

Uniformidad $J' = H'/H' \text{ max}$, donde H' es la diversidad de Shannon y Weaver y $H' \text{ max}$ es el logaritmo natural del número total de tipos polínicos presentes en las muestras.

1.6. Morfología del polen

El polen es un elemento importante en la dieta de las abejas. Aporta proteínas, lípidos y vitaminas, los cuales varían dependiendo de la especie vegetal (Yang *et al.*, 2013). El término polen proviene del latín *pollen-inis* que significa “polvo muy fino”. Se forma en los estambres de la planta a partir de una célula madre que, a través de divisiones meióticas, darán origen a los granos de polen mediante el proceso de la microsporogénesis. La microsporogénesis puede ser de dos tipos: sucesiva o simultánea. En la microsporogénesis sucesiva la célula madre pasa por un proceso de meiosis I en la cual ocurre división del núcleo y el citoplasma, y esta división da origen a dos células separadas por paredes de calosa. Posteriormente, ocurre una segunda meiosis que dará origen a cuatro células divididas por la pared calosa y darán origen a cuatro granos de polen unidos en forma de tétrada tetragonal. En la microsporogénesis simultánea durante la meiosis I ocurre la división del núcleo y el citoplasma, sin embargo, no se forma la pared de calosa. Al final de la meiosis II se forma la pared que divide a las monadas o granos de polen, dando origen a granos unidos en forma de tétrada tetraédrica. Durante el desarrollo del polen, las células tapetales cumplen con funciones importantes como la de proveer nutrientes a las microesporas (polen en desarrollo), además, participan en la formación de la pared del polen, formación del polen kit y añaden moléculas en la pared responsables de la incompatibilidad esporofítica (Laín, 2004; Pacini, 1990). Una vez maduro el polen, durante la

antes de ser liberados en forma de tétradas, monadas individuales, polinias, poliadas u otra agregación, ya sea unidos por hilos de vicina o polen kit. Los granos de polen serán transportados hasta el estigma receptivo de las plantas por medio de un componente abiótico como el viento, agua, o algún factor biótico como insectos, aves y otros vertebrados.

El polen está constituido por una capa externa llamada exina y una capa interna llamada intina. La exina es una capa de esporopolenina resistente a la acción de los ácidos y bases concentradas. Sin embargo, es una capa que presenta cierta elasticidad y plasticidad, permitiendo al grano de polen adaptarse a las condiciones ambientales de cambio de volumen y forma mediante el proceso de harmomegata. Para referirnos a las capas que la conforman se utilizan dos nomenclaturas, la primera cuando la visualizamos en un microscopio electrónico de transmisión, los términos empleados son ectexina y endexina (Faegri, 1956). La ectexina es la capa más externa y está conformada por los elementos esculturales, tectum, columela y la capa basal, y debajo de esta se encuentra la endexina. La segunda nomenclatura se emplea en observaciones al microscopio óptico: sexina y nexina (Erdtman, 1952). En la sexina podemos encontrar a los elementos supracteales, tectum y la columela; la nexina, engloba la capa basal y la endexina. La intina es la capa más interna de la pared del grano de polen y está compuesta por celulosa, pectinas y glucoproteína; no es resistente a los ácidos y se destruye fácilmente con la acetólisis (Figura 1.1).

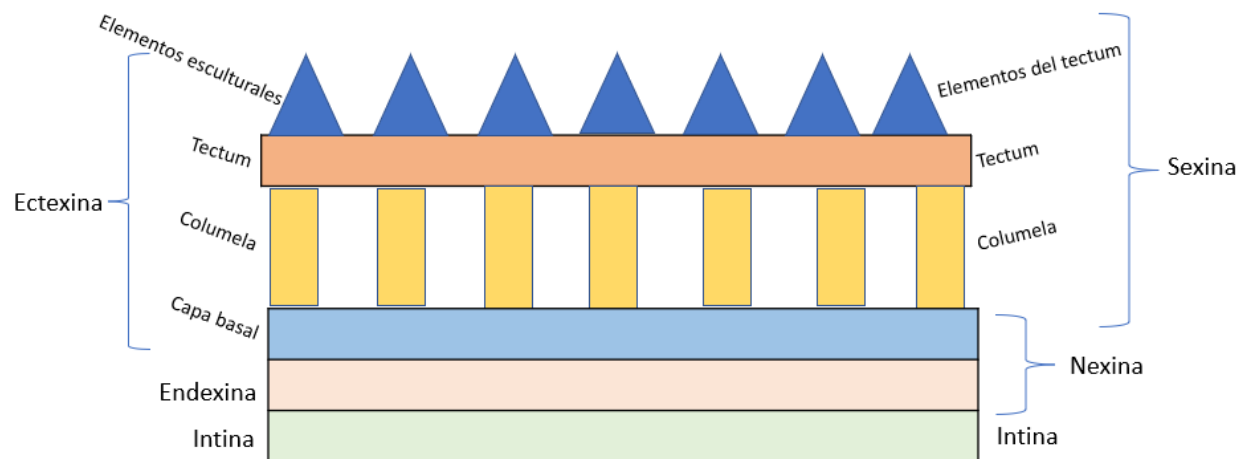


Figura 1.1. Capas de la pared de un grano de polen (adaptado de Punt *et al.*, 2007).

El polen presenta una morfología definida y permite determinar en la mayoría de los casos, el taxón del cual procede a través de la morfología de la pared. Los principales caracteres

utilizados para las descripciones palinológicas son la polaridad y simetría, forma y tamaño, número y posición de las aberturas, estructura, escultura y ornamentación.

Polaridad y simetría: Durante su proceso de formación, el polen se encuentra asociado en tétrada, producto de la microsporogénesis. En esta etapa se puede determinar la polaridad y el tipo de abertura. En cada mónada que conforma la tétrada se pueden distinguir dos caras, la cara polar proximal y la cara polar distal. La cara polar proximal está orientada hacia el interior de la tétrada y la cara polar distal es la que se encuentra opuesta a la cara polar proximal. Por otro lado, en cada mónada podemos trazar líneas imaginarias para establecer el eje polar y el eje ecuatorial. El eje polar es la línea recta imaginaria que pasa por el centro de la monada hacia el centro de la tétrada, pasa por el centro de la cara polar proximal y distal, y el eje ecuatorial es la línea recta imaginaria que separa la cara polar proximal y distal. Los granos de polen pueden ser polares o apolares. Los apolares no presentan una clara polaridad, y los polares pueden ser isopolares cuando las caras polar proximal y distal son iguales. Son heteropolares cuando hay una diferencia entre la cara polar proximal y distal. La simetría del grano de polen se define siempre en vista polar y ecuatorial. Puede ser bilateral con dos planos verticales de simetría o radial cuando existe más de dos planos verticales de simetría.

Forma y tamaño: Los granos de polen tienen volumen. En los microscopios se describe la forma en vista polar y ecuatorial. Para definir la forma, deben medirse en vista ecuatorial el eje polar (P) y el eje ecuatorial (E) y la relación P/E define la forma de los granos de polen. Las formas de los granos de polen pueden ser oblado, oblado esferoidal, peroblado, perprolado, prolado, prolado esferoidal, suboblado o subprolado (Punt *et al.*, 2007; Erdtman, 1943).

Aberturas: Son áreas delgadas y especializadas de la pared del polen, pueden ser simples o compuestas. Las aberturas simples pueden ser poros, colpos o sulcos. En las aberturas compuestas la ectoabertura se encuentran en la sexina/ectexina, y la endoabertura en la endexina/nexina, y las mesoaberturas algunas veces se encuentran en una posición media entre la ecto y endo abertura. Las aberturas funcionan como sitios de germinación permitiendo la salida del tubo polínico, también posibilitan la ruta de transferencia de agua y otras sustancias hacia el citoplasma, y la pared se adapta a estos cambios de hidratación (Punt *et al.*, 2007).

Estructura, escultura y ornamentación: La escultura y estructura fueron estudiadas desde los años 30 por Potonié (1934), Iversen y Troels-Smith (1950), Faegri y Iversen (1964). La

estructura corresponde a la construcción interna de la pared de polen y la escultura a los elementos superficiales de la pared que aparecen como un relieve, se proyectan hacia afuera de la superficie del polen. La ornamentación está formada por los elementos esculturales que se disponen sobre la superficie, son muy diversos pueden ser gemas, báculos, espinas, verrugas, clavos, estrías, entre otros (Punt *et al.*, 2007).

Las descripciones de estos caracteres serán utilizadas para determinar la procedencia de los granos de polen y determinar el origen botánico de las mieles con la ayuda de estudios previos, catálogos palinológicos, artículos especializados y colecciones palinológicas existentes.

1.7. Microorganismos asociados a los recursos florales y a las abejas

El polen, el néctar, el pan de abeja, el alimento larval y la miel se encuentran colonizados por diversos microorganismos adaptados a las condiciones para subsistir en esos ambientes. Los microorganismos son un grupo diverso que incluye bacterias, hongos y levaduras. En las colonias de las abejas estos pueden ser clasificados en tres tipos: patógenos, que causan enfermedades dentro de las colonias; benignos (comensales) y beneficiosos (Evans y Armstrong, 2006). Muchos microorganismos benéficos inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos, otros ayudan en la predigestión de los alimentos, a la conservación y transformación del polen y néctar en pan de abeja y miel, respectivamente (Menezes *et al.*, 2013; Gilliam, 1997). Las interacciones entre microorganismos-recursos-abejas presentan una larga historia evolutiva (Gilliam *et al.*, 1990).

1.7.1. Microorganismos en el pan de abeja y en la miel

El polen y el néctar son los recursos tróficos para los polinizadores. Se han descrito grupos importantes de microorganismos que los habitan y participan en el proceso de transformación a pan de abeja y a miel, además, protegen dichos alimentos contra agentes dañinos (Menezes *et al.*, 2013; Gilliam, 1997).

En el polen, ocurren cambios fisicoquímicos y microbiológicos que comienzan desde el momento en que las abejas lo humedecen con secreciones y néctar almacenado en el buche melario para empaquetarlo y transportarlo a la colmena (Gilliam *et al.*, 1988). Muchos microorganismos transferidos de estas secreciones hacen que la mezcla de polen baje el pH y así comience un proceso de fermentación que cambian la naturaleza del polen antes de ser

almacenado y consumido por las abejas. La conversión del polen a pan de abeja es un proceso de varias fases que ocurren después de su almacenamiento en las celdas o potes de alimento. La primera fase es la sucesión microbiana que dura unas 12 horas y se caracteriza por el desarrollo de un grupo heterogéneo de microorganismos entre los que se encuentran las bacterias y levaduras. En la segunda fase hay un incremento de bacterias ácido-lácticas (*Streptococcus*), que utilizan factores de crecimiento producidos por las levaduras y muchas bacterias ambientales para reducir el pH del polen. En la tercera fase, el crecimiento de las bacterias como *Streptococcus* se interrumpe, pero hay un aumento de *Lactobacillus* (Gilliam, 1979). *Pseudomonas* también está presente y posiblemente contribuyen a la anaerobiosis requerida por *Lactobacillus* para la predigestión de los granos de polen (Klungness y Peng, 1984). Las primeras tres fases de la conversión del polen en pan de abeja duran unos 7 días. En la cuarta fase, el proceso de fermentación de las bacterias ácido-lácticas se completa aproximadamente en 15 días, aunque los microorganismos permanecen durante varios meses. Las levaduras están presentes inicialmente en pequeñas cantidades, pero luego aumentan después de la fermentación y permanecen en el polen almacenado por más tiempo que otros microorganismos (Gilliam, 1979).

En el pan de abeja de *A. mellifera* se han reportado la presencia de más de 31 aislados bacterianos, la mayoría Gram positivos pertenecientes a *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, bacterias que producen ácido láctico y acético, y que intervienen en el proceso de transformación del polen almacenado (Vázquez y Olofsson, 2009). Al igual, han reportado diversas especies del género *Bacillus*, entre estas a *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y *B. thuringiensis* (Gilliam, 1979). También han reportado a *Arthrobacter* sp., *Fructobacillus fructosus*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus* firm5, *Micrococcus* sp., *Melissococcus plutonius*, *Streptococcus* sp. y bacterias del orden Actinomycetales, así, como las bacterias Gram negativas *Gilliamella* sp., *Pseudomonas* sp., *Parasacharribacter apium*, *Yersinia* sp. y bacterias del orden Xanthomonadales (Beux *et al.*, 2022; Floyd *et al.*, 2020; García *et al.*, 2006). También han reportado levaduras del género *Metschnikowia*, *Starmerella* (*Candida*) y *Zygosaccharomyces* (Detry *et al.*, 2020).

En el pan de abeja de *Melipona fasciata* se han reportado cepas muy activas de *Bacillus* spp. que producen enzimas proteolíticas, carbohidrasas, caprilato esterasa-lipasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa, fosfatasa alcalina, butirato esterasa, leucina aminopeptidasa, quimotripsina, fosfatasa ácida, fosfoamidasa y alfa-glucosidasa; enzimas que intervienen en la transformación del polen convirtiendo en alimentos más digeribles (Gilliam *et al.*, 1990). En

Nannotrigona testaceicornis han reportado a bacterias corineformes, bacterias de la familia Lactobacillaceae, de la clase Bacilli, así, como cocos de las familias Micrococcaceae y Streptococcaceae (Gavazzoni *et al.*, 2022). En *Tetragonisca angustula* han reportado a la levadura *Starmerella meliponinorum* (Rosa *et al.*, 2003).

En el néctar, las levaduras son los organismos más abundantes, pueden originar cambios en su concentración y en su composición (Herrera *et al.*, 2008; Canto *et al.*, 2008). En el néctar de *Hibiscus* sp. y *Ruellia* sp. han reportado la abundancia de los géneros *Candida*, *Kodamaea*, *Metschnikowia* y *Wickerhamiella* (Saluja y Prasad, 2008; Lachance *et al.*, 1999). Otros estudios realizados en *Hibiscus rosa-sinensis* L. y *Ixora coccinea* Comm. ex Lam. reportaron abundancia de las levaduras *Bensingtonia miscanthi*, *Bullera pyricola*, *Candida succiphila*, *Debaryomyces castellii*, *Mrakia frigida*, entre otros (Mushtaq *et al.*, 2006). Por su parte, Herrera *et al.* (2009), reportaron altas abundancias de levaduras en el néctar de 37 especies de plantas analizadas del sur de la península Ibérica (España) y la península de Yucatán al oeste de México.

La transformación del néctar a miel no solo involucra cambios fisicoquímicos por enzimas diastasas, sino que también involucra la participación de estos microorganismos (Pozo *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2009; Canto *et al.*, 2007). La miel es la principal fuente de carbohidratos para las abejas; es una solución viscosa alta en azúcares, principalmente fructosa y glucosa (85-95 %), además, contiene agua, cenizas, proteína, trazas de vitaminas y otras sustancias. Las mieles de las abejas sin aguijón presentan un alto contenido de agua, condiciones muy ácidas, alta presión osmótica y presencia de compuestos antimicrobianos que limita la sobrevivencia de microorganismos, siendo específicos los que logran establecerse (Teixeira *et al.*, 2003; Gilliam *et al.*, 1990). En la miel de *A. mellifera* han reportado la presencia de más de 21 especies bacterianas, destacando entre las más abundantes a *Lactobacillus kunkeei* (85.6 %), Acetobacteraceae (6.1 %), *Lactobacillus*, *Sphingomonas yunnanensis* y *Fructobacillus* (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022). Floyd *et al.*, (2020) y Olofsson y Vázquez (2008) reportaron a *Lactobacillus kunkeei* y *Lactobacillus* firm5 como las más abundantes, otras especies reportadas fueron *Melissococcus plutonius*, *Parasacharribacter apium*, *Fructobacillus fructosus*, Actinomycetales y las Gram negativas *Gilliamella apicola* y Xanthomonadales. En las mieles de *Melipona beecheii* han reportado una riqueza bacteriana de 12 especies, con la abundancia de bacterias Gram positivas de la familia Lactobacillaceae (78.6 %) y *Pediococcus* (21.1 %) (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022). La familia Lactobacillaceae ha sido reportada al igual en mieles de *Lepidotrigona*, así como en el aparato digestivo de las abejas lo que podría indicar que es un taxa habitual de las abejas y de ahí se transfieren a las mieles (Tang *et al.*, 2021; Lashani *et*

al., 2020; Tamarit *et al.*, 2015). En *Melipona fasciata* han reportado a *Bacillus megaterium*, *B. circulans* y *B. alvei* muy activos metabólicamente (Gilliam *et al.*, 1990). Para *Nannotrigona testaceicornis* han reportado a bacterias corineformes, bacterias de la clase Bacilli, de la familia Lactobacillaceae y Micrococcaceae (Gavazzoni *et al.*, 2022). En *Tetragonisca angustula* a *Bacillus* spp., en especial a *B. pumilus*, *Clostridium* spp., y en menor abundancia a *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y a las Gram negativas *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* (Beux *et al.*, 2022; Pucciarelli *et al.*, 2014).

En cuanto a la presencia de hongos, en la miel de *A. mellifera*, han reportado más de 22 especies, entre las abundantes a *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces siamensis*, *Aspergillus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Sterigmatomyces halophilus*, *Hannaella sinensis*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Diutina catenulata*, *Periconia*, *Xylariales*, *Metarhizium*, *Dactylaria fragilis*, *Cladosporium*, *Aureobasidium pullulans*, *Flabellascoma cycadicola*, entre otros (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022). Para *M. beecheii* han reportado 14 especies con abundancias mayores al 1 %, entre las abundantes a *Zygosporium pseudogibbum*, *Kodamaea ohmeri* y *Cladosporium sphaerospermum*, además de *Aspergillus*, *Cladosporium* spp., *Moniliella Wickerhamomyces sydowiorum*, *Wickerhamiella versatilis*, y levaduras como *Candida* spp., en especial *Candida apicola* (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022). En *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* y *Frieseomelitta varia*, se ha documentado una fuerte asociación con levaduras del género *Candida*, así como *Aureobasidium pullulans*, *Kodamaea ohmeri*, *Rhodotorula* spp., *Starmerella meliponinorum* y Tipo *Zygosaccharomyces bisporus* (Beux *et al.*, 2022; Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003). En general, se han encontrado diferencias en la composición y estructura de la comunidad microbiana entre las mieles de *A. mellifera* y las abejas sin aguijón.

1.7.2. Microorganismos asociados al aparato digestivo de las abejas

El aparato digestivo de las abejas es un sitio metabólicamente activo, su composición y estructura microbiana permiten mantener funciones esenciales al huésped. Su composición es variada y está asociada al tipo de alimentación, edad y estado de salud de la abeja. A pesar de lo anterior, han reportado bacterias centrales presentes en todas las abejas del mundo y han documentado su importancia en funciones esenciales que involucra la digestión del polen, absorción de nutrientes y sistema inmune de las abejas (Tang *et al.*, 2021; Lashani *et al.*, 2020; Tamarit *et al.*, 2015). Además, pueden segregar enzimas como las pectinasas, celulasas y

proteasas que mejoran la asimilación de nutrientes, y proporcionar nutrientes que por sí mismos no pueden metabolizar (Coh-Martínez *et al.*, 2019; Cadez *et al.*, 2015).

En las abejas melíferas, la microbiota se concentra principalmente en la parte posterior de su intestino, es decir, en los intestinos medio (ventrículo o mesenterón) y posterior (proctodeo), esta última porción incluye el recto. En los intestinos de *A. mellifera*, a través de métodos tradicionales de cultivo, han reportado bacterias como a *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. pumilus*, así, como *Lactobacillus kunkeei*, *L. jensenii*, *L. fructosus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium* y numerosas levaduras como *Candida parapsilosis*, *C. reukaufii*, *C. tenuis*, *Torulopsis famata*, *T. globosa* y *T. inconspicua* (Coh-Martínez *et al.*, 2019; Asama *et al.*, 2015). Las bacterias ácido-lácticas (BAL) de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* originadas en la miel son otro grupo importante asociado al aparato digestivo de las abejas (Vázquez y Olofsson, 2009).

En estudios moleculares, para obreras de *A. mellifera*, se han descrito nueve especies bacterianas dominantes en los intestinos: *Lactobacillus* Firm-4 y *Lactobacillus* Firm-5 pertenecientes al filo Firmicutes; *Bifidobacterium asteroides* perteneciente al filo Actinobacteria, así, como las bacterias Gram negativas *Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apicola* pertenecientes al filo Proteobacteria, las cuales constituyen la microbiota central de las abejas del mundo, además de *Bartonella apis*, *Apibacter adventoris*, *Frischella perrara* y Acetobacteraceae, todas Gram negativas (Kwong y Moran, 2016; Anderson *et al.*, 2013; Engel *et al.*, 2012; Mrázek *et al.*, 2008). Se ha descrito que bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* participan en el procesamiento del néctar y en el metabolismo de los carbohidratos, además, promueven la digestión y absorción de nutrientes, eliminan moléculas dañinas, y protegen contra la invasión de patógenos y parásitos (Engel y Moran, 2013; Hooper *et al.*, 2012). La especie *Lactobacillus kunkeei* ha sido reportada como abundante en el aparato digestivo, y otros géneros reportados son *Bacillus* spp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas* sp. (Tamarit *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2013; García *et al.*, 2006). En *Apis cerana*, mediante técnicas de cultivo han reportado a Firmicutes (*Lactococcus* y *Staphylococcus*), *Enterobacter* y *Klebsiella* (Disayathanoowa *et al.*, 2012).

En las abejas nativas sin aguijón, se ha reportado en los intestinos de *Lepidotrigona terminata* bacterias pertenecientes a Firmicutes y proteobacterias (Suphaphimol *et al.*, 2020). Para *Nannotrigona testaceicornis* han reportado bacterias corineformes, bacterias de la familia Lactobacillaceae, de la clase Bacilli y de la familia Micrococcaceae (Gavazzoni *et al.*, 2022). En

Melipona panamica, *M. bocandei* y *M. quadrifasciata* han reportado la abundancia de *Lactobacillus kunkeii*, *Lactobacillus Firm-5*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, y *Acetobacteraceae*; las bacterias *Gilliamella* y *Snodgrassella* reportadas dentro de la microbiota central de *A. mellifera*, pueden estar ausentes o en bajas proporciones en las abejas nativas sin aguijón (Díaz *et al.*, 2017; Koch *et al.*, 2013). Para *Meliponula lendliana*, *M. ferruginea*, *M. togoensis*, *M. bocandei*, *Hypotrigona* sp, y *Liotrigona* sp. reportan la abundancia de *Lactobacillus* sp. y en bajas proporciones a *Bifidobacterium*, *Bombilactobacillus* y las Gram negativas *Acetobacter*, *Bombella* y *Wolbachia* (Tola *et al.*, 2021). Otras especies bacterianas reportadas son *Bacillus* spp., bacterias pleomórficas, Gram variables, mohos (principalmente *Penicillia*), Actinomycetes y levaduras (Tola *et al.*, 2021). Para *A. mellifera* se ha encontrado levaduras como *Candida tropicalis*, *Hanseniaspora vineae*, *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima*, (Kogan *et al.*, 2023).

1.7.3. Microorganismos asociados en los nidos de las abejas

En los nidos de las abejas sin aguijón se han reportado diversos grupos de microorganismos dentro de sus colonias. En restos fósiles de la abeja sin aguijón *Proplebeia dominicana* han encontrado ADN de bacterias del género *Bacillus* de hace ≈ 20 millones de años, lo que sugiere una relación muy antigua con este género (Camargo *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 1994). Estudios realizados en *Melipona quadrifasciata* concluyeron que la abeja no sobrevive sin la asociación de las bacterias del género *Bacillus* (Machado, 1971). Otro género bacteriano reportado dentro de los nidos de las abejas es *Streptomyces* (Promnuan *et al.*, 2009). También, han reportado más de diez géneros de levadura asociadas a las colonias de meliponinos, las más representativas son *Candida* y *Starmerella*, que se encuentran con mucha frecuencia en el polen y la miel almacenada (Rosa *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 1992). La función de las levaduras en las colonias de *Melipona* es similar al papel de las bacterias; secretan enzimas, que convierten el polen a pan de abeja y el néctar a miel, además ayudan a su conservación. En nidos de la abeja *Ptilotrigona lurida*, las levaduras del género *Candida* deshidratan el polen almacenado, este proceso de deshidratación es eficiente para evitar su deterioro y evitar que larvas de la mosca *Pseudohypocera* consuman el polen y causen daños graves a la colonia.

En las abejas *Tetragonula collina* y *Partamona* sp., se ha reportado que coleccionan esporas de *Rhizopus* sp. y la almacenan en sus nidos, aunque el valor nutritivo de las esporas en comparación con el polen es bajo y podrían complementar su dieta (Eltz *et.*, 2002). En nidos de

Scaptotrigona depilis, *Tetragona clavipes* y *Melipona flavolineata* crece un hongo filamentoso dentro de las celdas de cría, y era considerado como un agente patógeno, sin embargo, en investigaciones realizados mostraron sus efectos benéficos. El hongo prolifera antes de que el huevo eclosione y crece intensamente, posteriormente, las larvas consumen este hongo que crece en la superficie del alimento larval. En experimentos, demostraron que las larvas dependen de este hongo para sobrevivir, en ensayos inhibieron el crecimiento de este hongo, lo que originó que todas las larvas de las abejas murieran, demostrando la estrecha relación de este hongo con el desarrollo y sobrevivencia de las larvas (Menezes, 2010).

1.8. Origen, evolución y distribución de las abejas sin aguijón

Las abejas se clasifican en siete familias dentro de la superfamilia Apoidea (Michener, 2000), poseen características particulares que las separan de sus parientes cercanos las avispas; son predominantemente vegetarianas y han desarrollado estructuras especializadas para optimizar la colecta de polen y néctar de las plantas. La familia Apidae es una de las más importantes por su actividad ecológica y aprovechamiento como actividad económica, esta familia presenta un grupo que posee corbículas o canastas que les permite optimizar el transporte de polen hasta sus nidos. Las primeras abejas corbiculadas divergieron hace aproximadamente 72-95 millones de años de sus ancestros Centridini del Nuevo Mundo que precedieron a la evolución de la eusocialidad (Martins *et al.*, 2014). Las abejas corbiculadas se ubican dentro de la subfamilia Apinae y comprende cuatro tribus, Apini (abejas melíferas), Bombini (abejorros), Euglossini (abeja orquídea), y Meliponini (abejas sin aguijón) (Michener, 2000). Las abejas melíferas y las abejas nativas sin aguijón presentan el nivel más alto de eusocialidad en el que hay una clara división reproductiva del trabajo, cuidado cooperativo de la cría, traslape de generaciones y diferencias morfológicas entre reinas y obreras (Roubik, 2006; Crozier y Pamilo, 1996; Michener, 1974).

Las abejas sin aguijón son un grupo muy antiguo. La evidencia más temprana de su origen data de la última etapa del cretácico, y el registro más antiguo que se tiene proviene de la especie *Cretotrigona prisca* que data del Mesozoico. Al parecer, las abejas sin aguijón son de origen Godwánico, pero presentaron una diversificación a posteriori, principalmente en América del Sur. Se cree que los eventos de vicarianza (separación geográfica de poblaciones dentro de una especie) contribuyeron a la diversidad de las abejas sin aguijón en la región neotropical (Camargo y Vit, 2013). De acuerdo con Grüter (2020) a nivel mundial se conocen 58 géneros y 552 especies de abejas sin aguijón. Su distribución se centra en las regiones

tropicales y subtropicales del planeta, pero la mayor abundancia y diversidad se ha registrado en las regiones del neotrópico con 31 géneros y 426 especies (Grüter, 2020).

Estudios moleculares confirmaron que *Melipona* es un clado moderno dentro de las abejas sin aguijón, de origen post-godwánico, que probablemente surgió hace aproximadamente 24 millones de años en el Oligoceno (Rasmussen y Cameron, 2010). Sin embargo, estudios posteriores de 35 especies de *Melipona* utilizando marcadores ADN mitocondrial, ribosómico y nuclear, sugiere incluso un origen más reciente de este género (14-17 millones de años, durante el Mioceno) (Ramírez *et al.*, 2010).

En México, se han registrado al menos 46 especies de abejas sin aguijón, dentro de las cuales el género *Melipona* es uno de los más importantes (Ayala, 1999). Este género está representado por siete especies, que comprenden el 15 % de la fauna mexicana de abejas sin aguijón (Ayala *et al.*, 2013). Entre las especies mexicanas de *Melipona*, dos se encuentran en bosques altos: *M. colimana* y *M. fasciata*; y dos se encuentran en tierras tropicales bajas: *M. solani* y *M. belizae*; *M. yucatanica* y *M. lupitae* son las meliponas mexicanas más pequeñas y endémicas; y *M. beecheii* la de mayor distribución geográfica, y también la más relevante por su importancia económica y cultural (Ayala 1999). En la península de Yucatán, de las 17 especies de abejas sin aguijón presentes *M. beecheii* ha sido manejada y aprovechada desde la época precolombina hasta la actualidad (Quezada-Euan, 2018, González- Acereto *et al.*, 2008, Ayala, 1999).

1.9. Importancia cultural y ecológica de *Melipona beecheii*

En Mesoamérica, *M. beecheii* tiene al menos 20 nombres locales diferentes, entre los que se encuentran abeja-real, *Yilkil-kab*, *Colel-kab*, *Xunan kab* (*Xunaan-kaab*), *Pool-kab*, colmena-kab, abeja-alazana, *pipioli*, *mimialcuatl*, *tsaspena*, gato, abeja-aluva, blanco-aluva, criolla, jicote-gato, jicote-estrella, abeja de la tierra, *Ajau-chab* y *Suk-ajatié* (González-Acereto, 2008; Moure *et al.*, 2007). Esta especie fue rutinariamente propagada para obtener beneficios de ella, su manejo y aprovechamiento data de los tiempos precolombinos.

Los mayas durante años criaron y aprovecharon a esta abeja por las propiedades medicinales de la miel. La miel es utilizada para tratar afecciones, problemas respiratorios, digestivos, de la piel y para preparar alimentos (Quezada-Euan, 2018; González-Acereto *et al.*, 2008). De esta abeja se obtienen varios productos catalogados según su utilidad en varias categorías como son alimento, herramientas y artesanías, medicinas, y económicas. La miel era la principal

materia prima que se aprovechaba debido a que se utilizaba frecuentemente en la medicina tradicional, como moneda de cambio, para preparar bebidas como el “Sacaj” y el “Báalché” utilizadas en las ceremonias sagradas (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006).

Se piensa que, debido a los mayas, la meliponicultura (cría, manejo y aprovechamiento de las abejas nativas sin aguijón) se extendió a otras civilizaciones en Mesoamérica (Kent, 1984). Un aspecto clave de la cría en Mesoamérica fue el desarrollo de colmenas de medidas estándar para dar cabida a las colonias. Existen diferentes tipos de colmenas, troncos huecos (jobón) utilizados ampliamente y de manera tradicional en el área maya, vasijas de barro utilizadas como colmenas en el altiplano mexicano de Puebla, Veracruz y Oaxaca, y cajas de madera (Arnold *et al.*, 2018; Quezada-Euán, 2018; González-Acereto, 2008). Para los mayas, la meliponicultura se convirtió en parte de la cosmogonía y la mitología. Esta cultura le confirió un gran significado espiritual a una de las abejas que codiciaban, la “Xunan-Kab” (la abeja o dama de la miel). La evidencia de la importancia económica y religiosa de Xunan-Kab se encuentra en el arte y los manuscritos mayas, así como en el códice Tro-Cortesiano o de Madrid (Quezada-Euán, 2018; Sotelo-Santos y Asomoza, 2018; Zralka *et al.*, 2014; Crane, 1992).

Por otra parte, su función polinizadora es de suma importancia para la flora nativa regional, ya que propicia la conservación y dispersión del germoplasma de los recursos florísticos en las selvas de la región. Su contribución no se puede reemplazar por la polinización gestionada comercialmente, ya que tienen un papel ecológico preponderante en la reproducción de las plantas, son uno de los grupos más importantes en la polinización de las angiospermas, tanto para las plantas silvestres como para numerosas plantas cultivadas como el café, aguacate, rambután, tomate, alfalfa, calabaza, fresa, chile habanero, entre otras (Slaa *et al.*, 2006). Se estima que aproximadamente el 80 % de los alimentos que se consumen son polinizados por las abejas (Slaa *et al.*, 2006). Debido a su tamaño, esta abeja logra polinizar una mayor diversidad de flores que resulta de difícil acceso para otras especies, ya que en las regiones tropicales existen flores de diferentes tamaños y formas (Michener, 2013). Además, tienen una alta capacidad de reclutamiento de individuos de la colmena para el forrajeo y una constancia en la visita de las flores, lo que permite una polinización eficiente de plantas cuyo periodo de floración es breve, como por ejemplo la planta del café (Brosi, 2009; Barth *et al.*, 2008).

1.10. La meliponicultura como actividad de traspatio

La meliponicultura maya es una práctica precolombina basada en el manejo, crianza, cuidado y aprovechamiento de las abejas nativas sin aguijón. Para los mayas, la cría de las abejas nativas tenía una importancia similar al cultivo de maíz, alimento básico en las civilizaciones mesoamericanas (de Jong, 1999). De acuerdo con los restos arqueológicos y la distribución actual de *M. beecheii*, es probable que la meliponicultura haya comenzado en la región de la península de Yucatán y el norte de Guatemala, probablemente hace aproximadamente 1400-1900 años y de ahí se extendió a otras regiones de Mesoamérica (Crane, 1992; Kent, 1984). En Yucatán, de las 17 especies registradas resalta el manejo de *M. beecheii*, la cual es cultivada en ciertas comunidades del estado con la finalidad de obtener productos como el propóleo, cerumen, polen y miel de buena calidad cuya comercialización genera ingresos y fortalece la economía familiar de las comunidades rurales (González-Acereto *et al.*, 2008; Ayala, 1999). En el estado de Yucatán, se tiene el registro de más de mil meliponicultores que se dedican a esta actividad junto con la agricultura principalmente. En las comunidades rurales, su manejo es tradicional de traspatio, semejante a una casa tradicional maya, delimitado por cuatro postes de madera y techo con palma de guano y piso de concreto, en su interior instalan estantería de madera ordenada donde colocan los jobones. Vinculan su manejo con el huerto familiar, cultivos y frutales propios del solar maya, así como diversas especies florales (González-Acereto *et al.*, 2008). En el estado de Campeche, Negrín y Sotelo (2016) reportaron 41 meliponicultores. Cabe señalar que los censos no abarcaron todo el estado, y la mayoría obtuvieron sus jobones por herencia, generalmente de los padres o abuelos, lo que indica su transferencia entre generaciones. La edad de los meliponicultores registrados es mayor a los 51 años, además sus hijos y nietos han emigrado a las ciudades, y los que permanecen en dichas localidades participan en otras actividades, sin mostrar interés por conocer y cuidar a las abejas sin aguijón o meliponinos. Para facilitar su manejo se utilizan troncos ahuecados con un orificio de acceso estrecho, contruidos de árboles de ya'axniik (*Vitex gaumeri*), tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), pich (*Enterolobium cyclocarpum*), cedro (*Cedrela* sp.), zapote (*Manilkara* sp.), entre otros (Negrín y Sotelo, 2016).

1.11. Distribución y características morfológicas de *Melipona beecheii*

La distribución de *Melipona beecheii* abarca México, Centro América (Guatemala, Belice, Honduras, Salvador, Nicaragua, Costa Rica) y las Antillas (Cuba y Jamaica). En México, se distribuye desde los bosques tropicales y subtropicales de las costas del Pacífico y del Golfo

(Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz) y la península de Yucatán (Campeche, Quintana Roo y Yucatán) (Figura 1.2) (Genaro, 2008; Ayala, 1999).



Figura 1.2. Distribución geográfica de *Melipona beecheii* en Mesoamérica y México. (Tomado de Quezada-Euan, 2018).

M. beecheii es una abeja robusta de aproximadamente 9.7 a 10.7 mm de largo, de coloración negro con franjas amarillas en el abdomen, carece de aguijón funcional y solo poseen vestigios de lo que en el pasado evolutivo fue el aguijón (Figura 1.3). Además, poseen una estructura pilosa en forma de cepillo en el extremo más ancho de la tibia, que se conoce como penicillium, y en comparación con los otros grupos de abejas corbiculadas la venación en sus alas es débil. Presenta un integumento en su mayoría de color negro, las patas presentan dibujos amarillos, pardos y negros; presentan una longitud del cuerpo entre 9.7-10.7 mm con escapos amarillos en la superficie anterior (Ayala, 1999). Presenta en el tórax una pubescencia (vellosidad) blanquecina que se torna color naranja en el sitio de unión al tórax. El abdomen es negro con cinco anillos transversales color amarillo verdoso. Los tres pares de patas son de color naranja o marrón con el tercer par de patas al final de la tibia manchado de negro. Los ojos son de color gris verdoso translúcido (González-Acereto, 2008; Ayala, 1999).



Figura 1.3. Abeja adulta de *Melipona beecheii* en la entrada del nido. (Fotos cortesía de L. Medina)

Esta abeja es de carácter dócil, aunque las abejas de grandes poblaciones pueden ocasionalmente desencadenar a la hora de la inspección un ataque rápido, llegando a morder principalmente los párpados del meliponicultor. La entrada a los nidos es muy característica al presentar un orificio de entrada con una estructura de forma radiada por donde sólo cabe una abeja y es protegida por una abeja guardiana. La colonia presenta una población que fluctúa entre 800 y 1,200 abejas (González-Acereto, 2008). Esta abeja establece sus nidos en las cavidades de los árboles vivos como el ramón (*Brosimum alicastrum* Sw. ssp. *alicastrum*), pich (*Enterolobium cyclocarpum*) y tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), entre otros.

1.12. Organización de la colonia y recursos colectados por *Melipona beecheii*

La colonia de *M. beecheii* se encuentra conformada por a) una reina fisogástrica que es la que pone los huevos que darán origen a las abejas obreras y a los machos; b) las obreras que son las abejas encargadas del mantenimiento de la colonia realizando diversas actividades como el forrajeo, limpieza, defensa del nido y alimentación de las larvas; y c) los machos, cuya función principal es aparearse con las reinas vírgenes para formar otras colonias y en ocasiones también ayudan en la termorregulación de la colmena y otras actividades (Kwapong *et al.*, 2010).

Para la subsistencia y mantenimiento de la colonia, *M. beecheii* colecta y almacena en potes de cerumen los recursos de polen y néctar obtenidos de diversas especies y familias botánicas de plantas (Figura 1.4) (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018, 2016; Roubik y Villanueva-Gutiérrez, 2009; Martínez-Hernández *et al.*, 1993). En Yucatán, la familia más importante es Fabaceae que

cuenta con 236 especies y 78 géneros (Duno de Stefano *et al.*, 2018). Entre las especies de plantas que pecorea *M. beecheii* se encuentran *Cenostigma gaumeri*, *Desmanthus virgatus* (L) Willd., *Desmodium* sp., *Leucaena shannonii* Donn. Sm., *L. leucocephala*, *Lonchocarpus* sp., *L. punctatus* Kunth, *Mimosa* sp., *M. bahamensis* Benth., *Piscidia piscipula* (Fabaceae), otras especies son *Alternanthera ramossisima* (Mart.) Chodat (Amaranthaceae); *Thrinax radiata* (Arecaceae); *Viguiera dentata* (Asteraceae); *Bursera simaruba*, *B. schlechtendalii* Engl. (Burseraceae); *Psidium guajava* (Myrtaceae); *Gymnopodium floribundum* (Polygonaceae); *Serjania triquetra* Radlk., *Thouinia paucidentata* Radlk. (Sapindaceae), entre otros (Ortiz-Reyes *et al.*, 2022; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018; 2011, Roubik y Moreno, 2018).



Figura 1.4. Polen y néctar almacenados en potes de cera de *Melipona beecheii*.

También forrajea plantas únicamente poliníferas como *Cochlospermum vitifolium* (Bixaceae), *Senna* spp., *Senna racemosa* (Fabaceae), *Solanum* spp., *S. americanum* Mill. y *S. erianthum* D. Don. (Solanaceae), los cuales se encuentran entre los 10 géneros más importantes para *M. beecheii* y otras abejas sin aguijón en Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Oaxaca y Veracruz (Bacab-Pérez *et al.*, 2024; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018, 2002; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018, 2011; Roubik y Moreno, 2018; Enríquez y Dardón, 2007).

1.13. Retos de la meliponicultura

La meliponicultura enfrenta diversos desafíos. Entre estos se destaca la sustitución de esta abeja por *A. mellifera*, problemas relacionados con la destrucción de las selvas tropicales (urbanización, monocultivos, incendios forestales), por lo tanto, hay pérdida de espacios para anidar y disminución de recursos florales, así como el poco interés de la población joven de las

comunidades rurales que prefieren emigrar a las ciudades. Existe también desconocimiento del valor de su miel, así como falta de financiamiento y apoyos. Todo esto se agrava por el uso intensivo y extensivo de agroquímicos para el control de plagas en cultivos, los cuales, afectan directamente a las poblaciones de abejas, provocando su muerte, alteraciones en su reproducción, sistema nervioso y sistema inmune, originando que sean más susceptibles a diversas enfermedades y plagas como la mosca *Pseudohyocera kerteszi* (Diptera: Phoridae) (Martín-Culma y Arenas-Suárez, 2018; Lesur, 2002). Por lo anterior, es importante la difusión de la información de *M. beecheii*, así como impulsar canales de comercialización, y conocer a mayor profundidad las especies vegetales de las cuales se alimentan para contrarrestar los efectos de la pérdida de vegetación extensiva.

JUSTIFICACIÓN

En la península de Yucatán, se han identificado más de 900 especies de plantas melíferas aprovechadas por los polinizadores, entre ellos, la abeja nativa *M. beecheii*, la cual obtiene polen y néctar de diversas especies vegetales. El manejo de esta abeja se centra en las comunidades rurales generando ingresos y fortaleciendo su economía familiar. Más de mil meliponicultores se dedican a esta actividad junto con la agricultura principalmente. Debido a problemáticas como el incremento acelerado de la urbanización, el establecimiento de grandes áreas de monocultivos, las sequías prolongadas y los incendios forestales, han propiciado la reducción de la vegetación original, afectando la disponibilidad de los recursos florales para las abejas. Derivado de esto, la falta de recursos polínicos podría afectar la dinámica de los microorganismos que habitan en el intestino y de aquellos que participan en la transformación de sus recursos alimenticios y procesos esenciales para la sobrevivencia de las abejas. Por lo tanto, la conservación de las especies vegetales polínicas y néctar-polinífera de importancia para las abejas es fundamental para mantener colonias de abejas fuertes y en buen estado de salud. Por lo anterior, es importante documentar y ampliar la información de las especies vegetales que visita la abeja maya para obtener polen y néctar en el estado de Yucatán. Los resultados de este trabajo se pondrán a disposición de los meliponicultores quienes podrán mantener y reproducir especies de interés nectarífera, polinífera y néctar-polinífera en sus meliponarios como estrategias que permitan obtener colonias de abejas sanas. Las acciones que se llevarán a cabo para la difusión de la información será la entrega de los productos finales de este trabajo, un listado general de las especies vegetales identificadas en el pan de abeja y en las mieles, un listado de las especies vegetales importantes encontradas en cada meliponario, un listado de la caracterización botánica de sus mieles y un folleto sobre las

abundancias e importancia de los microorganismos en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de las abejas. Esta investigación junto a las realizadas por diversos autores ayudará en futuros trabajos que prioricen la conservación de la flora, principalmente las especies de importancia en el aporte de polen y néctar, la cual resulta relevante para los meliponicultores comprometidos con el bienestar de la abeja maya en la península de Yucatán.

Preguntas del capítulo II

¿Cómo es la diversidad de tipos polínicos presentes en las muestras de pan de abeja y miel colectados de potes cerrados en nidos de la abeja *M. beecheii* de meliponarios tradicionales del estado de Yucatán?

¿Con base al espectro de polen registrado para esta abeja, cuáles plantas forrajea *M. beecheii* para obtener néctar?

¿Con base al espectro de polen registrado para esta abeja, cuál es su probable comportamiento de colecta o forrajeo? ¿colecta polen y néctar de las mismas plantas que visita?

Preguntas del capítulo III

¿Cómo cambia la abundancia de células microbianas, bacterias y levaduras, entre el pan de abeja, miel y el aparato digestivo de *M. beecheii* en nidos de meliponarios tradicionales de Yucatán?

¿Qué relación existe entre la composición y la abundancia de polen contenidos en el pan de abeja, miel y aparato digestivo con la abundancia de estos microorganismos?

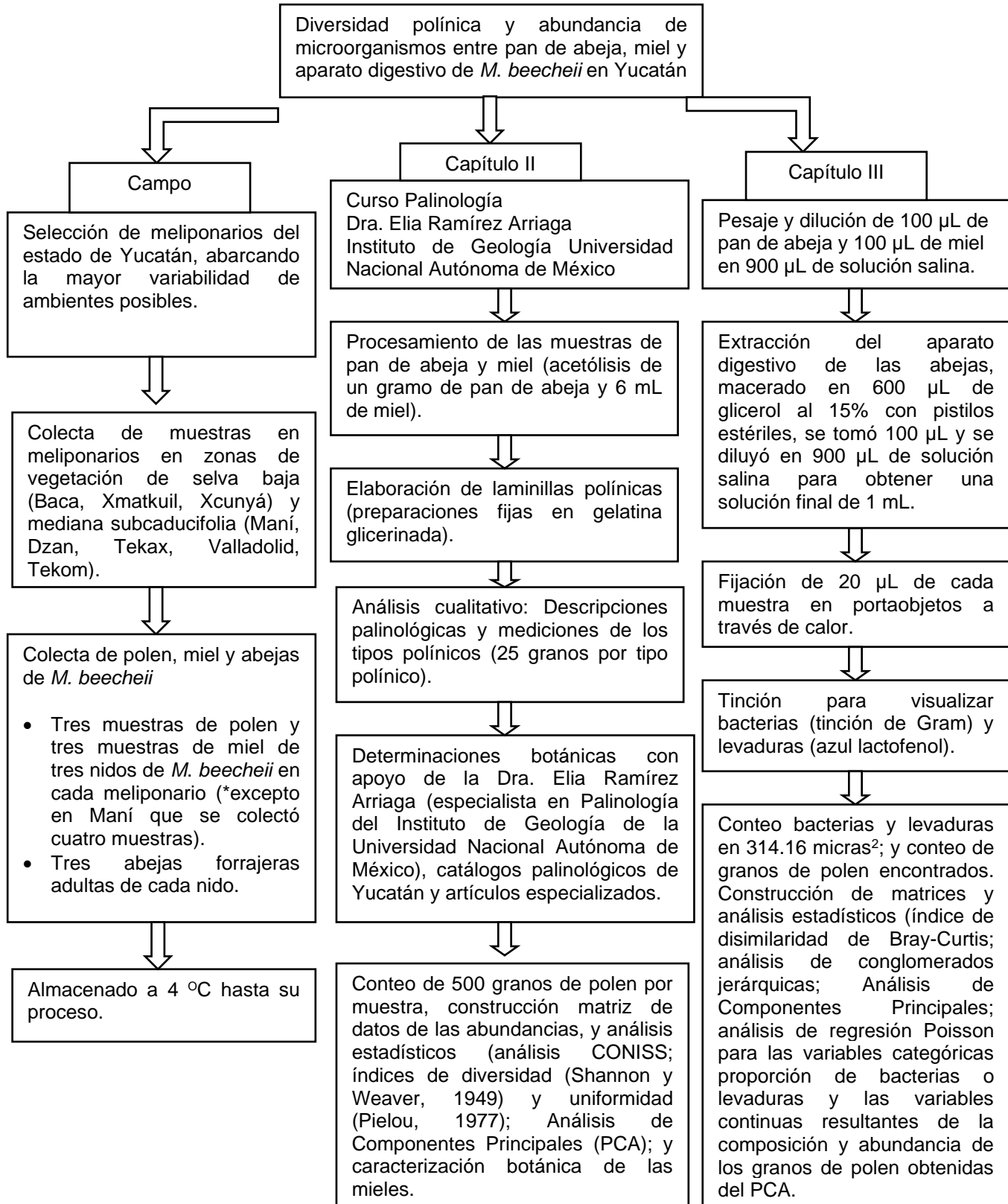
OBJETIVO GENERAL

Evaluar, mediante análisis melisopolinológico y microbiológico, los tipos polínicos y los principales grupos de microorganismos presentes en las muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* colectados en ocho meliponarios tradicionales en el estado de Yucatán. Lo anterior, para sugerir el comportamiento de colecta de la abeja y establecer la relación entre la abundancia de células microbianas con la composición y abundancia de granos de polen.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Documentar la diversidad de tipos polínicos presentes en las muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii* y determinar cuáles son las especies de aporte de polen y néctar a las colonias de abejas establecidas en meliponarios tradicionales del estado de Yucatán, esto a través de los análisis melisopalinológicos.
- Indicar a través de métricas de diversidad, el comportamiento de colecta de polen y néctar de la abeja.
- Analizar la composición y abundancia de los tipos polínicos contenidos en el pan de abeja, miel y aparato digestivo.
- Estimar y comparar la abundancia de bacterias y levaduras en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de esta abeja en preparaciones fijas de microscopía.
- Analizar la relación entre la abundancia de bacterias y levaduras con la composición de especies de granos de polen presentes en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

Apidologie (2024) 55:22 ©
The Author(s), 2024

Original article



<https://doi.org/10.1007/s13592-024-01060-0>

Melissopalynology of pot-pollen and pot-honey of the Mayan stingless bee *Melipona beecheii* Bennett, 1831 (Apidae, Meliponini) in Yucatan, Mexico

Armando Ismael Bacab-Pérez¹ , Elia Ramírez-Arriaga² , and Azucena Canto¹ 

¹ Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), Mérida, Yucatán, Mexico

² Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, CDMX, Mexico

Received 27 September 2023 – Revised 7 December 2023 – Accepted 18 January 2024

Abstract – The Mayan bee *Melipona beecheii* is one of the most important and widely cultivated stingless bees in Mexico. In order to document pollen and nectar resources for *M. beecheii* during the dry season, 25 pot-pollen and 25 pot-honey samples were collected from February to May 2021 at eight villages in Yucatan, Mexico. All samples were acetolysed, and 500 pollen grains were counted randomly for each sample. A total of 21 taxa belonging to eight botanical families were observed in the pot-pollen samples; in contrast, 32 pollen types from 16 botanical families were recorded in the pot-honey samples. According to PCA analyses, the pollen types that explained the maximum variance among the pot-pollen samples were *Senna racemosa* var. *racemosa*, *Lonchocarpus punctatum*, *Cochlospermum vitifolium*, *Bursera schlechtendalii* and *B. simaruba*, while *S. racemosa* var. *racemosa*, *C. vitifolium*, *Alternanthera ramosissima*, *Psidium guajava*, *B. schlechtendalii*, *B. simaruba*, *L. punctatum*, *Mimosa bahamensis* and *Solanum americanum* explained the greatest variance among the pot-honey samples. Our results confirm that *M. beecheii* displays polylectic foraging and targets for the secondary vegetation of tropical deciduous and tropical semideciduous forests. Diversity in the pot-pollen was found to be lower than that of the pot-honey samples. Since some pot-honey samples were overrepresented by the pollen grains of *S. racemosa* var. *racemosa*, PCA and cluster analysis grouped those pot-pollen and pot-honey samples together.

Melipona beecheii / melissopalynology / pot-pollen / pot-honey / mayan stingless bee

1. INTRODUCTION

Currently, 46 stingless bee species have been reported in Mexico. One of the most important of these is *Melipona beecheii*, which has a wide distribution (Ayala 1999). Also known as the Mayan bee or *Xunan Kab*, *M. beecheii* is a stingless bee that is valued and cultivated by the Mayas for over 2100 years (Canto et al. 2021) in the Yucatan Peninsula, Mexico. Its honey, pollen and cerumen, this latter substance referred to as

‘Campeche wax’, and products derived from these resources are of biocultural importance. The Madrid Codex describes their importance in culture and traditional medicine, as well as the gods (e.g. *Ah Mucen Cab*) who were believed to take care of this native bee (Tozzer and Allen 1910).

More than 2327 species of vascular plants have been recorded in the aforementioned region, of which approximately 900 arboreal, shrub and herbaceous species are of melliferous importance for the 17 species of bees native to the same location (Ayala 1999; Duno et al. 2018; CONABIO 2018). During pollen and nectar foraging, bees contribute to the cross-pollination of native and cultivated plants. Pollen is an essential resource in the diet of bees because it provides proteins, lipids, vitamins and essential amino acids (Yang et al. 2013). In addition, nectar is an

Corresponding author: E. Ramírez-Arriaga, elia@unam.mx
Manuscript editor: James Nieh

Published online: 11 March 2024

aqueous solution consisting mainly of sugars, amino acids, mineral ions and essential oils (Baker and Baker 1983; Musicante and Galetto 2008). It is important to note that honey produced by stingless bees has particular physicochemical and organoleptic characteristics such as higher moisture and free acidity, and it is considered medicinally important in several Mexican regions (Rosales 2012).

Melissopalynological research helps us to determine the floral sources used for pollen and nectar collection, which are necessary for the larval diet and honey production. Among the most complete melissopalynological studies carried out in Mexican stingless bees, the investigation conducted in *Nannotrigona perilampoides*, *Plebeia* sp., *Scaptotrigona mexicana* and *Tetragonisca angustula* by Martínez-Hernández et al. (1993), who analysed pot-pollen, pot-honey and larval food during an annual cycle in Chiapas, emphasises the importance of native and cultivated plants in the diet of these polylectic bees. Ramírez-Arriaga and Martínez-Hernández (2007) conducted pollen spectra analysis of *S. mexicana* honey in Puebla; Pacheco-Palomo (2011) reported pollen recovered from *M. beecheii* pot-honey in Campeche as well as its physicochemical characteristics; Quiroz-García et al. (2011) investigated pollen spectra in *S. hellwegeri* in Jalisco; Espinoza-Toledo et al. (2018) studied at the family level pollen grains from the honey of *M. beecheii*, *M. solani* and *S. mexicana* in Chiapas; Villanueva-Gutiérrez et al. (2018) worked with *M. beecheii* pollen loads in Yucatan, citing *Bursera simaruba*, *Gliricidia sepium*, *Solanum*, *Senna*, *Metopium brownei*, *Cochlospermum*, *Viguiera dentata*, *Pouteria unicularis*, *Thrinax* and *Euphorbia* among the significant plant; López-Roblero et al. (2021) studied pollen recovered from the honey of *S. mexicana*, *M. beecheii*, *M. solani* and *Tetragonisca angustula* from Chiapas. Finally, Ortiz-Reyes et al. (2022) carried out melissopalynological studies and physicochemical analysis of *M. beecheii* and *Scaptotrigona mexicana* pot-honey samples in Veracruz.

More than 32 plant species have been reported in Mexico and Mesoamerica for *M. beecheii* and other stingless bees, which mainly forage on *Bursera simaruba*, *Gliricidia sepium*, *Solanum*, *Senna*, *Metopium brownei*, *Cochlospermum vitifolium*, *Viguiera dentata*, *Pouteria unicularis*, *Euphorbia*, *Thrinax* and *Psidium guajava*, among others (Enríquez and Dardón 2007; Ramírez-

Arriaga et al. 2007, 2018; Villanueva-Gutiérrez et al. 2018).

In order to document pollen and nectar resources for the Mayan honey bee *M. beecheii*, we conducted melissopalynological analyses of pot-pollen and pot-honey samples collected from eight backyard meliponaries located in the state of Yucatan. This study also aimed to estimate foraging strategies and to propose a standardised method for the characterisation of *M. beecheii* pot-honey samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area

The study was conducted from February to May 2021, during the dry season and in eight meliponaries where the native bee *M. beecheii* is cultivated. These privately owned meliponaries, located in back yards, were built with wooden roofs and concrete floors and housed 6 to 60 colonies, mainly of *M. beecheii* in wooden boxes (Table I). The meliponaries are located at a minimum distance of 7 km and a maximum distance of 191 km from each other (Figure 1). In general, the meliponaries were adjacent to agricultural crops and home gardens, which were surrounded by secondary low deciduous forest vegetation (trees 4 to 12 m tall) and secondary medium deciduous forest vegetation (trees 10 to 15 m tall). Both of these plant communities are dominant in the state of Yucatan (Figure 1).

Table I List of towns where pot-pollen and pot-honey samples were collected in Yucatan, Mexico

Town	Coordinates	Number of nests	Site characteristics
Maní	20°22'46.956" N 89°23'5.514" W	22	The stingless bee boxes were in a back yard. The surrounding vegetation was secondary tropical semideciduous forest.
Baca	21°06'47.0" N 89°24'25.2" W	6	The stingless bee boxes were in a back yard. The surrounding vegetation was secondary tropical deciduous forest.
Dzan	20°22'46.1244" N 89°26'41.132" W	15	The stingless bee boxes were in a citrus grove, mainly lemon and orange. The surrounding vegetation was secondary tropical semideciduous forest.
Valladolid	20°40'42.3" N 88°11'47.0" W	5	The stingless bee boxes were in a back yard with the presence of <i>Trigona nigra</i> and <i>Scaptotrigona</i> sp. nests. The surrounding vegetation was secondary tropical semideciduous forest.
Tekax	20°11'56.4" N 89°16'19.3" W	17	The stingless bee boxes were in a back yard with the presence of <i>Scaptotrigona</i> sp. nests. The surrounding vegetation was secondary tropical semideciduous forest.
Xcunuyá	21°7'57.2268" N 89°36'45.6732" W	17	The stingless bee boxes were in a back yard. The surrounding vegetation was secondary tropical deciduous forest.
Xmatkuil	20°52'01.2" N 89°37'28.7" W	60	The stingless bee boxes were in a back yard with the presence of boxes of <i>Partamona</i> sp., <i>Lestrimelitta</i> sp., <i>Cephalotrigona</i> sp., <i>Trigona</i> sp., <i>Scaptotrigona</i> sp., <i>Nannotrigona</i> sp. and <i>Frieseomelitta</i> sp. The surrounding vegetation was secondary tropical deciduous forest.
Tekom	20°36'28.9" N 88°15'36.4" W	23	The bee boxes were in a back yard. The surrounding vegetation was secondary medium semideciduous forest.

2.2. Sample collection and processing

Three samples of pot-pollen and three samples of pot-honey were collected from three nests of *M. beecheii* at each meliponary located in the villages of Baca, Dzan, Valladolid, Tekax, Xcunuyá, Xmatkuil and Tekom, except for the one in Maní, where four pot-pollen and four pot-honey samples from four colonies were studied. The colonies were catalogued in good health and with good pollen and honey storage by the owners. Closed pot-pollen and pot-honey were sampled from each nest, and pollen samples were collected with sterile spoons and honey samples with sterile syringes.

Subsequently, each extracted sample was placed separately in a sterile vial. Flowers were collected from the plants in the back yards of the meliponaries to obtain reference pollen.

At the Paleopalynology Laboratory: Paleopalynology and Actuopalynology of the Institute of Geology of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), all samples were registered with a catalogue number, and then 6 ml of pot-honey samples and 1 g of pot-pollen samples were processed using Erdtman's acetolysis method (1960). After the samples were processed, permanent slides were made with glycerine gelatine.

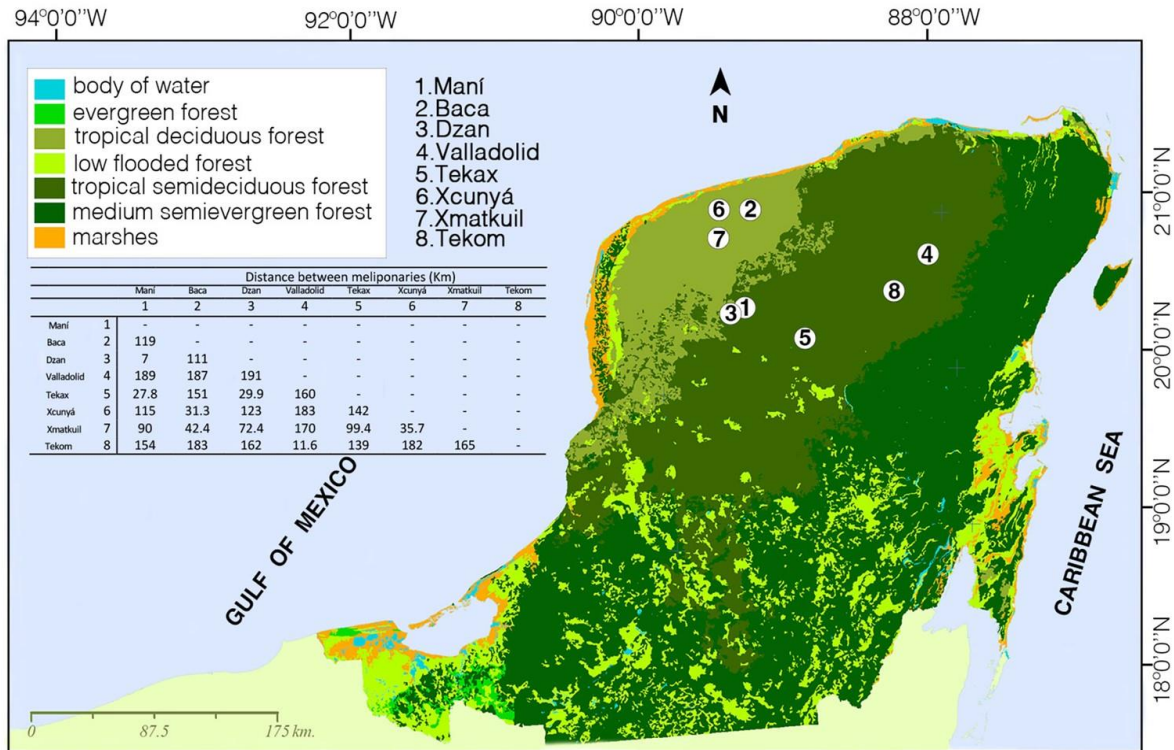


Figure 1. Map of the Yucatan Peninsula, Mexico, location of the traditional meliponaries and distance between them in secondary tropical deciduous forest and tropical semideciduous forest vegetation (modified from Durán and García 2011).

2.3. Qualitative pollen analysis and characterization of honey

First, pollen grains were described using a ZEISS AXIOLAB optical microscope with phase contrast at 100 x magnification. For the identification of pollen grains, reference pollen collections, palynological catalogues (Palacios-Chávez et al. 1991; Martínez-Hernández et al. 1993), melissopalynological studies (Ramírez-Arriaga 2007; Ramírez-Arriaga et al. 2016) as well as floristic lists of the Yucatan Peninsula were consulted.

To estimate the abundance of each pollen type in the samples in a standardised manner, 500 pollen grains were counted randomly for each sample. Following Louveaux et al. (1978), taxa were classified into predominant pollen ($P \geq 45\%$), secondary pollen ($S = 16-45\%$), important minor pollen ($I = 3-15\%$) and minor pollen ($M \leq 3\%$). Finally, the main pollen grains observed in the analysed samples were photographed.

2.4. Statistical analysis of pollen spectra

After the counts were performed, a data matrix was created and used for different analyses, in Tilia Graph to plot pollen diagrams in which the pollen types were classified by plant life form (tree, shrub, grass and vine or lianas). A CONISS analysis using the incremental sum of squares method was also performed to cluster the samples (Grimm 1987).

In order to analyse the most probable collecting behaviour of *M. beecheii*, the diversity (Shannon and Weaver 1949) and evenness (Pielou 1977) indices were calculated. When plants were foraged heterogeneously, J' values were close to zero. Conversely, if the resources were exploited homogeneously, the values were close to 1.

Moreover, a principal component analysis (PCA) was performed with variance-covariance data to explain the maximum variability among pot-pollen, pot-honey, and both pot-pollen and pot-honey spectra. The cluster analysis was carried out with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), using the Euclidean similarity index with Past 4 software (Hammer et

al. 2007), which allowed us to analyse the samples of the different meliponaries by similarity.

3. RESULTS

3.1. Pot-pollen melissopalynological spectrum

A total of 12,542 pollen grains were counted in the 25 pot-pollen samples analysed, recording 21 taxa belonging to eight botanical families. The Fabaceae family exhibited the highest richness with 12 pollen types, followed by Bixaceae and Burseraceae with two pollen types each (Table II). As for abundance, the Fabaceae, Burseraceae and Bixaceae families recorded the highest values (Figure 2).

With regard to the abundance of pollen grains found in the pot-pollen samples collected in Maní, the predominant pollen types were *Senna racemosa* var. *racemosa* and *Cochlospermum vitifolium*. In Baca, *S. racemosa* var. *racemosa* was also predominant, followed by the minor pollen types *Mimosa* sp. (10%), *M. bahamensis* and *Desmanthus virgatus*. In all samples from Dzan, *S. racemosa* var. *racemosa* was predominant, followed by *Solanum americanum*, which was considered a minor pollen. In Valladolid, *S. racemosa* var. *racemosa* and *Lonchocarpus punctatus* predominated, while *S. racemosa* var. *racemosa* and *C. vitifolium* were recorded as the most prevalent pollen types in the samples collected in Tekax. Similarly, at the Xcunyá site, *S. racemosa* var. *racemosa* was the predominant pollen types, and *Bursera* spp. pollen was observed on a secondary level. The copal tree or *Bursera* pollen types were predominant in both Xmatkuil and Tekom (Figure 3 and Table II).

Finally, pollen types considered rare were *Leucaena leucocephala* ssp. *leucocephala*, *Caesalpinia gaumeri* and *Desmodium* sp. in Maní; *Solanum erianthum* in Baca; *Vachellia* sp. in Xcunyá; and *Desmanthus virgatus*, *Mimosa bahamensis* and *Pimenta dioica* in Tekom, all observed in the pot-pollen samples but not included in the pollen counts.

The Shannon–Weaver index (H') ranged from 0.19 to 1.24, most diversity values indicated a low diversity of species exploited by *M. beecheii* to obtain pollen, with the highest values in the samples from Tekax ($H' = 1.22$) and Xcunyá ($H' = 1.02$). Further, Pielou index (J') ranged from 0.16 to 0.88, most of the evenness values (J'), which were less than or equal to 0.67, suggest heterogeneous foraging behaviour (Figure 4).

In general terms, *M. beecheii* predominantly foraged in the arboreal stratum, followed by the herbaceous and shrub stratum. According to the foraging similarity observed in the meliponaries, the CONISS analysis formed two groups: group A included the Maní, Baca, Dzan, Valladolid and Tekax sites, where the Mayan bee predominantly visited *S. racemosa* var. *racemosa* and *C. vitifolium*; group B included Xcunyá, Xmatkuil and Tekom, where the dominance of *Bursera simaruba* and *B. schlechtendalii* was notable, in addition to the presence of the cultivated tree *Psidium guajava* (Figure 3).

The principal component analysis (PCA) of the 25 pot-pollen samples indicated that the first three components explain 99.16% of the variance in the data. The first component explains 71.57%, the second 20% and the third 7.59%. The pollen types that explain the maximum variance among the samples are *S. racemosa* var. *racemosa*, *L. punctatum* and *C. vitifolium*, additional pollen types that contributed to a minor degree to explaining the percentage of variation were *B. schlechtendalii* and *B. simaruba* (Table III).

Three groups were differentiated in the PCA, and this was confirmed in the cluster analysis; in group A, there were three samples from Tekax and Maní in which *C. vitifolium* dominated, while group B associated twelve samples from the Maní, Baca, Dzan, Valladolid, Tekax and Xcunyá sites, defined mainly by *S. racemosa* var. *racemosa*. Group C congregated samples from Xcunyá, Xmatkuil and Tekom mainly because of the abundance of *B. schlechtendalii* and *B. simaruba*. Finally, a sample from Valladolid (H-5070) was isolated owing to the dominance of *L. punctatum* (Figures 5 and 6).

Table II Percentages of pollen spectra recorded in pot-pollen samples of *Melipona beecheii* in Yucatan

	Maní		Baca		Dzan		Valladolid		Tekax		Xcunuyá		Xmatkuil		Tekom											
Number of samples:	5058	5059	5060	5061	5062	5063	5064	5065	5066	5067	5068	5069	5070	5071	5072	5073	5074	5075	5076	5077	5078	5079	5080	5081	5082	
AMARANTHACEAE																										
<i>Alternanthera ramosissima</i>								0.2																		
ANACARDIACEAE																										
<i>Astronium graveolens</i>												3.6														0.4
BIXACEAE																										
<i>Bixa orellana</i>													5.7													
<i>Cochlospermum vitifolium</i>													4.6	0.4												0.2
BURSERACEAE																										
<i>Bursera simaruba</i>																										
<i>Bursera schlehtendalii</i>																										
FABACEAE																										
<i>Crotalaria</i> sp.																										
<i>Desmodium</i> sp.																										
<i>Desmanthus virgatus</i>																										
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>																										
<i>Leucaena leucocephala</i> ssp. <i>leucocephala</i>																										
<i>Leucaena</i> sp.																										
<i>Lonchocarpus punctatus</i>																										
<i>Mimosa bahamensis</i>																										
<i>Mimosa</i> sp.																										
<i>Senna racemosa</i> var. <i>racemosa</i>																										
<i>Senna</i> sp.1																										
<i>Senna</i> sp.2																										
MYRTACEAE																										
<i>Psidium guajava</i>																										
SAPINDACEAE																										

Table II (continued)

	Maní		Baca		Dzan		Valladolid		Tekax		Xcunuyá		Xmatkuil		Tekom										
Number of samples:	5058	5059	5060	5061	5062	5063	5064	5065	5066	5067	5068	5069	5070	5071	5072	5073	5074	5075	5076	5077	5078	5079	5080	5081	5082
H'					3.8	3.8	3.8	2.4	3.8	3.8	0.2														
<i>Thouinia paucidentata</i>																									
SOLANACEAE																									
<i>Solanum americanum</i>	1.2	0.8	1.6	2.4	3.8	3.8	8.6	11.6	1.2	3.6	0.4														
																2.6			0.8		0.4	0.6			
																									0.2

3.2. Pot-honey melissopalynological spectrum

In the 25 honey samples analysed, a total of 12,696 pollen grains were counted and 32 different pollen types belonging to 16 botanical families were recorded. Fabaceae stands out with 14 pollen types, followed by Burseraceae, Solanaceae and Sapindaceae with two pollen types each (Table IV). With regard to pollen abundance, Fabaceae recorded the highest value, followed by Burseraceae, Myrtaceae, Amaranthaceae, Solanaceae, and Bixaceae (Figure 7).

In the pot-honey samples from Maní, *Alternanthera ramosissima* was predominant and the secondary elements were *Mimosa* sp., *S. racemosa* var. *racemosa*, *Solanum americanum* and *Lonchocarpus* sp. Honey samples from Baca showed *S. racemosa* var. *racemosa* as predominant and secondary taxa were *S. americanum* and *Mimosa bahamensis*, while *Waltheria rotundifolia* was of minor importance. In the case of Dzan, *S. racemosa* var. *racemosa* was predominant, followed by the secondary pollen types *S. americanum* and the less important *Serjania triquetra*. In Valladolid, *A. ramosissima* was recorded as predominant, with secondary pollen of *Lonchocarpus punctatus* and *S. racemosa* var. *racemosa*. In the Tekax pot-honey samples, *C. vitifolium* and *A. ramosissima* predominated, while *S. racemosa* var. *racemosa* was secondary. In Xcunuyá, *S. racemosa* var. *racemosa* was also predominant, and *B. schlechtendalii*, *B. simaruba* and Fabaceae occurred as secondary pollen. The samples from Xmatkuil exhibited as secondary elements *B. simaruba*, *B. schlechtendalii* and *Psidium guajava*, while *Byrsonima* sp. was of minor importance. Finally, in the Tekom pot-honey samples, *P. guajava* predominated and *B. simaruba* was of minor importance.

The diversity indices recorded in the honey samples ranged from 0.88 to 2.35, with the highest value observed in Maní ($H' = 2.35$). Uniformity indices (J') oscillated between 0.35 and 0.85, most of the J' values, which were less than or equal to 0.68 indicating heterogeneous foraging of resources (Figure 4).

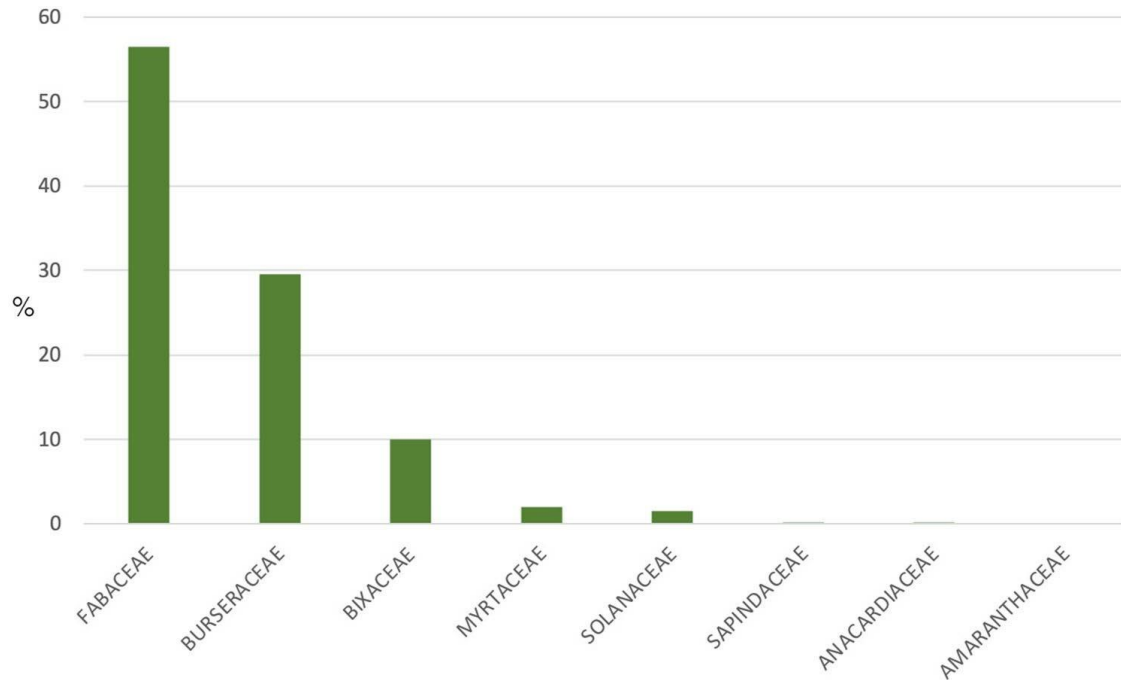


Figure 2. Percentages of the botanical families registered in the pot-pollen of *Melipona beecheii* collected in the backyard meliponaries in Yucatan, Mexico.

The greatest number of pollen grains recorded in the pot-honey samples came mainly from arboreal plants of the Fabaceae family, followed by herbaceous, shrub and liana (Figure 8). The CONISS analysis showed three main groups with two subgroups each according to the similarity of pollen types recorded in each sample. Group A

included Maní, Baca and Dzan; group B comprised Valladolid and Tekax. It should be noted that in groups A and B the collection in the arboreal and herbaceous stratum, and to a lesser extent the arboreal stratum, was predominant; in group C where samples from Xcunúyá, Xmatkuil and Tekom are grouped, the arboreal stratum was dominant (Figure 8).

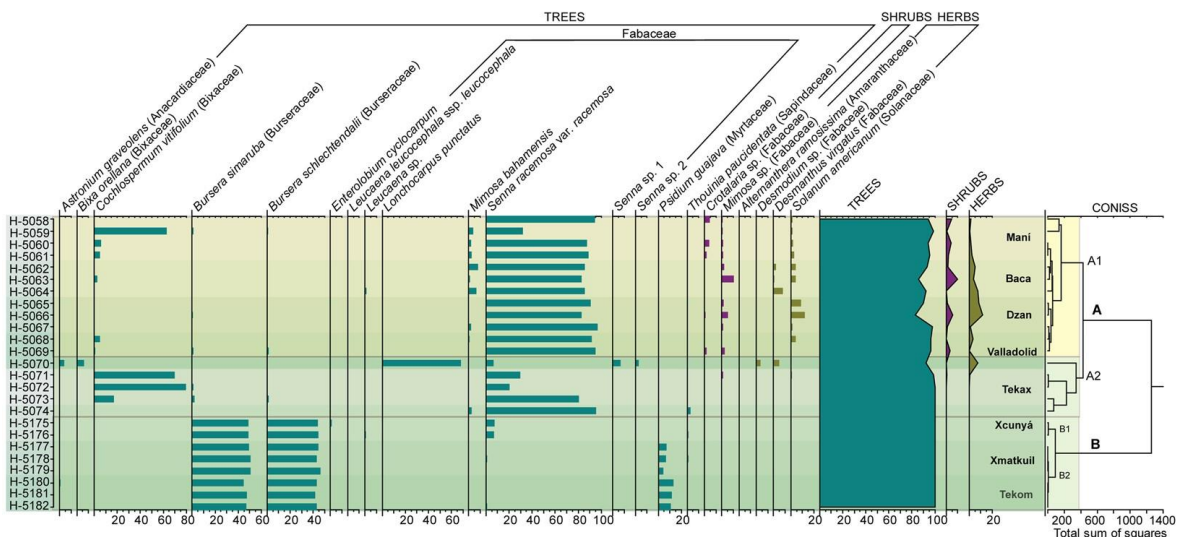


Figure 3. Melissopalynological spectrum of the pot-pollen samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.

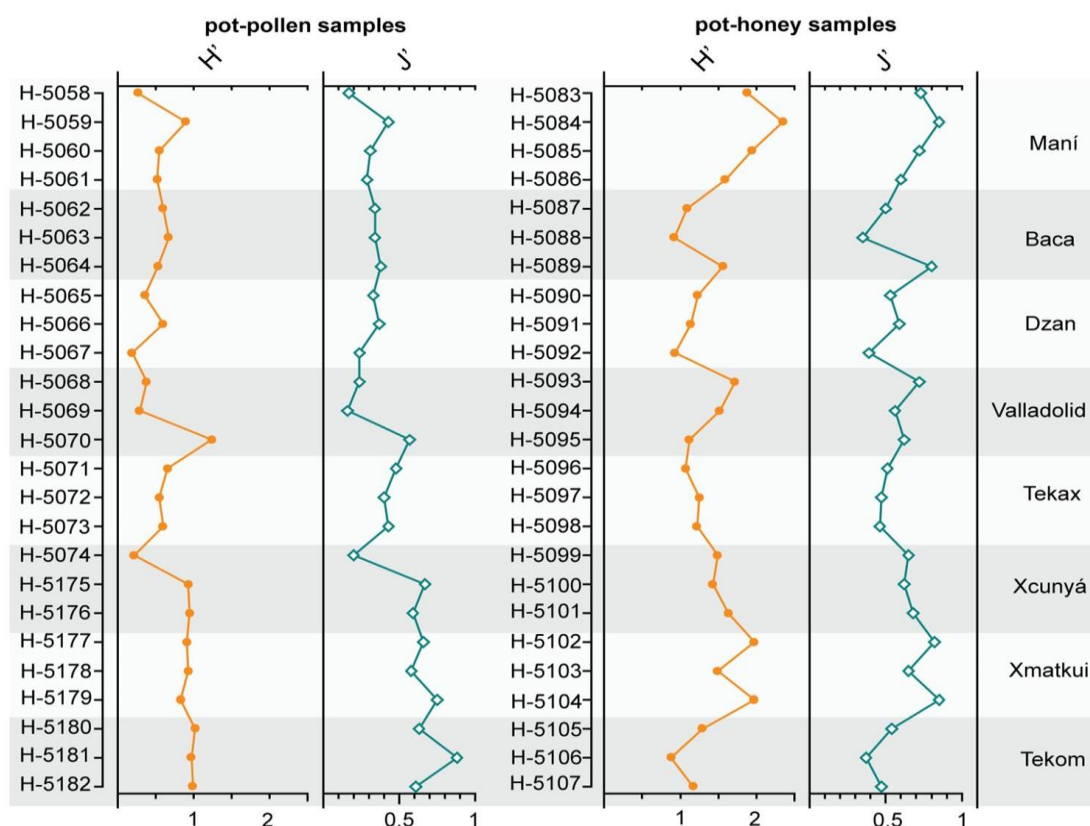


Figure 4. Diversity (H') and evenness (J') indices in the pot-pollen and pot-honey samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico

Table III Principal component analysis (PCA) of the *Melipona beecheii* pot-pollen spectrum

Eigenvectors PCA			
	PC 1	PC 2	PC 3
Eigenvalue	7.383	4.169	2.198
Variance (%)	71.566	20.003	7.5961
Cumulative variance (%)	71.566	91.569	99.1651
<i>Senna racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	-0.825	-0.280	-0.230
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	0.030	0.072	0.821
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	0.007	0.857	-0.334
<i>Bursera schlechtendalii</i>	0.376	-0.285	-0.252
<i>Bursera simaruba</i>	0.417	-0.313	-0.280

The PCA of the 25 honey samples (Figure 9) showed that the first four components account for 83.58% of the variance. The first component explains 33.94%, the second 23.38%, the third 14.22% and the fourth component 12.04%. The pollen types that account for the maximum variance among the samples are *S. racemosa* var. *racemosa*, *C. vitifolium*, *A. ramosissima*, *P. guajava*, *B. schlechtendalii* and *B. simaruba*, other less significant taxa explaining the percentage of variation are *L. punctatus*, *M. bahamensis* and *S. americanum* (Table V).

The pot-honey samples were associated into six groups, and these groups as well as the relationship among the samples are detailed in the cluster analysis (Figures 9 and 10). Group A contains four samples from Baca, Valladolid and Tekax which were associated mainly by *A. ramosissima*; group B clusters five samples from Xcunyah and Xmatkuil which share an abundance of *B. schlechtendalii* and *B. simaruba*; group C contains only five samples from Maní, Baca and Valladolid where

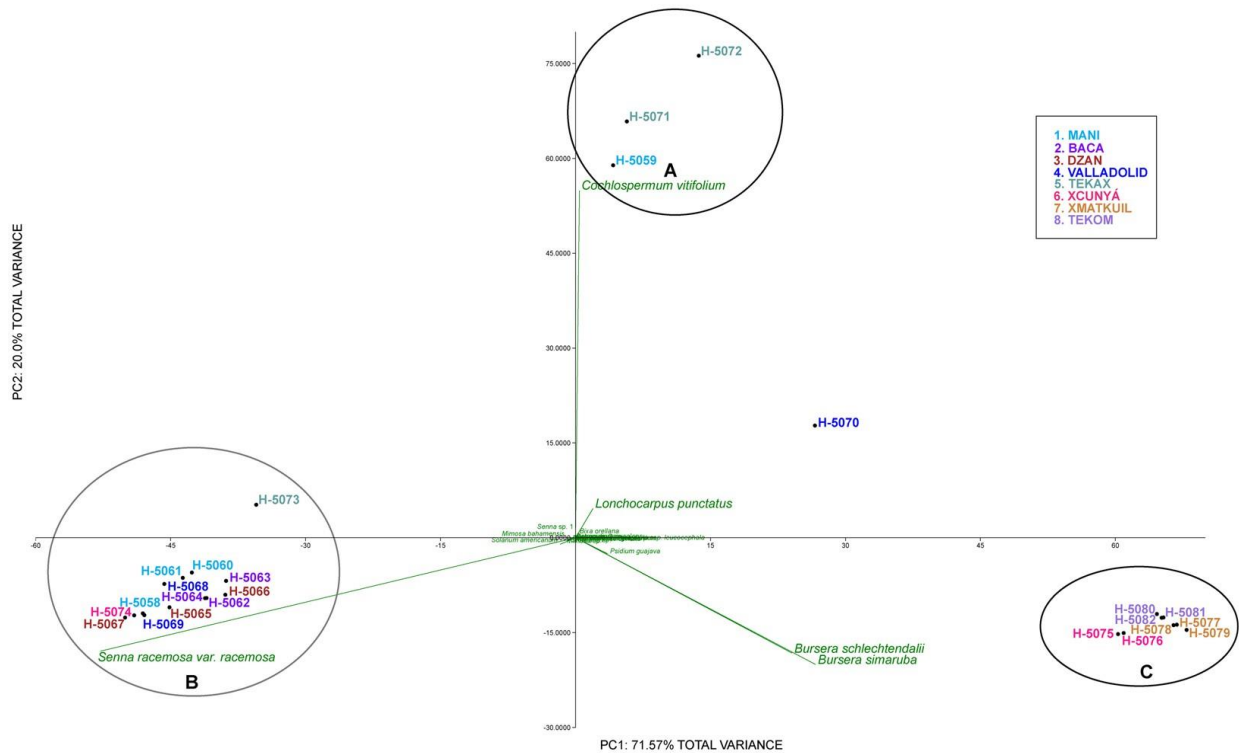


Figure 5. PCA of the *Melipona beecheii* pot-pollen samples collected in Yucatan, Mexico.

the significant elements were *S. americanum*, *M. bahamensis* among others; group D includes six samples from Baca, Dzan and Xcunyá associated by *S. racemosa* var. *racemosa*; group E contains two samples from Tekax by *C. vitifolium*, and group F relates the three samples from Tekom through *P. guajava* (Figures 9 and 10).

3.3. Comparative statistical analysis between the pot-honey and pot-pollen spectra

In order to determine the relationship between the pot-pollen and pot-honey samples, a primary component analysis was performed (Figure 11), which showed that the first three components explain 80.25% of the data variance. The first component accounts for 50.69%, the second component 17.76% and the third 11.80%. The pollen types explaining the maximum variance among the samples are *S. racemosa* var. *racemosa*, *C. vitifolium*, *A. ramosissima*, *B. simaruba* and *B.*

schlechtendalii; besides, other taxa of minor importance are *P. guajava*, *L. punctatus*, *M. bahamensis* and *S. americanum* (Table VI).

A total of five groups were formed (Figures 11 and 12): group A includes a total of 19 samples: 6 pot-honey and 13 pot-pollen samples from Maní, Baca, Dzan, Valladolid, Tekax and Xcunyá, all associated mainly by *S. racemosa* var. *racemosa*; in group B, there are 3 pot-pollen and 2 pot-honey samples from Tekax and Maní in which *C. vitifolium* is significant; group C contains 3 pot-honey samples from Tekom that share the dominance of *P. guajava*; group D comprises 5 pot-honey samples and 8 pot-pollen samples from Xcunyá, Xmatkuil and Tekom, which share an abundance of *B. schlechtendalii* and *B. simaruba*; finally, group E includes 9 pot-honey samples and one pot-pollen sample from Valladolid, Maní, Tekax and Baca, with a primary dominance of *A. ramosissima* and *L. punctatus* (Figures 11 and 12).

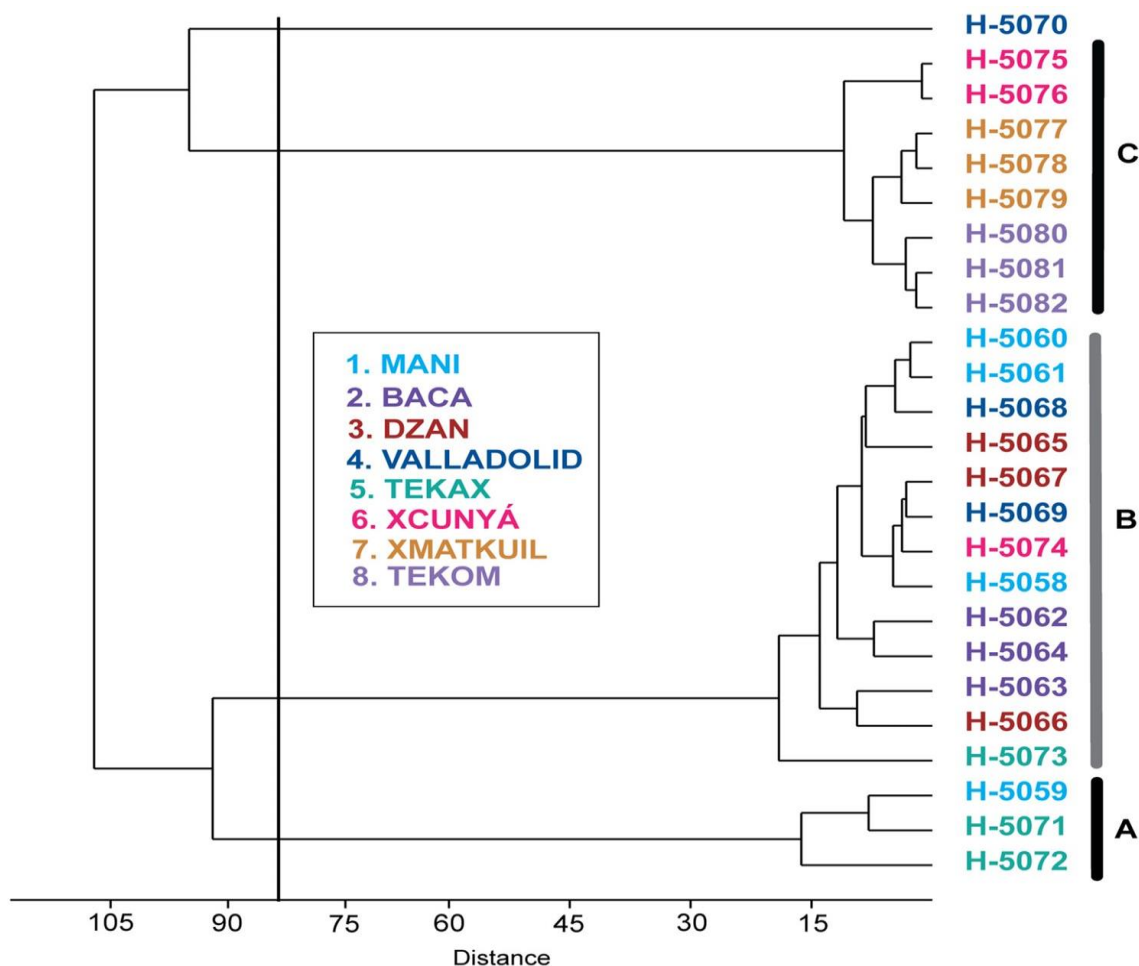


Figure 6. Cluster analysis of the pot-pollen samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.

3.4. Botanical characterization of pot-honey samples

The characterisation of *M. beecheii* honeys was carried out considering only nectar-producing plants, *i.e.* elements were reported to be exclusively polliniferous were not included in this analysis, so abundances were recalculated considering only the plants reported as nectar-producing. It should be noted that not all of these plants have been confirmed as nectar producers through studies, despite being considered nectariferous.

A total of 16 nectariferous plants from the arboreal, herbaceous, shrub and liana strata were recorded (Table VII). The Fabaceae family was the most significant with ten pollen types. The most important nectariferous plants were *A. ramosissima*, *Thrinax radiata*, *B. simaruba*, *B. schlechtendalii*, *Crotalaria* sp., *Leucaena leucocephala* var. *leucocephala*, *L. punctatus*, *Lonchocarpus* sp., *M. bahamensis*, *Mimosa* sp., *W. rotundifolia*, *P. guajava*, *Thouinia paucidentata* and *Serjania triquetra* (Figures 13 and 14).

Table IV Percentages of pollen spectra recorded in pot-honey samples of *Melipona beecheii* in Yucatan

	Maní		Baca		Dzán		Valladolid		Tekax		Xucuná		Xmatkuil		Tekom												
	5083	5084	5085	5086	5087	5088	5089	5090	5091	5092	5093	5094	5095	5096	5097	5098	5099	5100	5101	5102	5103	5104	5105	5106	5107		
Number of samples:	5083	5084	5085	5086	5087	5088	5089	5090	5091	5092	5093	5094	5095	5096	5097	5098	5099	5100	5101	5102	5103	5104	5105	5106	5107		
H-																											
AMARANTHACEAE																											
<i>Alternanthera</i>	0.6	12.2	6.6	52.5	0.8						50.3	63.4	65.1	5.7	3.6								0.6	0.6	0.4		
<i>tamosissima</i>																											
ANACARDIACEAE																											
<i>Astronium graveolens</i>																							1.5	1	0.8		
ARECACEAE																											
<i>Thrinax radiata</i>																											
ASTERACEAE																											
<i>Viguiera dentata</i>	0.2	1.4	7.6	4.1			0.4																			0.4	
BIXACEAE																											
<i>Cochlospermum</i>	7.2	5.3	2.4	0.6	0.4	0.4		2	1	8			13.1	67.4	65.5												
<i>vitifolium</i>																											
BURSERACEAE																											
<i>Bursera sinaruba</i>	3.3	4.5	0.6	0.6	2	0.2	0.2			0.4			1.2	2.6		32.7	35.8	2	19.5	41.5	15.8	12	7.4	12.7			
<i>Bursera schlechtendalii</i>	1.8	3.3			0.6								0.8	2		36.5	31.6	0.8	24.2	32.8	21.2	8.6	3.3	7.2			
FABACEAE																											
<i>Crotalaria</i> sp.	5.7	7.3	5.2	3.7			4.3	1.2	1.6	4.8																	
<i>Caesalpinia gaumeri</i>						1.4	0.2																				
<i>Desmodium</i> sp.			1.2								0.8																
<i>Desmanthus virgatus</i>	1	0.2	0.2	0.6	0.4					1.2	0.6																
<i>Leucaena leucocephala</i>	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.6					0.4		0.2	0.2		0.4	0.6	8.2	0.4							0.2	
<i>ssp. leucocephala</i>																											
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	1	3	1.6	5.9	3.6	5.4				40.4	22.5	16.7														1	
<i>Lonchocarpus</i> sp.	19.9	12	5.2	3.4	0.8	0.2				5			6	3.6										0.6			
<i>Mimosa bahamensis</i>	29.3	22.4	31.5	21.1	12.3	0.2	21.8	1.8	2	2.2	1	1	1.4			0.6	0.8	3.6	3.1	0.4	3.1	3.6	6.2	8			
<i>Mimosa</i> sp.	1.4	2.2	1.2		3.2	8.8	0.8	2	5.5	1.4	0.6		0.8	0.6	0.6												
Fabaceae																											
<i>Piscidia piscipula</i>																											
<i>Senna racemosa</i> var.	5.9	10.2	30.3	6.5	69.3	79	23.4	54.9	58	76.8	25.6	12.3	8.6	16.4	12.1	18.4	19.4	23.9	46	3.3	3.4	4.8	1.9	0.2	0.4		
<i>racemosa</i>																											
<i>Senna</i> sp.1																											0.2

Table IV (continued)

	Maní		Baca		Dzán		Valladolid		Tekax		Xucuyá		Xmatkuil		Tekom										
	5083	5084	5085	5086	5087	5088	5089	5090	5091	5092	5093	5094	5095	5096	5097	5098	5099	5100	5101	5102	5103	5104	5105	5106	5107
Number of samples:	5083	5084	5085	5086	5087	5088	5089	5090	5091	5092	5093	5094	5095	5096	5097	5098	5099	5100	5101	5102	5103	5104	5105	5106	5107
H-																									
<i>Vachellia</i> sp. 2																	2.8	0.8	0.6						
MALPIGHIACEAE																									
<i>Byrsosima</i> sp.																	15.7	4.3	15.8	1.1					0.4
MALVACEAE																									
<i>Waltheria rotundifolia</i>			2.2	6.9	0.4	15.6	0.4	1.6	0.8	0.2															
MYRTACEAE																									
<i>Psidium guajava</i>	2		0.8	0.8				0.6	0.6	0.4	0.8	0.4	1.4	0.8	0.4	1.4			18.2	10.7	23.1	64.8	78.6	66.9	
PINACEAE																									
<i>Pinus</i> sp.							0.8		0.4																
POLYGONACEAE																									
<i>Gymnopodium floribundum</i>								5.4	2								3.4	1.8	1.4	3.1	1.2	2.3	5	1.6	1.6
PRIMULACEAE																									
<i>Myrsine cubana</i>	0.8													0.8	1										
RUTACEAE																									
<i>Citrus</i> sp.																									
SAPINDACEAE																									
<i>Thouinia paucidentata</i>	1.8		0.4					1.2	1.4	1.8	0.4	0.6	0.6	0.8	0.8	0.4	0.6	0.6	0.8	6.2	0.8	8.7	0.4		0.2
<i>Serjania triquetra</i>							11.3	3.1	1.4	0.4															
SOLANACEAE																									
<i>Solanum americanum</i>	23.8	13	3.8	1.8	1.6	32.2	25.9	28.5	12.2	7	6.1	8.9	2.6	2.1	1.8				6	4.5	5.2	0.6	0.2		
<i>Solanum erianthum</i>			0.6																						

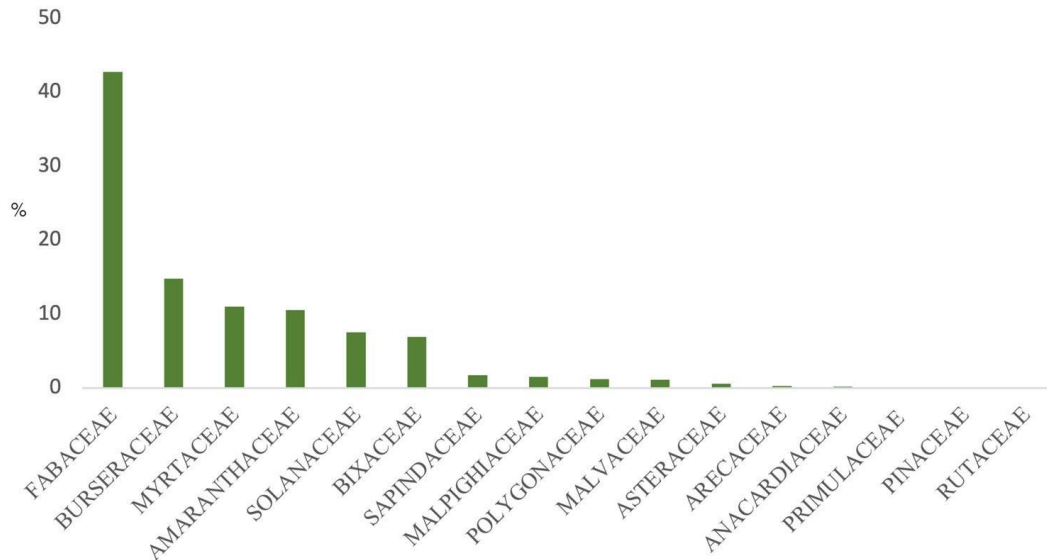


Figure 7. Percentages of the botanical families registered in the pot-honey of *Melipona beecheii* collected in the backyard meliponaries in Yucatan, Mexico.

A total of 15 honey samples were characterised as monofloral. Four samples were monofloral from *A. ramossissima*: H-5086 collected in Maní, H-5094 and H-5095 in Valladolid, as well as sample H-5096 in Tekax. In Xcunuyá, honey H-5100 was monofloral from *B. simaruba*, as well as H-5103 from Xmatkuil. A monofloral sample (H-5099) from *B. schlehtendalii* was collected in Xcunuyá. Sample H-5093 collected in Valladolid was monofloral from *L. punctatus*. In Maní, H-5083 and H-5085 were monofloral from *M. bahamensis*, just like H-5089 from Baca. All samples collected in Tekom (H-5105, H-5106 and H-5107) were monofloral from *P. guajava*. Finally, in Dzan, sample H-5090 was monofloral from *S. triquetra*.

By contrast, nine samples were classified as multifloral and one as bifloral. In the village of Maní, sample H-5084 was characterised as multifloral from *M. bahamensis*, *A. ramossissima*, *Lonchocarpus* sp. and *Crotalaria* sp., while in Baca, sample H-5087 was multifloral from *M. bahamensis*, *L. punctatus* and *Mimosa* sp.; H-5088 was multifloral from *L. punctatus*, *P. guajava* and *Mimosa* sp. In Dzan sample H-5091 was multifloral from *Crotalaria* sp., *Mimosa* sp. and *S. triquetra*, besides, sample H-5092 was multifloral of *Crotalaria* sp., *M. bahamensis*, *Mimosa* sp.,

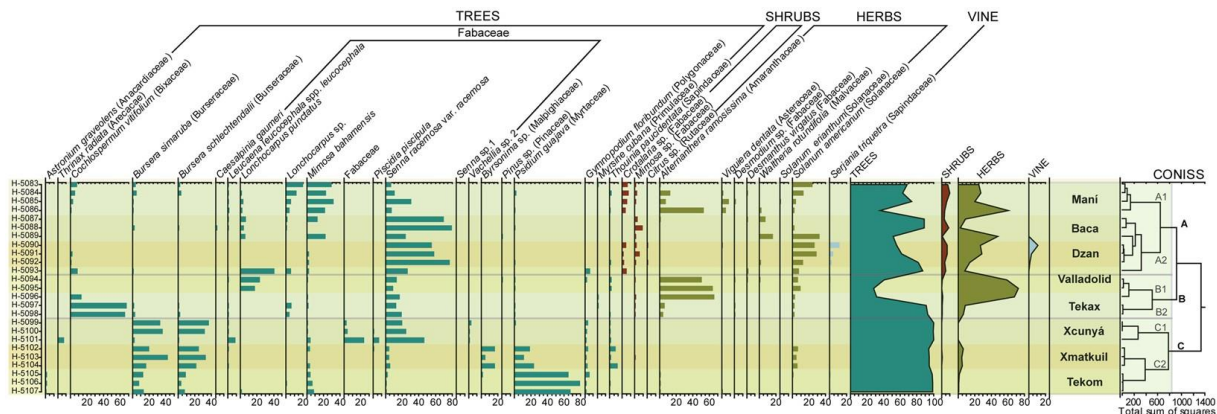


Figure 8. Melissopalynological spectrum of the *Melipona beecheii* pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.

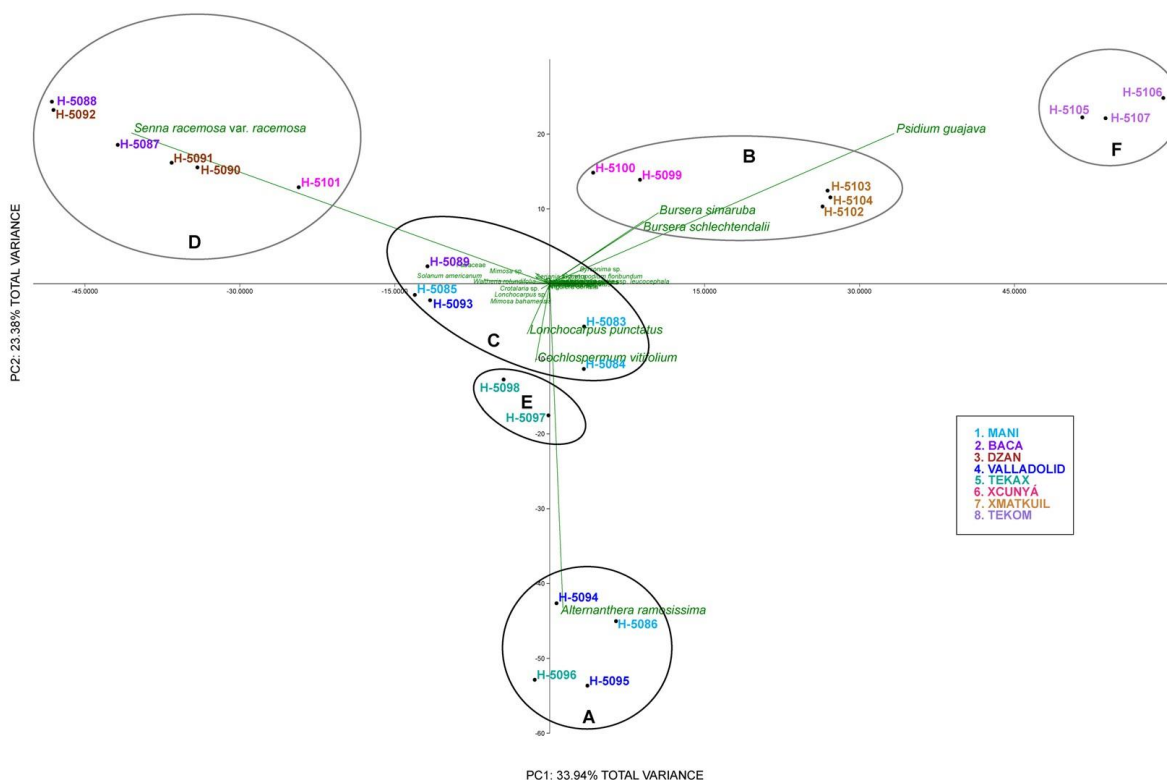


Figure 9. PCA of the *Melipona beecheii* pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.

S. triquetra and *W. rotundifolia*. In Tekax, sample H-5098 was multifloral from *A. ramosissima*, *B. simaruba*, *B. schlehtendalii* and *Lonchocarpus* sp., and sample H-5097 was bifloral from *A. ramosissima* and *Lonchocarpus* sp. In Xcunyá, sample H-5101 was multifloral from Fabaceae, *L.*

leucocephala, *Thrinax radiata* and *P. piscipula*. In Xmatkuil, honey samples H-5102 and H-5104 were multifloral from *B. simaruba*, *B. schlehtendalii*, *Byrsonima* sp., *P. guajava* and *T. paucidentata* (Figure 13).

Table V Principal component analysis (PCA) of the *Melipona beecheii* pot-honey spectrum

Eigenvectors PCA				
	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
Eigenvalue	5.338	4.233	3.478	2.709
Variance (%)	33.94	23.38	14.22	12.04
Cumulative (%)	33.94	57.32	71.54	83.58
Variable	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
<i>Senna racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	-0.737	0.367	-0.210	-0.170
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	-0.025	-0.190	0.836	-0.351
<i>Alternanthera ramosissima</i>	0.023	-0.788	-0.378	-0.019
<i>Psidium guajava</i>	0.607	0.365	-0.278	-0.539
<i>Bursera schlehtendalii</i>	0.166	0.153	0.097	0.531
<i>Bursera simaruba</i>	0.192	0.173	0.089	0.511
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	-0.040	-0.122	-0.088	-0.018
<i>Mimosa bahamensis</i>	0.010	0.070	0.147	-0.012
<i>Solanum americanum</i>	-0.116	0.009	-0.039	-0.007

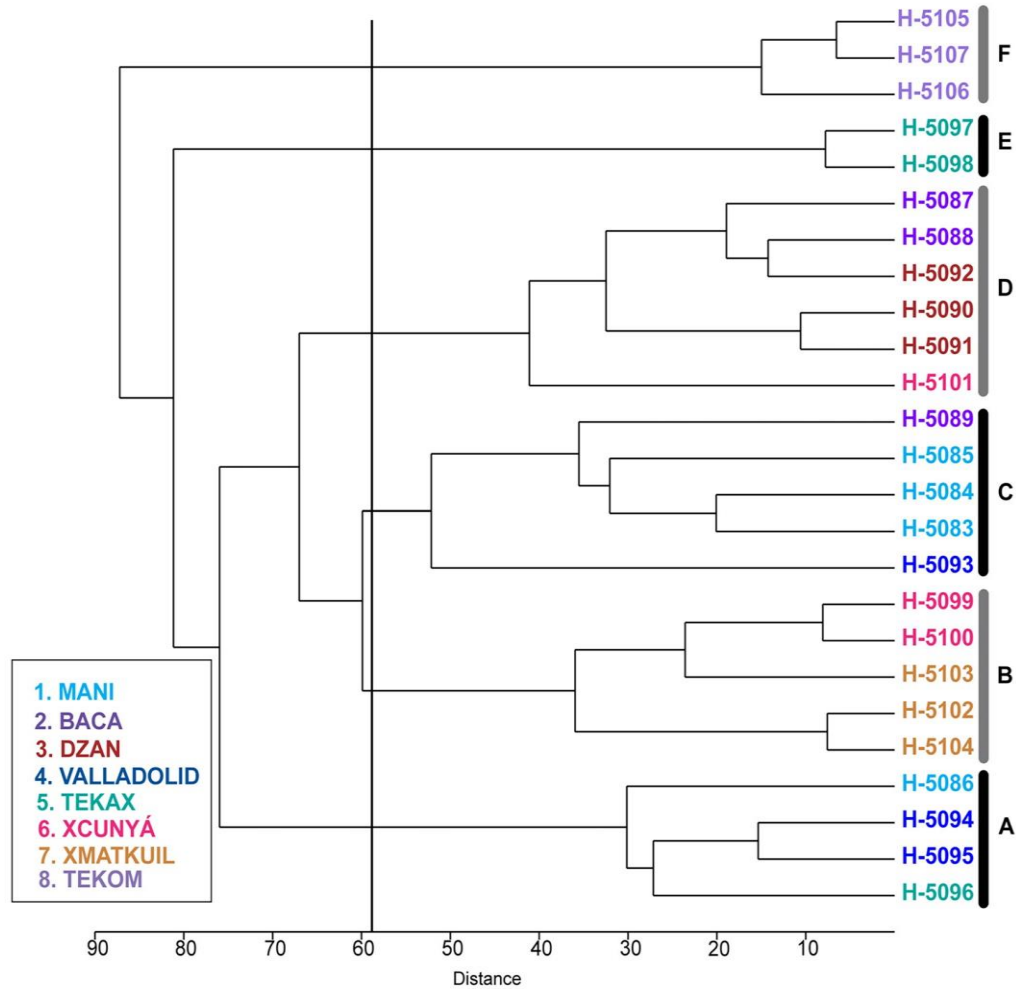


Figure 10. Cluster analysis for the pot-honey samples from *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.

The CONISS analysis formed three main groups with subgroups: group A included the meliponaries in Maní, Baca and Dzan where *M. beecheii* foraged at the arboreal, shrub and herbaceous strata; group B comprised Valladolid and Tekax, where the native bee predominantly collected from the arboreal and herbaceous strata; and in group C, consisting of the Xcunyá, Xmatkuil and Tekom meliponaries, the Mayan bee foraged at the arboreal stratum. A generally clear separation was observed among the samples from the different sites (Figure 13).

4. DISCUSSION

In the Yucatan Peninsula the floristic richness includes over 2300 species of vascular plants. Floristic studies carried out in Yucatan indicate

that the most common families in low deciduous forest are Fabaceae, Bignoniaceae, Convolvulaceae, Orchidaceae and Euphorbiaceae, while the families Fabaceae, Rubiaceae, Sapotaceae, Myrtaceae and Ebenaceae are most abundant in medium subdeciduous forest (Miranda 1958; Zamora Crescencio et al. 2008).

The most abundant family in the studied region is Fabaceae, with 236 species and 78 genera (Duno de Stefano et al. 2018), which has been reported as one of the most important families in Mexico that include polliniferous and nectariferous plants (Martínez-Hernández et al. 1993; Roubik and Villanueva-Gutiérrez 2009; Ramírez-Arriaga et al. 2016, 2018; López-Roblero et al. 2021; Ortiz-Reyes et al. 2022).

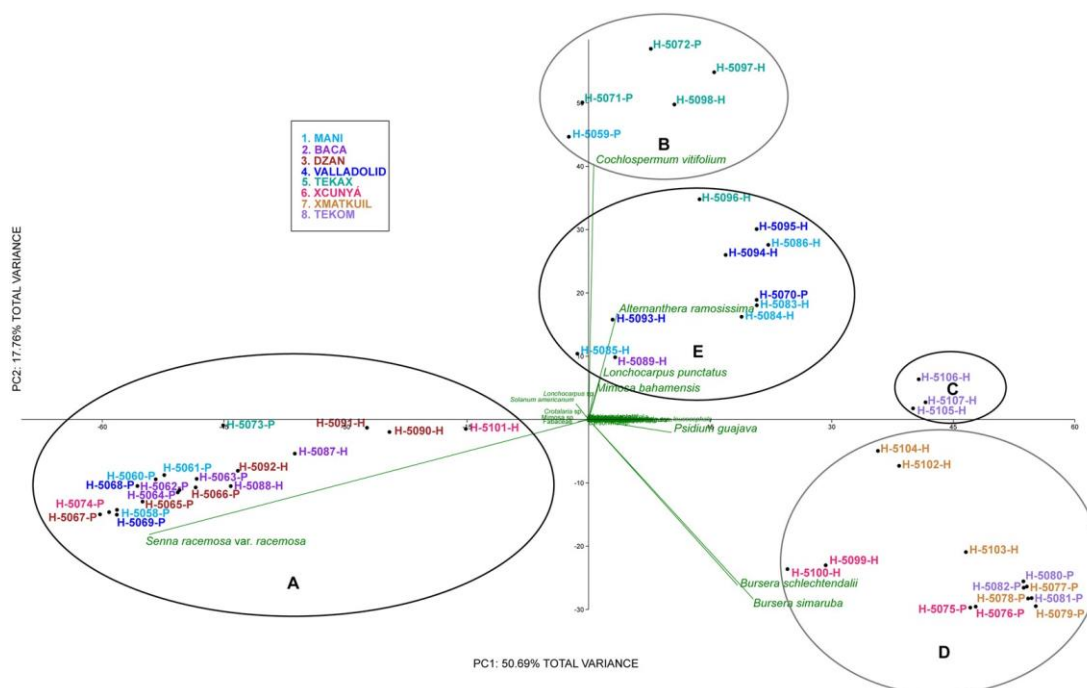


Figure 11. Comparative PCA between the *Melipona beecheii* pot-pollen and pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.

Table VI Comparative principal component analysis (PCA) between the *Melipona beecheii* pot-pollen and pot-honey spectra.

Eigenvectors PCA				
Variable	PC 1	PC 2	PC 3	
<i>Senna racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	-0.877	-0.294	-0.127	
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	0.010	0.654	-0.678	
<i>Alternanthera ramosissima</i>	0.057	0.272	0.454	
<i>Bursera simaruba</i>	0.329	-0.459	-0.294	
<i>Bursera schlechtendalii</i>	0.298	-0.424	-0.277	
<i>Psidium guajava</i>	0.166	-0.033	0.271	
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	0.025	0.109	0.212	
<i>Mimosa bahamensis</i>	0.010	0.070	0.147	
<i>Solanum americanum</i>	-0.025	0.041	0.112	

Five Fabaceae pollen types were notable in the present study: *L. punctatus*, *Lonchocarpus* sp., *M. bahamensis*, *Mimosa* sp. and *S. racemosa* var. *racemosa*. Pollen of *L. punctatus* has been recovered from *A. mellifera* honey samples in Quintana Roo (Córdova-Rodríguez et al. 2023), while *Lonchocarpus* sp. has been observed in pollen spectra of *A. mellifera* honey samples in Yucatan and Tabasco, as well as in pollen loads of *S. mexicana* and *Plebeia* sp. in Mexico and Brazil (Martínez-Hernández et al. 1993; Alfaro Bates et al. 2010; Villanueva-Gutiérrez 2002; Castellanos-Potenciano et al. 2012; Córdova-Córdova et al. 2013; da Silva Correia and Peruquetti 2023).

The *Mimosa* genus, which has 11 species in the Yucatan Peninsula, is an important pollen resource for stingless bees. It has also been reported in Panama, Brazil and Colombia (Aguilar-Sierra and Smith-Pardo 2009; Pinto da Luz et al. 2011; Barth et al. 2012; Roubik and Moreno Patiño 2018; da Silva Correia and Peruquetti 2023). As for the species *M. bahamensis*, it has been described as an important pollen and nectar resource

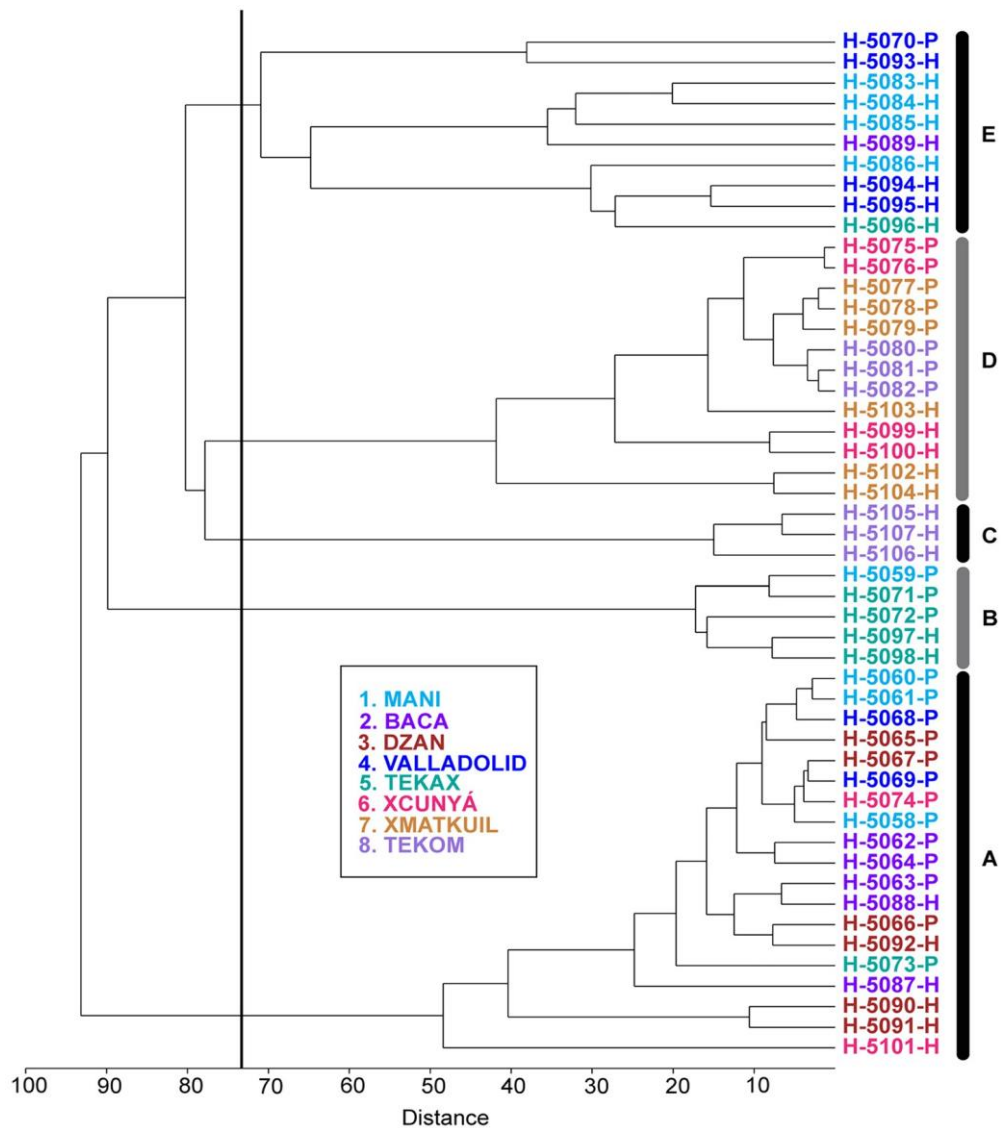


Figure 12. Comparative cluster between the *Melipona beecheii* pot-pollen and pot-honey samples collected in Yucatan, Mexico.

for *A. mellifera* in Yucatan (Villanueva-Gutiérrez 2002; Villanueva-Gutiérrez et al. 2009; Alfato et al. 2010; Córdova-Rodríguez et al. 2023). All the pollen types we found in pollen and honey have been reported as key sources of nectar and pollen for bees.

The *Senna* tree is very diverse in the American continent, and in the Yucatan Peninsula, 23 taxa have been reported. It is important to mention that over 70% of the *Senna* species have extrafloral nectaries visited by ants and that bees do not collect these sugary secretions (Marazzi et al. 2006). Further, *Senna* has been considered an important pollen resource in Yucatan, Campeche, Quintana Roo, Oaxaca, Veracruz and Brazil

Table VII Percentages of nectariferous plants recorded in pot-honey of *Melipona beecheii* samples in Yucatan

	Maní		Baca		Dzán		Valladolid		Tekax		Xcunuyá		Xmatkuil		Tekom											
	5083	5084	5085	5086	5087	5088	5089	5090	5091	5092	5093	5094	5095	5096	5097	5098	5099	5100	5101	5102	5103	5104	5105	5106	5107	
Number of samples:	5083	5084	5085	5086	5087	5088	5089	5090	5091	5092	5093	5094	5095	5096	5097	5098	5099	5100	5101	5102	5103	5104	5105	5106	5107	
H-																										
AMARANTHACEAE																										
<i>Alternanthera ramosissima</i>	0.9	17	10.4	57.5	7						61.9	76.8	95.9	31.1	25									0.6	0.6	0.4
ANACARDIACEAE																										
<i>Astronium graveolens</i>																								1.5	0.9	0.7
ARECACEAE																										
<i>Thrinax radiata</i>																										
ASTERACEAE																										
<i>Viguiera dentata</i>	0.3	1.9	1.2	4.5			1.4																			0.4
BURSERACEAE																										
<i>Bursera simaruba</i>	5.2	6.3	0.9	0.6		6.6	2.1			0.6				6.4	18	40.5	47		3.8	26	47.3	21.2	12.4	7.4	12.8	
<i>Bursera schlechtendalii</i>	2.7	4.6		4.7										4.3	13.8	45.2	41.5		1.9	32.2	37.3	28.4	8.8	3.3	7.2	
FABACEAE																										
<i>Crotalaria</i> sp.	8.9	10.1	8.2	4.1			20	12.3	11.1	8																
<i>Caesalpinia gaumeri</i>						3.1	0.7																			
<i>Desmodium</i> sp.			1.9								0.9			3.2	4.1											
<i>Desmanthus virgatus</i>	1.3	0.3		4.3		2.3			2																	
<i>Leucaena leucocephala</i> ssp. <i>leucocephala</i>	0.3	0.5	0.9	0.8	2	3.5					0.4			1	1.3	0.4	0.7		14.7	0.5		0.2				
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	1.3	4.7	4.7	1.7	15.3	18.4	12.3			68.1	27.7	20.2														0.9
<i>Lonchocarpus</i> sp.	31.5	16.8	8.2	3.6	6	7.4				8.3				33.3	25											0.5
<i>Mimosa bahamensis</i>	46.4	31.4	50.1	23.1	37.6	3.1	50	13.4	22.2	3.6	1.2			1.4	7.5		0.7	1	7.3	4.1	0.4	4.1	3.7	6.2	8	
<i>Mimosa</i> sp.	2.1	3	1.9		11.6	27.4	1.8	11.4	42.6	19.6	0.7			1.1	3.2	4.1										0.4
Fabaceae																										
<i>Piscidia piscipula</i>																										
<i>Vachellia</i> sp. 2																										
MALVACEAE																										
<i>Waltheria rotundifolia</i>																										
MYRTACEAE																										
						2.3	16	5.8	35.7	2.1	13.6	0.9														

Table VII (continued)

	Maní	Baca	Dzán	Valladolid	Tekax	Xcunjá	Xmatkuil	Tekom
Number of samples:	5083 5084 5085 5086 5087 5088 5089	5087 5088 5089	5090 5091 5092	5093 5094 5095	5096 5097 5098	5099 5100	5101 5102 5103	5104 5105 5106 5107
H-								
<i>Psidium guajava</i>	2.7	0.8	5.1	0.7	4.3	1.7	24.2	67.1 78.9 67.4
POLYGONACEAE								
<i>Gymnopodium floribundum</i>			9	2.4		4.2 2.3	2.8 4.1	5.1 1.5 1.5
PRIMULACEAE								
<i>Myrsine cubana</i>	1.2				1.1 5.3			
RUTACEAE								
<i>Citrus</i> sp.			2.1		0.2			
SAPINDACEAE								
<i>Thouinia paucidentata</i>	2.4	0.4	7.6	1.6	2.1	2.7	1.6 8.2	0.3 11.6
<i>Serjania triquetra</i>			60	31.4	14.5	0.4		0.3 0.1

and is among the 10 important genera for *M. beecheii* and other stingless bees (Enríquez and Dardón 2007; Ramírez-Arriaga et al. 2011, 2018; Villanueva-Gutiérrez et al. 2018; Ortiz-Reyes et al. 2022; da Silva Correia and Peruquetti 2023). Although it is not a nectariferous plant, pollen grains of *S. racemosa* have been frequently recorded in *M. beecheii*, *Scaptotrigona mexicana* and *A. mellifera* honey pollen spectra in Veracruz, Tabasco, Yucatan, Campeche and Quintana Roo (Villanueva-Gutiérrez et al. 2009; Córdova-Córdova et al. 2013; Ortiz-Reyes et al. 2022; Córdova-Rodríguez et al. 2023).

Other important pollen sources rely on the Amaranthaceae family. *A. ramosissima* has been recovered from *A. mellifera* honeys in the Yucatan Peninsula, Brazil and Argentina (Cabrera 2006; Pereira-Oliveira et al. 2010; Ramos-Díaz et al. 2015).

In addition, the “copal” tree or *Bursera* spp. has been reported as a species of great nectar-polliniferous relevance for *M. beecheii*, *S. mexicana*, *S. hellwegeri*, *Cephalotrigona* sp., *A. mellifera*, among others, in the states of Puebla, Oaxaca, Tabasco, Yucatan, Campeche, Quintana Roo, as well as in Panama (Ramírez-Arriaga and Martínez-Hernández 2007; Villanueva-Gutiérrez et al. 2009, 2018; Alfaro et al. 2010; Quiroz-García et al. 2011; Ramírez-Arriaga et al. 2011, 2018, 2020; Castellanos-Potenciano et al. 2012; Roubik and Moreno 2018; López-Roblero et al. 2021).

Cochlospermum vitifolium has been reported as an important pollen resource for *M. beecheii*, *Cephalotrigona* sp., *Tetragona* sp. and *A. mellifera* in the Yucatan Peninsula, in Panama, and in other regions of the Americas (Alfaro et al. 2010; CONABIO and AECID 2011; Villanueva-Gutiérrez 2018; Roubik and Moreno 2018; Córdova-Rodríguez et al. 2023).

The cultivated tree *P. guajava* is also considered a nectar-polliniferous plant for *M. crinita*, *M. scutellaris trinitatis*, *M. favosa*, *M. eburnea*, *Tetragonisca angustula*, *Trigona mieldaria*, *Trigona nigra* var. *paupera* and *A. mellifera* in Colombia, Brazil and Trinidad; as well as for *Scaura*, *Cephalotrigona* and *Tetragona* in Panama (Sommeijer et al. 1983; Alfaro et al. 2010; Pereira-Oliveira et al. 2010; Obregón 2011; Córdova-Córdova et al. 2013; Roubik and Moreno

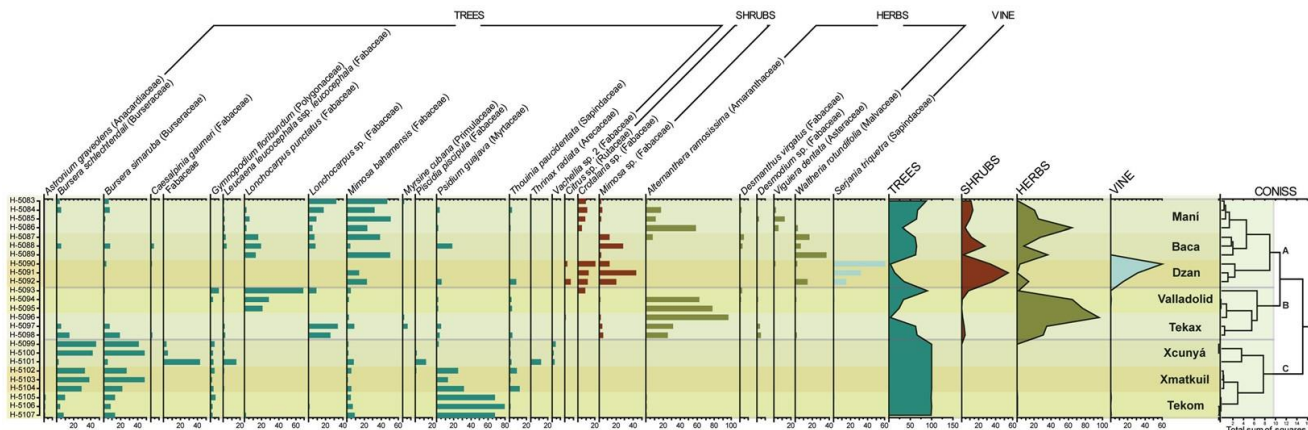


Figure 13. Melissopalynological spectrum of the nectariferous plants recovered from the pot-honey samples of *Melipona beecheii* collected in Yucatan, Mexico.

2018; Ortiz-Reyes et al. 2022; da Silva Correia and Perquetti 2023).

The herbaceous *S. americanum* has been reported in Spain and Colombia in honeys and pollen loads of *A. mellifera* (Girón-Vanderhuck 1995; Díaz-Losada et al. 1997; Terrab et al. 2004). Also, *Solanum* sp. has been cited in studies of *M. beecheii*, *A. mellifera*, *Cephalotrigona* sp., *M. crinitaha*, *M. fasciata*, *S. pectoralis*, *Tetragona* sp., *Trigona (Tetragonisca) angustula*, *T. (Tetragona) dorsalis*, *T. fuscipennis* and *T. muzoensis* in Mexico, Brazil, Colombia and Panama (Aguilar-Sierra and Smith-Pardo 2009; Villanueva-Gutiérrez et al. 2009, 2018; Ramírez-Arriaga et al. 2016; Roubik and Moreno 2018; da Silva Correia and Perquetti 2023).

The melissopalynological analyses of the present study suggested that *M. beecheii* workers incorporate pollen grains from polliniferous plants into honey pots only as an indirect action and probably during the packaging process. This is why it was possible to report pollen spectra of these honey samples and honey should only be characterised when nectariferous elements are included. In this sense, the recalculations we performed made it possible to characterise the monofloral honeys of *M. beecheii* from *A. ramosissima*, *B. simaruba*, *L. punctatus*, and *M. bahamensis*. It should be noted that these resources

have also been indicated as important for *A. mellifera* in Yucatan, Campeche and Quintana Roo (Cabrera 2006; Villanueva-Gutiérrez et al. 2009; Plan Rector 2011; Castellanos-Potenciano et al. 2012; Ramos-Díaz et al. 2015). By contrast, the pollen types *B. simaruba*, *B. schlehtendalii*, *M. bahamensis*, *L. leucocephala*, *L. punctatus*, *Lonchocarpus* sp., *M. bahamensis*, *P. piscipula*, *P. guajava*, *T. radiata* and *W. rotundifolia* were recorded in multifloral honey samples and in one bifloral honey.

Studies of the pollen spectrum show the polylectic behaviour of stingless bees, since they obtain their resources from diverse plant species belonging to local vegetation such as secondary and cultivated vegetation; in the analysis of pollen pots of *M. beecheii* in Campeche, monolectic and oligolectic temporal or local behaviour has been observed (Ramírez-Arriaga et al. 2018). Our results suggest polylectic foraging, since the foraging of *M. beecheii* includes diverse plant species; however, monolectic and oligolectic floral foraging were also observed in the Mayan stingless bee during the collection of pollen and nectar resources; this behaviour has been observed in *A. mellifera* and in diverse native bees (Ramírez-Arriaga and Martínez-Hernández 2007; Ramírez-Arriaga et al. 2018).

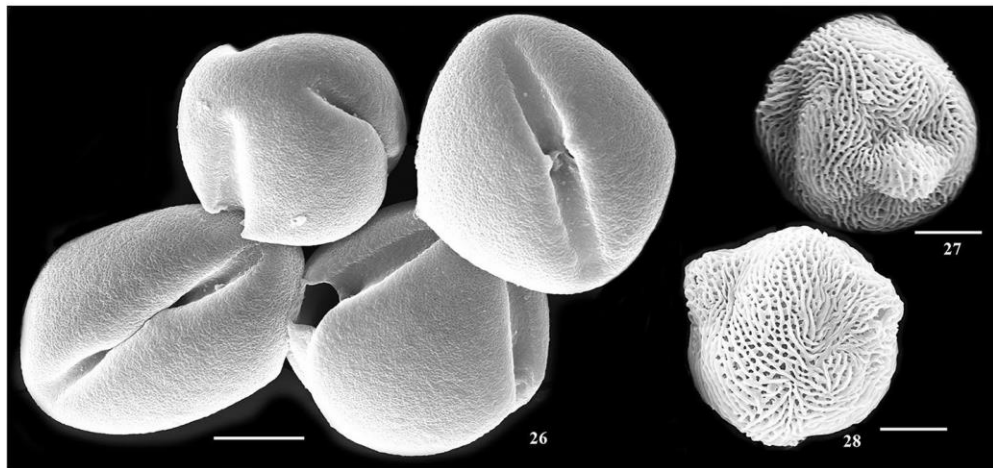
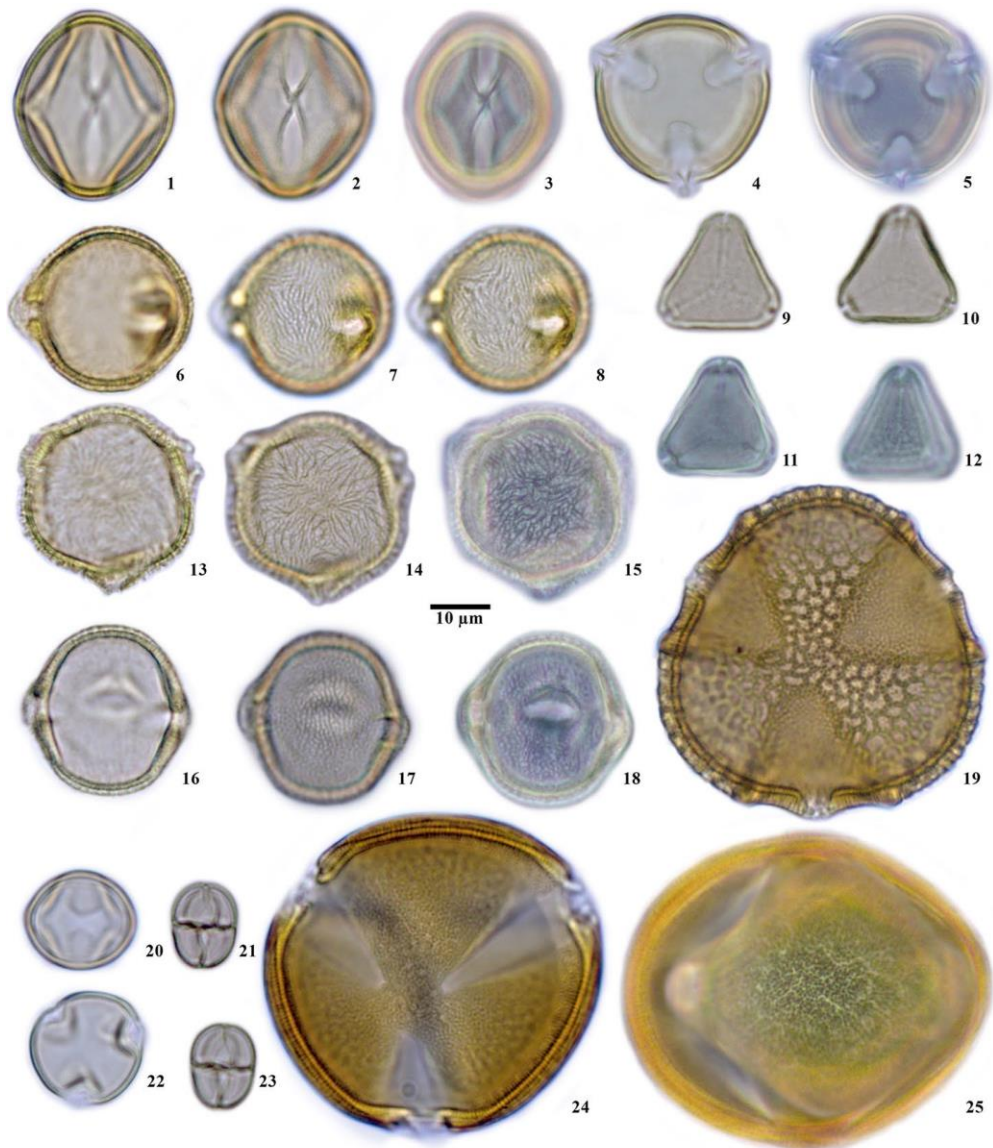


Figure 14. Pollen grains acetolysed from the pot-pollen and pot-honey samples of *Melipona beecheii* in Yucatan, Mexico. **1–5, 26** *Senna racemosa* var. *racemosa*. **6–8, 11–15, 28** *Bursera schlechtendalii*. **16–18, 27** *Bursera simaruba*. **9–12** *Psidium guajava*. **19** *Caesalpinia gaumeri*. **20, 22** *Cochlospermum vitifolium*. **21, 23** *Mimosa bahamensis*. **24, 25** *Leucaena leucocephala* ssp. *leucocephala*. **1–25** optical photomicrographs. **3, 5, 11, 12, 15, 18, 25** photomicrographs in phase contrast. **26–28** photomicrographs taken with scanning electron microscopy (SEM), scales represent 10 µm.

5. CONCLUSIONS

Our research found that the primary source of pollen in the pot-honey and pot-pollen samples of *M. beecheii* is derived from the Fabaceae family. This family is known to be one of the most diverse across the peninsula. However, we also found that species from the Burseraceae family and other minor families that are commonly found in the area may also play a crucial role as pollen and nectar sources for this bee.

The Principal Component Analysis (PCA) revealed that *S. racemosa* var. *racemosa* and *C. vitifolium* were the most significant contributors to the variance in the pot-pollen samples. It is worth noting that the honey of *M. beecheii* has a high abundance of pollen grains from *A. ramosissima*, *S. racemosa* var. *racemosa*, and *P. guajava*. According to the PCA analysis, these plants also contributed significantly to the variance in the analysed pot-honey samples.

The results suggest that plant diversity is critical in conserving bee resources in the Yucatan Peninsula. Our research also provides valuable information on the sustainable management of stingless beekeeping in the Yucatan Peninsula. Furthermore, this research can aid in decision-making processes that prioritize flora conservation, which is of great importance to stingless beekeepers committed to the welfare of the Mayan bee.

ACKNOWLEDGEMENTS

Many thanks are due to all the stingless bee keepers from the different sites in Yucatan State, Mexico. We thank Patrick Bennett Weill for proofreading and the revision of the English version. The authors also acknowledge Margarita Reyes-Salas and Sonia Ángeles-García for taking SEM photomicrographs.

AUTHOR CONTRIBUTION

AIBP, ERA, and AC: study conception, experimental design, and manuscript revision; AIBP and AC: fieldwork; AIBP and ERA: melissopalynology work, statistical analysis, data interpretation, and drafting of the paper.

FUNDING

The first author would like to thank CONAHCYT for the grant conferred during his doctoral studies (850354).

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

Data availability is not applicable; All data are included in this manuscript.

CODE AVAILABILITY

Not applicable.

DECLARATIONS

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

REFERENCES

- Aguilar-Sierra CI, Smith-Pardo AH (2009) Abejas visitantes de *Mimosa pigra* L (MIMOSACEAE) comportamiento de pecoreo y cargas polínicas. *Acta Biológica Colombiana* 14(1):109–120. http://www.scielo.org.co/ojs/cielo.php?pid=S0120-548X2009000100006&script=sci_artext
- Alfaro BRG, González J, Ortiz DJJ, Viera CFA, Burgos PAI, Martínez HE, Ramírez-Arriaga E (2010) Caracterización palinológica de las mieles de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Mérida-Yucatán. https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/versiones_digitales/mieles.pdf
- Ayala R (1999) Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* 106:1–123. https://www.academia.edu/2953968/Ayala_R_1999_Revisi%C3%B3n_de_las_abejas_sin_aguij%C3%B3n_de_M%C3%A9xico_Hymenoptera_Apidae_meliponini_Folia_Entomologica_Mexicana_106_1_123
- Baker HG, Baker I (1983) A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley B, Elias TS (eds) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, pp 126–152
- Barth OM, Freitas AS, Almeida-Muradian LB (2012) Palynological analysis of Brazilian stingless bee pot-honey. In: Vit P, Roubik DW (eds) *Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots*. SABER-ULA, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, pp 1–8. https://www.researchgate.net/publication/269990801_Palynological_analysis_of_Brazilian_stingless_bee_pot-honey
- Cabrera M (2006) Caracterización polínica de las mieles de la provincia de Formosa, Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales nueva serie* 8(2):135–142. <http://revista.museo.argentina.gob.ar/ojs/index.php/RevMus/artic/ver/ver/312/296>
- Canto A, Rodríguez R, Jiménez C, Olalde I, Carrillo L, Martínez J (2021) Abejas del Mayab, de la cosmogonía maya a una colección etnobiológica del Jardín Botánico Regional “Roger Orellana.” *Desde El Herbario CICY* 13:162–167
- Castellanos-Potenciano BP, Ramírez-Arriaga E, Zaldivar-Cruz JM (2012) Análisis del contenido polínico de mieles producidas por *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae) en el estado de Tabasco. *Acta zoológica mexicana* 28(1):13–36. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0065-17372012000100002&script=sci_abstract&lng=pt
- CONABIO (2018) *Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CDMX*
- CONABIO and AECID (2011) *Plan rector para promover una Denominación de Origen de mieles de la Península de Yucatán*. https://atlas.nacionales.ejasmx.github.io/atlas/pdfs/PlanRector_DenominacionOrigenMielesPeninsulaYucatan.pdf
- Córdova-Córdova CI, Ramírez-Arriaga E, Martínez-Hernández E, Zaldivar-Cruz JM (2013) Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera* L) de cuatro regiones del estado de Tabasco, México, mediante técnicas melisopolinológicas. *Universidad y ciencia* 29(2):163–178. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-29792013000200006&script=sci_abstract&lng=pt
- Córdova-Rodríguez A, Aragón-Moreno AA, Islebe GA, Torrescano-Valle N (2023) Botanical characterization of *Apis mellifera* honeys in areas under different degrees of disturbance in the southern Yucatan peninsula, Mexico. *Palynology*. <https://doi.org/10.1080/01916122.2023.2215290>
- da Silva Correia FC, Peruquetti RC (2023) Pollen niche of *Melipona crinita* Moure & Kerr, 1950 (Hymenoptera: Apidae) in a meliponary of Acre, Brazil: a study case. *Revista Chilena de Entomología* 49(2):237–254. <https://doi.org/10.35249/rche.49.2.23.04>
- Díaz-Losada E, González-Porto A, Saa-Otero MP (1997) Estudio melisopolinológico en Galicia (NW de España). *Orsis* 12:27–38
- Duno de Stefano R, Ramírez Morillo I, Tapia-Muñoz J, Hernández-Aguilar S, Can L, Cetzal-Ix W, Méndez-Jiménez N, Zamora-Crescencio P, Gutiérrez-Báez C, Carnevali Fernández-Concha G (2018) Aspectos generales de la flora vascular de la Península de Yucatán Mexicana. *Bot Sci* 96(3):515–532. <https://doi.org/10.17129/botsci.1868>
- Durán-García R, García-Contreras G (2011) Distribución espacial de la vegetación. In: Durán-García R, Méndez M (eds) *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. CICY, PD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, Mérida-Yucatán, pp 131–135. <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/>

- Sitios/ Biodiversidad/ pdfs/ Cap3/ 03% 20Distribución% 20especial. pdf
- Enríquez E, Dardón M (2007) Caracterización de la miel de meliponinos de distintas regiones biogeográficas de Guatemala. Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informacion/prunian/INF-2006-027.pdf>
- Erdtman G (1960) The acetolysis method, a revised description. *Sven Bot Tidskr* 54:561–564
- Espinoza-Toledo C, Vázquez-Ovando A, de los Santos RT, López-García A, Albores-Flores V, Grajales-Conesa J (2018) Miel de abejas sin aguijón del Soconusco, Chiapas: enfoque complementario. *Rev Biol Trop* 66(4):1536–1547. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32181>
- Girón-Vanderhuck M (1995) Análisis palinológico de la miel y la carga de polen colectada por *Apis mellifera* en el suroeste de Antioquia. *Colombia Bol Mus Ent Univ Valle* 3(2):35–54
- Grimm EC (1987) CONISS: a Fortran 77 program for stratigraphically constrained cluster analysis by the method of incremental sum of squares. *Comput Geosci* 13:13–35
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2007) PAST paleontological statistics. <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>
- López-Roblero E, Espinoza-Toledo C, López-García J, Grajales-Conesa J, Quiroz-García D (2021) Floral resources collected by four native bees species in southern Mexico. *Grana* 60(1):57–68. <https://doi.org/10.1080/00173134.2020.1767195>
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G (1978) Methods of melissopalynology. *Bee World* 59:139–157. https://scholar.google.com/scholar?cluster=1276195483007683336&hl=es&as_sdt=0_5#d=gs_qabs&t=1694109772052&u=%23p%3DOG5PXk2SG7EJ
- Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E (2006) Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, *Cassiinae*) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *Am J Bot* 93:288–303. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.2.288>
- Martínez-Hernández E, Cuadriello-Aguilar JJ, Tellez-Valdéz O, Ramírez-Arriaga E, Sosa NS, Melchor SJ, Medina-Camacho M, Lozano GS (1993) Atlas de las plantas y el polen utilizados por las cinco especies principales de abejas productoras de miel en la región del Tacaná. Publicación especial del Instituto de Geología, U.N.A.M, México
- Miranda F (1958) Estudios acerca de la vegetación. In: Beltrán E (ed) Los recursos naturales del sureste y su aprovechamiento, Tomo II. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, CDMX, pp 215–271
- Musicante ML, Galetto L (2008) Características del néctar de *Cologania broussonetii* (Balb) DC (Fabaceae) y su relación con los visitantes florales. *Ecología Austral* 18(2):195–204. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X200800200004&lng=es&tlng=pt
- Obregón CD (2011) Origen botánico de la miel y el polen provenientes de nidos de *Melipona eburnea* Friese, 1900 y *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), (Apidae: Meliponini) para estimar su potencial polinizador. Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8598>
- Ortiz-Reyes LY, Quiroz-García DL, Arreguín-Sánchez ML, Fernández NR (2022) Origen botánico y caracterización fisicoquímica de la miel de meliponinos (Apidae: Meliponini) de Teocelo, Veracruz, México. *Polibotánica* 54(27):153–170. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.10>
- Pacheco-Paloma KG (2011) Recursos florísticos empleados por *Melipona beecheii* Bennett (Apidae: Meliponinae), durante la época de lluvias 2008, en Chiná. Universidad Autónoma de Campeche, Campeche. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, p 106
- Palacios-Chávez R, Ludlow-Wiechers B, Villanueva-Gutiérrez R (1991) Flora palinológica de la reserva de la biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. *CiQRO, Chetumal-Quintana Roo*
- Pereira-Oliveira P, van den Berg C, Santos FDARD (2010) Pollen analysis of honeys from Caatinga vegetation of the state of Bahia, Brazil *Grana* 49(1):66–75. <https://doi.org/10.1080/00173130903485122>
- Pielou EC (1977) *Mathematical ecology*. Wiley, New York
- Pinto da Luz CF, Fernandes-Salomão TM, Alvarenga Lage LG, Canto Resende H, Garcia Tavares M, Oliveira-Campos LA (2011) Pollen sources for *Melipona capixaba* Moure & Camargo: an endangered Brazilian stingless bee. *Psyche J Entomol*. <https://doi.org/10.1155/2011/107303>

- <https://www.hindawi.com/journals/psychology/2011/107303/>
- Quiroz-García DL, Arreguín-Sánchez MDLL, Fernández-Nava R, Martínez-Hernández E (2011) Patrones estacionales de utilización de recursos florales por *Scaptotrigona hellwegeri* en la Estación de Biología Chamela, Jalisco, México. *Polibotánica* 31:89–119. <https://doi.org/10.35249/rche.49.23.04>
- Ramírez-Arriaga E, Martínez-Hernández E (2007) Melissopalynological characterization of *Scaptotrigona mexicana* Gúerin (Apidae: Meliponini) and *Apis mellifera* L. (Apidae: Apini) honey samples in northern Puebla state. *México Journal of Kansas Entomological Society* 80:377–391. [https://doi.org/10.2317/0022-8567\(2007\)80\[377:MCOSMG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2317/0022-8567(2007)80[377:MCOSMG]2.0.CO;2)
- Ramírez-Arriaga E, Navarro-Calvo LA, Díaz-Carbajal E (2011) Botanical characterization of Mexican honeys from a subtropical region (Oaxaca) based on pollen analysis. *Grana* 50(1):40–54. <https://doi.org/10.1080/00173134.2010.537767>
- Ramírez-Arriaga E, Martínez-Bernal A, Ramírez Maldonado N, Martínez-Hernández E (2016) Análisis palinológico de mieles y cargas de polen de *Apis mellifera* (Apidae) de la región Centro y Norte del estado de Guerrero, México. *Bot Sci* 94(1):141–156. <https://doi.org/10.17129/botsci.217>
- Ramírez-Arriaga E, Pacheco-Palomo KG, Moguel-Ordoñez YB, Zepeda-García MR, Godínez-García LM (2018) Angiosperm resources for stingless bees (Apidae, Meliponini): a pot-pollen melittopalynological study in the Gulf of Mexico. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW (eds) *Pot-pollen in stingless bee melittology*. Springer, Cham-Switzerland, pp 111–130. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5_9
- Ramírez-Arriaga E, Martínez-Hernández E, Reyes-Salas O, Sánchez-Dirzo MG, Castillo-Hernández MA (2020) Contenido polínico y análisis fisicoquímico de mieles de *Scaptotrigona mexicana* (Meliponini, Apidae) colectadas en el municipio de Cuetzalan del Progreso, Puebla. In: Castillo-Hernández MA (ed) *Estudio transdisciplinario de meliponicultura en la región de Cuetzalan, Puebla: análisis etnocientífico, etnoarqueológico y etnobiológico de la producción de miel virgen*. Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Investigaciones Antropológicas-EcceHomo-Conacyt, CDMX, pp 173–219
- Ramos-Díaz A, San Román-Ávila, Noriega-Trejo R, Góngora-Chin R, Sánchez-Contreras A, Rodríguez-Buenfil I (2015) Catálogo de los principales tipos polínicos encontrados en las mieles producidas en la Península de Yucatán. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Mérida-Yucatán. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5f243c5652181.pdf
- Rosales GRO (2012) Medicinal uses of *Melipona beecheii* honey, by the ancient Maya. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW (eds) *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. Springer, New York, pp 229–240. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_15
- Roubik DW, Moreno PJE (2018) The stingless honey bees (Apidae, Apinae: Meliponini) in Panama and pollination ecology from pollen analysis. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW (eds) *Pot-pollen in stingless bee melittology*. Springer, New York, pp 47–66
- Roubik DW, Villanueva-Gutiérrez R (2009) Invasive Africanized honey bee impact on native solitary bees: a pollen resource and trap nest analysis. *Biol J Lin Soc* 98(1):152–160. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01275.x>
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, p 96
- Sommeijer MJ, De Rooy GA, Punt W, De Bruijn LLM (1983) A comparative study of foraging behavior and pollen resources of various stingless bees (Hym, Meliponinae) and honeybees (Hym, Apinae) in Trinidad. *West-Indies. Apidologie* 14(3):205–224. https://www.apidologie.org/articles/apidologie/1983/03/Apidologie_0044-8435_1983_14_3_ART0006.pdf
- Terrab A, Pontes A, Heredia FJ, Díez MJ (2004) Palynological and geographical characterization of avocado honeys in Spain. *Grana* 43(2):116–121. <https://doi.org/10.1080/00173130310017634>
- Tozzer A, Allen GM (1910) *Animal figures in the Maya Codices*. In: *Papers of the Peabody Museum of American Archeology and Ethnology*, vol 3. Harvard University Press, Cambridge
- Villanueva-Gutiérrez R (2002) Polliniferous plants and foraging strategies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Yucatán Peninsula. *Mexico Rev Biol Trop* 50(3–4):1035–1044
- Villanueva-Gutiérrez R, Moguel-Ordoñez YB, Echazarreta-González CM, Arana-López G (2009) Monofloral honeys in the Yucatan peninsula.

Mexico Grana 48(3):214–223. <https://doi.org/10.1080/00173130902929203>

Villanueva-Gutiérrez R, Roubik DW, Colli-Ucán W, Tuz-Novelo M (2018) The value of plants for the Mayan stingless honey bee *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini): a pollen-based study in the Yucatan Peninsula, Mexico. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW (eds) Pot-pollen in stingless bee melittology. Springer, New York, pp 67–76. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5_5

Yang K, Wu D, Ye X, Liu D, Chen J, Sun P (2013) Characterization of chemical composition of bee pollen in China. J Agric Food Chem 61(3):708–718. <https://doi.org/10.1021/jf304056b>

Zamora-Crescencio P, García-Gil G, Flores-Guido J, Ortiz J (2008) Estructura y composición florística de la selva mediana subcaducifolia en el sur del estado de Yucatán, México. Polibotánica 26:39-66. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682008000200002&lng=es&tlng=es

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO III**ABUNDANCIA DE BACTERIAS Y LEVADURAS EN EL PAN DE ABEJA, MIEL Y APARATO DIGESTIVO DE *Melipona beecheii* BENNETT, 1831 (APIDAE: MELIPONINI) Y SU DEPENDENCIA CON LA COMPOSICIÓN Y ABUNDANCIA DEL POLEN COLECTADO**

Resumen. Los microorganismos que habitan los ambientes del néctar de las flores, del polen y del aparato digestivo de las abejas, son un grupo especializado en la explotación de los azúcares en ambientes extremos y que, a menudo, comparten afinidades filogenéticas y fisiológicas. Intervienen en las fermentaciones que ocurren en la transformación del polen en pan de abeja y del néctar en miel. Sin embargo, poco se sabe sobre estos fenómenos de transformación y sobre la manera en la que la composición y abundancia de los estos microorganismos van cambiando entre los ambientes extremos. Los microorganismos asociados al néctar y a las abejas, son un grupo diverso que intervienen en las fermentaciones acética y láctica que ocurren durante el proceso de transformación del polen a pan de abeja y del néctar a miel. Adicionalmente, los estudios de las comunidades microbianas de abejas se han centrado principalmente en *Apis mellifera* y existen huecos de información sobre otras abejas relevantes como la abeja sin aguijón *Melipona beecheii*. Esta abeja es también importante productora de miel en la península de Yucatán, por lo que, en este trabajo, se documentó cuantitativamente los tipos de granos de polen y la presencia de bacterias y levaduras en muestras de potes de pan de abeja, de miel y aparato digestivo de abejas obreras, en colonias de esta abeja bajo manejo en meliponarios tradicionales. Con estos datos, se analizó comparativamente mediante la aproximación de modelos lineales generalizados y Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés), la composición y abundancia de los tipos polínicos, la abundancia de bacterias y levaduras entre tipos de muestras y la relación entre la composición y abundancia de polen con la abundancia de microorganismos. Se documentó un total de 16 tipos polínicos, siendo las plantas *Senna racemosa* var. *racemosa*, *Bursera simaruba*, *Cochlospermum vitifolium*, *Bursera* spp., *Lonchocarpus punctatus*, *Mimosa bahamensis* y *Psidium guajava* las de mayor aporte de polen. Se encontraron diferencias en las abundancias de bacterias y de levaduras entre las muestras, siendo las bacterias las de mayor abundancia en el pan de abeja, mientras que las levaduras lo fueron en el intestino de las obreras. Se encontró una relación positiva y significativa entre la composición y abundancia de polen con la abundancia de ciertos microorganismos, ya que la

abundancia de polen promueve la abundancia de levaduras, mientras que el exceso de polen reduce la abundancia de bacterias. La presencia de polen de *B. simaruba* y *S. racemosa* var. *racemosa* se relacionan negativamente con la abundancia de bacterias, mientras que la presencia del polen de *A. ramosissima* promueve la abundancia de levaduras.

3.1. INTRODUCCIÓN

Melipona beecheii al igual que las abejas melíferas, son insectos sociales que viven en colonias permanentes, organizadas en castas, hay repartición de tareas dentro y fuera del nido como la colecta de alimento, resinas y otros materiales para mantener la homeostasis de la colonia. Sus miembros, principalmente abejas obreras, están en constante interacción social dentro de la colonia, generando una dinámica activa de adquisición y transferencia de microorganismos entre individuos y entre compartimentos tróficos como potes de polen y miel, y en su tracto digestivo. Las interacciones entre microorganismos y abejas sin aguijón presentan una consistente historia evolutiva, por ejemplo, el ADN de *Bacillus*, el cual es un género de bacterias aislado e identificado en nidos de abejas sin aguijón, ha sido encontrado en ejemplares fósiles de la abeja *Proplebeia dominicana* con una antigüedad de aproximadamente 20 millones de años (Camargo *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 1994). Las bacterias forman parte de la comunidad microbiana del pan de abeja, de la miel y del aparato digestivo de las abejas, donde son esenciales en la adaptación de los individuos a dietas particulares. Estudios muestran que las bacterias de los intestinos afectan la ganancia de peso de las abejas adultas, afectan la expresión de genes que rigen los niveles de insulina y vitelogenina, y aumentan la sensibilidad a la sacarosa (Zheng *et al.*, 2017). Además, producen ácidos grasos de cadena corta, como el acetato, el propionato y el butirato a partir de la degradación de polímeros vegetales del polen que sirven como fuente de energía para el huésped (Zheng *et al.*, 2017; Donohoe *et al.*, 2011). En el pan de abeja se han descrito grupos de microorganismos que intervienen en el proceso de transformación del polen a pan de abeja y del néctar a miel, y los protegen contra agentes dañinos como la mosca *Pseudohyocera kerteszi* (Diptera: Phoridae) que deteriora el polen almacenado y causa daños a la colonia (Tang *et al.*, 2021; Lashani *et al.*, 2020; Martín-Culma y Arenas-Suárez, 2018; Menezes *et al.*, 2013; Lesur, 2002; Gilliam, 1979).

En el polen almacenado de las abejas sin aguijón, se han reportado abundantes bacterias Gram positivas del género *Bacillus* spp. y ácido-lácticas fermentativas como *Lactobacillus* sp., *Fructobacillus* sp. y *Streptococcus* sp. (Menezes *et al.*, 2013; Gilliam *et al.*, 1997; 1990). Gavazzoni *et al.*, (2022) reportaron en el polen almacenado de la abeja *Nannotrigona*

testaceicornis la presencia de bacterias del género *Bacillus* y de la familia Lactobacillaceae y Streptococcaceae. Tang *et al.*, (2021) reportaron en el polen almacenado de *Lepidotrigona terminata*, *L. ventralis* y *Tetragonula pagdeni* abundantes bacterias de *Lactobacillus* sp., *Carnimonas* sp., *Escherichia* sp., *Shigella* sp. y *Acinetobacter* sp. También se han encontrado en el pan de abeja y en la miel de abejas sin aguijón, levaduras del género *Candida*, *Metschnikowia* y *Zygosaccharomyces* con capacidad proteolítica y pectinolítica que probablemente intervienen en la transformación del polen a pan de abeja (Rosa *et al.*, 2003). La evidencia apunta a que tanto bacterias como levaduras intervienen en el proceso de transformación del polen a un alimento más digerible, producen diversos péptidos con actividad antimicrobiana, ácidos grasos terminalmente ramificados con metilo N; y numerosas enzimas, incluidas pectinasas, celulasas, amilasas, proteasas, glucanasas e isomerasas muchas importantes en la transformación y conservación del pan de abeja (Katz y Demain, 1997; Gilliam *et al.*, 1990; Baptist *et al.*, 1978; Fogarty *et al.*, 1974).

En la miel de *M. beecheii*, se han identificado bacterias de la familia Lactobacillaceae y se sabe que algunas de ellas pueden secretar enzimas proteolíticas, glicolíticas y lipolíticas que intervienen en la maduración y conservación de la miel (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022; Gilliam *et al.*, 1990). Gavazzoni *et al.*, (2022) en mieles de *Nannotrigona testaceicornis* reportaron la presencia de bacterias corineformes, así como de la familia Lactobacillaceae, Bacillaceae y Micrococcaceae. En *Tetragonisca angustula*, Beux *et al.*, (2022) y Pucciarelli *et al.*, (2014) reportaron la abundancia de *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* sp., *S. saprophyticus* subsp. *bovis*, *S. vitulinus*, *S. kloosii* y *S. pasteurii*. Con respecto a levaduras, para *Frieseomelitta varia*, *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* y para *M. beecheii* se han reportado diversas especies de *Candida* spp., en especial *Candida apicola*, así como a *Starmerella meliponinorum*, *Aureobasidium pullulans*, *Kodamaea ohmeri*, y *Rhodotorula* (Jacinto-Castillo *et al.*, 2022; Teixeira *et al.*, 2003).

En el aparato digestivo de las abejas, se han reportado la presencia de bacterias que intervienen de manera activa en funciones esenciales como la predigestión del polen, nutrición, absorción de nutrientes y en el sistema inmune (Tang *et al.*, 2021; Lashani *et al.*, 2020; Tamarit *et al.*, 2015). De esta manera, se ha reportado en el aparato digestivo de *A. mellifera* a *Apibacter adventoris*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bartonella apis*, *Lactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5, *Frischella perrara*, *Gilliamella apicola* y *Snodgrassella alvi* como bacterias centrales de su aparato digestivo (Kwong y Moran, 2016; Anderson *et al.*, 2013; Engel *et al.*, 2012; Mrázek *et al.*, 2008). Estudios realizados en abejas de la tribu Meliponini han mostrado

una composición de microorganismos particular a cada especie de abeja. Suphaphimol *et al.*, (2020) para *Lepidotrigona terminata* reportaron la abundancia de bacterias del filo Firmicutes; mientras que Gavazzoni *et al.*, (2022) reportaron bacterias corineformes y otras de la familia Bacillaceae, Lactobacillaceae y Micrococcaceae. Díaz *et al.*, (2017) y Koch *et al.*, (2013) reportaron para *Melipona panamica*, *M. bocandei* y *M. quadrifasciata* la abundancia de *Lactobacillus kunkeii*, *Lactobacillus Firm-5*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y bacterias de la familia Acetobacteraceae.

La mayor parte de la evidencia sobre la presencia de bacterias y levaduras hasta ahora, ha sido de valiosa documentación, pero sin relacionar cuantitativamente las abundancias entre bacterias y levaduras, ni entender completamente cómo es la relación cuantitativa entre las comunidades microbianas y los diferentes ambientes o compartimentos tróficos de las abejas, es decir, la relación que guardan la abundancia de bacterias y levaduras entre el pan de abeja, la miel y el intestino de las abejas. Esta información aportaría a entender la relación polen-microorganismos y su importancia en la nutrición de las abejas. Teniendo esto en cuenta, en este estudio se estimó la abundancia de bacterias y de levaduras en tres compartimentos tróficos esenciales de la abeja *M. beecheii*: en potes de polen, en donde el polen colectado por las abejas obreras se almacena y transforma a pan de abeja; en potes de miel, en donde el néctar colectado se transforma a miel y; en los intestinos de las obreras forrajeadoras, en donde los microorganismos son reservados, mezclados con el néctar y el polen colectados e incluso transmitidos socialmente entre los miembros de la colonia (Kwong & Moran 2016).

Las preguntas de investigación planteadas en este trabajo son: 1) ¿Cómo cambia la abundancia de células microbianas, bacterias y levaduras, entre el pan de abeja, miel y el aparato digestivo de *M. beecheii* en nidos de meliponarios tradicionales de Yucatán? y 2) ¿Qué relación existe entre la composición y abundancia de polen contenidos en estos tres ambientes con la abundancia de estos microorganismos? Este trabajo se realizó en nidos de *M. beecheii* de meliponarios tradicionales del estado de Yucatán, México y sus resultados aportan al conocimiento de la biología de la abeja maya, muy apreciada y base de la meliponicultura en la región. Esperamos encontrar una alta abundancia de bacterias Gram positivas en las muestras de pan de abeja y en el aparato digestivo de *Melipona beecheii*, ya que, reportes previos indican altas abundancias que intervienen de manera activa en los procesos de transformación del polen almacenado y en funciones esenciales para la sobrevivencia de las abejas, además, en la miel, se espera encontrar una baja abundancia de bacterias y levaduras; y se espera que

la presencia y abundancia de los granos de polen tengan un efecto positivo en la abundancia microbiana.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Área de estudio

El estudio se realizó de febrero a mayo de 2021, durante la estación seca, período durante el cual, se presenta una temperatura media (\pm DE) de 26.5 (\pm 1.9) °C y humedad relativa (\pm DE) de 70.1 (\pm 4.6) %. Las muestras de pan de abeja, miel e intestinos de abejas obreras forrajeadoras se colectaron en ocho meliponarios de tipo tradicional que albergaban principalmente colonias de la abeja nativa *M. beecheii*. Las localidades donde se ubican los meliponarios son los municipios de Baca, Xcunyá, Xmatkuil, Maní, Dzan, Valladolid, Tekax y Tekom en el estado de Yucatán, México. La principal característica del ambiente que rodea a los meliponarios es que estaban ubicados en zonas adyacentes a cultivos agrícolas y huertos familiares o rodeados por remanentes de selva baja caducifolia (árboles de 4 a 12 de altura) o de selva mediana subcaducifolia (árboles de 10 a 15 m de altura) o estaban ubicados en patios traseros de las casas. Todos los meliponarios estaban contruidos con techos de palma de guano y pisos de concreto, rodeados de una pequeña zanja de agua para evitar hormigas (Figura 3.1). Los nidos donde se obtuvieron las muestras fueron considerados, por parte de los propietarios, en buen estado de salud, con suficiente población de obreras, cantidad adecuada de almacenamiento de polen y miel en potes y albergaban de 6 a 60 colonias de abejas por meliponario.



Figura 3.1. Meliponario de construcción tradicional con colonias de *Melipona beecheii* en cajas de madera de un meliponario de traspatio en Tekax, Yucatán, México.

3.2.2. Colecta y procesamiento de muestras de pan de abeja, miel y abejas de *Melipona beecheii*

En cada meliponario, se colectaron muestras de pan de abeja y de miel de tres colonias de *M. beecheii*, excepto en el de Maní, en donde se colectaron muestras de polen y de miel de cuatro colonias. En cada colonia, se seleccionó un pote de cera de reciente construcción (color de la cera claro), que contuviera polen almacenado (pan de abeja) y que ya estuviera operculado; esto permitió garantizar que fuera polen colectado de la temporada en la que el muestreo fue realizado. De esta manera se aseguró en lo posible que las muestras estuvieran en las etapas de transformación y, por lo tanto, los microorganismos que pudiera contener estuvieran en actividad y no en formas de resistencia como sería en las etapas finales de su transformación. El contenido de cada pote fue colectado completamente con cucharas esterilizadas y fue almacenado en un vial estéril y almacenado a 4 °C hasta su procesamiento en laboratorio. Este mismo procedimiento fue aplicado a potes que contenían miel, y en estos potes, la miel se extrajo con jeringas estériles de plástico cuya punta tenía adaptada una manguera para

venocllisis de seis cm de largo. Cada muestra extraída se colocó en un vial estéril. Las muestras extraídas fueron etiquetadas y almacenadas a 4 °C hasta su posterior análisis. Adicional a la colecta de las muestras de pan de abeja y miel, también se capturaron tres abejas obreras adultas forrajeras por cada colonia. Estas abejas fueron capturadas a la entrada de su colonia, a su regreso de su viaje de colecta de néctar y polen, y para su captura se usó una red entomológica. Cada abeja se colocó por separado en un vial estéril y se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas (García *et al.*, 2006). Los materiales no resistentes al calor como guantes, jeringas hipodérmicas de 20 mL y mangueras para venocllisis fueron esterilizados con luz ultravioleta durante 20 minutos en una campana de flujo laminar TERLAB, Modelo TE-FLV12, Serie 150504, y el resto de material en autoclave Felisa®, Modelo FE-399, Serie 17040022 a 121 °C durante 20 minutos a 14 psi.

El contenido colectado de cada pote fue pesado (pan de abeja) o su volumen (miel) fue registrado. De cada material colectado, se separó un gramo o un mililitro según fuera en caso, y se puso en un vial aparte procurando homogeneizar las muestras para garantizar la obtención de una submuestra representativa del contenido de cada pote estudiado. De Cada gramo o mililitro se extrajo 100 microgramos o microlitros según fuera el caso y se le añadieron 900 µL de solución salina para obtener un volumen final de 1 mL de solución por submuestra en un vial aparte. Las abejas colectadas fueron sacrificadas aplicando frío (4 °C por 24 horas), posteriormente, sus cuerpos fueron lavados con solución salina para eliminar partículas contaminantes que pudiesen estar adheridas a su cuerpo. Las abejas fueron disectadas y se les extrajo el aparato digestivo, este procedimiento se realizó con un microscopio estereoscopio y pinzas entomológicas y bisturí estériles. El aparato digestivo completo de cada abeja fue triturado usando pistilos estériles en 600 µL de glicerol al 15 %, se registró el volumen de cada muestra y se tomó 100 µL, al cual se le agregó 900 µL de solución salina para obtener un volumen de 1 mL. Los viales conteniendo las soluciones de miel, pan de abeja e intestinos triturados fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento con técnicas de microscopía. Estos procedimientos fueron realizados siguiendo la metodología de Disayathanoowat *et al.*, (2012) y de García *et al.*, (2006).

3.2.3. Microscopía: tinción y conteo de microorganismos

En total, se obtuvieron 25 viales conteniendo pan de abeja en solución (uno por pote por colonia y tres colonias por meliponario, excepto en Maní en donde se muestrearon cuatro colonias), 25 viales conteniendo miel en solución. Cada vial correspondió a un pote de miel o

pan de abeja o abeja obrera obtenido por colonia, de tres colonias estudiadas por meliponario, excepto en Maní en donde se muestrearon cuatro colonias.

Para la detección y conteo de bacterias, de cada vial, conteniendo las muestras de miel, o pan de abejas o intestinos, se tomó una alícuota de 20 μL que fue fijada en un portaobjeto individual con aplicación de calor. Este procedimiento se repitió seis veces por cada vial para lograr mayor exactitud en el conteo. En cada preparación se realizó la tinción de Gram para detectar la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La tinción de Gram se realizó con un kit de tinción de Gram (HYCEL) siguiendo la metodología de Smith y Hussey (2005). El principio de coloración para distinguir grupos de bacterias se basa en que las bacterias Gram positivas, al presentar una pared celular gruesa formada de un 80-90 % de polímeros de peptidoglucano y polímeros de ácido teicoico, retienen el colorante violeta cristal, los cristales formados al aplicarle yodo atrapan el colorante y después de una fase de decoloración con etanol, permiten distinguir a este grupo por la coloración de azul a violeta. Las bacterias Gram negativas, al tener la pared celular más delgada (10-20 % de peptidoglucanos) y presentar una capa más externa hecha de una mezcla de lipopolisacáridos, lipoproteínas y lípidos, no retiene el colorante en la fase de decoloración con alcohol, por lo que este grupo presenta una coloración de rojo a rosa (Davies *et al.*, 1983).

Para la detección y conteo de levaduras, se tomó una alícuota de 20 μL de cada vial conteniendo las muestras de miel, pan de abeja o intestinos, y se les aplicó una fase de aclarado agregando 5 μL de hidróxido de potasio al 10 % siguiendo la metodología de Llovo y Pontón (2007). El hidróxido de potasio digiere parcialmente los componentes proteicos contenidos en las células, pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares, lo que permite una confiable visualización de las levaduras en las muestras. De manera individual, las alícuotas fueron fijadas en un portaobjeto con aplicación de calor. Este procedimiento fue repetido seis veces por cada vial. Las alícuotas fijadas fueron teñidas con 5 μL de azul de lactofenol (colorante que contiene fenol, ácido láctico y azul de metilo). El fenol promueve la inactivación de las enzimas hidrolíticas, evitando así la lisis celular, el ácido láctico preserva las estructuras fúngicas y el azul de metilo se une a la quitina de las paredes celulares, tiñendo sus estructuras y permitiendo su visualización confiable.

Cada preparación obtenida fue observada bajo la óptica de un microscopio (Olympus modelo cx31) con un ocular de 10 x 20 de magnificación con reglilla milimétrica incluida y un objetivo de 100x aplicando aceite de inmersión. Esto permitió dividir el campo óptico (314.16 micras²) en

cuatro secciones con la finalidad de realizar el conteo de células microbianas barriendo con los ojos cada sección del campo ocular y luego sumando los conteos, para finalmente obtener un conteo de bacterias, de levaduras (o elementos fúngicos) para cada vial representando las muestras de miel, pan de abejas e intestinos de abejas obreras por pote, colonia y meliponarios estudiados.

3.2.4. Conteo de granos de polen

En las preparaciones de microscopía para detectar y contar bacterias y elementos fúngicos, también se contabilizaron los granos de polen. Para esto, se identificaron las especies de plantas a las que pertenecían los granos contenidos en cada preparación y se contó el número de granos de polen por especie. Para la identificación del polen, se describieron las características morfológicas de la pared de los granos de polen detectados y se compararon con catálogos palinológicos y artículos especializados en melisopalinología hasta lograr identificar a nivel de especie. Estos conteos sirvieron para documentar la composición de especies de granos de polen, calcular la abundancia de granos de polen y como variable explicativa de la abundancia de microorganismos entre la miel, pan de abeja e intestinos de abejas obreras.

3.2.5. Análisis estadístico

Para conocer la composición de especies de granos de polen por meliponario, se construyó una matriz de presencia-ausencia entre las especies de polen y las muestras por meliponario distinguiendo entre miel, pan de abeja e intestinos. Con esta matriz, se calculó una matriz de distancias de disimilaridad aplicando el índice de Bray-Curtis y se realizó un análisis de conglomerados obteniendo un dendrograma jerárquico con el método de aglomeración de grupos de pares ponderados por media aritmética (WPGMA). Esta aproximación de discriminación separa en grupos aplicando como criterio que la distancia de disimilaridad de un conglomerado a otro debe ser mayor que la distancia promedio de cada uno de sus miembros al siguiente conglomerado. Al cumplirse el criterio, entonces se distingue como un grupo diferenciado. Este dendrograma fue complementado con un mapa de calor en el que la intensidad del color representa la abundancia de polen por especie planta y por pote y meliponario. Este análisis gráfico permitió identificar grupos afines con relación a la composición de especies de granos de polen y su importancia con relación a su abundancia

entre ambientes (miel, pan de abeja, intestinos) y por meliponarios. Se usaron las bibliotecas *vegan*, *ggendo* y *stats* de la plataforma *r* versión 4.3.1 para este análisis.

Para incluir la composición de especies de granos de polen como variable explicativa en los subsiguientes análisis, se utilizaron los datos de abundancias de especies de polen, corregidos por el método Hellinger de raíz cuadrada del dato, para disminuir el efecto de doble cero en cálculo del índice de disimilitud de la composición entre muestras (Legendre y Gallanger 2001). Posteriormente, se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) permitiendo que las distancias de disimilitud resultantes fueran reflejadas por la amplitud de los ángulos y longitud de vectores dentro de un gráfico de dos ejes. Para seleccionar los ejes a graficar, de los ejes resultantes del PCA, se escogieron los que englobaran el mayor porcentaje (> 50 %) de variación multidimensional de las muestras, para esto se construyó un gráfico de contribuciones de las especies de granos de polen en cada eje. Se usaron las bibliotecas *vegan* para el análisis de PCA, *FactoMiner* y *factoextra* de la plataforma *r* para realizar el gráfico y calcular la contribución de cada especie de polen a cada eje. Con base a este análisis, los ejes seleccionados PCA1 y PCA2 fueron incluidos como variables explicativas independientes en el análisis de regresión subsiguiente.

Para analizar diferencias en la abundancia de células microbianas (bacterias y levaduras) entre los ambientes de pan de abeja, miel e intestino, así como analizar su relación con la composición y abundancia de especies de granos de polen, se aplicaron modelos de regresión lineal generalizada. Para esto, se asumió que la distribución de los residuales es binomial negativa, ya que el histograma de frecuencias de los datos presentó una joroba sesgada a la derecha y una dispersión extrema. En el modelo puesto a prueba, la proporción de células microbianas está determinada por el tipo de ambiente (miel, pan de abeja o intestino), por la abundancia de granos de polen y por la composición de especies de polen. Se consideró al ambiente pan de abeja como el nivel de referencia y que es el compartimento que por definición concentra la mayor abundancia de polen. Los coeficientes de regresión generados por el modelo fueron calculados por el método robusto de pesado de las observaciones con respecto a su dispersión. Estos coeficientes fueron graficados junto con su respectivo intervalo de confianza al 95% más un intervalo interno del 50 % para poder comparar y explorar el patrón de diferencias entre los tres ambientes y la influencia de covarianza las variables explicativas de abundancia general de polen y composición de especies de polen. Posterior a la aplicación de los modelos mixtos generalizados, se calcularon la mediana y los cuartiles predichos por tipo de ambiente y se graficaron en diagramas de caja y bigote. Estos diagramas

fueron complementariamente graficados con los datos observados. Se utilizaron las bibliotecas *jtools* y *broom.mixed*, *MASS* y *ggplot2* de la plataforma *r* versión 4.3.1 para los análisis y gráficos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Pan de abeja y miel de potes

El peso promedio por pote (\pm DE) del pan de abeja fue 20.1 ± 2.7 g con valores mínimos de 15.8 g y máximo de 26.8 g, y para la miel, el volumen promedio por pote (\pm DE) fue 8.1 ± 3.5 mL con valores mínimos de 5 mL y máximo de 20.5 mL (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Peso del pan de abeja y volumen de miel por pote en colonias de *Melipona beecheii* de meliponarios tradicionales en ocho localidades del estado de Yucatán. Los potes eran recién cerrados.

Localidad (meliponario)	Coordenadas	Colonia	Pan de abeja (g)	Miel (mL)
Maní	20°22'46.956" N 89°23'5.514" W	Caja 034	18	5.3
Maní	20°22'46.956" N 89°23'5.514" W	Caja 017	15.8	5
Maní	20°22'46.956" N 89°23'5.514" W	Jobón 1	21.1	11.5
Maní	20°22'46.956" N 89°23'5.514" W	Jobón 2	20.4	8
Baca	21°06'47.0" N 89°24'25.2" W	Caja 1	19.7	6.8
Baca	21°06'47.0" N 89°24'25.2" W	Caja 2	21.1	7.5
Baca	21°06'47.0" N 89°24'25.2" W	Caja 3	20.4	20.5
Dzan	20°22'46.1244" N 89°26'41.132" W	Caja 1	24	6.5
Dzan	20°22'46.1244" N 89°26'41.132" W	Caja 6	25	14.2
Dzan	20°22'46.1244" N 89°26'41.132" W	Caja 13	21.9	13.5
Valladolid	20°40'42.3" N 88°11'47.0" W	Caja 1	19.9	7.5
Valladolid	20°40'42.3" N 88°11'47.0" W	Caja 2	16.4	8.5
Valladolid	20°40'42.3" N 88°11'47.0" W	Caja 3	19.2	7.5
Tekax	20°11'56.4" N 89°16'19.3" W	Caja 1	16.5	5
Tekax	20°11'56.4" N 89°16'19.3" W	Caja 2	19.2	7.5
Tekax	20°11'56.4" N 89°16'19.3" W	Caja 3	26.8	10
Xcunyá	21°7'57.2268" N 89°36'45.6732" W	Caja 1	21.1	8
Xcunyá	21°7'57.2268" N 89°36'45.6732" W	Caja 2	18.7	5.3
Xcunyá	21°7'57.2268" N 89°36'45.6732" W	Caja 3	17	6.5
Xmatkuil	20°52'01.2" N 89°37'28.7" W	Caja M69(29)	16.7	6.9
Xmatkuil	20°52'01.2" N 89°37'28.7" W	Caja MM57	19.5	7.1

Xmatkuil	20°52'01.2" N 89°37'28.7" W	Caja MM56 2P	21.6	7.4
Tekom	20°36'28.9" N 88°15'36.4" W	Tekom Caja 3	21.2	5.6
Tekom	20°36'28.9" N 88°15'36.4" W	Tekom Caja 8	18.9	5.7
Tekom	20°36'28.9" N 88°15'36.4" W	Tekom Caja 17	22.1	5.2

3.3.2. Análisis de la composición de especies de polen en muestras

En total, sumando las muestras de pan de abeja, de miel e intestinos, se registraron 16 tipos polínicos. En el pan de abeja, los granos de polen más abundantes fueron de *Senna racemosa* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby var. *racemosa*, *Bursera simaruba* (L.) Sarg., *Bursera schlechtendalii* Engl. y *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Spreng. En la miel fueron *Alternanthera ramosissima* (Mart.) Chodat, *B. simaruba*, *S. racemosa* y *Mimosa bahamensis* Benth., y por último, en el aparato digestivo fue *S. racemosa*, seguido de *A. ramosissima* y *B. simaruba* (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Tipos polínicos registrados en las muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* en meliponarios tradicionales del estado de Yucatán, México. En el cuadro, se muestra el número de granos de polen por especie de planta contabilizados en las preparaciones de microscopía.

Especie	Tipo de ambiente		
	Pan de abeja	Miel	Aparato digestivo
<i>Alternanthera ramosissima</i>	3	26	3
<i>Bixa orellana</i>	2		
<i>Bursera simaruba</i>	631	17	3
<i>Bursera schlechtendalii</i>	452	3	
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	390	10	1
<i>Crotalaria</i> sp.	7	1	2
<i>Desmanthus virgatus</i>	9		
<i>Leucaena leucocephala</i>	1		
<i>Lonchocarpus</i> sp.		2	
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	88	5	
<i>Mimosa bahamensis</i>	63	20	
<i>Mimosa</i> sp.	19	6	
<i>Psidium guajava</i>	46	6	

<i>Senna racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	1632	26	14
<i>Senna</i> sp.1	8		
<i>Solanum americanum</i>	23	5	
Total, granos de polen	3,374	127	23

De acuerdo con el índice de disimilitud de Bray-Curtis y el análisis de conglomerados jerárquicos de composición de especies, se logran diferenciar cuatro grupos principales a una distancia de disimilaridad de 1.4 veces. Un conglomerado agrupó las muestras de pan de abeja y miel de los meliponarios de Tekom e Xmatkuil con un subgrupo definido principalmente por la presencia de *Psidium guajava* (Figura 3.2). El segundo y tercer grupo presentaron dos subgrupos, donde las muestras de intestinos se distinguen y forman conglomerados, y estuvieron agrupadas por los tipos polínicos *Crotalaria* sp. y *Bursera simaruba*. La mayoría de las muestras de pan de abeja se agruparon en el cuarto grupo, las taxa importantes fueron *Solanum americanum*, *Mimosa* sp., *M. bahamensis* y *B. simaruba* (Figura 3.2).

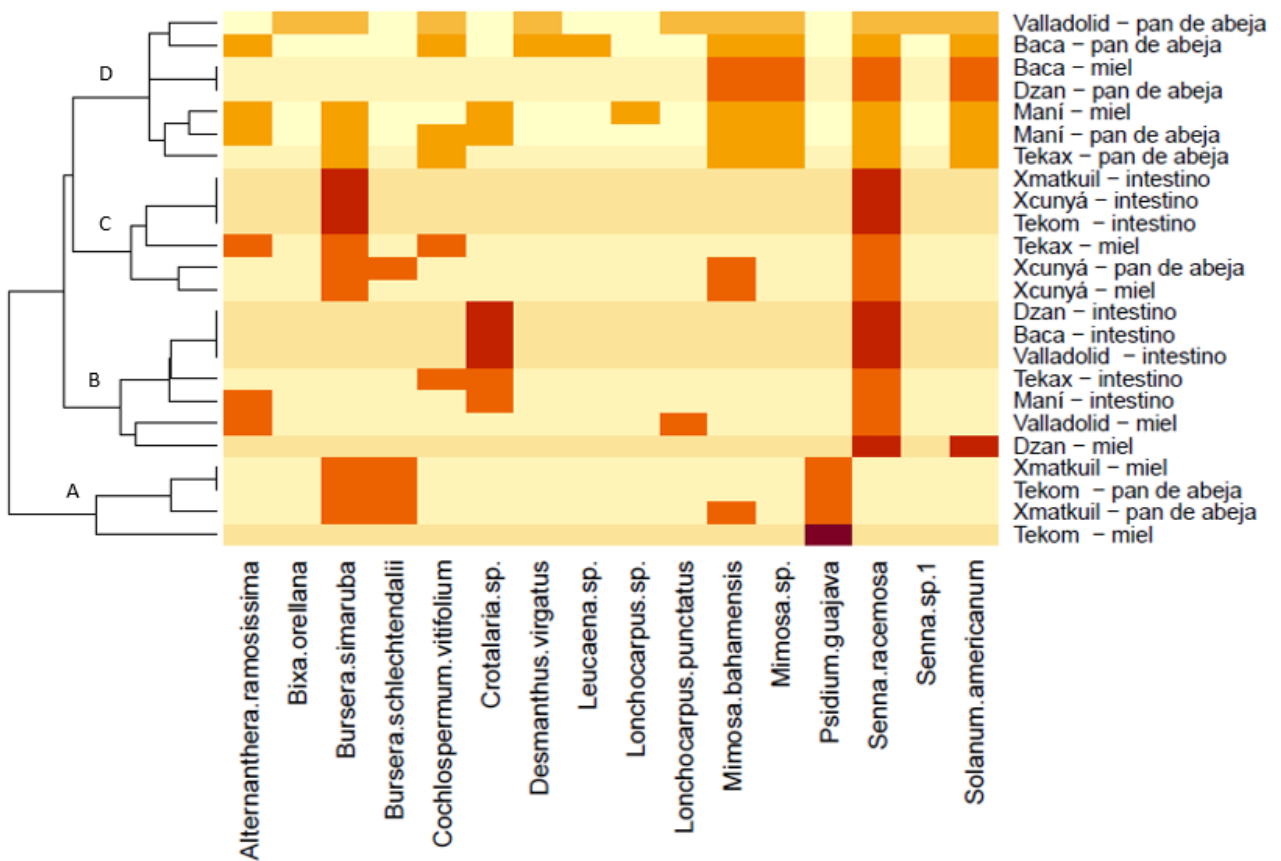


Figura 3.2. Dendrograma realizado con una matriz de disimilaridad de Bray-Curtis con datos de presencia-ausencia de especies de polen en las muestras. Se usó el método de WPGMA para generar los grupos. El dendrograma está acoplado a un mapa de calor en el que la intensidad del color denota la frecuencia de aparición de las especies a lo largo de las muestras. En el gráfico se pueden distinguir cuatro grupos principales.

3.3.3. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El PCA realizado para reducir la multidimensionalidad de la composición y abundancia de especies de granos de polen para su uso en el análisis de regresión, indicó que los primeros cuatro componentes explican el 76.53 % de la varianza de los datos (Cuadro 3.3). El primer eje (Dim1) explica la mayor parte de la variación de la composición de especies, englobando el 46.9 %. Este primer eje más el eje 2 (Dim2) con un 14.1 %, alcanzan a explicar más de la mitad de la variación total de la composición de especies. Otros dos ejes que explican más allá del 5 % son el eje 3 (8.8 %) y el eje 4 (6.7 %) y entre estos cuatro ejes, se alcanza a explicar el 76.5 % de la variación total (Cuadro 3.3). Los tipos polínicos de mayor contribución en la varianza fueron *Senna racemosa* con un aporte mayor al 50 %, *Bursera simaruba* 20 % y *Alternanthera ramosissima* (Figura 3.3). Con base a estos datos, se consideraron los primeros dos ejes que explican el 61.06 % de la varianza de los datos como variables continuas para realizar el subsiguiente análisis de regresión con modelo mixtos generalizados. Para el primer eje (Dim-1 o PC1) las especies de mayor contribución fueron *S. racemosa* (62 %) y *B. simaruba* (32 %), y en el segundo eje (Dim-2 o PC2) fueron *A. ramosissima* (35 %), *B. simaruba* (30%), *S. racemosa* (19 %) y *B. schlechtendalii* (7 %) (Figura 3.3).

Cuadro 3.3. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los tipos polínicos encontrados en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* en Yucatán México.

Ejes	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Eigenvalue	0.2729	0.08213	0.05097	0.03900	0.03119	0.02804	0.02401
Varianza (%)	46.93	14.126	8.766	6.707	5.364	4.822	4.130
Varianza acumulada (%)	46.93	61.061	69.827	76.534	81.898	86.720	90.850

Cuadro 3.3. Continuación

Ejes	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14
------	-----	-----	------	------	------	------	------

Eigenvalue	0.01831	0.01433	0.01060	0.00721	0.00138	0.000919	0.000444
Variance (%)	3.149	2.464	1.823	1.2414	0.2384	0.15819	0.07644
Cumulative variance (%)	93.999	96.463	98.286	99.5270	99.7654	99.92356	1.000000

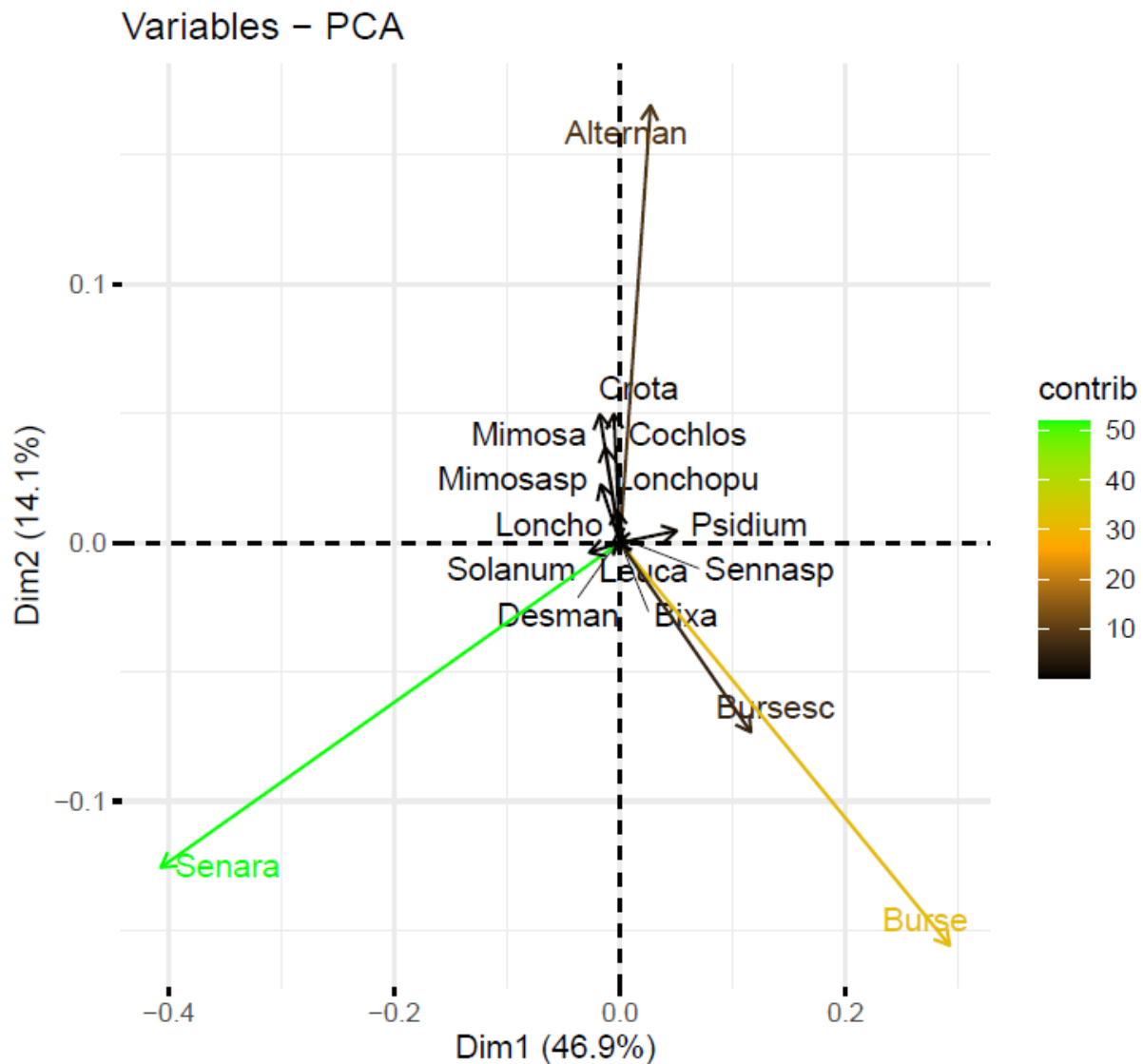


Figura 3.3. Análisis de Componentes Principales (PCA) para explorar la variación en la composición de especies de granos de polen en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii* en meliponarios tradicionales del estado de Yucatán, México. En el gráfico Senara= *Senna racemosa* var. *racemosa*, Desman= *Desmanthus virgatus*, Solanum= *Solanum americanum*, Loncho= *Lonchocarpus* sp., Mimosasp= *Mimosa* sp., Mimosa= *Mimosa bahamensis*, Alternan= *Alternanthera ramosissima*, Crota= *Crotalaria* sp., Cochlos= *Cochlospermum vitifolium*, Lonchopu= *Lonchocarpus punctatus*,

Psidium= *Psidium guajava*, Leuca= *Leucaena leucocephala*, Sennasp= *Senna* sp.1, Bixa= *Bixa orellana*, Bursesc= *Bursera schlechtendalii*, Burse= *Bursera simaruba*. Contri= contribución al porcentaje de la varianza. Dim1 = eje 1 de PCA, Dim2 = eje 2 de PCA.

3.3.4. Abundancia de bacterias y levaduras

En el pan de abeja, se analizaron un total de 150 preparaciones de microscopía para visualizar bacterias y 150 para levaduras, en la miel 150 para bacterias y 150 para levaduras, y para los intestinos 450 para bacterias y 450 para levaduras, y en total se revisaron 1,500 preparaciones. En todas las preparaciones de tinciones de Gram, únicamente se encontraron bacterias pertenecientes al grupo de las Gram positivas. De acuerdo con los datos observados, en el pan de abeja se observó la mayor abundancia bacteriana con un promedio (\pm DE) de 406 ± 368 células bacterianas y con una mediana de 331, seguido del aparato digestivo con 124 ± 54.6 con una mediana de 124, y por último, la miel con 95 ± 52 células bacterianas con una mediana de 84. Respecto a las levaduras sus abundancias fueron menores a las bacterianas, el promedio (\pm DE) para el pan de abeja fue de 9 ± 3 células de levaduras con una mediana de 7.6, en la miel de 4.4 ± 2.4 con una mediana de 4.6 y en los intestinos de 12.4 ± 6 con una mediana de 10. Las medias de las bacterianas para el pan de abeja presentaron valores entre 44.6 a 918, en la miel de 34 a 172 y por último en el intestino de 58 a 186; y para levaduras de 5.6 a 13.5, de 1 a 7.6 y de 8 a 27 para el pan de abeja, miel e intestinos, respectivamente (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Estadística descriptiva de la abundancia observada de bacterias y levaduras por meliponarios en muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo *Melipona beecheii* en Yucatán, México. SD=desviación estándar. RIQ= Rango intercuartílico.

Meliponario	Tipo de muestra	Número de preparaciones Tinción Gram	Abundancia Bacteria (314.16 micras ²)		Número de preparaciones Tinción lactofenol	Abundancia Levadura (314.16 micras ²)	
			Media ± SD	Mediana (RIQ)		Media ± SD	Mediana (RIQ)
Maní	Pan de abeja	24	75.5 ± 31.8	68.5 (58.5)	24	13.5 ± 6.3	12.5 (12)
Baca		18	873.6 ± 185.6	882 (371)	18	7.3 ± 3.5	7 (7)
Dzan		18	144 ± 133.5	73 (237)	18	6.3 ± 4.1	5 (8)
Valladolid		18	519 ± 465.3	552 (929)	18	5.6 ± 2.3	7 (4)
Tekax		18	44.6 ± 13	44 (26)	18	13.3 ± 7.3	16 (14)
Xcunyá		18	72.3 ± 25.8	60 (47)	18	8 ± 4.5	7 (9)
Xmatkuil		18	603 ± 380.2	699 (742)	18	8 ± 3.6	9 (7)
Tekom		18	918.3 ± 677.3	622 (349)	18	7 ± 3.6	6 (7)
Maní	Miel	24	34.2 ± 13.3	29 (22.2)	24	6.7 ± 5.6	5 (9.7)
Baca		18	53.3 ± 3.5	50 (7)	18	5.3 ± 1.5	5 (3)
Dzan		18	152.3 ± 45	149 (90)	18	2.3 ± 0.5	2 (1)
Valladolid		18	133.6 ± 108.2	125 (216)	18	6.6 ± 5	6 (10)
Tekax		18	44.6 ± 9.6	43 (19)	18	4 ± 1	4 (2)
Xcunyá		18	80.6 ± 14.2	74 (26)	18	7.6 ± 4.6	5 (8)
Xmatkuil		18	172.6 ± 61.6	152 (118)	18	1	1 (0)
Tekom		18	88.3 ± 40.2	102 (77)	18	2 ± 1	2 (2)
Maní	Aparato digestivo	72	159.4 ± 29.1	172 (47)	72	27 ± 7.2	25 (14)
Baca		54	182.3 ± 16	181 (32)	54	13.6 ± 5.6	12 (11)
Dzan		54	186.6 ± 10.9	193 (19)	54	10 ± 2	10 (4)
Valladolid		54	168 ± 42.7	163 (85)	54	12.3 ± 2	13 (4)
Tekax		54	89.6 ± 15.3	97 (28)	54	8.3 ± 5.8	6 (11)
Xcunyá		54	58.3 ± 11	59 (22)	54	8 ± 1.7	7 (3)
Xmatkuil		54	80.6 ± 32.2	76 (64)	54	10.3 ± 2.5	10 (5)
Tekom		54	69 ± 49.3	50 (93)	54	10.3 ± 5.5	10 (11)

3.3.5. Análisis de regresión binomial negativa

Los resultados de los análisis sobre la abundancia bacteriana y de levaduras mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.5). La mayor abundancia bacteriana se presentó en el pan de abeja con una mediana predicha de 331 células bacterianas con un RIQ de 508. El segundo ambiente con abundancia de bacterias fue el intestino, presentó una mediana predicha de 124 células bacterianas con un RIQ de 106. Por último, la miel presentó la menor con una mediana predicha de 84 células bacterianas con un RIQ de 100. Para levaduras, la mayor abundancia se presentó en el aparato digestivo con una mediana predicha de 10.3 células de levadura con un RIQ de 4.5, seguido del pan de abeja con 7.6 células de levadura con un RIQ de 5.5, y, por último, la miel que no fue significativa presentó una mediana predicha de 4.6 células de levadura con un RIQ de 4.6. Estos resultados indican la presencia de una mayor abundancia de levaduras en los intestinos y la menor en la miel (Figura 3.4).

Cuadro 3.5. Análisis de regresión binomial negativa para estimar diferencias en la abundancia de bacterias y levaduras entre los ambientes de pan de abeja, aparato digestivo y miel de potes cerrados en colonias de *Melipona beecheii* y la influencia de la composición de especies de polen y la abundancia de granos de polen contenidos en las muestras.

Bacteria				
	Coeficiente	Error Estándar	Z	P
Pan de abeja	8.497692	0.545644	15.574	<0.0001***
Aparato digestivo	-3.576811	0.544657	-6.567	<0.0001***
Miel	-3.828412	0.540336	-7.085	<0.0001***
PC1	-0.966674	0.395168	-2.446	0.0144 *
PC2	-0.410012	0.400611	-1.023	0.3061
Abundancia de polen	-0.020127	0.004034	-4.989	<0.0001***
Levadura				
Pan de abeja	1.452598	0.392874	3.697	0.000218 ***
Aparato digestivo	1.088727	0.392036	2.777	0.005485 **

Miel	-0.021997	0.390306	-0.056	0.955057
PC1	0.172009	0.292281	0.589	0.556193
PC2	0.929250	0.296589	3.133	0.001730 **
Abundancia de polen	0.005676	0.002889	1.965	0.049450 *

Significancia: < 0.0001 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.

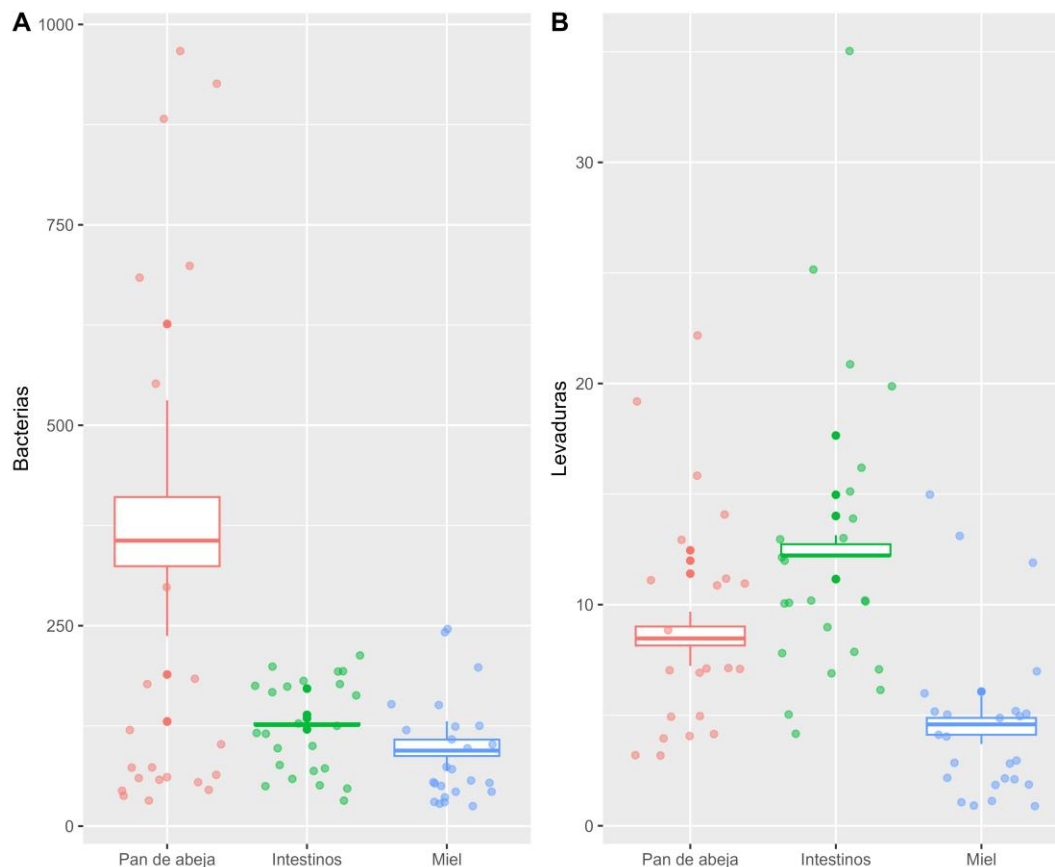


Figura 3.4. Abundancia de microorganismos entre los tres ambientes: pan de abeja, miel e intestino de *Melipona beecheii*. Se presentan datos observados más mediana y los cuartiles predichos. A) bacterias; B) levaduras.

De acuerdo con los modelos empleados para bacteria y levadura, los resultados indican que probabilísticamente en el pan de abeja de *M. beecheii* podemos encontrar abundancias bacterianas cercanas a 331 células bacterianas en 314.16 micras², en los intestinos 124 células bacterianas en 314.16 micras² y en la miel 84 células bacterianas en 314.16 micras². Respecto a las levaduras, en el pan de abeja son cercanos a 7.6 células de levaduras en 314.16 micras²,

en los intestinos 10.3 células de levaduras en 314.16 micras² y en la miel 4.6 células de levaduras en 314.16 micras² (Figura 3.4).

Los resultados para las variables abundancia de polen fueron estadísticamente significativos para bacterias y levaduras, y la composición y abundancia de polen PC1 fue significativa en bacterias y el PC2 en levaduras (Cuadro 3.6).

Los coeficientes de regresión mostraron que la abundancia polínica tiene un efecto ligeramente negativo en la abundancia de bacterias, mientras que para levaduras su efecto es positivo; y la composición y abundancia de polen (PC1 y PC2) son significativos e influyen sobre la abundancia de bacterias y levaduras (Cuadro 3.6 y Figura 3.5)

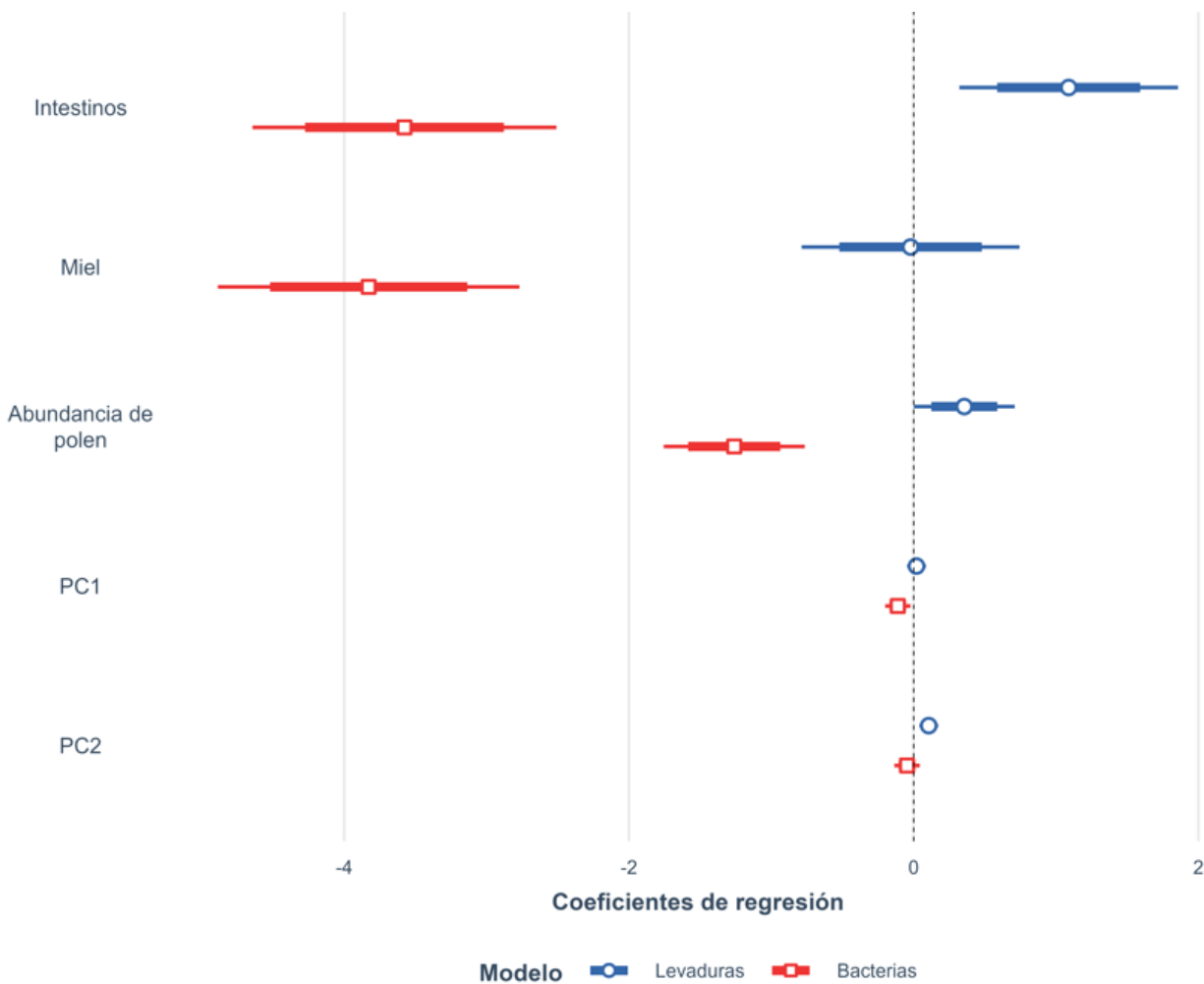


Figura 3.5. Coeficientes de regresión para abundancia de bacterias y levaduras contabilizadas en preparaciones fijas. Pan de abeja: valor numérico de referencia 0.0; PC1 y PC2: composición y abundancia de granos de polen.

3.4. DISCUSIÓN

Diversos autores han enfocado sus estudios en conocer la composición y abundancia de las especies microbianas a través de los análisis moleculares. Lo anterior permite realizar identificaciones a un nivel taxonómico detallado, pero sin relacionar cuantitativamente el número de células completas que hay en cada ambiente (pan de abeja, miel y aparato digestivo), y cómo el polen, un elemento indispensable en su dieta, puede influir en su dinámica. En este trabajo, se analizaron preparaciones fijas de microscopía para cuantificar polen y células completas de dos grupos distintos de microorganismos taxonómicamente lejanos (bacterias y levaduras) de manera simultánea, cuantitativa y económica. Lo anterior, permitió realizar un análisis comparativo entre ambientes que nos señala un patrón de distribuciones relacionadas con el tipo de célula, que sugiere su importancia en el proceso de alimentación de *M. beecheii*.

Los granos de polen son elementos indispensables en la nutrición de las abejas, se ha reportado que pueden producir más de 250 sustancias con actividad biológica. Es una fuente crucial de proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, lípidos, vitaminas, minerales, fitoquímicos, entre otros (Laaroussi *et al.*, 2023; Margaoan *et al.*, 2014). La composición y abundancia de los granos de polen encontrados en conjunto en el pan de abeja, miel y aparato digestivo que fueron analizados, mostraron una riqueza de 16 tipos polínicos. Todos ya han sido reportados en otros trabajos como recursos importantes de polen y néctar para las abejas. Los granos de polen de mayor importancia o aquellos, que, de acuerdo a su contribución en la varianza, pueden influir en la dinámica microbiana, en el componente PC1 encontramos a *Senna racemosa* y *B. simaruba*, los cuales han sido reportados como predominantes ($\geq 45\%$) en el pan de abeja y en mieles de *Melipona beecheii* provenientes de diversas localidades del estado de Yucatán, así como en Campeche (Chiná), Quintana Roo (Puerto Morelos, Reserva de la Biosfera de Sian ka'an, Sur de Felipe Carrillo Puerto, Chetumal), y en Chiapas (Tapachula, Tuxtla Chico y Cacahoatán), entre otros (Bacab-Pérez *et al.*, 2024; López-Roblero *et al.*, 2021; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018). *B. simaruba*, también ha sido reportado como recurso importante para otras abejas, como para *Scaptotrigona mexicana* en Chiapas y el norte de Puebla (Cuauhtamazaco, Cuauhtlapanaloyan, Ixtahuata, Pinahuista, Tzinacapan, Tepetzintan, Tetelilla de Islas, Xalpantzingo, Yohualichan); y para *Tetragonisca angustula* en Chiapas (López-Roblero *et al.*, 2021; Ramírez-Arriaga y Martínez-Hernández, 2007). Para *A. mellifera* ha sido reportado en Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Oaxaca, Puebla, Tabasco, entre otros (Ramos-Díaz *et al.*

2015; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2011; Alfaro *et al.*, 2010; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2009; Ramírez-Arriaga y Martínez-Hernández, 2007).

En el componente PC2 los granos de polen de mayor contribución fueron *A. ramossisima*, *B. simaruba*, *S. racemosa* y *B. schlechtendalii*. Estas especies vegetales han sido reportadas como recursos de polen y néctar importantes para *A. mellifera* y *M. beecheii* en la península de Yucatán (Bacab-Pérez *et al.*, 2024; Córdova-Rodríguez *et al.*, 2023; Villanueva-Gutiérrez, 2018; Alfaro *et al.*, 2010). Otros taxones de menor aporte para ambos ejes fueron *Psidium guajava*, *Mimosa bahamensis*, *Cochlospermum vitifolium*, *Crotalaria* sp., *Lonchocarpus punctatus* y *Solanum*. El polen de *C. vitifolium* y *S. racemosa* ha sido documentada con frecuencia en los espectros polínicos de las mieles de *M. beecheii* y *A. mellifera* a pesar de no ser plantas nectaríferas (Bacab-Pérez *et al.*, 2024; Córdova-Rodríguez *et al.*, 2023; Villanueva-Gutiérrez, 2018). La presencia de estos granos de polen podría deberse a una sobre representación, producto del polen adheridos al cuerpo de la abeja y depositados en el néctar durante su búsqueda y colecta. De igual manera, en observaciones de campo se ha observado la adición de polen por parte de las abejas a la miel, este comportamiento podría deberse para enriquecer el contenido proteínico de las mieles, sin embargo, ha sido poco estudiado.

Respecto a la abundancia microbiana, los resultados de la presente investigación sugieren que bacterias y elementos fúngicos ocupan distintos ambientes, probablemente porque la miel, el pan de abeja y los intestinos, representan nichos distintivos que promueven el crecimiento de un tipo específico de microorganismo. De esta manera, nuestros datos sugieren fuertemente que habrá una mayor abundancia de bacterias en el pan de abeja con respecto a la miel y los intestinos de las abejas obreras. En contraste con esto, nuestros datos muestran una mayor abundancia de levaduras en los intestinos. Estos resultados son reveladores porque nos dan un panorama sobre la conformación y abundancia de los principales grupos de microorganismos en el pan de abeja, miel y los intestinos de las abejas. La abundancia bacteriana encontrada en el pan de abeja podría deberse a la disponibilidad de nutrientes proporcionados por el polen, ya que las bacterias para crecer necesitan agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales (Caycedo *et al.*, 2021; Power *et al.*, 2009), por lo que la riqueza y disponibilidad de nutrientes del pan de abeja promueve el crecimiento de bacterias. Estudios han reportado la abundancia de bacterias en el polen almacenado, así como su participación en la transformación a pan de abeja (Gilliam, 1979). Gilliam (1979), reporta en el polen almacenado una alta abundancia de bacterias Gram positivas con abundancia de las bacterias ácido-lácticas que participan de manera directa en el

proceso de transformación del pan de abeja. Al igual, reporta una baja abundancia de levaduras en las primeras etapas del pan de abeja, con un incremento hasta después de la fermentación, por lo que la baja abundancia de las levaduras encontradas podría deberse al estado inicial de la transformación del polen. De manera específica, se han identificado especies bacterianas en el polen almacenado dentro de las colonias de abejas. Anderson *et al.*, (2013) para *A. mellifera* reportaron a *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus firm5*, Actinobacteria, Alpha 2.2 y Beta proteobacteria. Beux *et al.*, (2022) reportaron para *Tetragonisca angustula* abundancias de 3.59 log UFC/g de bacterias lácticas y de 4.66 log UFC/g para levaduras. Floyd *et al.*, (2020) reportaron a *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus firm5*, *Melissococcus plutonius*, *Fructobacillus fructosus*, *Gilliamella apicola*, *Parasacharibacter apium*, Xanthomonadales y Actinomycetales. Gilliam *et al.*, (1990) reportaron en *Melipona fasciata* la abundancia de más de 54 cepas del género *Bacillus* spp. Gavazzoni *et al.*, (2022) reportaron en el polen almacenado de *Nannotrigona testaceicornis* la presencia de bacterias corineformes, *Bacillus* spp., y bacterias de la familia Lactobacillaceae y Streptococcaceae. Tang *et al.*, (2021) para *Lepidotrigona terminata*, *L. ventralis* y *Tetragonula pagdeni* reportaron la abundancia de bacterias Firmicutes, Proteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias. Respecto a las levaduras, Detry *et al.*, (2020) reportaron para *Apis mellifera* una población de levaduras de 6 UFC/mg, y reportaron a *Starmerella* spp., *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia* como abundantes. Teixeira *et al.*, (2003) para *Tetragonisca angustula* reportaron abundancias de 1.3×10^6 UFC g⁻¹ de levaduras, y citaron la presencia de levaduras del género *Candida* spp., así como a *Starmerella meliponinorum*, *Aureobasidium pullulans*, entre otros.

El intestino fue el segundo elemento con mayor abundancia de bacterias, al ser un sitio metabólicamente activo se ha reportado diversos grupos bacterianos simbióticos en homeostasis. Son indispensables para la predigestión de polen, nutrición, absorción de nutrientes y en el sistema inmune de las abejas (Tang *et al.*, 2021; Lashani *et al.*, 2020; Tamarit *et al.*, 2015). En el intestino de las abejas se han identificado grupos bacterianos importantes. Anderson *et al.*, (2013) en *A. mellifera* reportaron la abundancia de *Lactobacillus Firm 5*, *Lactobacillus Firm 4*, *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* (Gamma1), Alpha 2.1 (Acetobacteraceae), Alpha 2.2 (Acetobacteraceae) y Bifidobacterium. Disayathanoowa *et al.*, (2012) reportaron en obreras de *Apis cerana indica* una población bacteriana de 5.40×10^7 CFU/g, en larvas del cuarto estadio (6-8 días después de la eclosión) de 1.20×10^7 CFU/g y en pupas (15-17 días) una abundancia de 1.90×10^7 CFU/g reportaron a Firmicutes (*Lactococcus* y *Staphylococcus*), *Enterobacter* y *Klebsiella*. Suphaphimol *et al.*, (2020) reportaron para

Lepidotrigona terminata poblaciones de bacterias ácido-lácticas entre $1.56 \times 10^6 \pm 0.06$ CFU/g y $1.90 \times 10^6 \pm 0.01$ CFU/g identificaron los géneros *Fructobacillus* y *Leuconostoc*. Tang *et al.*, (2021) en *L. terminata*, *L. ventralis* y *Tetragonula pagdeni* reportaron abundancia de bacterias del filo Proteobacteria (66-88 %), Firmicutes (6-27 %) y Actinobacteria; y reportaron a *Acetobacter*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* como abundantes.

En la miel, los resultados mostraron la menor abundancia de bacterias y levaduras respecto al pan de abeja y los intestinos, esta baja abundancia observada podría deberse a sus características fisicoquímicas, ya que, a pesar de su alto contenido de agua que permite la sobrevivencia de microorganismos, presenta condiciones muy ácidas, alta presión osmótica y compuestos antimicrobianos que reducen su colonización siendo específicos los que logran establecerse (Teixeira *et al.*, 2003; Gilliam *et al.*, 1990). Jacinto-Castillo *et al.*, (2022) en estudios moleculares para las mieles de *A. mellifera* y *M. beecheii* en Yucatán, reportaron para *A. mellifera* la presencia de más de 21 especies bacterianas, identificaron a *Lactobacillus kunkeei* como abundante (85.6 %), Acetobacteraceae (6.1 %), *Lactobacillus*, *Sphingomonas yunnanensis* y *Fructobacillus*. Para *M. beecheii* reportaron 12 especies, con abundancia de una especie de la familia Lactobacillaceae (78.6 %) y *Pediococcus* (21.1 %). En elementos fúngicos reportaron 29 y 35 especies para *A. mellifera* y *M. beecheii*, respectivamente, y reportaron la abundancia de *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces siamensis* y *Aspergillus* en las mieles de *A. mellifera*; y a *Zygosporium pseudogibbum*, *Kodamaea ohmeri* y *Cladosporium sphaerospermum* para *M. beecheii*. Además, identificaron levaduras como *Candida* sp. y *Candida apicola*. Olofsson y Vázquez (2008) reportaron en la miel de *A. mellifera* una abundancia bacteriana de 5×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC/g⁻¹) con abundancia de las ácido-lácticas. Gavazzoni *et al.*, (2022) reportaron en mieles de *Nannotrigona testaceicornis* a *Bacillus* spp., bacterias de la familia Lactobacillaceae y Micrococcaceae. Beux *et al.*, (2022) reportaron para *Tetragonisca angustula* una abundancia bacteriana de 3.56 log UFC/g y de 4.41 UFC/g para levaduras. Pucciarelli *et al.*, (2014) reportaron para *T. angustula* una abundancia de 3.13 ± 1.05 Log UFC/g para bacterias y para levaduras y hongos 3.02 ± 0.99 log UFC/g, reportaron bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, entre otros. Por otra parte, Teixeira *et al.*, (2003) reportaron para *Tetragonisca angustula* una abundancia de levaduras de $\sim 2.6 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ con abundancia de *Starmerella meliponinorum*.

Nuestros resultados mostraron que las bacterias y las levaduras guardan una estrecha relación con el polen, que es un recurso indispensable en su dieta, e influyen sobre su dinámica

microbiana en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de la abeja *M. beecheii*. La abundancia polínica es un factor que puede influir de diferente manera sobre bacterias y levaduras. Por un lado, en bacterias un incremento de la abundancia polínica puede provocar efectos negativos, mientras que para levaduras es favorable. Este efecto podría deberse a lo ya reportado por autores como Lavie (1960), quien reportó que las propiedades antibióticas del polen afectan a algunas bacterias entre estas se encuentran *Bacillus alvei* y *B. larvae*, pero no afecta a los hongos, por lo que puede limitar el número y especies bacterianas sin afectar a las levaduras. Por otra parte, el polenkitt que recubre a muchos granos de polen puede defender al polen contra microorganismos (Pacini y Hesse 2005), por lo que el efecto acumulativo de muchos granos de polen con polenkitt podría afectar a las bacterias. Respecto a las levaduras, diversos estudios microscópicos en el néctar han demostrado que el número de levaduras está correlacionado positivamente con la abundancia de granos de polen (Pozo *et al.*, 2015; Herrera, 2017). Pozo y Jacquemyn (2019), determinaron que la adición de polen al néctar favorece al crecimiento de levaduras, esto se debe a que los granos de polen aportan aminoácidos y nitrógeno indispensables para las levaduras, además demostraron que la composición polínica es otro factor que influye sobre esta dinámica. Sus resultados mostraron que el polen de *Cistus* sp. favorece mejor a las levaduras que el polen de *Brassica* sp. y *Papaver* sp. De acuerdo con Gottsberger *et al.*, (1990), la concentración de proteínas y con ello aminoácidos en el néctar se incrementa con la adición de granos de polen, por lo que la adición de polen proporciona un suplemento de nitrógeno que favorece al crecimiento de las levaduras.

Estudios realizados por Friedle *et al.*, (2021) mostraron que la composición polínica de las cargas de polen en *A. mellifera* ejerce un efecto sobre la presencia de microorganismos. Reportaron que el polen de *Aruncus* sp. y *Ligustrum* sp. promueven la abundancia de las bacterias *Lactobacillus* y *Pseudomonas*, así como a los hongos *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Mycosphaerella*; y el polen de *Acer* sp., *Aesculus* sp. y *Ranunculaceae* a las bacterias *Pseudomonas*, *Rosenbergiella* y *Acinetobacter*, y a hongos como *Zygosaccharomyces*, *Cladosporium* y *Podosphaera*. Nuestros resultados mostraron que los granos de polen de *S. racemosa*, *Bursera* spp., *A. ramosissima*, *C. vitifolium*, *L. punctatus*, *M. bahamensis* y *P. guajava* son las especies que influyen en la abundancia de bacterias y levaduras en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii*. Nuestros datos apoyan la hipótesis planteada, ya que, de acuerdo con esta, se encontraron altas abundancias bacterianas en el pan de abeja y en los intestinos, que, de cierta forma son afectados por la composición y abundancia de los granos de polen.

3.5. CONCLUSIÓN

Investigaciones anteriores han demostrado que las bacterias y levaduras son importantes para la transformación del polen almacenado en pan de abeja, y del néctar en miel, así como de su importancia en los intestinos, donde son esenciales para la vida de las abejas (Gilliam, 1979; Tang *et al.*, 2021; Lashani *et al.*, 2020; Tamarit *et al.*, 2015). En este trabajo, únicamente se encontraron bacterias Gram positivas, el cual podría deberse a sus altas abundancias en las muestras, sin embargo, no se descarta la presencia de bacterias Gram negativas, ya que, debido a sus bajas abundancias serían detectados a través de análisis moleculares o cultivos selectivos. Podemos concluir que el polen influye sobre la dinámica de bacterias y levaduras presentes en el pan de abeja, miel y en los intestinos. Aquí, hemos brindado información sobre las especies polínicas que influyen sobre la abundancia de microorganismos y, apoyan la idea de que la composición y abundancia del polen influyen sobre bacterias y levaduras.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

La presente tesis se enfocó en documentar los tipos polínicos y los principales grupos de microorganismos presentes en las muestras de pan de abeja, miel y aparato digestivo de *Melipona beecheii*. Lo anterior, permitió conocer las especies de polen y néctar importantes para esta abeja y conocer cómo se relaciona con la abundancia microbiana. El manejo de esta abeja es principalmente de traspatio y debido a su rango de forrajeo está condicionada a la flora de los alrededores del meliponario. Nuestros resultados mostraron que esta abeja bajo estas condiciones de traspatio visita 35 especies vegetales, aunque, se ha reportado que esta abeja colecta polen de más 68 especies vegetales en Yucatán (Villanueva-Gutiérrez *et al.* 2018). La principal fuente de polen y de néctar para *M. beecheii* se derivó de la familia Fabaceae, además, también encontramos especies de la familia Burseraceae y otras familias menores, las cuales también pueden desempeñar un papel crucial como fuentes de polen y néctar para esta especie de abeja nativa. Las especies polínicas *Cochlospermum vitifolium*, *Senna racemosa*, *Solanum americanum* y las néctar-poliníferas *Alternanthera ramosissima*, *Bursera* spp., *Lonchocarpus punctatus*, *Mimosa bahamensis* y *Psidium guajava* encontradas como abundantes, han sido reportados en otros trabajos como recursos importantes para esta abeja y para otras abejas nativas. Ha sido reportado para la abeja *Scaptotrigona mexicana* en Chiapas y el norte de Puebla; y para *Tetragonisca angustula* en Chiapas (López-Roblero *et al.*, 2021; Ramírez-Arriaga y Martínez-Hernández, 2007). Estas especies vegetales son importantes para implementar su cultivo en los alrededores de los meliponarios ya que son fuente abundante de polen y néctar, las cuales las abejas colectan y almacenan en potes de ceras dentro de sus nidos, donde son transformados en pan de abeja y en miel indispensables para su alimentación.

Durante los procesos de transformación del pan de abeja y de la miel se ven involucradas diversas bacterias y levaduras, y muchas de estas están en asociación directa en el aparato digestivo de las abejas, donde son fundamentales para su sobrevivencia (Kwon y Moran, 2016; Menezes *et al.*, 2013; Gilliam *et al.*, 1997; 1990; Rosa *et al.*, 2003). Se detectó que bacterias y levaduras presentan abundancias diferentes en cada ambiente (pan de abeja, miel y aparato digestivo). La disponibilidad de nutrientes podría ser el factor que favorece la abundancia

bacteriana observada en el pan de abeja, ya que, de acuerdo con Caycedo *et al.*, (2021) y Power *et al.*, (2009) las bacterias abundan cuando existen condiciones de carbono, nitrógeno y algunas sales minerales. Otra condición que favorece a este medio son las enzimas agregadas durante el empaquetamiento del polen, ya que pre-digieren el protoplasma del polen y durante el shock osmótico que provoca la ruptura del polen, su contenido es liberado al exterior haciendo digeribles las proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas, antioxidantes y otras sustancias contenidas en él (Dustmann, 2007). La baja abundancia de bacterias y levaduras encontradas en la miel podría estar relacionado al alto contenido de azúcares, así como a la baja disponibilidad de proteínas y aminoácidos, a sus características fisicoquímicas, como son condiciones muy ácidas, alta presión osmótica y presencia de compuestos antimicrobianos (Teixeira *et al.*, 2003; Gilliam *et al.*, 1990). Las bacterias Gram positivas encontradas en el pan de abeja y en la miel podrían pertenecer a los géneros de *Bacillus* y a las ácido-lácticas fermentativas como *Lactobacillus* sp., *Fructobacillus* sp. y *Streptococcus* reportadas como abundantes en estas muestras (Gilliam, 1979). Respecto a los intestinos, diversos estudios han evidenciado que los intestinos de las abejas obreras están dominados por nueve grupos bacterianos, que comprenden entre el 95 % y el 99.9 % de las bacterias en casi todos los individuos (Kwon y Moran, 2016; Moran *et al.*, 2012; Jeyaprakash *et al.*, 2003).

De acuerdo con estudios realizados por Kwon y Moran (2016), en la boca de las abejas hay una baja abundancia de bacterias y son procedentes del néctar y del entorno de la colmena. En el buche hay principalmente miembros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae y las especies *Lactobacillus kunkeei* y *Parasaccharibacter apium* que habitan en el néctar y los materiales de la colmena. En el intestino medio reportaron pocas bacterias, ya que esa región no proporciona un sustrato estable para la colonización bacteriana, ya que está revestida por un material quitinoso que se desprende continuamente conocido como matriz peritrófica (Engel y Moran, 2013). Por otro lado, en el píloro reportaron la abundancia *Frischella perrara*. La mayor comunidad bacteriana la reportaron en la región del intestino posterior, esta región está revestida con una capa estable y reportaron abundancias de 10^8 y 10^9 células bacterianas que representa > 99 % de las bacterias en las abejas obreras adultas. Este segmento del intestino está dividido en dos regiones, el íleon y el recto, cada una de las cuales tiene una composición de comunidad microbiana distinta. El íleon, un tubo estrecho con seis pliegues longitudinales, está dominado por las principales especies bacterianas gramnegativas: en el lumen de los pliegues, *Snodgrassella alvi* forma una capa directamente en la pared intestinal, sobre la cual

se forma una capa de *Gilliamella apicola*. El recto, es donde se almacenan los desechos fecales antes de la defecación, y puede funcionar en la reabsorción de agua y sales. La comunidad microbiana en el recto está dominada por las bacterias grampositivas fermentativas *Lactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5 y el grupo *B. asteroides*. Los dos grupos de especies de *Lactobacillus* también se pueden encontrar en el lumen del íleon, pero son más abundantes en el recto (Powell *et al.*, 2014; Martinson *et al.*, 2012). De acuerdo con lo reportado, las especies *Lactobacillus* Firm-5, es la más abundante ocupando poco más de 40 % de la abundancia total, seguido de *Lactobacillus* Firm-4 con alrededor del 20 % y las bacterias gram negativas se encuentran alrededor del 10% de comunidad total. Sin embargo, en nuestras muestras no encontramos bacterias Gram negativas, esto podría deberse a que en diversas investigaciones han evidenciado que la comunidad bacteriana de los intestinos de las abejas sin aguijón es diferente al de otras abejas, donde, las bacterias Gram negativas *Gilliamella* y *Snodgrassella* pueden estar ausentes o en bajas proporciones en las abejas sin aguijón (Díaz *et al.*, 2017; Koch *et al.*, 2013). Por el contrario, se reporta la abundancia de bacterias Gram positivas en el intestino de las abejas sin aguijón, como son las bacterias corineformes, Firmicutes, proteobacterias, bacterias de la familia Lactobacillaceae, de la familia Micrococcaceae, de la clase Bacilli y la abundancia de *Lactobacillus kunkeii*, *Lactobacillus* Firm-5, *Streptococcus*, entre otros (Gavazzoni *et al.*, 2022; Suphaphimol *et al.*, 2020).

La dinámica de estos microorganismos en el pan de abeja, miel y aparato digestivo están relacionados con el polen, un recurso indispensable en su dieta. La abundancia polínica es un factor que puede provocar efectos negativos para bacterias, mientras que para levaduras es favorable. Este efecto podría deberse a lo ya reportado por autores como Lavie (1960), quien reportó que las propiedades antibióticas del polen afectan a algunas bacterias, pero no afecta a los hongos. Del mismo modo, el incremento de granos de polen con polenkitt afectan a los microorganismos (Pacini y Hesse 2005). En levaduras, estudios realizados por Pozo *et al.*, (2015), Herrera (2017) y Pozo y Jacquemyn (2019), reportaron el efecto positivo del incremento de polen en el néctar, esto podría deberse porque la adición de polen al néctar incrementa el contenido proteínico que favorecen al crecimiento de levaduras. En este ambiente es común encontrar levaduras alrededor de los granos de polen, ya que es la fuente de aminoácidos y nitrógeno indispensables para su crecimiento. Nuestros resultados mostraron que los granos de polen de las especies *S. racemosa*, *Bursera* spp., *A. ramosissima*, *C. vitifolium*, *L. punctatus*, *M. bahamensis* y *P. guajava* son las especies que influyen en la abundancia de bacterias y levaduras.

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

Se puede concluir que la importancia de los granos de polen va más allá de la polinización que permite perpetuar las especies vegetales, ya que influyen sobre la dinámica de muchos organismos, entre estos, los que participan en los procesos de transformación del pan de abeja, la miel, y los que participan en funciones esenciales en los intestinos que permiten la sobrevivencia de las abejas. Por lo que la conservación de las especies vegetales polínicas y néctar-polinífera de importancia para las abejas, es fundamental para mantener colonias de abejas fuertes y en buen estado de salud.

Nuestra investigación encontró que la fuente principal de polen y de néctar para *M. beecheii* se derivó de la familia Fabaceae. Esta familia es conocida por ser una de las más diversas de toda la península. Además, también encontramos a especies de la familia Burseraceae y otras familias menores que se encuentran comúnmente en el área, las cuales también pueden desempeñar un papel crucial como fuentes de polen y néctar para esta especie de abeja nativa.

Las especies vegetales consideradas como poliníferas y néctar-poliníferas aquí identificadas son importantes y deben ser consideradas para preservar y sembrar en los meliponarios o en otras áreas cercanas, esto con la finalidad de contrarrestar la pérdida de los recursos florales para las abejas nativas ocasionados por el incremento de la urbanización y el establecimiento de monocultivos.

Las especies *Bursera simaruba* y *B. schlechtendalii* encontradas como especies importantes, están adaptadas a las condiciones ambientales locales, y pueden ser consideradas para ser propagadas en áreas donde la vegetación se encuentra perturbada, o en parques, avenidas, solares en casas, o su uso como cercas vivas, ya que son especies que producen abundante polen y néctar para las abejas nativas. *Senna racemosa* es otra especie importante, produce grandes cantidades de polen, podría ser considerada para plantarse en parques, avenidas, jardines, aceras ya que no es una especie exigente al tipo de suelo, es tolerante a la sequía y de crecimiento rápido. *Lonchocarpus* spp. son fuentes de polen y néctar, y puede sembrarse en parques, jardines, áreas verdes, camellones, en banquetas, en patios, y también a lo largo de todo un camellón. *Mimosa* spp. es un recurso polínico y de néctar, y puede ser usado en áreas verdes, jardines, en patios de las casas, o en remantes de la vegetación. *Cochlospermum vitifolium* es una fuente importante de polen y puede ser incluido en jardines, aceras, patios,

como cercas vivas y en bordes de caminos. *Psidium guajava* es una planta néctar-polinífera y puede sembrarse en jardines, parques, huertos familiares y en patios de las casas. *Piscidia piscipula* es una fuente de polen y néctar, de igual manera puede propagarse en parques, jardines, avenidas y en los patios de las casas, es una especie muy resistente al a la sequía y a la radiación solar. *Solanum* es una fuente de polen para las abejas y puede ser cultivada en los patios de las casas.

Estas especies botánicas son importantes no solo como fuente de alimento de polen y néctar, sino, que los granos de polen muestran una relación estrecha con la abundancia de bacterias y levaduras. En el polen almacenado, las bacterias son abundantes, mientras que en la miel es baja. Esta relación junto a las características propias de cada ambiente permite la transformación del pan de abeja y de la miel. Por lo cual, es importante la conservación de la flora nativa, ya que la pérdida de esta podría afectar las dinámicas microbianas ocasionando alteraciones en las funciones digestivas de las abejas, en los procesos de transformación del pan de abeja y de la miel. Por lo anterior, es importante incrementar la información existente de las especies botánicas que visita *M. beecheii* en meliponarios tradicionales, ya que, debido a su manejo de traspatio, visitan la flora adyacente a los meliponarios, donde, la vegetación en su mayoría está limitada a remanentes de la vegetación original.

4.3. PERSPECTIVAS

Aunque los datos obtenidos fueron altamente informativos y uno de los más completos realizados en Yucatán, los resultados presentados comprenden el periodo de febrero a mayo, por lo que se requiere ampliar la información generada. Se presenta una serie de perspectivas que pueden realizarse para completar la investigación de esta tesis:

- Incrementar el número de meliponarios en distintos municipios para obtener la mayor variación ambiental, ya que hay especies importantes que en algunas áreas no están presentes y son otras las que cumplen ese rol.
- Realizar seguimiento en otras temporadas, o durante un año, ya que de esta manera podemos documentar el rol de las especies, y ver cómo cambian a través del tiempo, y registrar un listado más completo de los recursos de polen y néctar en las diferentes estaciones del año.

- Realizar mediciones de la cantidad y concentración de los azúcares del néctar y realizar observaciones de campo de las especies reportadas como nectaríferas, ya que en algunas especies está la incertidumbre si son realmente especies néctar-poliníferas.
- Analizar muestras de polen, miel y propóleo ya que de esta manera se obtiene un listado más completo de las especies importantes no solo de polen y de néctar, sino de las posibles plantas que las abejas nativas visitan para obtener sus resinas.
- En cuanto a los microorganismos, analizar la microbiota del polen y néctar almacenado en sus diferentes estados de transformación, esto para tener una información detallada de la dinámica de bacterias y levaduras para esta abeja.
- Realizar cultivos microbiológicos y realizar pruebas bioquímicas para identificar a nivel específico los géneros y las especies de bacterias y levaduras presentes en el pan de abeja, miel y aparato digestivo de *M. beecheii*.
- Realizar estudios moleculares para obtener una información detallada de los microorganismos presentes en el pan de abeja, miel y aparato digestivo.
- Realizar estudios de la composición bioquímica de los granos de polen encontrados y analizar si están correlacionados con su comportamiento de colecta.
- Analizar la microbiota de cada región del aparato digestivo de *M. beecheii* para tener una información más precisa de su abundancia en cada una región.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, B.R.G., González, J., Ortiz, D.J.J., Viera, C.F.A., Burgos, P.A.I., Martínez, H.E., Ramírez-Arriaga, E. (2010). Caracterización palinológica de las mieles de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Mérida-Yucatán.
- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Corby-Harris, V. (2013). 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, e83125.
- Arnold, N., Zepeda, R., Vázquez-Dávila, M., Aldasoro-Maya, M. (2018). Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México y Catálogo de especies. San Cristóbal de las Casas: Ecosur-Conabio, 147,46 p.
- Asama, T., Arima, T., Gomi, T., Keishi, T., Tani, H., Kimura, Y., Hashimoto, K. (2015). *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology* 119, 818-826.
- Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106, 1-123.
- Ayala R., González V.H., Engel M.S. (2013). Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution, and indigenous knowledge. In: Vit P, Pedro S.R.M., Roubik D.W. (eds) *Pothoney: a legacy of stingless bees*. Springer, New York, pp. 135-152.
- Bacab-Pérez, A. I., Ramírez-Arriaga, E., Canto, A. (2024). Melissopalynology of pot-pollen and pot-honey of the Mayan stingless bee *Melipona beecheii* Bennett, 1831 (Apidae, Meliponini) in Yucatan, Mexico. *Apidologie*, 55, 22.
- Baena-Díaz, F., Chévez, E., Ruiz de la Merced, F., Porter-Bolland, L. (2022). *Apis mellifera* en México: producción de miel, flora melífera y aspectos de polinización. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 13, 525-548.

- Baker, H.G., Baker, I. (1983). A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley B, Elias TS (eds) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, pp. 126-152.
- Baptis, J.N. Mandel, M., Gherna, R.L. (1978). Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*. *Int. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28, 229-244.
- Barth, F., Hrncir, M., Jarau, S. (2008). Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini). *Journal of Comparative Physiology a Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 194, 313-327.
- Beux, M.R., Ávila, S., Surek, M., Bordin, K., Leobet, J., Barbieri, F., Rosa, E.A.R. (2022). Microbial biodiversity in honey and pollen pots produced by *Tetragonisca angustula* (Jataí). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, e22210440.
- Brosi, B. (2009). The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *Forest Ecology and Management*, 258, 1830-1837.
- Cabrera, M. (2006). Caracterización polínica de las mieles de la provincia de Formosa, Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales nueva serie*, 8, 135-142.
- Cadez, N., Fülöp, L., Dlačny, D., Peter, G. (2015). *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 645-654.
- Camargo, J.M.F., García, M.V.B, Junior, E.R.Q., Castrillon, A. (1992). Notas previas sobre a bionomia de *Ptilotrigona lurida* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): associação de leveduras em pólen estocado. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 8, 391-395.
- Camargo, J.M.F., Grimaldi, D.A., Pedro, S.R.M. (2000). The extinct fauna of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Dominican amber: Two new species and redescription of the male of *Proplebeia dominicana* (Wille and Chandler). *American Museum Novitates* 3293, 1-24.

- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. (2007). Meliponini. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR (eds) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, 272-578.
- Camargo, J.M.F., Vit, P. (2013). Historical biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the neotropical region. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW (eds) Pot-honey: a legacy of stingless bees. Springer, New York, 19-34
- Cano, R.J., Borucki M.K., Higby-Schweitzer M., Poinar H.N., Poinar G.O., Pollard K.J. (1994). *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? *Applied and Environmental Microbiology*, 60,2164-2167.
- Canto, A., Pérez, R., Medrano, M., Castellanos, M.C, Herrera, C.M. (2007). Intra-plant variation in nectar sugar composition in two *Aquilegia* species (Ranunculaceae): contrasting patterns under field and glasshouse conditions. *Annals of Botany*, 99, 653-660.
- Canto, A., Herrera, C.M., Medrano, M., Pérez, R., García, I.M. (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an xperimental test. *American Journal of Botany*, 95, 315-320.
- Carnevali, G., Tapia-Muñoz, J.L., De Stefano, R.D; Ramírez, I. (2010). Flora ilustrada de la península de Yucatán: listado florístico. CICY AC Mérida Yucatán México.
- Castellanos-Potenciano, B.P., Ramírez-Arriaga, E., Zaldívar-Cruz, J.M. (2012). Análisis del contenido polínico de mieles producidas por *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae) en el estado de Tabasco. México. *Acta zoológica mexicana*, 28, 13-36.
- Caycedo Lozano, L., Ramírez, L.C.C., Suárez, D.M.T. (2021). Bacteria, nutrition and growth: a look from chemistry. *Nova*,19, 49-94.
- Coh-Martínez, M.E., Cetzal-Ix, W., Martínez-Puc, J.F., Basu, S.K., Noguera-Savelli, E., Cuevas, M.J. (2019). Perceptions of the local beekeepers on the diversity and flowering phenology of the melliferous flora in the community of Xmabén, Hopelchén, Campeche, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 15:16.
- CONABIO. (2018). Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CDMX.

- Córdova-Córdova, C.I., Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E., Zaldívar-Cruz, J.M. (2013). Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera* L) de cuatro regiones del estado de Tabasco, México, mediante técnicas melisopalinológicas. *Universidad y Ciencia*, 29, 163-178.
- Córdova-Rodríguez, A., Aragón-Moreno, A.A., Islebe, G.A., Torrescano-Valle, N. (2023). Botanical characterization of *Apis mellifera* honeys in areas under different degrees of disturbance in the southern Yucatan peninsula, Mexico. *Palynology*, 47.
- Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., Dollin, A., Heard, T., Aguilar, I., Venturieri, G.C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37, 275-292.
- Crane, E. (1992). The past and present status of beekeeping with stingless bees. *Bee World*, 73, 29-42.
- Crozier, R.H., Pamilo, P. (1996). Evolution of social insect colonies: sex allocation and kin selection. Oxford University Press.
- da Silva Correia, F.C., Peruquetti, R.C. (2023). Pollen niche of *Melipona crinita* Moure & Kerr, 1950 (Hymenoptera: Apidae) in a meliponary of Acre, Brazil: a study case. *Revista Chilena de Entomología*, 49, 237-254.
- de Jong, H.J. (1999). The Land of corn and honey: The keeping of stingless bees (Meliponiculture) in the Ethno-Ecological environment of Yucatan (Mexico) and El Salvador. Ph.D. Thesis, Utrecht University, Utrecht.
- Davies, J.A., Anderson, G.K., Beveridge, T.J., Clark, H.C. (1983). Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain. *Journal of bacteriology*, 156, 837-845.
- Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E., Daniel, H.M. (2020). Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation. *Microorganisms*, 8, 1789.
- Díaz, S., de Souza Urbano, S., Caesar, L., Blochtein, B., Sattler, A., Zuge, V., Haag, K.L. (2017). Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of invertebrate pathology*, 143, 35-39.

- Disayathanoowat, T., Yoshiyama, M., Kimura, K., Chantawannakul, P. (2012). Isolation and characterization of bacteria from the midgut of the Asian honey bee (*Apis cerana indica*). *Journal of Apicultural Research*, 51, 312-319.
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., Bultman, S.J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism*, 13, 517-526.
- Duno de Stefano, R., Ramírez Morillo, I., Tapia-Muñoz, J., Hernández-Aguilar, S., Can, L., Cetzal-Ix, W., Méndez-Jiménez, N., Zamora-Crescencio, P., Gutiérrez-Báez, C., Carnevali Fernández-Concha, G. (2018). Aspectos generales de la flora vascular de la Península de Yucatán Mexicana. *Botanical Sciences*, 96, 515-532.
- Durán, R., Méndez, M. (2010). Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.
- Dustmann, J. (2007). Fresh pollen offers best therapeutic and nutritional benefits. In: 5th German Apitherapy Congress. Passau, Germany, pp. 2.
- Eltz, T., Brühl, C.A., Görke, C. (2002). Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. *Insectes Sociaux*, 49, 28-30.
- Engel, P., Martinson, V.G., Moran, N. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 109, 11002-11007.
- Engel, P., Moran, N.A. (2013). The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37, 699-7355.
- Enríquez, E., Dardón, M. (2007). Caracterización de la miel de meliponinos de distintas regiones biogeográficas de Guatemala. Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Erdtman, G. (1943). *An Introduction to Pollen Analysis*. Waltham Mass. 239 pp.
- Erdtman, G. (1952). *Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms*. Almqvist and Wiksell, *Stockholm*. 539 pp.

BIBLIOGRAFÍA

- Evans, J.D., Armstrong, T.N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology*.
- Faegri, K. (1956). Recent trends in palynology. *Bot. Rev.* 22, 639-664.
- Faegri, K., Iversen, J. (1964). Textbook of Pollen Analysis, 2nd ed. Munksgaard, Copenhagen. 237 pp.
- Flores, J.S., Durán, R., Ortiz, J.J. (2010). Comunidades vegetales terrestres. *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*, 125-129.
- Floyd, A.S., Mott, B.M., Maes, P., Copeland, D.C., McFrederick, Q.S., Anderson, K.E. (2020). Microbial ecology of european foul brood disease in the honey bee (*Apis mellifera*): Towards a microbiome understanding of disease susceptibility. *Insects*, 11, 555.
- Fogarti, W.M., Griffin, P.J., Joyce, A.M. (1974). Enzymes of *Bacillus* species-part I. *Process Biochem*, 9,11,18, 24.
- Friedle, C., D'Alvise, P., Schweikert, Wallner, K., Hasselmann, M. (2021). Changes of microorganism composition in fresh and stored bee pollen from Southern Germany. *Environ Sci Pollut Res.* 28, 47251-47261.
- Gavazzoni, L., Pavanelli, M.F., Gregório, A., Wielewski, P., Galhardo, D., da Rosa Santos, P., Toledo, V.D.A.A.D. (2022). Bacterial microbiota in *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier, 1836) colonies. *Journal of Apicultural Research*, 62, 795-803.
- García G.D., Rojas Mogollón, M.A., Sánchez Nieves, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana*,11,123-129.
- Genaro, J.A. (2008). Origins, composition and distribution of the bees of Cuba (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). *Insecta Mundi, Paper*, 583.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10, 269-274.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155,1-10.

- Gilliam, M., Lorenz B.J., Richardson, G.V. (1988). Digestive enzymes and micro-organisms in honey bees, *Apis mellifera*: Influence of streptomycin, age, season, and pollen. *Microbios*, 55, 95-114.
- Gilliam, M., Roubik, D.W., Lorenz, B.J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21,89-97.
- González-Acereto, J.A. (2008). Cría y manejo de abejas nativas sin aguijón en México. Material de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- González-Acereto, J.A., De Araujo-Freitas, Ch., Medina-Medina, L.A. (2008). Aprovechamiento ancestral y sustentable de las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) por campesinos mayas de Yucatán. pp. 9-18. V Congreso Mesoamericano sobre abejas sin aguijón.
- González-Acereto, J.A., Quezada-Euán, J.J.G., Medina-Medina, L.A. (2006). New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatan: results of an integral program to rescue and promote the activity. *Journal of Apicultural Research*, 45, 234-239.
- Gottsberger, G., Arnold, T., Linskens, H. F. (1990). Variation in floral nectar amino acids with aging of flowers, pollen contamination, and flower damage. *Israel Journal of Plant Sciences*, 39,167-176.
- Grüter, C. (2020). Stingless bees: their behaviour, ecology and evolution. *Springer Nature*, 45-47.
- Herrera, C. M. (2017). Scavengers that fit beneath a microscope lens. *Ecology*,98,10.
- Herrera, C.M., C., Canto, A., Pozo M.I. (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany*, 103, 1415-1423.
- Herrera, C.M., García, I.M., Pérez, R. (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumblebee-pollinated plants. *Ecology*, 89, 2369-2376.
- Herrero, B., Valencia-Barrera, R., San Martín, R., Pando, V. (2002). Characterization of honeys by melissopalynology and statistical analysis. *Canadian Journal of Plant Science*, 82, 75-82.

- Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268-1273.
- Iversen, J., Troels-Smith, J. (1950). Pollenmorphologische Definitionen und Typen. *Dan. Geol. Unders.* 43, 1-54.
- Jacinto-Castillo, D.F., Canto, A., Medina-Medina, L.A., O'Connor-Sánchez, A. (2022). Living in honey: bacterial and fungal communities in honey of sympatric populations of *Apis mellifera* and the stingless bee *Melipona beecheii*, in Yucatan, Mexico. *Archives of Microbiology*, 12,204-718.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M.A., Allsopp, M.H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of invertebrate pathology*, 84, 96-103.
- Kent, R.B. (1984). Mesoamerican stingless beekeeping. *J Cult Geogr*, 4,14-28.
- Klungness, L.M., Peng, Y.S. (1984). A histochemical study of pollen digestion in the alimentary canal of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 30, 511-521.
- Koch, H., Abrol, D.P., Li, J., Schmid-Hempel, P. (2013). Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular ecology*, 22, 2028-2044.
- Koch, H., Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,108, 19288-19292.
- Köppen, W. (1936). Das geographische System der Klimate In Handbuch der Klimatologie. Band I, Teil C; Berlin, Germany. 44 pp.
- Kogan, H.V., Elikan, A.B., Glaser, K.F., Bergmann, J.M., Raymond, L.M., Prado-Irwin, S.R., Snow, J.W. (2023). Colonization of honey bee digestive tracts by environmental yeast *Lachancea thermotolerans* is naturally occurring, temperature dependent, and impacts the microbiome of newly emerged bees. *Microbiology Spectrum*, 11, e05194-22.
- Katz, E., Demain A.L., (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, 41, 449-474.

- Kwapong, P., Aidoo, K., Combey, R., Karikari, A. (2010). Stingless Bees; Importance, Management and Utilisation; A Training Manual for Stingless Beekeeping.
- Kwong, W.K, Moran, N.A. (2016). Gut microbial communities of social. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 374-384.
- Láin, C.S. (2004). Glosario de términos palinológicos. *Lazaroa*, 25, 93-112.
- Lashani, E., Davoodabadi, A., Dallal, M.M.S. (2020). Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Veterinary research fórum*, 11,121.
- Laaroussi, H., Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Bakour, M., Ousaaïd, D., El Ghouizi, A., Lyoussi, B. (2023). Unveiling the techno-functional and bioactive properties of bee pollen as an added-value food ingredient. *Food Chemistry*, 405, 134958.
- Lavie, P. (1960). Les substances antibactériennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifera* L.). *Les Annales de Abeille*, 3, 103-183.
- Lesur, L. (2002). Manual de apicultura. México: Trillas.
- López-Roblero, E., Espinoza-Toledo, C., López-García, J., Grajales-Conesa, J., Quiroz-García, D. (2021). Floral resources collected by four native bees species in southern Mexico. *Grana*, 60, 57-68.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59, 139-157.
- Llovo, J.,Pontón, J. (2007). 14a. Diagnostico microscópico de la micosis.
- Machado, J.O. (1971). Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura*, 23, 625-633.
- Margaoan, R., Mărghițaș, L.A., Dezmiorean, D.S., Dulf, FV., Bunea, A., Socaci, S.A., Bobiș, O. (2014). Los orígenes botánicos predominantes y secundarios del polen influyen en el perfil de carotenoides y ácidos grasos del polen fresco recolectado por abejas. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 62, 6306-6316.

BIBLIOGRAFÍA

- Martins, A.C., Melo, G.A.R., Renner, S.S. (2014). The corbiculate bees arose from new world oil-collecting bees: implications for the origin of pollen baskets. *Mol Phylogenet Evol*, 80, 88-94.
- Martinson, V.G., Moy, J., Moran, N.A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl. Environ. Microbiol*, 78, 2830-2840.
- Martín-Culma, N.Y., Arenas-Suárez, N.E. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Secretaría de Desarrollo Rural. Entramado*, 14, 232-240.
- Martínez-Hernández, E., Cuadriello-Aguilar, J.I., Téllez-Valdez, O., Ramírez-Arriaga, E., Sosa N.S., Melchor, S.J., Medina-Camacho, M., Lozano, G.S. (1993). Atlas de las plantas y el polen utilizados por las cinco especies principales de abejas productoras de miel en la región del Tacaná, Chiapas, México. Publicación especial del Instituto de Geología, U.N.A.M, México.
- Melo, G.A.R. (2016). *Plectoplebeia*, a new Neotropical genus of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Fortschr Zool* 33:e20150153.
- Menezes, C. (2010). A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de doutorado, Departamento de Biología, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F.A.F.L., Venturieri, G.C., Imperatriz-Fonseca, V.L. (2013). The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: Vit, P., Pedro, S., Roubik, D. (eds) *Pot-Honey*. Springer, New York, NY. 153-171.
- Michener C.D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Belknap Press, Harvard University, Cambridge.
- Michener, C.D. (2000). *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Michener, C.D. (2013). The Meliponini. En *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* eds. Vit, P., Pedro, S. & Roubik, D. 3-17, Springer.

- Miranda, F. (1958). Estudios acerca de la vegetación. In: Beltran E (ed), Los recursos naturales del sureste y su aprovechamiento, Tomo II. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, CDMX, pp. 215-271.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., Sabree, Z.L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLOS ONE* 7, e36393.
- Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. (2007). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. *Sociedade Brasileira de Entomologia*, Curitiba.
- Mushtaq, M., Ayesha, J., Sharfun, N. (2006). Biodiversity of yeast microflora in nectar of *Bombax ceiba* and *Canna indica* flower. *Pakistan Journal Botany*, 38, 1279-1288.
- Musicante, M.L., Galetto L. (2008). Características del néctar de *Cologania broussonetii* (Balb) DC (Fabaceae) y su relación con los visitantes florales. *Ecología austral*, 18, 195-204.
- Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerova, K., Kott, T., Kopečný, J. (2008). Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica*, 53, 229-233.
- Negrín Muñoz, E., Sotelo Santos, L.E. (2016). Abejas nativas, señoras de la miel. Patrimonio cultural en el estado de Campeche / Native bees, honey ladies. Cultural heritage in the State of Campeche. *RICSH Revista Iberoamericana De Las Ciencias Sociales Y Humanísticas*, 5, 162-185.
- Niemeyer, H., Teillier, S. (2007). Aromas de la flora nativa de Chile. Gobierno de Chile. Fundación para la innovación agraria. Ministerio de agricultura. 448 p.
- Olofsson, T.C., Vázquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current microbiology*, 57, 356-363.
- Ortiz-Reyes, L.Y., Quiroz-García, D.L., Arreguín-Sánchez, M.L., Fernández, N.R. (2022). Origen botánico y caracterización fisicoquímica de la miel de meliponinos (Apidae: Meliponini) de Teocelo, Veracruz, México. *Polibotánica*, 54, 153-170.
- Pacini, E. (1990). Tapetum and microspore function. In "Microspores: evolution and ontogeny" Blackmore S, Knox RB.

- Pacini, E., Hesse, M. (2005). Pollenkitt-its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200,399-415.
- Pacini, E., Viegi, L., Franchi, G. (2008). Types, evolution and significance of plant-animal interactions. *Rendiconti Lincei*, 19, 75-101.
- Pedro, S.R.M. (2014). The stingless see fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61, 348-354.
- Pereira-Oliveira, P., van den Berg, C., Santos, F.D.A.R.D. (2010). Pollen analysis of honeys from Caatinga vegetation of the state of Bahia, Brazil. *Grana*, 49, 66-75.
- Piccini, C., Antunez, K., Zunino, P. (2004). An approach to the characterization of the honey bee hivebacterial flora. *Journal of Apicultural Research*, 43,101-104.
- Pielou, E.C. (1977). *Mathematical ecology*. Wiley, New York.
- Potonié, R. (1934). Zur Morphologie der fossilen Pollen und Sporen. *Arb. Inst. Paläobotanik Petrographie Brennsteine* 4, 5-24.
- Power, D.A., Johnson, J.A. (2009). Difco™ & BBL™ manual. *Manual of Microbiological Culture Media*, 359, 60.
- Pozo, M.I., Herrera, C.M., Bazaga, P. (2011). Species richness of yeast communities in floral nectar of southern spanish plants. *Microbial Ecology*, 61, 82-91.
- Pozo, M.I., Jacquemyn, H. (2019). Addition of pollen increases growth of nectar-living yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 15.
- Pozo, M.I., Lievens, B., Jacquemyn, H., Peck, R. L. (2015). Nectar: production, chemical composition and benefits to animals and plants. *Nectar: Production, Chemical Composition and Benefits to Animals and Plants*. New York: Nova Publishing, 1-41.
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., Moran, N.A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7378-7387.
- Proctor, M., Yeo, P., Lack, A. (1996). *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Portland, OR.

- Promnuan, Y., Takuji, K., Chantawannakul, P. (2009). Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 25, 1685-1689.
- Pucciarelli, A.B., Schapovaloff, M.E., Kummritz, S., Seňuk, I.A., Brumovsky, L.A., Dallagnol, A.M. (2014). Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Revista Argentina de Microbiología*, 46, 325-332.
- Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S., Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of palaeobotany and palynology*, 143,1-81.
- Quezada-Euán, J.J.G. (2018). Stingless bees of Mexico: the biology, management and conservation of an ancient heritage. New York: *Springer*, 294.
- Ramírez S.R., Nieh J.C., Quental T.B., Roubik D.W., Imperatriz-Fonseca V.L., Pierce N.E. (2010). A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol Phylogenet Evol*, 56, 519-525.
- Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E. (2007). Melissopalynological characterization of *Scaptotrigona mexicana* Guerin (Apidae: Meliponini) and *Apis mellifera* L. (Apidae: Apini). Honey samples in northern Puebla state, Mexico. *Journal of Kansas Entomological Society*, 80, 377-391.
- Ramírez-Arriaga, E., Navarro-Calvo, L.A., Díaz-Carbajal, E. (2011). Botanical characterisation of Mexican honeys from a subtropical region (Oaxaca) based on pollen analysis. *Grana*, 50, 40-54.
- Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Bernal, A., Ramírez Maldonado, N., Martínez-Hernández, E. (2016). Análisis palinológico de mieles y cargas de polen de *Apis mellifera* (Apidae) de la región Centro y Norte del estado de Guerrero, México. *Botanical Sciences*, 94, 141-156.
- Ramírez-Arriaga, E., Pacheco-Palomo, K.G., Moguel-Ordoñez, Y.B., Zepeda-García, M.R., Godínez-García, L.M. (2018). Angiosperm resources for stingless bees (Apidae, Meliponini): a pot-pollen melittopalynological study in the Gulf of Mexico. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik DW (eds) Pot-pollen in stingless bee melittology. Springer, Cham-Switzerland, pp. 111-130.

- Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E., Reyes-Salas, O., Sánchez-Dirzo, M.G., Castillo-Hernández, M.A. (2020). Contenido polínico y análisis fisicoquímico de mieles de *Scaptotrigona mexicana* (Meliponini, Apidae) colectadas en el municipio de Cuetzalan del Progreso, Puebla. In: Castillo-Hernández, M.A. (ed) Estudio transdisciplinario de meliponicultura en la región de Cuetzalan, Puebla: análisis tecnocientífico, etnoarqueológico y etnobiológico de la producción de miel virgen. Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Investigaciones Antropológicas-EcceHomO-Conacyt, CDMX, pp. 173-219.
- Ramos-Díaz, A., San Román-Ávila, Noriega-Trejo, R., Góngora-Chin, R., Sánchez-Contreras, A., Rodríguez-Buenfil, I. (2015). Catálogo de los principales tipos polínicos encontrados en las mieles producidas en la Península de Yucatán. Centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, Mérida-Yucatán.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol J Linn Soc*, 99, 206-232.
- Reyes, M.N.J., Rodríguez, V.G.M. (2005). Resultados preliminares del análisis polínico de una muestra de miel del apiario del centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias.
- Rosa, C.A., Lachance, M.A., Silva, J.O., Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Antonini, Y., Martins, R.P. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS yeast research*, 4, 271-275.
- Roubik, D.W. (1983). Nest and colony characteristics of stingless bees from Panama (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 56, 327-355.
- Roubik, D.W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 37, 124-143.
- Roubik, D.W., Moreno, P.J.E. (2018). The stingless honey bees (Apidae, Apinae: Meliponini) in Panama and pollination ecology from pollen analysis. In: Vit P, Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (eds) Pot-pollen in stingless bee melittology. *Springer*, New York, pp. 47-66.

- Roubik, D.W., Villanueva-Gutiérrez, R. (2009). Invasive Africanized honey bee impact on native solitary bees: a pollen resource and trap nest analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98, 152-160.
- Saluja, P., Prasad, G. (2008). *Gandida ruelliae* sp. nov., novel yeast species isolated from flowers of *Ruellia* sp. (Acanthaceae). *Yeast Research*. 8, 660-666.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Social. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5592435&fecha=29/04/2020#gsc.tab=0. (Acceso 25 julio 2024).
- Shannon, C.E., Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. *Urbana*, p. 96.
- Slaa, E.J., Sánchez, C.L.A., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37, 293-315.
- Smith, A.C., Hussey, M.A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology*.
- Sotelo-Santos, L.E., Asomoza, C.A. (2018). The Maya Universe in a Pollen Pot: native stingless bees in Pre-Columbian Maya art. In P. Vit, S.R.M. Pedro & D.W. Roubik (Eds.), *Pot-pollen in stingless bee melittology* (pp. 299-312). New York: Springer.
- Suphaphimol, N., Attasopa, K., Pakwan, C., Chantawannakul, P., Disayathanoowat, T. (2020). Cultured-dependent and cultured-independent study of bacteria associated with Thai commercial stingless bee *Lepidotrigona terminata*. *Journal of Apicultural Research*, 60, 341-348.
- Tamarit, D., Ellegaard, K.M., Wikander, J., Olofsson, T., Vázquez, A., Andersson, S.G. (2015). Functionally structured genomes in *Lactobacillus kunkeei* colonizing the honey crop and food products of honeybees and stingless bees. *Genome Biology and Evolution*, 7, 1455-1473.
- Tang, Q.H., Miao, C.H., Chen, Y.F., Dong, Z.X., Cao, Z., Liao, S.Q., Guo, J. (2021). The composition of bacteria in gut and beebread of stingless bees (Apidae: Meliponini) from tropics Yunnan, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 114, 1293-1305.

- Teixeira, A.C., Marini, M.M., Nicoli, J.R., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M.A., Rosa, C.A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 339-343.
- Tola, Y.H., Waweru, J.W., Ndungu, N.N., Nkoba, K., Slippers, B., Paredes, J.C. (2021). Loss and gain of gut bacterial phylotype symbionts in Afrotropical stingless bee species (Apidae: Meliponinae). *Microorganisms*, 9, 2420.
- Trejo-Torres, J.C. (2014). Vegetación y Paisaje del Puuc de Yucatán. Reporte final del proyecto "Difusión Ambiental en la Reserva Biocultural Estatal Puuc". Kaxil Kiuic A.C. and Programa de Pequeñas Donaciones-FMAM-México-PNUD, Mérida, 54.
- Vázquez, A., Olofsson, T.C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 48, 189-195.
- Velandia, M., Restrepo, S., Cubillos, P., Aponte, A., Silva, I. (2012). Catálogo fotográfico de especies de flora apícola en los departamentos de Cauca, Huila y Bolivar, Bogotá (Colombia): Instituto Humboldt, 84.
- Villanueva-Gutiérrez, R. (2002). Polliniferous plants and foraging strategies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 50, 1035-1044.
- Villanueva-Gutiérrez, R., Moguel-Ordóñez, Y.B., Echazarreta-González, C.M., Arana-López, G. (2009). Monofloral honeys in the Yucatan peninsula, Mexico. *Grana*, 48, 214-223.
- Villanueva-Gutiérrez, R., Roubik, D.W., Colli-Ucán, W., Tuz-Novelo, M. (2018). The value of plants for the Mayan stingless honey bee *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini): a pollen-based study in the Yucatan Peninsula, Mexico. In: Vit P, Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (eds) Pot-pollen in stingless bee melittology. *Springer*, New York, pp. 67-76.
- Villaseñor, J.L., Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 134-142.
- Von Der Ohe, W., Oddo, L., Piana, M., Morlot, M., Peter, M. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, 18-25.

- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 61, 708-718.
- Yoshiyama, M., Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102,91-96.
- Zheng, H., Powell, J.E., Steele, M.I., Dietrich, C., Moran, N.A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 4775-4780.
- Zralka, J. Koszkuł, W., Radnicka, K., Sotelo-Santos, L.E., Hermes, B. (2014). Excavations in Nakum structure 99: new data on protoclassic rituals and precolumbian Maya beekeeping. *Estudios de cultura Maya*, 44, 85-117.