



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DEL POLEN EN LA
MIEL PARA SU IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA MEDIANTE
METABARCODING.**

Tesis

QUE PRESENTA:

Biol. Andrea Lara Cecil Aldaco Figueroa

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Maestra en Ciencias Biológicas

Director de tesis

Dra. Yvonne Herrerías-Diego

Coasesor

Dr. Mauricio Quesada Avendaño

Febrero del 2023 Morelia, Michoacán.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por siempre apoyarme y darme todo lo que necesité, para llegar a donde estoy e inculcarme el valor de la educación.

A mis abuelos Alfonso y Cecilia porque siempre me motivaron a estudiar y por todo su apoyo.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por haberme aceptado en el posgrado y por permitirme seguir desarrollándome profesional y académicamente.

A CONACYT por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

A LANASE por permitirme realizar mi trabajo en el laboratorio y brindarme todo lo que necesité para desarrollarlo.

Al FONDO SECTORIAL CONACYT- SADER 291333 “Manejo sustentable de polinizadores: estatus actual, factores de riesgo y estrategias para el aprovechamiento de las abejas melíferas y silvestres en sistemas de agricultura protegida y en cultivos a campo abierto en México”; y a DGAPA-PAPIIT IV200418 “Análisis de los factores que amenazan a los polinizadores nativos e introducidos en México: vinculación de la docencia con la investigación en ecología genómica, conservación biológica y ecología del paisaje”.

A la Dra. Yvonne Herrerías Diego, mi asesora, por aceptarme como su alumna, por su conocimiento, asesoría y apoyo durante este tiempo.

Al Dr. Mauricio Quesada Avendaño, mi co-asesor, por permitirme realizar mi trabajo de maestría en su laboratorio, por estar pendiente de que siempre tuvieramos lo que necesitáramos y por su asesoría.

A mis sinodales el Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca por la retroalimentación que me brindó en cada tutorial y por la materia optativa que impartió y que tuve el gusto de tomar durante la maestría; al Dr. Arnulfo Blanco García y la Dra. Silvana Martén por su asesoría en cada tutorial.

Al M. en C. Franciso Balvino por su apoyo siempre que tuve dudas, la paciencia, el conocimiento compartido y por la introducción que me dio al tema.

A la M. en C. Violeta Patiño Conde, por su guía en la parte técnica, su paciencia, sus consejos y conocimiento compartido. Sin la cual habría estado perdida.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio en LANASE por su apoyo, y por hacer más amenas las horas de trabajo.

DEDICATORIA

Para mi extraordinaria madre Yolanda por su amor infinito, mi ejemplo a seguir, mi guía, mi pilar, mi todo. Por su apoyo incondicional en cada decisión sin importar lo absurda o tonta que parezca. Este logro no solo es mío, también de ella.

Para mi abuelo Alfonso, que siempre estuvo desde el primer día de kinder para recogerme a la hora de salida hasta la universidad cuando salía tarde de los laboratorios de Biología.

Para mi abuela Cecilia, que con el cariño del mundo me preparaba mi desayuno para llevarme a la escuela y me deseaba un buen día. Hubiera deseado que no se hubiera ido tan temprano, cuando comenzaba este nuevo capítulo, y me hubiera acompañado este día para ver su cara de orgullo y su sonrisa, como cada vez que terminaba un grado académico. Espero me este viendo desde el cielo.

Para mi prima Ana Victoria, por estar conmigo, abrazarme cuando lo necesité, por llorar conmigo, por no dejarme sola aún cuando tenía sus propias luchas, por siempre estar.

Para mi primo Memo por escucharme, apoyarme y siempre estar cuando lo necesito, aún cuando esta atravesando por situaciones difíciles, por confiar en mí y por hacerme reír con sus bromas.

Para mi prima Carolina, por iluminar mis tardes con sus sonrisas.

Para mi tío Guillermo por siempre estar presente y pendiente de mi.

Para mis amigos Karina, Ana, Diana, Adrián, Arturo, Sandra y Yoani. Fueron luz en mis momentos más oscuros especialmente los dos años pasados y que siempre voy a estar infinitamente agradecida de tenerlos en mi vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIA.....	4
ABSTRACT.....	9
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivo particular.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Muestreo en campo.....	20
Preparación de las muestras de miel.....	22
Extracción de ADN ambiental de mezclas de polen obtenidas de miel.....	24
Evaluación del ADN ambiental obtenido de muestras de miel.....	27

Construcción y secuenciación de bibliotecas metabarcoding de los marcadores ITS2 y trnL para la identificación del origen botánico de mieles	29
Proceso bioinformático para el análisis metabarcoding de las regiones ITS2 y trnL para la identificación del origen botánico de mieles	34
7. RESULTADOS.....	36
PARTE 1. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN AMBIENTAL DE MUESTRAS DE MIEL Y SU EVALUACIÓN.....	36
PARTE 2. APLICACIÓN DE METODO DE EXTRACCION Y ANALISIS DE METABARCODING PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN BOTÁNICO DE LA MIEL.	39
8. DISCUSIÓN	57
9. CONCLUSIONES	65
10. BIBLIOGRAFÍA.....	66

Figura 1. Mapa del estado de Guanajuato, México que muestra los sitios de colecta.	20
Figura 2. Gel de extracción que muestra el resultado de las extracciones de ADN con los tres protocolos.	37
Figura 3. Amplificación de los marcadores ITS2 U3P4 y trnL c-h.	38
Figura 4. Gráfica que muestra los porcentajes de abundancia por Familia de cada apiario para el gen ITS2	46

Figura 5. Gráfica que muestra los porcentajes de abundancia por Género de cada apiario para el gen ITS2.	47
Figura 6. Gráfica que muestra el origen botánico de la miel a nivel de Familia de cada apiario para el gen trnL.	55
Figura 7. Gráfica que muestra el origen botánico de la miel de cada apiario para el gen trnL a nivel de Género.....	56
Tabla 1. Tabla con la información de los apiarios visitados.....	21
Tabla 2. Secuencias del gen ITS2 U3P4 y trnL c-h.	30
Tabla 3. Reacción de amplificación de los marcadores ITS2 U3P4 Y trnL c-h y programas de PCR.....	31
Tabla 4. Reacción de indexación para Nextera.	33
Tabla 5. Comparación de pureza y cantidad de ADN por cada protocolo probado.	36
Tabla 6. Tabla con la identidad botánica de la miel de cada apiario a partir del marcador ITS2.	40
Tabla 7. Tabla que muestra el origen botánico de la miel de cada apiario a partir del marcador trnL.	49

ABSTRACT

In Mexico, beekeeping is one of the main activities of the agricultural sector due to the production of high quality honey, which is established through its different properties, product of the floral resources that bees use to produce it, which determine its botanical origin, therefore its importance in the economic, social and environmental sector. In recent years, honey has gained recognition, especially those that are labeled with their botanical identity, that is, with the plants that the bees used to produce it, which at the same time increases its monetary value.

The objective of this work was to develop a DNA extraction protocol from the pollen found in honey to identify the floral resources used by *Apis mellifera* to produce it, which gives honey its botanical origin. 46 honey samples were used, collected in 16 different apiaries in the state of Guanajuato, Mexico. From the extraction of DNA from pollen found in honey in conjunction with high-throughput sequencing and metabarcoding using two genetic markers, ITS2 U3P4 and trnL c-h, we generated genomic libraries, obtaining a total of 123 taxa for ITS2, which belong to 17 Orders, 24 Families, 46 Genera and 36 Species; and 100 for trnL which belong to 19 Orders, 24 Families, 36 Genera and 21 Species. The extraction protocol turned out to be effective, it was also observed that the ITS2 gene had superior results in terms of taxon identification, but together with trnL they proved to complement each other by expanding the taxonomic identification to know the floral resources used by bees for the production of honey.

RESUMEN

En México, la apicultura es una de las principales actividades del sector agropecuario debido a la producción de miel de alta calidad, la cual se establece a través de sus diferentes propiedades, producto de las especies vegetales con las que se produce o recursos florales que utiliza, las cuales determinan su origen botánico, por lo tanto es de importancia en el sector económico, social y ambiental. En los últimos años la miel ha adquirido un reconocimiento, sobre todo las que son etiquetadas con su identidad botánica, es decir con las plantas que las abejas utilizaron para producirla, lo que al mismo tiempo incrementa su valor monetario. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de extracción del ADN del polen que se encuentra en la miel para identificar los recursos florales que utiliza *Apis mellifera* para producirla, los cuales le otorgan su origen botánico a la miel. Se utilizaron 46 muestras de miel que fueron colectadas en 16 apiarios distintos del estado de Guanajuato, México. A partir de la extracción del ADN del polen que se encuentra en la miel en conjunto con la secuenciación de alto rendimiento y metabarcoding utilizando dos marcadores genéticos, ITS2 U3P4 y trnL c-h, generamos librerías genómicas, obteniendo un total de 123 taxas para ITS2, los cuales pertenecen a 17 Ordenes, 24 Familias, 46 Géneros y 36 Especies; y 100 para trnL de los cuales se identificaron 19 Ordenes, 24 Familias, 36 Géneros y 21 Especies. El protocolo de extracción resultó ser efectivo, además se observó que el gen ITS2 tuvo resultados superiores en cuanto a identificación de taxones, pero en conjunto con trnL demostraron complementarse ampliando la identificación

taxonómica para conocer los recursos florales que utilizan las abejas para la producción de la miel.

PALBRAS CLAVE: ITS2, trnL, origen botánico, recursos florales, melisopalinología.

1. INTRODUCCIÓN

Dado que polinizan la mayoría de las plantas cultivadas por el ser humano, así como muchas plantas silvestres, las abejas constituyen un grupo de especies con un importante papel en los ecosistemas naturales y manejados (Ortiz-Sánchez & Belda, 1994; Prosser & Hebert, 2017). Se estima que contribuyen con cerca del 35% de la producción global de al menos 800 plantas cultivadas (Nicholls & Altieri, 2013).

Apis mellifera es una abeja con un alto valor económico debido a la producción de miel y de otros derivados apícolas (Mostajeran et al., 2006). En México, la apicultura es una de las principales actividades del sector agropecuario debido a la producción de miel de alta calidad exportada principalmente a Estados Unidos y Europa (Froylán et al., 2018). La calidad de la miel se establece a través de sus diferentes propiedades organolépticas como el sabor, el color y su aroma, mismas que son producto de las especies vegetales o recursos florales con las que se produce la miel y las cuales determinan su origen botánico (Castillo Cázares et al., 2016). Por lo que, tiene gran impacto en el sector económico, social y ambiental (Froylán et al., 2018).

El análisis del polen que se encuentra en la miel nos permite establecer la proporción de especies silvestres y cultivadas utilizadas, así como el hábitat y el estado de conservación de la flora en el entorno en el que fue creada. Esta información nos ayuda a tomar decisiones que aumentarán el valor agregado de la miel como producto comercial (Alaniz-Gutierrez et al., 2017).

La composición del polen en la miel se ha determinado tradicionalmente

mediante microscopía (melisopalinología). Sin embargo, es común que esta técnica no permita la identificación de plantas más allá del nivel de género o familia, por lo que los estudios en diversidad de polen en la miel son muy limitados (Keller et al., 2015; Leontidou et al., 2018; Smart et al., 2017). Por lo tanto, el análisis de la composición polínica se ha realizado recientemente utilizando secuenciación de alto rendimiento mediante análisis de regiones específicas del ADN denominadas como "códigos de barras" o metabarcoding. Para mezclas biológicas complejas los datos pueden ser cuantitativos y cualitativos hasta el nivel de Especie o Género para determinados grupos taxonómicos de plantas. (Omelchenko et al., 2022; Hawkins et al., 2015; Bruni et al., 2014; Prosser & Hebert, 2017)

Actualmente se piensa que para identificar correctamente una especie de planta, se deben secuenciar varias regiones genómicas juntas. Las regiones del cloroplasto *rbcL* y *matK* fueron las primeras propuestas de códigos de barras para plantas terrestres y junto con la inclusión las regiones nucleares ITS, 18S y *psbA-trnH*, *trnL* del cloroplasto representan los códigos de barras más importantes para la determinación taxonómica de especies vegetales (Ferreira de Lima et al., 2018; Bruni et al., 2017).

Con el avance en la tecnología de secuenciación masiva, el estudio del origen botánico y geográfico de la miel es mucho más fácil ya que es rápido, preciso y confiable (Laha et al., 2017). Debido al interés ecológico, social y económico de *Apis mellifera* el objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo de extracción de ADN del polen que se encuentra en la miel para la identificación de los recursos florales que utiliza *Apis mellifera* para la producción de miel.

2. ANTECEDENTES

Actualmente se estima la existencia de más de 20,000 especies de Apoideos incluidas en 425 géneros y siete familias distribuidas en el mundo (Reyes-Novelo et al., 2009; Strange et al., 2008). A la fecha, se han descubierto alrededor de 26 subespecies y numerosos ecotipos de *A. mellifera*, descritos en función de su morfología, comportamiento y rasgos moleculares.

En las colonias de abejas melíferas, la búsqueda de alimento es realizada exclusivamente por las abejas recolectoras, estas colectan el néctar, polen, y agua, además de resinas de una gran diversidad de recursos vegetales (Wright et al., 2018). El néctar floral, compuesto principalmente por carbohidratos es su principal fuente de combustible para el vuelo, la termorregulación y la producción de cera (Wright et al., 2018; DeGrandi-Hoffman et al., 2018; Domínguez-Álvarez et al., 2009). Las abejas melíferas recolectan comida y luego la refinan de modo que esta sea diferente de cómo era originalmente. Las colonias de abejas europeas almacenan alimentos principalmente en forma de miel (néctar) y pan de abeja (polen).

Apis mellifera es considerada con valor económico debido a los productos apícolas que produce. La producción de miel es una de las características conductuales más complejas de las abejas ya que se ve afectada por distintos factores genéticos y ambientales (Mostajeran et al., 2006). La miel es un alimento natural mundialmente reconocido por su alto valor nutricional y por sus beneficios a

la salud humana (Hasam et al., 2020; Machado De-Melo et al., 2018). La calidad de la miel desde un punto de vista económico depende de la región geográfica, las condiciones climáticas (Chua et al., 2014; Ojeda de Rodríguez et al., 2004) y de la elección floral de la abeja (Hasam et al., 2020; Bolland, 2003).

Solo el 16% de la flora mundial sirve como fuente de alimento para las abejas melíferas, y solo el 1,6% es utilizada para producir la mayor parte de la miel que se consume a nivel mundial, lo que representa alrededor de 4000 especies diferentes de plantas melíferas (Cázares et al., 2016).

Aunque el contenido de polen en la miel es muy bajo (niveles traza), varía en función de la riqueza floral de cada zona y del aporte de néctar y polen de cada especie vegetal, por lo que algunas especies están infra o sobrerrepresentadas en el perfil palinológico. Comprender el origen botánico y geográfico de la miel producida por las abejas es de importancia ecológica y comercial.

Tradicionalmente se utiliza el análisis del polen para determinar su origen geográfico, ya que el polen refleja el tipo de vegetación de donde las abejas han recolectado el néctar (Guertler et al., 2014). Existen varios métodos disponibles para la determinación del origen botánico y geográfico de la miel. Estos consisten en la identificación del polen devuelto a la colmena por las abejas melíferas, ya sea directamente recolectando polen en la entrada de la colmena utilizando trampas de polen o examinando el polen que se encuentra mezclado en la miel (melisopalinología). La identificación del polen llevado a la colmena proporciona una medida directa del forrajeo de polen, mientras que el polen de la miel proporciona una visión general a largo plazo de las plantas que se utilizan tanto para coleccionar

néctar como para coleccionar polen. Estos métodos se utilizan habitualmente para identificar la composición botánica de la miel con el fin de comprobar su origen geográfico para mejorar la calidad y la trazabilidad de los alimentos (Hawkins et al., 2015). Sin embargo, es común que esta técnica no permita la identificación de plantas más allá del nivel de género o familia, por lo que los estudios en diversidad de polen son muy limitados (Keller et al., 2015; Leontidou et al., 2018; Smart et al., 2017). Además, la identificación morfológica del polen requiere una habilidad y experiencia considerables ya que algunos tipos polínicos pueden ser particularmente difíciles de distinguir (Hawkins et al., 2015; Richardson et al., 2015).

Las técnicas basadas en el ADN han ganado importancia como resultado de los avances en la genética molecular, que ahora permiten la detección de cantidades diminutas de ADN, ya que con frecuencia estas técnicas son más rápidas, más precisas y más confiables. (Guertler et al., 2014). Incluso aún cuando la presencia de pared celular vegetal, así como la presencia de sustancias como taninos, fenoles y polisacáridos complejos presentan desafíos únicos para la extracción de ADN de las plantas ya que pueden afectar la calidad del ADN e inhibir reacciones posteriores (Jain et al., 2013). Un primer acercamiento para detectar la presencia de ADN de polen o especies de plantas predefinidas, fue la aplicación de qPCR dirigida. Entre otros métodos, se han utilizado plataformas Sanger para determinar el orden de los nucleótidos en los códigos de barras de ADN de cloroplastos o regiones de genes nucleares para discriminar las especies vegetales del polen contenido en la miel (Utzeri et al., 2018).

Este enfoque de secuencia dirigida, ha sido ampliado utilizando secuenciación de alto rendimiento para acelerar la producción de secuencias de datos que se analizan utilizando canales bioinformáticos diseñados específicamente. Además del análisis de miel, los códigos de barra de ADN de plantas se han utilizado para la identificación de especies de polen, clasificación de plantas, estudios ecológicos y análisis forenses. Estas regiones incluyen genes nucleares (18s rDNA y espaciadores transcritos internos ribosomales ITS1 e ITS2) y genes de plástidos o regiones intergénicas de plástidos (matK, rbcL, trnH-psbA y trnL, accD, ndhJ, rpoB, rpoC1, ycf5, atpF-H, psbK-I, rbcLa, trnL-F, etc).

Todas las regiones de ADN de cloroplasto o de genes nucleares tienen ventajas y desventajas, incluida la capacidad discriminatoria entre diferentes familias o especies, tasas de éxito de amplificación y secuenciación y disponibilidad de conjuntos de secuencias de referencia para el análisis de datos (Utzeri et al., 2018; Omelchenko et al., 2022; Kishor et al., 2018).

Las regiones del genoma del cloroplasto rbcL, matK, trnL, trnH-psbA e ITS2 nuclear se utilizan con mayor frecuencia como códigos de barras de ADN vegetal (Yao et al., 2010, Omelchenko et al., 2022). Algunos de estos códigos de barras se han utilizado con éxito variable para estudios con “metabarcoding” para polen. Sin embargo, solo se ha evaluado la consistencia cualitativa y cuantitativa en estudios de metabarcoding de las regiones rbcL, matK, ITS2 y trnL, mediante la comparación con métodos tradicionales de microscopia. En particular, un estudio exhaustivo de ITS2 y rbcL ha demostrado la utilidad del metabarcoding de polen para la

construcción de redes de polinizadores y el análisis cualitativo de mezclas de polen (Omelchenko et al., 2022).

Como uno de los marcadores más importantes en estudios de evolución y sistemática molecular, la región ITS2 muestra una variabilidad de secuencia significativa a nivel de especie o inferior. La disponibilidad de su información estructural permite el análisis a un nivel taxonómico superior, lo que proporciona información adicional para mejorar la precisión y la solidez en la reconstrucción de árboles filogenéticos. La región ITS2 se considera uno de los códigos de barras de ADN candidatos debido a sus valiosas características, incluida la disponibilidad de regiones conservadas para diseñar cebadores universales, la facilidad de su amplificación y la suficiente variabilidad para distinguir incluso especies estrechamente relacionadas (Yao et al., 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia ecológica y económica de *A. mellifera* en México y de los recursos que produce, es importante determinar el origen botánico de la miel que produce.

4. HIPÓTESIS

Mediante la extracción de ADN del polen en la miel y su amplificación en regiones específicas del gen ITS2 U3P4 y trnL c-h podremos identificar los recursos florales utilizados por *Apis mellifera* para la producción de miel.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo de extracción eficiente de ADN del polen que se encuentra en la miel que nos permita identificar los recursos florales utilizados por *A. mellifera* para producirla.

5.2. Objetivo particular

- Elaborar librerías genómicas que nos permitan determinar los recursos florales con los cuales se produce la miel mediante metabarcoding de ADN utilizando las regiones genéticas ITS2 U3P4 y trnL c-h.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo en campo

Durante el mes de noviembre del año 2021, correspondiente a la época seca, 48 muestras de miel fueron colectados en 16 apiarios localizados en los municipios de Apaseo el Alto, Acámbaro, Yuriria, Tarimoro, Jerécuaro, San Luis de la Paz, San Diego de la Unión y Celaya, en el estado de Guanajuato, México (Figura 1). En la Tabla 1, se enlistan los nombre de los apiarios, sus coordenadas geográficas y la clave de identificación.



Figura 1. Mapa del estado de Guanajuato, México que muestra los sitios de colecta.

En cada apiario se muestrearon tres colmenas y de cada cada colmena se tomó un fragmento de 20 x 10 cm del bastidor con miel operculada, sumando un total de 48 muestras de miel o tres muestras por cada uno de los 16 apiarios. Cada fragmento fue puesto en una bolsa ziploc claramente etiquetada, y las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta su almacenamiento en condiciones de refrigeración en el Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica (LANASE-UNAM).

Tabla 1. Tabla con la información de los apiarios visitados.

Estado	Apiario	Identificación de colmena	Latitud	Longitud
Guanajuato	La puertita	15-1 15-2 15-3	20.054514	-101.3333
	San Luis de la Paz 1*	2-1 2-2	21.260117	-100.77005
	El maguey	G214 G215 G216	20.109171	-100.69574
	Palo Alto	12-1 12-2 12-3	20.365223	-100.60474
	La estanzuela	G220 G221 G222	20.175981	-100.49818
	El jaral	G217 G218 G219	20.109803	-100.71896
	San Luis de los Agustinos	13-1 13-3 13-2	20.183708	-100.68807
	Ojo de agua de la trinidad	11-1 11-2 11-3	20.387854	-100.636406
	Mesa de capula	10-1 10-2 10-3	20.409063	-100.581100
	Las mesas*	16-1 16-2	20.065132	-101.334444

	El sarampión	G223 G224 G225	20.181910	-100.539980
	La parcela	7-1 7-2 7-3	21.427391	-100.804267
	La trinidad	9-1 9-2 9-3	21.341024	-100.915840
	Las del bordo	3-1 3-2 3-3	21.222812	-100.646156
	Teneria	5-1 5-2 5-3	20.598602	-100.791021
	Los mogotes	14-1 14-2 14-3	20.133898	-101.333191

*En estos apiarios se perdieron muestras en el transcurso de la recolección a su almacenamiento en LANASE.

Preparación de las muestras de miel

Antes de iniciar propiamente el protocolo de extracción de ADN, todas las muestras de miel fueron procesadas de acuerdo con Soares et al. (2015), con algunas modificaciones, con el propósito de recuperar los granos de polen contenidos en la miel, utilizados para determinar el origen botánico, y eliminar la mayor cantidad de azúcares. Cada una de las 46 muestras de miel fue procesada como se describe a continuación:

1. De cada muestra se obtuvieron 15 ml de miel líquida que se repartieron equitativamente en tres tubos tipo falcon de 50 ml, y a cada tubo se agregaron 40 ml de agua destilada para completar un volumen final de 45ml.
2. Los tres tubos, por muestra, fueron puestos en baño María durante 10 minutos a una temperatura de 40°C, para después homogeneizar el

contenido manualmente y centrifugar por 10 minutos a 11,000 revoluciones por minuto (rpm).

3. Todo el sobrenadante fue desechado por completo, incluyendo los restos de cera, sin tocar el pellet adherido al fondo o en las paredes del tubo.
4. El pellet de cada tubo se resuspendió con 5 ml de agua destilada, y los triplicados de una misma muestra fueron mezclados en un solo tubo. Posteriormente, se agregaron 30 ml de agua destilada a dicho tubo y el contenido se homogeneizó manualmente.
5. Cada tubo se centrifugó por 10 minutos a 11,000 rpm, y se desechó el sobrenadante
6. El nuevo pellet se resuspendió en 2 ml de agua destilada, y este volumen se repartió equitativamente en dos tubos tipo falcon de 2 ml.
7. A cada tubo de 2 ml, dos por muestra, se agregó 58.7 mg de mezcla de perlas de borosilicato, previamente esterilizadas, de las siguientes medidas: 106 micras (30%), 150 a 212 micras (50%), 212 a 300 micras (10%) y 425 a 600 micras (10%).
8. Estos tubos fueron puestos en el vortex durante 2 minutos, y después se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 minutos.
9. El sobrenadante fue desechado y el pellet se deshidrató en un vacofuga usando una temperatura de 30°C y un tiempo entre 40 a 60 minutos dependiendo de la muestra. Este pellet fue utilizado para realizar la extracción de ADN con el objetivo de conocer el origen botánico de las 48 muestras de miel (3 por cada uno de los 16 apiarios).

Extracción de ADN ambiental de mezclas de polen obtenidas de miel

Para elegir un protocolo de extracción de ADN, se probaron dos kits comerciales, DNeasy Plant Mini Kit (Mca. Qiagen) y Wizard Genomic DNA Purification Kit (Mca. Promega), y uno basado en el protocolo publicado por Lalhmangaihi et al. (2014) al que le realizamos una serie de modificaciones (por lo que nos estaremos refiriendo a este protocolo como “protocolo modificado”), para una misma muestra de miel. Los dos primeros se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, sin modificación alguna, y el tercero como se describe más adelante. Estos primeros resultados mostraron que el protocolo modificado de Lalhmangaihi et al. (2014) fue notablemente eficiente en comparación a las extracciones obtenidas por cualquiera de los dos kits comerciales.

A continuación se describe detalladamente el protocolo de extracción modificado y utilizado para la extracción de ADN del polen contenido en la miel.

Materiales de laboratorio

Reactivos

Buffers de extracción: Buffer SDS (50 mM Tris-HCl, 150 mM EDTA, 150 mM NaCl, SDS 2%, pH 7.5) y Buffer CTAB (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, CTAB 3%, 2% PVP, pH8.0).

Proteinasa K (Qiagen)

DTT 110mM

Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1)

Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1)

Acetato de Sodio 3 mM

Isopropanol

Etanol al 70%

Agua ultrapura

Equipo

Tubos falcon de 50 ml y 2 ml

Tubos de 1.5 ml

Centrífuga para tubos falcon de 50 ml

Centrífuga para tubos de 1.5 ml

Fluorometro

Bioespectometro

Vacuofuga

Vortex

Protocolo

Lisis celular y nuclear

1. Al pellet de polen, obtenido tras la preparación de la muestra, se agregaron 300 μ L de Buffer SDS, 10 μ L de Proteinasa K y 100 μ L de DTT.
2. La mezcla anterior se homogeneizó en el vortex por unos segundos, y se incubó a 37°C en un baño seco durante 1 hr, sin agitación.
3. Transcurrida la primera hora de incubación, se agregaron 300 μ L de Buffer CTAB, otros 10 μ L de proteinasa K y 100 μ L de DTT.
4. La nueva mezcla se homogeneizó en el vortex por unos segundos y se incubó a 56°C por 1 hr, sin agitación.

5. Transcurrida la segunda hora de incubación, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió el volumen del sobrenadante.

Extracción de proteínas y otros biomoléculas

6. El sobrenadante se mezcló con un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1), la cual se homogeneizó en el vortex por unos segundos hasta que adquirió una apariencia lechosa.
7. La nueva mezcla se centrifugó, a 10,000 rpm durante 10 minutos, para separar la fase acuosa (superior) de la fase orgánica (inferior).
8. La fase acuosa se recuperó, con ayuda de una micropipeta con capacidad de 20 - 200 uL, en un tubo de 1.5 ml esteril, previamente etiquetado, sin tocar la fase orgánica, y se volvió a medir su volumen.
9. La fase acuosa recuperada ahora se mezcló con un volumen igual de Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1), la cual se homogeneizó en el vortex por unos segundos.
10. La nueva mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, para separar las fases una vez más.
11. La fase acuosa se recuperó, nuevamente con ayuda de una micropipeta, en un tubo de 1.5 ml esteril, previamente etiquetado, sin tocar la fase orgánica.

Precipitación y limpieza del ADN de las mezclas de polen

12. Por tercera vez se midió el volumen de la fase acuosa recuperada y se agregó a esta un volumen correspondiente al 10% de acetato de Sodio 3 mM.

13. A la mezcla anterior se agregó un volumen igual de Isopropanol, se mezcló por inversión repetida del tubo y se incubó a -20°C durante toda la noche (aproximadamente 12 hrs).
14. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se retiró con ayuda de una micropipeta sin tocar el precipitado o pellet formado al fondo del tubo.
15. El precipitado se lavó con 400 µL de Etanol al 70%, mezclando lentamente por inversión.
16. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta cuidando de no tocar el precipitado.
17. Para secar el precipitado, el tubo con el pellet se colocó en una vacofuga entre 20 a 40 minutos manteniendo una temperatura de 30°C.
18. Para rehidratar el pellet se agregaron 50 µL de agua ultrapura y se colocó en el vortex hasta que se disolvió completamente.
19. Las muestras fueron evaluadas y almacenadas a - 20 C hasta su uso para la construcción de bibliotecas.

Evaluación del ADN ambiental obtenido de muestras de miel

Para evaluar el ADN extraído por el protocolo antes descrito se realizaron las siguientes pruebas. En primer lugar, se estimó la concentración de las soluciones de ADN por fluorimetría y, en segundo lugar, se evaluó la pureza de estas soluciones por espectrofotometría. La concentración (ng/ uL) se midió en un fluorómetro modelo Quantus (Mca. Promega) y se utilizó un método de tinción

específico para ADN de doble cadena. La pureza fue medida en un espectrofotómetro modelo BioSpectrometer (Mca. Eppendorf), usando el programa rutinario para ADN y la microcubeta. Este programa evalúa las proporciones de absorbancia en 260/280 para la relación ADN y proteínas presentes en la solución, y en 260/230 para la relación ADN y otros contaminantes que absorben en 230 nm como sales caotrópicas, fenoles, terpenos, carbohidratos, etc. Los valores esperados son de 1.8 - 2 para la primera proporción, y de 1.8 - 2.2 para la segunda. Por último, las muestras fueron reveladas con SYBR Safe (Mca, Thermo) en un gel de agarosa al 1% con el objetivo de evaluar visualmente la integridad y grado de degradación, si lo presentaban, de las muestras respecto al control Lambda DNA/HindIII, que tiene un fragmento de aproximadamente 23 000 pares de bases (pb). Este gel corrió durante 30 minutos a 90 Voltios en una cámara de electroforesis modelo EasyCast (Mca. Thermo Scientific).

Para finalizar con la evaluación de los tres diferentes protocolos de extracción de ADN, se procedió a la amplificación de los marcadores ITS2 y el extremo 5' del intron (UAA) de trnL para todas las muestras obtenidas de ADN, una para cada protocolo comercial y dos réplicas para el protocolo modificado de Lalmangaihi et al. (2014). Los detalles para realizar este procedimiento son descritos en la siguiente sección y corresponden exclusivamente al paso de amplificación del marcador específico.

Construcción y secuenciación de bibliotecas metabarcoding de los marcadores ITS2 y trnL para la identificación del origen botánico de mieles

Continuando con los objetivos propuestos, un total de 33 muestras de ADN ambiental (mezcla de polen recuperado de las mieles) para ITS2 y 40 para trnL, obtenidas por el protocolo de Lalmangaihi et al. (2014), fueron empleadas para la construcción y secuenciación de dos marcadores, ITS2 y trnL, ampliamente utilizados en el estudio de metabarcoding para la identificación de plantas por secuenciación masiva. La construcción de ambos tipos de bibliotecas fue realizada como una adaptación del protocolo para el marcador 16S, empleado para la identificación de bacterias, publicado por la compañía Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Ref. 15044223).

Construcción y multiplexación de bibliotecas. Las bibliotecas de cada marcador se procesaron por separado utilizando los primers U3 y P4 propuestos por Cheng et al. (2016) para el marcador ITS2, y los primers *c* y *h* propuestos por Taberlet et al. (2007) para el marcador trnL (Tabla 2). Estos primers fueron sintetizados, respectivamente, junto con los adaptadores “overhang” forward (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG) y reverse (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG) para los índices Nextera XT de Illumina (ver Illumina Adapter Sequences Document # 1000000002694 v16).

Tabla 2. Secuencias del gen ITS2 U3P4 y trnL c-h.

Nombre	Secuencia 5' > 3'
Forward ITS2-U3	CA[AT]CGATGAAGAACG[CT]AGC
Reverse ITS2-P4	CCGCTTA[GT]TGATATGCTTAAA
Forward trnL c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
Reverse trnL h	CCATTGAGTCTCTGCACCTATC

En términos generales, la construcción de las bibliotecas se realizó por medio de dos reacciones en cadena de la polimerasa para (1) amplificación del marcador de interés (de aquí en adelante nombrada como PCR-1) y (2) para indexar (adicionar índices o 'barcodes') las bibliotecas obtenidas de la primera reacción (de aquí en adelante nombrada como PCR-1). Todas las reacciones fueron preparadas en un Gabinete de PCR (Mca. Esco) y todos los consumibles estaban certificados para uso en "biología molecular" (tubos de 0.2 ml, puntas con filtro de diferentes capacidades volumétricas).

Amplificación del marcador específico o PCR-1. Las primeras reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante para el Multiplex PCR kit (Qiagen), ajustando a 35 µL el volumen total, utilizando entre 15 y 20 ng totales de ADN ambiental, y el par de primers correspondiente a un marcador particular. Todas las reacciones fueron puestas en un termociclador modelo Nexus (Mca. Eppendorf), las condiciones específicas de las reacciones para cada marcador y del programa de PCR están indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Reacción de amplificación de los marcadores ITS2 U3P4 Y trnL c-h y programas de PCR.

Reactivos concentración inicial	Volumen	Concentración final
2x QIAGEN Master Mix Multiplex PCR	17.5 µL	1x
Primer forward ITS2-U3 2 uM o Primer forward trnL c 2 uM	1.25 µL	0.2 uM
Primer reverse ITS2-P4 2 uM o Primer reverse trnL h 2 uM	1.25 µL	0.2 uM
ADN ambiental	según concentración inicial	15-20 ng
Agua ultrapura	aforar a 35 µL	
Programa PCR-1 para ITS2	Programa PCR-1 para trnL	
3 minutos a 94° C	4 minutos a 94° C	Desnaturalización inicial
40	35	Ciclos de amplificación
40 segundos a 95° C	40 segundos a 95° C	Desnaturalización
40 segundos a 50° C	40 segundos a 50° C	Alineamiento de primers
1 minuto a 72°C	4 segundos a 72° C	Polimerización
7 minutos a 72° C	5 minutos a 72° C	Polimerización final

Las amplificaciones esperadas fueron corroboradas por electroforesis capilar en el equipo Qiaxcel Advanced (Mca. QIAGEN). Para ello, se preparan tiras de 12 muestras de acuerdo con las especificaciones del fabricante y agregando 3 µL de las reacciones de amplificación. El tamaño de los fragmentos para ambos genes fue estimado utilizando el cartucho Qiaxcel DNA Screening (Mca. Qiagen), la escalera QX Size Marker 50 bp - 800 bp v 2.0 (Mca. QIAGEN) y el perfil default para ambos productos.

Purificación de amplificaciones de PCR-1 por perlas magnéticas. Una vez que se corroboró la amplificación de todas las muestras, 30 µL de las reacciones fueron purificadas utilizando perlas magnéticas Pronex (Mca. Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para purificar las amplificaciones de ITS2, con un rango de tamaño entre 468 y 475 pb, se utilizó una proporción de 1.3X; y para el fragmento amplificado de trnL, con un rango de tamaño de 241-300 pb, fue de 1.4X. Tras su purificación, todas las muestras fueron cuantificadas en Qubit usando el kit 1X dsDNA HS para conocer la concentración (ng/µL) antes de proceder a la segunda amplificación.

Indexación de las bibliotecas o PCR-2. Estas segundas amplificaciones se realizaron con el propósito de indexar o marcar molecularmente cada biblioteca y hacer posible su multiplexación antes de su secuenciación masiva. Para ello se eligieron 33 combinaciones de los índices comerciales Nextera XT para las bibliotecas de ITS2, y 40 para las bibliotecas de trnL.

Las segundas reacciones se realizaron de la misma manera para todas las bibliotecas y siguiendo las instrucciones del fabricante para el Hotstart Master kit (Qiagen). El volumen total se ajustó a 35 µL, se utilizaron entre 15 y 20 ng totales de la primera amplificación, y una combinación única de los índices para cada biblioteca. Todas las reacciones fueron puestas en un termociclador modelo Nexus (Mca. Eppendorf), las condiciones específicas de estas reacciones y del programa de PCR están indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacción de indexación para Nextera.

Reactivos concentración inicial	Volumen	Concentración final	Programa PCR-1 para ITS2	
2x Hotstart Master Mix	17.5 µL	1x	3 minutos a 95° C	Desnaturalización inicial
Índice i5	1.25 µL		8	Ciclos de indexación
Índice i7	1.25 µL		30 segundos a 95° C	Desnaturalización
Amplificación PCR-1	según concentración inicial	15-20 ng	30 segundos a 55° C	Alineamiento de primers
Agua ultrapura	aforar a 35 µL		30 minutos a 72° C	Polimerización
			5 minutos a 72° C	Polimerización final

La indexación de las bibliotecas fue corroborada, nuevamente, por electroforesis capilar en el equipo Qiaxcel Advanced, usando el cartucho Qiaxcel DNA High Resolution, la escalera QX Size Marker 50 bp - 800 bp v 2.0 (Mca. QIAGEN) y una biblioteca no indexada como control para verificar el aumento de tamaño. Tras verificar la indexación de todas las bibliotecas, ambos grupos de bibliotecas indexadas fueron purificadas nuevamente por perlas magnéticas Pronex (Mca. Promega) siguiendo los mismos pasos que en la primera purificación. Así mismo, estas bibliotecas fueron cuantificadas nuevamente en Qubit y utilizando el mismo kit.

Multiplexación o formación del pool de secuenciación. Con las bibliotecas indexadas, purificadas y cuantificadas se calculó la molaridad de cada una y se procedió a su normalización y multiplexación como lo indica el protocolo para la preparación de 16s de Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Ref. 15044223). Un pool a 4 nM fue preparado para cada grupo de bibliotecas, uno

para aquellas de ITS2 y otro para trnL. Ambos pools fueron secuenciados en un equipo MiSeq (instalado en el INMEGEN), utilizando una placa de 2 x 250 para las bibliotecas de ITS2 y una de 2 x 150 para trnL.

Proceso bioinformático para el análisis metabarcoding de las regiones ITS2 y trnL para la identificación del origen botánico de mieles

Tras la secuenciación de cada placa (una para cada gen), las bibliotecas indexadas fueron demultiplexadas automáticamente en BaseSpace de Illumina (<https://basespace.illumina.com/>). Por cada biblioteca indexada se obtuvieron dos archivos tipo fastq.gz: R1 y R2 que contienen las secuencias forward o reverse, respectivamente, sus calidades y el número de lecturas obtenidas; los cuales fueron almacenados en el Cluster de supercómputo del LANASE para su posterior análisis en QIIME 2 (Boylen et al., 2019). El análisis de cada marcador, ITS2 y trnL, se realizó independientemente y consistió de cuatro grandes fases: 1) preparación de los datos y análisis de la calidad, 2) control de calidad de las secuencias y clustering, 3) análisis taxonómico y, 4) análisis de diversidad y origen botánico. En términos generales, la primera fase se realizó de la misma manera para ambos marcadores pero los parámetros empleados para cada marcador son especificados en las dos últimas fases.

Preparación de los datos y análisis de la calidad. Para conocer la calidad de las lecturas de todas y determinar los valores requeridos para el procedimiento de control de calidad se siguieron estos pasos: a) todos archivos *fastq.gz* de un mismo marcador, tanto R1 como R2, fueron importados a un archivo *.qza* usando el

comando *import*; b) este nuevo archivo se analizó estadísticamente y sus resultados se visualizaron usando el comando *summarize*; c) el archivo .qzv producido en el paso anterior se visualizó en QIIME 2 view (<https://view.qiime2.org/>).

Control de calidad de las secuencias y clustering. El filtrado y limpieza de las secuencias se realizó con DADA2 usando el comando *denoised_paired* y especificando y asumiendo por default 97% de similitud para la clusterización.

Análisis taxonómico para ITS2. En primer lugar, la base de datos All eucariota de ITS2 fue obtenida desde UNITE (<https://doi.org/10.15156/BIO/2483916>) y un clasificador fue entrenado con este utilizando el comando *feature-classifier* con el método *fit-classifier-naive-bayes*. Posteriormente, las secuencias representativas obtenidas en el paso anterior fueron clasificadas utilizando el comando *feature-classifier classify-sklearn* y clasificador entrenado. Los resultados obtenidos fueron tabulados y graficados usando los comandos *metadata tabulate* y *taxa barplot*.

Análisis taxonómico para trnL. En primer lugar, se construyó una base de datos con todas aquellas secuencias de trnL encontradas en el NCBI y que corresponden a especies nativas de México, la cual se encuentra disponible en el Repositorio del LANASE. Posteriormente, un clasificador fue entrenado con esta base utilizando el comando *feature-classifier* y el método *fit-classifier-naive-bayes*. Finalmente, las secuencias representativas obtenidas en el paso anterior fueron clasificadas utilizando el comando *feature-classifier classify-sklearn* y clasificador entrenado. Los resultados obtenidos fueron tabulados y graficados usando los comandos *metadata tabulate* y *taxa barplot*.

7. RESULTADOS

PARTE 1. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN AMBIENTAL DE MUESTRAS DE MIEL Y SU EVALUACIÓN

En esta primera parte se muestran los resultados en cuanto a la selección del protocolo de extracción de ADN, aquí se presentan las imágenes y datos de concentración obtenidos por los diferentes protocolos DNeasy Plant Mini Kit, Wizard Genomic DNA Purification Kit y el protocolo publicado por Lalhmangaihi et al. (2014).

En primer lugar, la extracción de ADN obtenida por el protocolo modificado de Lalhmangaihi et al. (2014) presenta una concentración 10 veces mayor que aquella obtenida por el protocolo de Wizard Genomic DNA Purification Kit, mientras que los valores de pureza son sustancialmente mejores que aquellos obtenidos para este último protocolo (ver Tabla 5). Por su parte, la extracción de ADN por el protocolo de DNeasy Plant Mini Kit no fue exitosa y los valores obtenidos no cumplen ni con los mínimos requeridos.

Tabla 5. Comparación de pureza y cantidad de ADN por cada protocolo probado.

Protocolo	Wizard Genomic DNA Purification Kit (Mca. Promega)	DNeasy Plant Mini Kit (Mca. Qiagen)	Modificado de Lalhmangaihi et al., (2014)
Concentración ng/ μ L	6.1	0.011	67
260/280	1.89	-0.89	2.05
260/230	1.68	-0.81	1.93

En la Figura 2 se observa claramente una banda de ADN de alto peso molecular, aproximadamente con 23,000 pb en comparación con el marcador Lambda DNA/HindIII (Mca. Promega) en ambas réplicas del protocolo modificado de Lalhmangaihj et al. (2014), así como un barrido acompañante. Mientras que las muestras obtenidas por los protocolos comerciales no revelan ninguna banda o barrido.

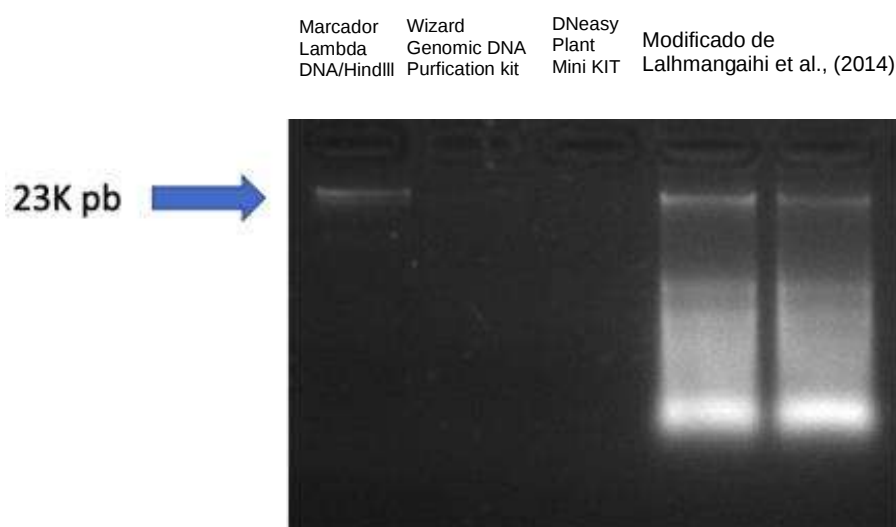


Figura 2. Gel de extracción que muestra el resultado de las extracciones de ADN con los tres protocolos.

En lo que se refiere a la amplificación de los marcadores ITS2 y trnL (extremo 5') como parte de la evaluación de los protocolos de extracción, la Figura 3 muestra que este procedimiento fue exitoso para ambas regiones, trnL (del carril A01 al A06) e ITS2 (del carril A07 al A12), para las extracciones del protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit y aquellas del protocolo modificado de Lalhmangaihj et al. (2014). En tanto que las amplificaciones hechas a partir del ADN extraído por el protocolo de DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). En el carril A01 perteneciente a la

muestra tratada con Qiagen se observa que no hubo una amplificación para el gen *trnI* al igual que para el gen ITS2 en el carril A07. En el carril A03 se encuentra la muestra tratada con Promega que amplifico para el gen *trnL* y para el gen ITS2 en el carril A09; y en los carriles A04 y A05 se encuentran las muestras tratadas con el protocolo modificado de Lalhmangaihi et al. (2014), para el gen *trnL* y en los carriles A10 y A11 para el gen ITS2, donde se puede observar que amplificó para ambos genes.

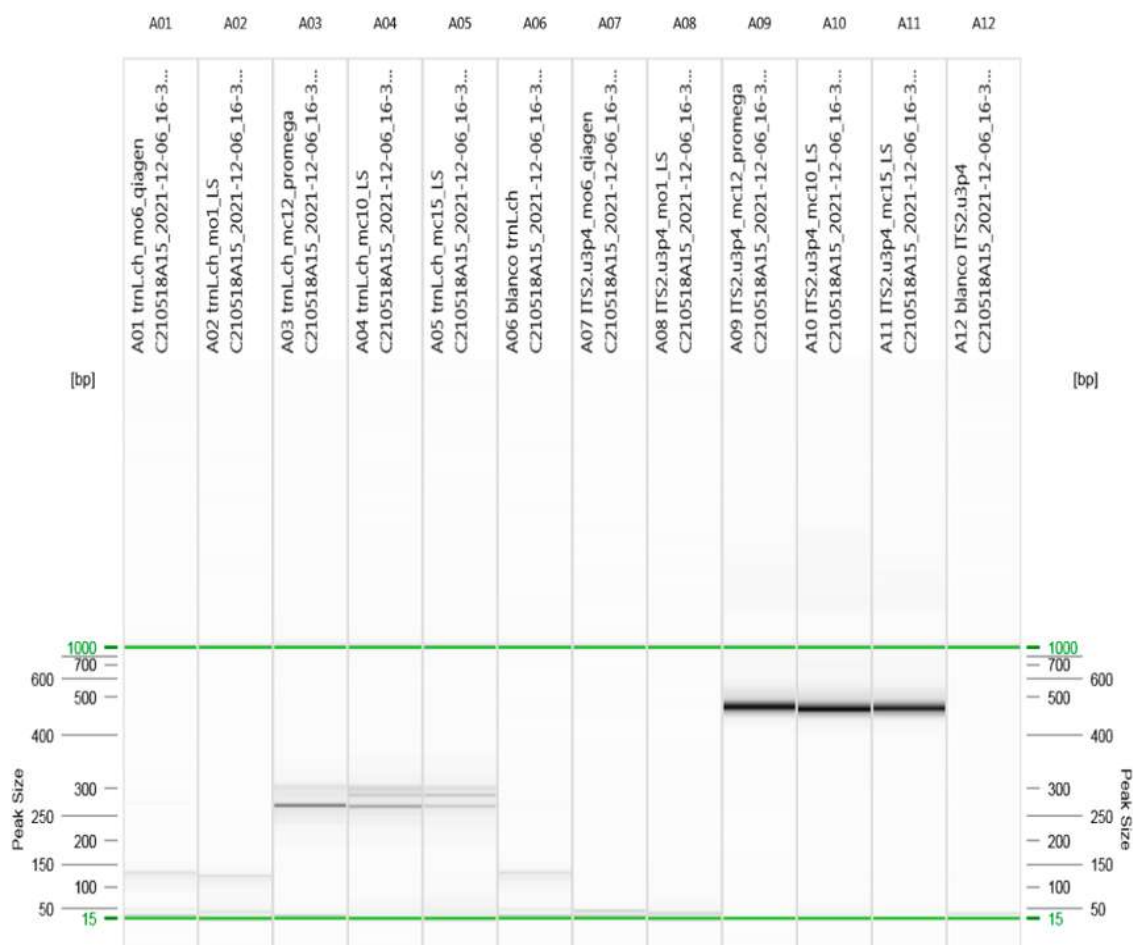


Figura 3. Amplificación de los marcadores ITS2 U3P4 y *trnL* c-h.

PARTE 2. APLICACIÓN DE METODO DE EXTRACCION Y ANALISIS DE METABARCODING PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN BOTÁNICO DE LA MIEL.

En esta parte se muestran los resultados de la aplicación del método de extracción, construcción y secuenciación de las bibliotecas analizadas con metabarcoding de los marcadores ITS2 y trnL para la identificación del origen botánico de las mieles pertenecientes a los 16 apiarios del estado de Guanajuato, México.

Para el gen ITS2 solo se utilizaron 13 apiarios ya que un apiario no amplificaron las muestras para este gen en la reacción de PCR y de dos apiarios no regresaron secuencias.

Para el gen ITS2 se obtuvieron un total de 873, 991 lecturas o reads pertenecientes a plantas de las cuales 400,811 no fueron identificadas, mientras 473, 180 que si lo fueron; solo se tomaron en cuenta los taxa que tuvieran al menos 100 reads o lecturas de respaldo.

De acuerdo con los resultados, se identificaron en las muestras, polen proveniente de 17 Ordenes: Asterales, Malvales, Brassicales, Myrtales, Sapindales, Asparagales, Rosales, Fabales, Santalales, Malpighiales, Lamiales, Poales, Cucurbitales, Caryophyllales, Gentianales, Ranunculales y Solanales. También se identificaron 24 Familias: Asteraceae, Malvaceae, Myrtaceae, Brassicaceae, Rutaceae, Asparagaceae, Resedaceae, Anacardiaceae, Fabaceae, Loranthaceae, Rhamnaceae, Tropaeolaceae, Lamiaceae, Rosaceae, Euphorbiaceae, Poaceae, Cucurbitaceae, Salicaceae, Tamaricaceae, Rubiaceae, Oleaceae, Verbenaceae, Ranunculaceae y Moraceae (Tabla 6).

También se identificaron 46 Géneros: *Simsia*, *Triumfetta*, *Eucalyptus*, *Bidens*, *Brassica*, *Asparagus*, *Reseda*, *Raphanus*, *Cosmos*, *Schinus*, *Psittacanthus*, *Viguiera*, *Pseudoziziphus*, *Medicago*, *Parthenium*, *Tropaeolum*, *Salvia*, *Fragaria*, *Sicyos*, *Baccharis*, *Salix*, *Stevia*, *Eruca*, *Sonchus*, *Verbesina*, *Tamarix*, *Marina*, *Richardia*, *Hilaria*, *Sida*, *Fraxinus*, *Melinis*, *Heterosperma*, *Melampodium*, *Aloysia*, *Ageratina*, *Tagetes*, *Clematis*, *Cucurbita*, *Koanophyllon*, *Helianthus*, *Euphorbia*, *Sechium*, *Brickellia*, *Ligustrum* y *Malva* (Tabla 6).

Mientras que a nivel específico se identificaron 36 especies: *Bidens aurea*, *Brassica carinata*, *Reseda luteola*, *Raphanus sativus*, *Cosmos bipinnatus*, *Schinus terebinthifolia*, *Viguiera angustifolia*, *Parthenium hysterophorus*, *Tropaeolum majus*, *Salvia tiliifolia*, *Psittacanthus mayanus*, *Baccharis salicifolia*, *Salix amygdaloides*, *Fragaria daltoniana*, *Eruca vesicaria*, *Psittacanthus macrantherus*, *Sicyos anunu*, *Eucalyptus globulus*, *Verbesina helianthoides*, *Tamarix usneoides*, *Marina maritima*, *Brassica cretica*, *Eucalyptus alba*, *Richardia scabra*, *Hilaria cenchroides*, *Fraxinus americana*, *Melinis repens*, *Sida parvifolia*, *Heterosperma pinnatum*, *Sonchus oleraceus*, *Aloysia citrodora*, *Tagetes patula*, *Clematis henryi*, *Helianthus tuberosus*, *Sechium edule* y *Euphorbia graminea* (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla con la identidad botánica de la miel de cada apiario a partir del marcador ITS2.

Apiario	Familia	Total de reads	Género	Total de reads
El jaral	Asteraceae	65005	<i>Simsia</i>	58031
			<i>Viguiera</i>	4572
			<i>Cosmos</i>	749
			<i>Parthenium</i>	330
			<i>Ageratina</i>	243

			<i>Sonchus</i>	180
			<i>Melampodium</i>	104
	Rosaceae	4103	<i>Fragaria</i>	4098
	Rutaceae	1923		
	Myrtaceae	1644	<i>Eucalyptus</i>	1633
	Brassicaceae	1593	<i>Brassica</i>	1010
	Resedaceae	872	<i>Reseda</i>	872
	Poaceae	804	<i>Melinis</i>	445
			<i>Hilaria</i>	348
	Cucurbitaceae	436	<i>Sicyos</i>	373
	Lamiaceae	391	<i>Salvia</i>	391
	Euphorbiaceae	323		
	Fabaceae	245		
	Tamaricaceae	189	<i>Tamarix</i>	189
	Malvaceae	107	<i>Triumfetta</i>	107
			NA	3376
El maguey	Asteraceae	50102	<i>Simsia</i>	46591
			<i>Viguiera</i>	1357
			<i>Sonchus</i>	756
			<i>Melampodium</i>	136
			<i>Bidens</i>	132
			<i>Koanophyllon</i>	212
			<i>Heterosperma</i>	406
	Myrtaceae	11888	<i>Eucalyptus</i>	11888
	Rutaceae	8932		
	Resedaceae	5036	<i>Reseda</i>	5036
	Lamiaceae	3688	<i>Salvia</i>	3688
	Rhamnaceae	878	<i>Pseudoziziphus</i>	878
	Euphorbiaceae	316		
	Rosaceae	245	<i>Fragaria</i>	245
	Poaceae	186	<i>Hilaria</i>	170
	Cucurbitaceae	165	<i>Sicyos</i>	147
	Brassicaceae	128	<i>Brassica</i>	128
	Malvaceae	124		
			NA	9082
La estanzuela	Resedaceae	18577	<i>Reseda</i>	18577
	Malvaceae	15365	<i>Triumfetta</i>	15365
	Asteraceae	8465	<i>Simsia</i>	8280

	Rhamnaceae	1181	<i>Pseudoziziphus</i>	1176
	Rutaceae	238		
	Ranunculaceae	182	<i>Clematis</i>	182
	Myrtaceae	120	<i>Eucalyptus</i>	117
	Euphorbiaceae	107		
			NA	291
La parcela	Asteraceae	32058	<i>Bidens</i>	23119
			<i>Simsia</i>	5777
			<i>Stevia</i>	2445
			<i>Baccharis</i>	567
	Lamiaceae	194	<i>Salvia</i>	194
	Resedaceae	129	<i>Reseda</i>	129
	Salicaceae	101		
			NA	173
La puerlita	Asteraceae	23797	<i>Simsia</i>	16641
			<i>Bidens</i>	3281
			<i>Cosmos</i>	367
			<i>Verbesina</i>	1373
	Brassicaceae	23055	<i>Raphanus</i>	22849
			<i>Tropaeolum</i>	5347
			<i>Brassica</i>	204
	Loranthaceae	8383	<i>Psittacanthus</i>	8383
	Tropaeolaceae	5347		
	Rutaceae	2963		
	Malvaceae	2376	<i>Triumfetta</i>	2200
			<i>Sida</i>	176
	Myrtaceae	2257	<i>Eucalyptus</i>	2257
	NA	561		
	Cucurbitaceae	311	<i>Sicyos</i>	311
			NA	5530
La trinidad	Asteraceae	26496	<i>Simsia</i>	19222
			<i>Bidens</i>	4827
			<i>Sonchus</i>	828
			<i>Viguiera</i>	475
			<i>Parthenium</i>	442
	Brassicaceae	24645	<i>Brassica</i>	21023
			<i>Raphanus</i>	997
			<i>Eruca</i>	2339

	Myrtaceae	1753	<i>Eucalyptus</i>	1746
	Cucurbitaceae	1312	<i>Sicyos</i>	1254
	Asparagaceae	617	<i>Asparagus</i>	617
	Rutaceae	576		
	Lamiaceae	307	<i>Salvia</i>	307
	Fabaceae	299	<i>Marina</i>	152
	Malvaceae	179		
			NA	1322
Las del bordo	Asparagaceae	35385	<i>Asparagus</i>	35385
	Brassicaceae	9054	<i>Brassica</i>	8087
			<i>Eruca</i>	343
	Fabaceae	7705	<i>Medicago</i>	7650
	Asteraceae	4257	<i>Simsia</i>	3378
			<i>Bidens</i>	316
			<i>Viguiera</i>	163
	Verbenaceae	331	<i>Aloysia</i>	331
Los mogotes	Malvaceae	114	<i>Malva</i>	101
			NA	989
	Malvaceae	73919	<i>Triumfetta</i>	73912
	Asteraceae	31542	<i>Bidens</i>	25961
			<i>Simsia</i>	3273
			<i>Cosmos</i>	616
			<i>Viguiera</i>	322
			<i>Baccharis</i>	212
			<i>Stevia</i>	177
			<i>Tagetes</i>	181
	Loranthaceae	852	<i>Psittacanthus</i>	852
	Cucurbitaceae	796	<i>Sicyos</i>	609
			<i>Cucurbita</i>	179
	Brassicaceae	552	<i>Brassica</i>	341
			<i>Raphanus</i>	201
	Rubiaceae	398	<i>Richardia</i>	398
	Poaceae	394		
	Rutaceae	342		
	Resedaceae	197	<i>Reseda</i>	197
	Myrtaceae	124	<i>Eucalyptus</i>	110
	Fabaceae	100		
			NA	917

Mesa de capúla	Asteraceae	51997	<i>Simsia</i>	27310
			<i>Bidens</i>	12831
			<i>Cosmos</i>	9124
			<i>Parthenium</i>	412
			<i>Triumfetta</i>	5099
			<i>Eucalyptus</i>	3385
			<i>Pseudoziziphus</i>	3274
			<i>Viguiera</i>	225
	Rutaceae	27713		
	Malvaceae	5315	<i>Sida</i>	182
	Myrtaceae	3405		
	Rhamnaceae	3277		
	Salicaceae	2928	<i>Salix</i>	2920
	Poaceae	2775		
	Brassicaceae	2531	<i>Brassica</i>	2350
	Fabaceae	898	<i>Marina</i>	882
	Cucurbitaceae	461	<i>Sicyos</i>	404
	Euphorbiaceae	275	<i>Euphorbia</i>	123
	Rubiaceae	216	<i>Richardia</i>	216
	Lamiaceae	139	<i>Salvia</i>	139
	NA	199	NA	32817
Palo alto	Myrtaceae	22122	<i>Eucalyptus</i>	22122
	Asteraceae	10223	<i>Cosmos</i>	4629
			<i>Viguiera</i>	1636
			<i>Pseudoziziphus</i>	771
			<i>Simsia</i>	264
			<i>Helianthus</i>	175
	Brassicaceae	10192	<i>Brassica</i>	9675
	Rutaceae	1916		
	Rhamnaceae	771		
	Euphorbiaceae	382		
	Oleaceae	326	<i>Fraxinus</i>	326
San Luis de la Paz	Asteraceae	1150	<i>Simsia</i>	1134
			<i>Triumfetta</i>	448
	Malvaceae	448		
	Myrtaceae	391	<i>Eucalyptus</i>	391
	NA	383		
	Lamiaceae	372	<i>Salvia</i>	372

	Resedaceae	171	<i>Reseda</i>	171
			NA	399
San Luis de los Agustinos	Asteraceae	45002	<i>Simsia</i>	41334
			<i>Triumfetta</i>	40252
			<i>Pseudoziziphus</i>	1750
			<i>Cosmos</i>	731
			<i>Baccharis</i>	2067
	Malvaceae	40261		
	Rhamnaceae	1750		
	Rutaceae	880		
	Brassicaceae	553	<i>Brassica</i>	541
	Poaceae	128		
			NA	1576
Tenería	Asteraceae	52346	<i>Simsia</i>	45851
			<i>Parthenium</i>	4819
			<i>Viguiera</i>	191
	Myrtaceae	32839	<i>Eucalyptus</i>	32839
	Anacardiaceae	14785	<i>Schinus</i>	14785
	Euphorbiaceae	2822		
	Tamaricaceae	1069	<i>Tamarix</i>	1069
	Rutaceae	160		
			NA	206

Los porcentajes de abundancia de las cinco Familias con mayor representación en la miel para cada apiario fueron diferentes, dando como resultado que la composición botánica de cada uno era específica (Figura 4). La Familia Asteracea esta presente en todos los apiarios, e incluso es la que tiene mayor porcentaje de abundancia para la mayoría de los apiarios estando entre el 50 y 80% predominantemente sobre otras Familias, a excepción de cinco apiarios, “La estanzuela” donde predominan tres Familias Resedaceae, Lamiaceae y Malvaceae tendiendo una abundancia de casi el 30% cada una; “Las del bordo” donde casi todo el perfil pertenece a la Familia Asparagaceaea; “La puertita” donde

predominan Asteraceae y Brassicaceae; “Palo alto” donde predominan tres familias, Asteraceae, Fabaceae y Brassicaceae y “Los mogotes” donde predomina la Familia Malvaceae. Y el resto de las Familias se encuentra con un porcentaje más bajo.

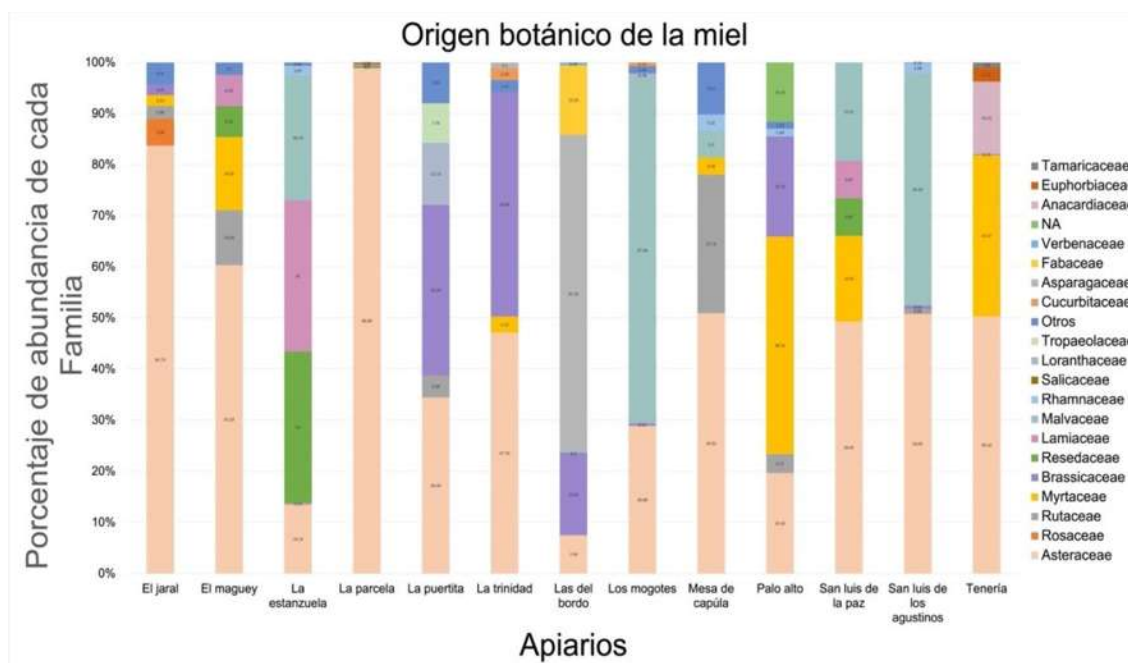


Figura 4. Gráfica que muestra los porcentajes de abundancia por Familia de cada apiario para el gen ITS2

El Género *Simsia* perteneciente a la familia Asteraceae se encuentra en la mayoría de los apiarios a excepción de el apiario “Palo alto” y en la mayoría igualmente es el más abundante, seguido de *Viguiera* y *Bidens*; a excepción del apiario “Las del bordo” donde predomina el género *Asparagus*; “Los mogotes” donde predomina *Triumfetta* y “Palo alto” donde predomina *Eucalyptus*. Y el resto de los Géneros que se encuentran en menor abundancia (Figura 5).

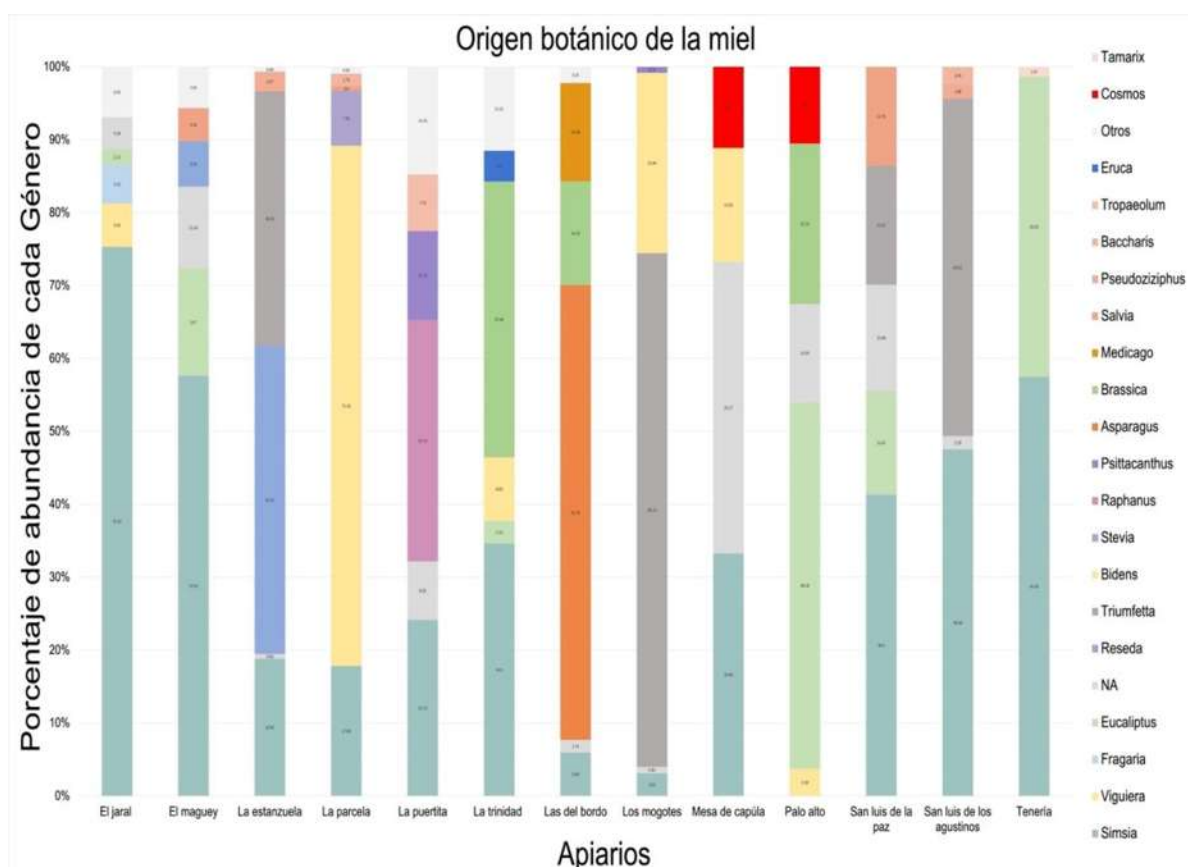


Figura 5. Gráfica que muestra los porcentajes de abundancia por Género de cada apiario para el gen ITS2.

Para el gen trnL se obtuvieron un total de 844, 571 lecturas o reads pertenecientes a plantas de las cuales 591,074 no fueron asignadas contra 253,497 que si lo fueron, de igual forma solo se tomaron en cuenta los taxa que tuvieran al menos 100 reads o lecturas de respaldo.

De acuerdo con los resultados, se identificaron en las muestras, polen proveniente de 19 Ordenes: Hypnales, Malvales, Fabales, Asterales, Poales, Arecales, Asparagales, Cucurbitales, Apiales, Caryophyllales, Lamiales, Solanales,

Myrtales, Sapindales, Brassicales, Malpighiales, Gentianales, Rosales, Pinales (Tabla 7).

Se identificaron 24 Familias: Malvaceae, Fabaceae, Asteraceae, Poaceae, Arecaceae , Orchidaceae, Cucurbitaceae, Apiaceae, Aizoaceae, Lamiaceae, Acanthaceae, Solanaceae, Convolvulaceae, Onagraceae, Meliaceae, Brassicaceae, Lythraceae, Malpighiaceae, Salicaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Moraceae, Asparagaceae, Pinaceae. Se pudieron indentificar 36 géneros: *Solidago*, *Saccharum*, *Livistona*, *Dendrobium*, *Eleusine*, *Cucumis*, *Eryngium*, *Zaleya*, *Betonica*, *Dicliptera*, *Physalis*, *Dalbergia*, *Pisum*, *Cicer*, *Vicia*, *Alysicarpus*, *Vigna* ,*Pomoea*, *Ludwigia*, *Trichilia*, *Brassica*, *Lythraceae*, *Triumfetta*, *Abutilon*, *Sida*, *Cassia*, *Amorimia*, *Populus*, *Mesosphaerum*, *Justicia*, *Strophanthus*, *Markhamia*, *Salvia*, *Ficus*, *Aphyllanthes*, *Pinus* (Tabla 7).

Por otro lado se identificaron 21 Especies: *Dendrobium porphyrochilum*, *Eleusine coracana*, *Cucumis* sp. JP-2019, *Eryngium campestre*, *Zaleya* sp. JP-2019, *Dicliptera resupinata*, *Physalis* sp. JP-2019, *Pisum sativum* subsp. *Elatius*, *Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*, *Ipomoea* sp. JP-2019, *Ludwigia* sp. JP-2019, *Trichilia capitata*, *Brassica* sp. YC, *Lythraceae* sp. JP-2019, *Triumfetta* sp. JP-2019, *Sida acuta*, *Cassia abbreviata*, *Amorimia candidae*, *Eryngium campestre*, *Justicia, anselliana*, *Markhamia zanzibarica* y *Aphyllanthes monspeliensis* (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla que muestra el origen botánico de la miel de cada apiario a partir del marcador trnL.

Apiario	Familia	Ttotal de reads	Género	Total de reads
Ojo de agua de la trinidad	Convolvulaceae	26088	<i>Ipomoea</i>	26088
	Fabaceae	15271	<i>Cassia</i>	15016
			<i>Vigna</i>	101
	Apiaceae	14076	<i>Eryngium</i>	14076
	Meliaceae	13126	<i>Trichilia</i>	13126
	Asteraceae	12534		
	Malpighiaceae	3013	<i>Amorimia</i>	3013
	Malvaceae	2322	<i>Sida</i>	1986
			<i>Abutilon</i>	208
			<i>Triumfetta</i>	128
	Brassicaceae	2086	<i>Brassica</i>	2086
	Salicaceae	1575	<i>Populus</i>	1575
	Solanaceae	1117	<i>Physalis</i>	1117
	NA	952		
	Arecaceae	817	<i>Livistona</i>	817
	Pinaceae	402	<i>Pinus</i>	402
	Orchidaceae	291	<i>Dendrobium</i>	291
			NA	13699
San luis de los agustinos	Fabaceae	24221	<i>Cassia</i>	24119
			<i>Pisum</i>	102
	Meliaceae	8919	<i>Trichilia</i>	8919
	Asteraceae	2820		
	Salicaceae	2732	<i>Populus</i>	2723
	Arecaceae	1278	<i>Livistona</i>	1278
	Brassicaceae	1106	<i>Brassica</i>	1106
	Malvaceae	615	<i>Triumfetta</i>	540
	Onagraceae	469	<i>Ludwigia</i>	469
	Convolvulaceae	462	<i>Ipomoea</i>	462
	Pinaceae	389	<i>Pinus</i>	389
	Cucurbitaceae	156	<i>Cucumis</i>	156
			NA	2861
La puertita	Meliaceae	10963	<i>Trichilia</i>	10963
	Malvaceae	6907	<i>Triumfetta</i>	6862
	Brassicaceae	1292	<i>Brassica</i>	1292

	Fabaceae	1247	<i>Cassia</i>	943
			<i>Pisum</i>	304
	Solanaceae	412	<i>Physalis</i>	412
	Asteraceae	406		
	Pinaceae	397	<i>Pinus</i>	397
	Asparagaceae	359	<i>Aphyllanthes</i>	359
	Acanthaceae	181	<i>Justicia</i>	181
	Poaceae	156	<i>Eleusine</i>	156
			NA	456
Mesa de capúla	Malvaceae	73001	<i>Sida</i>	64311
			<i>Abutilon</i>	8123
			<i>Triumfetta</i>	495
	Meliaceae	19418	<i>Trichilia</i>	19418
	Asteraceae	11249		
	Fabaceae	3500	<i>Cassia</i>	3317
			<i>Pisum</i>	170
			<i>Physalis</i>	113
	Brassicaceae	2953	<i>Brassica</i>	2953
	Asparagaceae	2120	<i>Aphyllanthes</i>	2120
	Pinaceae	841	<i>Pinus</i>	841
	Apiaceae	760	<i>Eryngium</i>	728
	Acanthaceae	695	<i>Justicia</i>	695
	Salicaceae	431	<i>Populus</i>	431
	Arecaceae	407	<i>Livistona</i>	407
	Convolvulaceae	275	<i>Ipomoea</i>	275
	Malpighiaceae	222	<i>Amorimia</i>	222
			NA	11428
Las mesas	Solanaceae	113		
	Malvaceae	2985	<i>Sida</i>	2664
			<i>Abutilon</i>	304
	Asteraceae	205		
El maguey			NA	205
	Malvaceae	63320	<i>Abutilon</i>	6548
			<i>Sida</i>	56723
	Apiaceae	7676	<i>Eryngium</i>	5994
	Asteraceae	2205		
	Brassicaceae	1029	<i>Brassica</i>	1029
	Fabaceae	688	<i>Cassia</i>	570
	Arecaceae	551	<i>Livistona</i>	551

	Salicaceae	362		
	Convolvulaceae	177	<i>Ipomoea</i>	177
	Onagraceae	137	<i>Ludwigia</i>	137
			NA	4321
El jaral	Brassicaceae	20259	<i>Brassica</i>	20259
	Asteraceae	9065		
	Malvaceae	2847	<i>Triumfetta</i>	1942
			<i>Sida</i>	798
			<i>Abutilon</i>	107
	Acanthaceae	2217	<i>Justicia</i>	2217
	Meliaceae	2089	<i>Trichilia</i>	2089
	Fabaceae	370	<i>Cassia</i>	364
	Onagraceae	322	<i>Ludwigia</i>	322
	Pinaceae	155	<i>Pinus</i>	155
			NA	9084
La estanzuela	Poaceae	64611		
	Asteraceae	12485		
	Brassicaceae	4932	<i>Brassica</i>	4932
	Convolvulaceae	2501	<i>Ipomoea</i>	2501
	Fabaceae	2472	<i>Vigna</i>	2058
			<i>Physalis</i>	347
			<i>Cassia</i>	246
			<i>Pisum</i>	163
	Pinaceae	1477	<i>Pinus</i>	1477
	Malvaceae	1334	<i>Triumfetta</i>	1254
	NA	800		
	Meliaceae	545	<i>Trichilia</i>	545
	Arecaceae	353	<i>Livistona</i>	353
	Solanaceae	347		
	Salicaceae	154		
			NA	78055
El sarampión	Poaceae	19771		
	Asteraceae	6223		
	Aizoaceae	4315	<i>Zaleya</i>	4315
	Malvaceae	4134	<i>Triumfetta</i>	4115
	NA	1914		
	Fabaceae	726	<i>Vigna</i>	586
			<i>Pisum</i>	140
	Arecaceae	615	<i>Livistona</i>	615

	Bignoniaceae	497	<i>Markhamia</i>	497
	Apiaceae	492	<i>Eryngium</i>	492
	Brassicaceae	315	<i>Brassica</i>	315
	Lythraceae	223	<i>Lythraceae</i>	223
	Acanthaceae	197		
	Convolvulaceae	184	<i>Ipomoea</i>	184
			NA	28128
La parcela	Aizoaceae	15687	<i>Zaleya</i>	15687
	Asteraceae	5507		
	Malvaceae	4404	<i>Triumfetta</i>	4363
	Convolvulaceae	1350	<i>Ipomoea</i>	1350
	Lamiaceae	471	<i>Salvia</i>	471
	Fabaceae	415	<i>Pisum</i>	215
			<i>Vigna</i>	155
	Apiaceae	130	<i>Eryngium</i>	130
La trinidad			NA	5564
	Asteraceae	23516		
	Orchidaceae	6111	<i>Dendrobium</i>	6111
	Solanaceae	1243		
	Brassicaceae	1116	<i>Brassica</i>	1116
	Poaceae	1111		
	Aizoaceae	856	<i>Zaleya</i>	856
	Pinaceae	726	<i>Pinus</i>	726
	Salicaceae	598		
	Acanthaceae	583	<i>Dicliptera</i>	562
	Fabaceae	552	<i>Physalis</i>	1243
			<i>Cassia</i>	278
			<i>Pisum</i>	274
	Arecaceae	515	<i>Livistona</i>	515
	Malvaceae	434	<i>Triumfetta</i>	370
	Lamiaceae	241	<i>Salvia</i>	192
	Bignoniaceae	229	<i>Markhamia</i>	229
	Lythraceae	184	<i>Lythraceae</i>	184
	Convolvulaceae	129	<i>Ipomoea</i>	129
	NA	103		
			NA	25377
Palo alto	Asteraceae	14618		
	Malvaceae	4686	<i>Triumfetta</i>	3674
			<i>Sida</i>	1012

	Poaceae	4411		
	Brassicaceae	1418	<i>Brassica</i>	1418
	Fabaceae	1325	<i>Cassia</i>	1010
			<i>Pisum</i>	232
	Arecaceae	1052	<i>Livistona</i>	1052
	Aizoaceae	930	<i>Zaleya</i>	930
	Orchidaceae	675	<i>Dendrobium</i>	675
	Acanthaceae	362	<i>Dicliptera</i>	362
	Salicaceae	300		
	Lythraceae	213	<i>Lythraceae</i>	213
	NA	211		
	Moraceae	197	<i>Ficus</i>	197
	Apiaceae	196	<i>Eryngium</i>	196
			NA	19624
Las del bordo	Asteraceae	52460		
	Aizoaceae	8974	<i>Zaleya</i>	8974
	Moraceae	1615	<i>Ficus</i>	1615
	Apiaceae	1082	<i>Eryngium</i>	1082
	Malvaceae	876	<i>Triumfetta</i>	745
			<i>Sida</i>	131
	Fabaceae	549	<i>Cassia</i>	549
			<i>Physalis</i>	114
	Arecaceae	539	<i>Livistona</i>	539
	Brassicaceae	385	<i>Brassica</i>	385
	Solanaceae	114		
	Onagraceae	114	<i>Ludwigia</i>	114
			NA	52479
	Asteraceae	23222		
Tenería	Brassicaceae	16760	<i>Brassica</i>	16760
	Aizoaceae	12365	<i>Zaleya</i>	12365
	Malvaceae	2137	<i>Sida</i>	1067
			<i>Triumfetta</i>	1028
	Meliaceae	1756	<i>Trichilia</i>	1756
	Apiaceae	1488	<i>Eryngium</i>	1488
	Convolvulaceae	1015	<i>Ipomoea</i>	1015
	Fabaceae	810	<i>Cassia</i>	745
	Onagraceae	222	<i>Ludwigia</i>	222
	Arecaceae	144	<i>Livistona</i>	144
	Salicaceae	103		

			NA	23525
Los mogotes	Malvaceae	40654	<i>Sida</i>	34325
			<i>Abutilon</i>	4042
			<i>Triumfetta</i>	2287
			<i>Brassica</i>	19006
	Brassicaceae	19006		
	Meliaceae	2077	<i>Trichilia</i>	2077
	Solanaceae	490		
	Asteraceae	470		
	Fabaceae		<i>Physalis</i>	490
San luis de la paz 1			NA	470
	Brassicaceae	24459	<i>Brassica</i>	24459
	Asteraceae	5138		
	Meliaceae	2670	<i>Trichilia</i>	2670
	Convolvulaceae	335	<i>Ipomoea</i>	335
	Solanaceae	100		
			NA	5155

Se observa que las familias con mayor abundancia son Asteraceae, Malvaceae y Brassicaceae (Figura 6), en algunos de los apiarios incluso dominan el perfil palinológico estando presente al menos en un 50% .

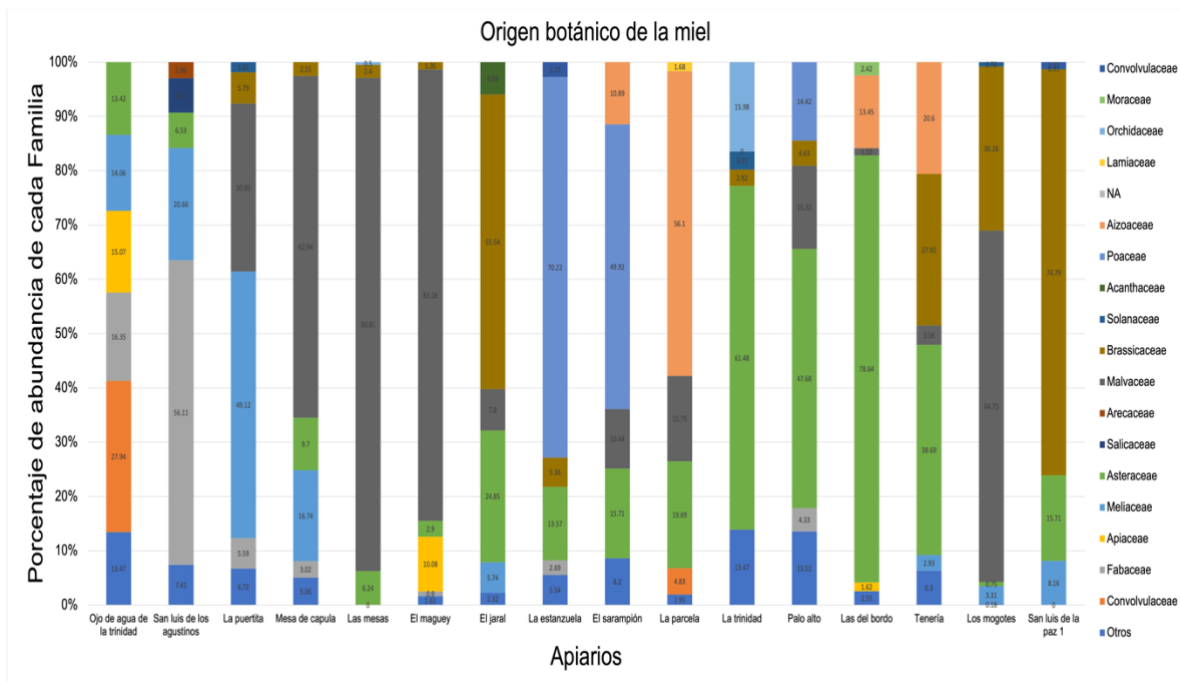


Figura 6. Gráfica que muestra el origen botánico de la miel a nivel de Familia de cada apiario para el gen trnL.

En la figura 7 se observa que los géneros más representantes que son *Cassia*, *Sida* y *Brassica* y también resalta la categoría de secuencias no asignadas en la mayoría de los apiarios.

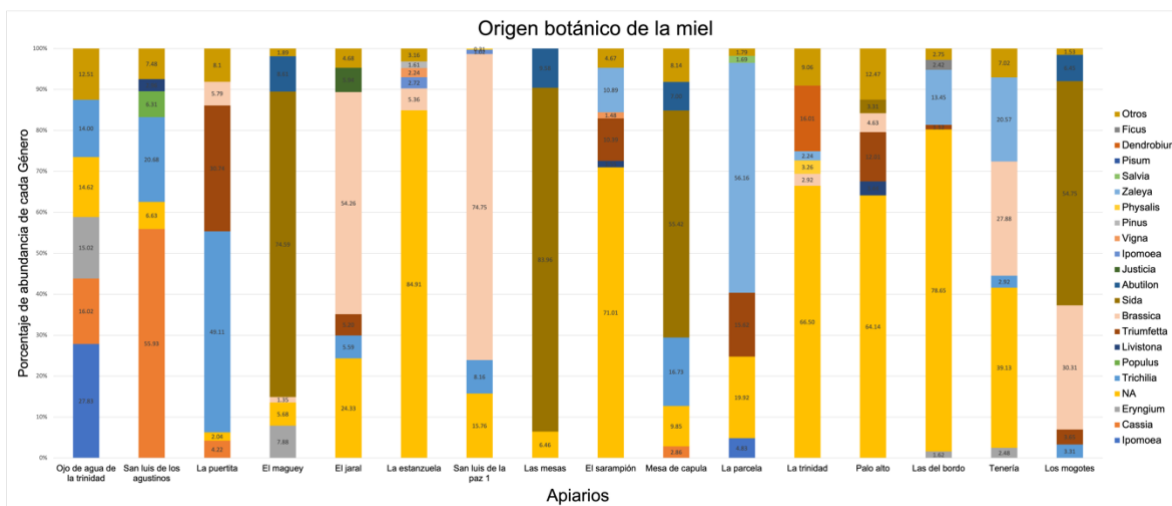


Figura 7. Gráfica que muestra el origen botánico de la miel de cada apiario para el gen trnL a nivel de Género.

8. DISCUSIÓN

La extracción de ADN de las plantas plantea desafíos únicos asociados con la alteración de la pared celular vegetal y la presencia de compuestos como taninos, fenoles y polisacáridos complejos al momento de la lisis celular que pueden afectar la calidad del ADN inhibiendo las reacciones posteriores (Jain et al., 2013).

Existe una variedad de métodos utilizados para la extracción de ADN, desde kits comerciales hasta los empleados en los laboratorios como el de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que es el comúnmente utilizado en estos procesos ya que es eficaz para eliminar compuestos como los polisacáridos y compuestos polifenólicos que podrían dañar la pureza y calidad del ADN (Narváez, 2013).

Dada la naturaleza de nuestras muestras tuvimos que realizar una serie de modificaciones al protocolo original de Lalhmangaihi et al. (2014) que tuvieron impacto en la evaluación del ADN, empezando por a) el tratamiento previo que se le dio a las muestras, b) el manejo de temperaturas, c) los tiempos de incubación y d) la concentración de los buffers de lisis.

Para el tratamiento previo se utilizó el protocolo de Soares et al., (2015) con ligeras modificaciones, una de ellas fue el uso y tamaño de las perlas, ya que es fundamental debilitar la exina del polen (Lalhmangaihi et al., 2014) y sea más fácil que las células se pongan en contacto con los buffers de extracción, ya que debido al tamaño que presentan es más fácil que colisionen con los granos de polen para romperlo o fracturarlo.

Durante la extracción de ADN es importante tener en cuenta los pasos correspondientes a incubación y precipitación ya que es innecesario y poco eficiente

el extender los tiempos ni aumentar las temperaturas con el fin de obtener mayor cantidad de ADN (Mazo, 2011), por lo que decidimos disminuir temperaturas al igual que tiempos de incubación en algunos pasos durante la extracción ya que probablemente estabamos degradando el ADN, con motivo de reducir el impacto de la alta temperatura sobre el ADN (Jain et al., 2013), al igual que el tiempo de precipitación.

Por último, la concentración y contenido de los buffers de lisis, un buffer de lisis adecuado es clave para la mayor obtención de moléculas de ADN (Mazo, 2011), en el buffer de lisis se aumentó la concentración de las sales (NaCl) ya que esto afecta la solubilidad de los polisacáridos en etanol, permitiendo una óptima precipitación de los ácidos nucleicos, otro inconveniente en la extracción de ADN es la remoción de polisacáridos sobre todo por la naturaleza de nuestras muestras, debido a que estos al precipitarse junto con el ADN promueven a la formación de un pellet con consistencia pegajosa y gelatinosa; con el objetivo de solucionar esto tambien se aumentan las concentraciones de sales, ya que estos son uno de los factores principales que inhiben las PCR (Mazo, 2011).

Se observó que las muestras tratadas con el kit de extracción de Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit y DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen se cuantificó muy poca cantidad de ADN a diferencia de la muestra tratada con el protocolo modificado de Lalmangaihi et al. (2014), donde podemos notar que es considerablemente más alta, hasta diez veces más que la que se obtiene con Wizard Genomic DNA Purification Kit, e incluso más que la extracción con DNeasy Plant Mini Kit. Por otra parte la pureza de las muestras con el protocolo de Promega

Wizard Genomic DNA Purification Kit y el protocolo modificado de Lalhmangaihi et al. (2014) son adecuadas estando dentro de los parámetros necesarios a diferencia de la muestra de DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen que no tiene la pureza adecuada.

Como se pudo observar el mejor método de extracción para tratar la miel es con el protocolo modificado de Lalhmangaihi et al. (2014), cuyos resultados se ven representados en el gel de agarosa (figura 2), ya que se pueden observar bandas de alto peso molecular de hasta 23000 pb y un barrido a diferencia de los protocolos de Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit y DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen donde no se va nada.

La secuenciación de próxima generación se ha utilizado con éxito para la evaluación taxonómica de plantas poliníferas a partir de muestras de miel (Laha et al., 2017). La elección de los cebadores o primers para PCR es muy importante durante la amplificación del ADN de la miel (Jain et al., 2013) para brindar la sensibilidad de detección y la resolución taxonómica deseadas (Milla et al., 2021). En cuanto a la amplificación de los marcadores ITS2 y trnL como parte de la evaluación de los protocolos de extracción, como se observa en la figura 3, muestra que este procedimiento fue exitoso para ambas regiones, trnL (del carril A01 al A06) e ITS2 (del carril A07 al A12), para las extracciones del protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit y aquellas del protocolo modificado de Lalhmangaihi et al. (2014). En tanto que las amplificaciones hechas a partir del ADN extraído por el protocolo de DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) no fueron exitosas.

Como pudimos observar a partir de la secuenciación de ADN de regiones específicas, se logró identificar el origen botánico de las muestras de miel. Para el

gen ITS2 logramos identificar un total de 123 taxones pertenecientes a 17 ordenes, 24 familias, 46 géneros y 36 especies, donde destaca la Familia Asteraceae estando presente en la mayoría de los apiarios y en mayor abundancia; 9 de los apiarios (“El jaral”, “El maguey”, “La parcela”, “La trinidad”, “Mesa de capula”, “San luis de la paz”, “San luis de los agustinos”, “Tenería”, y “Las del bordo”) tienen más del 45% de un solo taxa presente en este caso de la familia Asteracea; “Los mogotes” de la Familia Malvaceae y “Las del bordo” con la familia Asparagaceae; y los tres apiarios restantes (“La estanzuela”, “La puerita” y “Palo alto”) tienen un poco más de diversidad. En cuanto a las secuencias no asignadas, no se encuentran de forma notable a nivel de Familia y tampoco se encuentran de forma más abundante. En cuanto a Género, *Simsia* de la Familia Asteraceae se encontró en todos los apiarios y en mayor abundancia en 5 de ellos (“El jaral”, “El maguey”, “San luis de la paz”, “San luis de los agustinos” y “Tenería”) casi predominando en el perfil palinológico con casi más del 45%, *Bidens* predominó en “La parcela”; *Asparagus* predominando en “Las del bordo” abarcando cerca del 60% del perfil palinológico; “Los mogotes” donde el Género predominante fue *Triumfetta* abarcando casi el 70% y “Palo alto” donde el Género *Eucalyptus* abarca casi el 60%. En cuanto a las secuencias no asignadas a nivel de Género es notable que hay más a diferencia de Familia por ejemplo en “Mesa de capula” que hay casi el 33% de secuencias sin asignar; estas en comparación con el nivel de Familia, son más abundantes a nivel de Género.

En cuanto al gen trnL logramos identificar un total de 100 taxones pertenecientes a 19 ordenes, 24 familias, 36 géneros y 21 especies. Donde a nivel de Familia destacan Asteraceae predominando en el perfil de los apiarios “Palo

alto", "Tenería", "La trinidad" y "Las del bordo" con el 45% de abundancia; Brassicaceae en "San luis de la paz" y "El jaral" con más del 50% de abundancia; y Malvaceae con hasta el 60% de abundancia en "La puertita", "Mesa de capúla", "El maguey" y "Los mogotes"; Poaceae con hasta el 50% en "La estanzuela" y "El sarampion" y; Aizoaceae con casi el 60% en "La parcela". En cuanto a las no asignadas, no se encuentran representadas de forma importante en cuanto a abundancia en los apiarios. A nivel de Género para los apiarios "Mesa de capúla", "El maguey", "Las mesas" y "Los mogotes" abunda el Género *Sida* con más del 50%; en "San luis de los agustinos" abunda el Género *Cassia* con casi el 60%; en "La puertita" abunda *Trichilia* con casi el 50%; en "El jaral" y "San luis de la paz" abunda *Brassica* con más del 50%; en "La parcela" abunda *Zaleya* con casi el 60%. A nivel de Género es evidente que las categorías de secuencias no asignadas predomina los perfiles palinológicos de la mayoría de los apiarios, como es el caso de "La estanzuela", "El sarampión", "La trinidad", "Palo alto", "Las del bordo" y "Tenería" con más del 40%.

De acuerdo a los porcentajes de polen encontrados en la miel, se puede clasificar en mono o multifloral. El primero surge predominantemente de un solo origen botánico, generalmente una especie de planta que representa más del 45% del contenido total de polen (Soares et al., 2017). Por lo tanto si tomáramos en cuenta esta referencia podríamos clasificar la miel de los apiarios. Aunque se sabe que no puede haber una correspondencia lineal entre el número de lecturas y los granos de polen (Beltramo et al., 2017).

El código de barras de ADN ya se utiliza como técnica de identificación en un contexto legal para la trazabilidad del pescado (p. ej., por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. y por el gobierno de Filipinas) aunque, se necesitan más pruebas, pero todas las partes interesadas involucradas en la cadena de suministro de miel deberían considerar seriamente esta oportunidad (Bruni et al., 2014).

Como se pudo observar obtuvimos una gran variedad de taxones en cuanto a variedad de identificación del gen trnL e ITS2, donde las familias Malvaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Asteraceae, Asparagaceae, Poaceae, Cucurbitaceae, Lamiaceae, Salicaceae y Moraceae aparecen identificadas para ambos genes, sin embargo individualmente para el gen trnL hay 14 familias más diferentes (Meliaceae, Solanaceae, Pinaceae, Acanthaceae, Convolvulaceae, Aizoaceae, Arecaceae, Orchidaceae, Apiaceae, Onagraceae, Lythraceae, Malpighiaceae, Apocynaceae y Bignoniaceae) y para ITS2 también 14 (Myrtaceae, Rutaceae, Resedaceae, Anacardiaceae, Loranthaceae, Rhamnaceae, Tropaeolaceae, Rosaceae, Euphorbiaceae, Tamaricaceae, Rubiaceae, Oleaceae, Verbenaceae y Ranunculaceae); en cuanto a Género ambos genes coinciden solo con los géneros *Brassica* y *Sida*, el resto son diferentes; en cuanto a especies todas son diferentes para ambos genes.

En cuanto a la cantidad de secuencias que fueron asignadas y las que no, ITS2 resultó tener una mayor capacidad en cuanto a identificación ya que se lograron identificar un poco más de la mitad del total de las secuencias (473, 180) a diferencia de trnL que solo logro identificar 253, 497. Por separado, estas regiones

presentan ventajas y desventajas para lograr un buen alcance discriminatorio para una Familia o Especie de planta en particular (Beltramo, et al., 2021) ya que ITS2 siendo una región universal para eucariotas (Chen et al., 2010) va a identificar cualquier organismo eucarionte que se presente en la muestra, a diferencia de trnL que es una región específica de plantas ya que es material genético que se encuentra en el cloroplasto, por lo que dada la naturaleza de nuestro estudio resultó complementar a ITS2. Por lo que utilizados en conjunto pueden dirigirnos hacia resultados más amplios (Richardson et al., 2015, Milla et al., 2021); una de las desventajas es que al trabajar con ITS2 y con un grupo exclusivamente como en este caso de plantas hay que hacer una “limpieza” de secuencias que no sean plantas a diferencia de trnL.

Cabe destacar que la identificación es mejor a nivel de Género para ITS2 en comparación a trnL como lo menciona (Milla et al., 2022) ya que solo quedaron 62,619 sin asignar a diferencia de trnL donde quedaron 280,431. Aunque continuamente se actualizan las bases de datos para asignaciones taxonómicas, esto también puede estar influyendo para la secuencias que quedaron sin asignación taxonómica en ambos genes, pero sobretodo para trnL. Ya que para algunos genes existe más información como es el caso de ITS2 que es el comúnmente utilizado para este tipo de estudios a diferencia de trnL que es menos común y aunque la información que existe no es limitada, tampoco es tan extensa como para el gen ITS2 (Milla et al., 2021).

Independientemente de la evaluación individual de cada gen, sino de forma complementaria logramos nuestro objetivo de darle una identidad botánica a las muestras de miel de cada apiario logrando una amplia identificación taxonómica. La investigación en el campo de la Biología molecular para saber el origen floral de la miel ha sido impulsado en los últimos años, permitiendo la obtención de datos más confiables y dedicando menos tiempo por lo tanto los estudios relacionados con este tema son bastante significativos (Bayram, 2021).

El uso de metabarcoding Proporciona un método que puede usarse fácil y ampliamente para responder preguntas sobre el comportamiento de búsqueda de alimento de los polinizadores (Bruni et al., 2014), brinda información sobre el servicio ecosistémico vital proporcionado por las abejas polinizadoras (Park & Nieh, 2017) y en el seguimiento de las dietas de las abejas podría ayudar a determinar si tienen acceso a los recursos florales adecuados, que es una de las recomendaciones para el manejo de la salud de las colmenas (Milla et al., 2021).

9. CONCLUSIONES

- EL protocolo de extracción de Lalhmangaihi et al. (2014) que modificamos tiene resultados superiores a los otros dos métodos probados en cuanto a los parametros (pureza, cantidad de ADN obtenida y peso molecular) que utilizamos para la evaluación de la extracción de ADN.
- El uso de dos regiones genéticas de interés nos permitio tener un mayor alcance y conocimiento de los taxones que le asignan su origen botánico a las mieles.
- La región genética ITS2 mostró ser superior a la región trnL en cuanto a la identificación de los taxones.
- La Familia Asteraceae es una de las más abundantes en el perfil palinológico de cada apiario para ITS2, sin embargo para trnL tambien es un taxón que persite aunque no de manera abundante.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarenkov, Kessy; Zirk, Allan; Piirmann, Timo; Pöhönen, Raivo; Ivanov, Filipp; Nilsson, R. Henrik; Kõljalg, Urmas (2022): UNITE QIIME release for eukaryotes. Version 16.10.2022. UNITE Community
2. Alaniz-Gutiérrez, L. A., Ail-Catzim, C. E., Villanueva-Gutiérrez, R., Delgadillo-Rodríguez, J., Ortiz-Acosta, M. E., García-Moya, E., & Medina Cervantes, T. S. (2017). Caracterización palinológica de mieles del Valle de Mexicali, Baja California, México. *Polibotánica*, 0(43).
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.43.12>
3. Aldridge, G., Inouye, D. W., Forrest, J. R. K., Barr, W. A., & Miller-Rushing, A. J. (2011). Emergence of a mid-season period of low floral resources in a montane meadow ecosystem associated with climate change: Seasonal low in montane flowering. *Journal of Ecology*, 99(4), 905-913.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01826.x>
4. Bayram, N. E. (2021). Molecular approach to detecting pollen types in honey: DNA barcoding. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 49(1), 37-41.
5. Bolland, L. P. (2003). *La apicultura y el paisaje maya. Estudio sobre la fenología de floración de las especies melíferas y su relación con el ciclo apícola en La Montaña, Campeche, México*. 28.
6. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM,

Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, and Caporaso JG. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

7. Bruni, I., Galimberti, A., Caridi, L., Scaccabarozzi, D., De Mattia, F., Casiraghi, M., Labra, M., A DNA Barcoding Approach to Identify Plant Species in Multiflower Honey, *Food Chemistry* (2014)
8. Castillo Cázares, A. V., Moguel Ordóñez, Y. B., Cortés Cruz, M. A., Espinosa Huerta, E., Arechavaleta Velasco, M. E., & Mora Avilés, M. A. (2016).

- Composición botánica de mieles de la península de Yucatán, mediante qPCR y análisis de curvas de disociación. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 7(4), 489. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v7i4.4278>
9. Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1), e8613.
 10. Chiara, B., Francesco, C., Fulvio, B., Paola, M., Annalisa, G., Stefania, S., ... & Simone, P. (2021). Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control*, 128, 108175.
 11. DeGrandi-Hoffman, G., Gage, S. L., Corby-Harris, V., Carroll, M., Chambers, M., Graham, H., Watkins deJong, E., Hidalgo, G., Calle, S., Azzouz-Olden, F., Meador, C., Snyder, L., & Ziolkowski, N. (2018). Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology*, 109, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.002>
 12. Domínguez-Álvarez, A., & Cano-Santana, Z. (2009). *Estructura y fenología de la comunidad de abejas nativas (Hymenoptera: Apoidea)*. 12.
 13. Donkersley, P., Rhodes, G., Pickup, R. W., Jones, K. C., Power, E. F., Wright, G. A., & Wilson, K. (2017). Nutritional composition of honey bee food stores vary with floral composition. *Oecologia*, 185(4), 749-761. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3968-3>
 14. Echazarreta, C. M., Quezada-Euán, J. J. G., Medina, L. M., & Pasteur, K. L. (1997). Beekeeping in the Yucatan peninsula: Development and current

- status. *Bee World*, 78(3), 115-127.
<https://doi.org/10.1080/0005772X.1997.11099346>
15. Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. de M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., & Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332-346. <https://doi.org/10.1051/apido/2009012>
 16. Froylán, M.-P. J., William, C.-I., Antonio, G.-V. N., Fernando, C.-L., & Basu, S.-K. (2018). *Caracterización de la actividad apícola en los principales municipios productores de miel en Campeche, México* *Characterization of beekeeping activity in the main municipalities of honey production in Campeche, Mexico*. 5(1), 10.
 17. Guertler, P., Eicheldinger, A., Muschler, P., Goerlich, O., & Busch, U. (2014). Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food Chemistry*, 149, 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.129>
 18. Hasam, S., Qarizada, D., & Azizi, M. (2020). A Review: Honey and Its Nutritional Composition. *Asian Journal of Research in Biochemistry*, 34-43. <https://doi.org/10.9734/ajrb/2020/v7i330142>
 19. Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., Baillie, L., & Adams-Groom, B. (2015). Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLOS ONE*, 10(8), e0134735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
 20. Jain, S. A., Jesus, F. T. de, Marchioro, G. M., & Araújo, E. D. de. (2013).

- Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(4), 753-756.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400022>
21. Kadri, S. M., Zaluski, R., & Orsi, R. de O. (2017). Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. *Food Chemistry*, 218, 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.071>
22. Keller, A., Danner, N., Grimmer, G., Ankenbrand, M., von der Ohe, K., von der Ohe, W., Rost, S., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2015). Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology*, 17(2), 558-566.
<https://doi.org/10.1111/plb.12251>
23. Kishor R, Sharma GJ (2018) The use of the hypervariable P8 region of trnL(UAA) intron for identification of orchid species: Evidence from restriction site polymorphism analysis. *PLoS ONE* 13(5): e0196680
24. Kraaijeveld, K., de Weger, L. A., Ventayol García, M., Buermans, H., Frank, J., Hiemstra, P. S., & den Dunnen, J. T. (2015). Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 8-16.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12288>
25. Laha, R. C., De Mandal, S., Ralte, L., Ralte, L., Kumar, N. S., Gurusubramanian, G., Satishkumar, R., Mugasimangalam, R., & Kuravadi, N. A. (2017). Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition. *AMB Express*, 7(1),

132. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0429-7>
26. Lalmangaihi, R., Ghatak, S., Laha, R., Gurusubramanian, G., & Kumar, N. S. (2014). Protocol for Optimal Quality and Quantity Pollen DNA Isolation from Honey Samples. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, jbt.14-2504-001. <https://doi.org/10.7171/jbt.14-2504-001>
27. Leontidou, K., Vernesi, C., De Groeve, J., Cristofolini, F., Vokou, D., & Cristofori, A. (2018). DNA metabarcoding of airborne pollen: New protocols for improved taxonomic identification of environmental samples. *Aerobiologia*, 34(1), 63-74. <https://doi.org/10.1007/s10453-017-9497-z>
28. Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. de, Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
29. Mallinger, R. E., Gibbs, J., & Gratton, C. (2016). Diverse landscapes have a higher abundance and species richness of spring wild bees by providing complementary floral resources over bees' foraging periods. *Landscape Ecology*, 31(7), 1523-1535. <https://doi.org/10.1007/s10980-015-0332-z>
30. Martell Tamanis, A. Y., Lobato Rosales, F. G., Landa Zárate, M., Luna Chontal, G., García Santamaría, L. E., & Fernandez Lambert, G. (2019). Variables de influencia para la producción de miel utilizando abejas *Apis mellifera* en la región de Misantla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1353-1365. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1690>

31. Mazo Molina, L. C. (2011). Evaluación y comparación de 3 protocolos de extracción y amplificación del ADN contenido en exsiccados de orquídeas conservadas en colecciones de herbario.
32. Milla, L., Sniderman, K., Lines, R., Mousavi-Derazmahalleh, M., & Encinas-Viso, F. (2021). Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution*, 11(13), 8683-8698.
33. Milla, L., Schmidt-Lebuhn, A., Bovill, J., & Encinas-Viso, F. (2022). Monitoring of honey bee floral resources with pollen DNA metabarcoding as a complementary tool to vegetation surveys. *Ecological Solutions and Evidence*, 3(1), e12120.
34. Mohammad Mostajeran, Mohammad Ali Edriss and Mohammad Reza Basiri, 2006. Analysis of Colony and Morphological Characters in Honey Bees (*Apis mellifera meda*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 2685-2688.
35. Narváez Torres, P. (2013). *Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soya, Glycine max L., en la miel de abeja, Apis mellifera, de los estados de Campeche y Yucatán* (Doctoral dissertation, Tesis Lic. Biología. MX, Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias).
36. Nicholls, C.I. and Altieri, M.A. (2013) Plant Biodiversity Enhances Bees and Other Insect Pollinators in Agroecosystems. A Review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33, 257-274.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13593-012-0092-y>

37. Ojeda de Rodríguez, G., Sulbarán de Ferrer, B., Ferrer, A., & Rodríguez, B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, 84(4), 499-502. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00517-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00517-4)
38. Omelchenko, D.O.; Krinitsina, A.A.; Kasianov, A.S.; Speranskaya, A.S.; Chesnokova, O.V.; Polevova, S.V.; Severova, E.E. Assessment of ITS1, ITS2, 5'-ETS, and *trnL-F* DNA Barcodes for Metabarcoding of Poaceae Pollen. *Diversity* **2022**, *14*, 191.
39. Ortiz sánchez f.j., belda,j. fenologia de una comunidadde apiodea(hymenoptera) en medio agricola en el sureste d espaa Bol. *San. Veg. Plagas*, 20: 725-735, 1994
40. Park, B., & Nieh, J. C. (2017). Seasonal trends in honey bee pollen foraging revealed through DNA barcoding of bee-collected pollen. *Insectes Sociaux*, 64, 425-437.
41. Prosser, S. W., & Hebert, P. D. (2017). Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chemistry*, 214, 183-191.
42. Quesada, M., Sanchez-Azofeifa, G. A., Alvarez-Añorve, M., Stoner, K. E., Avila-Cabadilla, L., Calvo-Alvarado, J., Castillo, A., Espírito-Santo, M. M., Fagundes, M., Fernandes, G. W., Gamon, J., Lopezaraiza-Mikel, M., Lawrence, D., Morellato, L. P. C., Powers, J. S., Neves, F. de S., Rosas-Guerrero, V., Sayago, R., & Sanchez-Montoya, G. (2009). Succession and management of tropical dry forests in the Americas: Review and new perspectives. *Forest Ecology and Management*, 258(6), 1014-1024.

<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.023>

43. Reyes-Novelo, E., Ramírez, V. M., González, H. D., & Ayala, R. (2009). *[WILD BEES (HYMENOPTERA: APOIDEA) AS BIOINDICATORS IN THE NEOTROPICS]*. 14.
44. Richardson, R. T., Lin, C.-H., Sponsler, D. B., Quijia, J. O., Goodell, K., & Johnson, R. M. (2015). Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3(1), 1400066. <https://doi.org/10.3732/apps.1400066>
45. Smart, M. D., Cornman, R. S., Iwanowicz, D. D., McDermott-Kubeczko, M., Pettis, J. S., Spivak, M. S., & Otto, C. R. V. (2017). A Comparison of Honey Bee-Collected Pollen From Working Agricultural Lands Using Light Microscopy and ITS Metabarcoding. *Environmental Entomology*, nvw159. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw159>
46. Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2015). Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control*, 48, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.035>
47. Soares, S., Grazina, L., Costa, J., Amaral, J. S., Oliveira, M. B., & Mafra, I. (2018). Botanical authentication of lavender (*Lavandula* spp.) honey by a novel DNA-barcoding approach coupled to high resolution melting analysis. *Food Control*, 86, 367-373.
48. Strange, J. P., Garnery, L., & Sheppard, W. S. (2008). Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (*Apis mellifera* L.)

- ecotype for genetic conservation. *Journal of Insect Conservation*, 12(5), 527-537. <https://doi.org/10.1007/s10841-007-9093-6>
49. Wright, G. A., Nicolson, S. W., & Shafir, S. (2018). Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 327-344. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>
50. Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, et al. (2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE* 5(10): e13102. [doi:10.1371/journal.pone.0013102](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102)