



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**SISTEMÁTICA DE LAS ABEJAS DEL GÉNERO *MELIPONA* ILLIGER, 1806  
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI) DE MÉXICO Y CENTROAMÉRICA,  
PATRONES DE DISTRIBUCIÓN Y PERSPECTIVAS DE SU CONSERVACIÓN**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CARMEN LUCÍA YURRITA OBIOLS**

TUTOR DE TESIS:

DR. RICARDO AYALA BARAJAS, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DRA. MARÍA CARLOTA MONROY ESCOBAR, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE  
GUATEMALA

MÉXICO, Cd. Mx.

MAYO, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**SISTEMÁTICA DE LAS ABEJAS DEL GÉNERO *MELIPONA* ILLIGER, 1806  
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI) DE MÉXICO Y CENTROAMÉRICA,  
PATRONES DE DISTRIBUCIÓN Y PERSPECTIVAS DE SU CONSERVACIÓN**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CARMEN LUCÍA YURRITA OBIOLS**

TUTOR DE TESIS:

DR. RICARDO AYALA BARAJAS, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DRA. MARÍA CARLOTA MONROY ESCOBAR, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE  
GUATEMALA

MÉXICO, Cd. Mx.

MAYO, 2017

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de enero de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna YURRITA OBIOLS CARMEN LUCÍA con número de cuenta 510452157 con la tesis titulada: "Sistemática de las abejas del género *Mellipona Illiger*, 1806 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de México y Centroamérica, patrones de distribución y perspectivas de su conservación", realizada bajo la dirección del DR. RICARDO AYALA BARAJAS:

Presidente:	DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Vocal:	DR. ISMAEL ALEJANDRO HINOJOSA DÍAZ
Secretario:	DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS
Suplente:	DR. MIGUEL ALFONSO ORTEGA HUERTA
Suplente	DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 4 de abril de 2017.

  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México  
A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Ricardo Ayala Barajas

Dr. Atilano Contreras Ramos

Dra. María Carlota Monroy Escobar

## AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezco a las personas que me ayudaron a realizar este trabajo, pero si se me olvidó alguien le pido una disculpa. Si ahorita que estoy escribiendo no lo recuerdo, estoy segura que en algún momento de mi vida lo haré y no solo porque me ayudaron a realizar alguna parte de este trabajo, sino porque seguro me hicieron sonreír y al recordarles reflexiono sobre algo importante y porque definitivamente aportaron algo a mi vida, que me hará ser mejor, aunque no sea solo en la vida académica.

Al Dr. Ricardo Ayala por haberme apoyado en el desarrollo de este proyecto y por su orientación. Le agradezco a el y a su esposa Lupita por su hospitalidad, ¡gracias por todo!

Al Dr. Atilano Contreras por su apoyo.

A la Dra. Carlota Monroy por su apoyo y su ejemplo y al Dr. Tabaru por su apoyo económico

Al Dr. Oscar Cobar (USAC) y al Dr. Juan Nuñez (UNAM) por haber hecho que el convenio entre el posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM y la USAC pudiera ser posible.

Al Dr. Oscar Cobar por haberme dado la oportunidad de participar en este programa.

Al Dr. Miguel Ortega Huerta por su apoyo para los análisis espaciales y por su amistad.

Al Dr. Laurence Packer por su apoyo para que realizara una estancia en su laboratorio en Toronto, Canadá y para que secuenciara la mayoría de mis muestras. También le agradezco a el y a su esposa Gail por su hospitalidad durante mi estancia en Toronto

A Lilia Espinoza por su apoyo y paciencia

Al proyecto Barcode of Life, University of Guelph por el procesamiento de una parte de las muestras de DNA

Al Dr. Alejandro Zaldívar por su apoyo y orientación y por haberme brindado material, reactivos y espacio para que pudiera realizar una parte del trabajo de laboratorio

Al Dr. Carlos Pedraza-Lara por su apoyo y orientación para realizar el trabajo de laboratorio

A la M. en C. Laura Márquez por el procesamiento de otra parte de las muestras de DNA

A ELAP, Emerging Leaders for the Americas Program, por su apoyo para realizar una estancia de investigación en el Laboratorio del Dr. Laurence Packer en la Universidad de York, Canadá

Al Dr. Terry Griswold por su apoyo durante mi estancia en Utah State University. También le agradezco a Terry y a Rhonda su hospitalidad durante mi estancia en Logan, Utah.

A mis compañeros de Guatemala que participaron igual que yo en esta empresa

A José Martí Rosales y Erick Pineda por haberme recibido en Nicaragua y haberme llevado a coleccionar abejas

A la Dra. Ingrid Aguilar y a Eduardo Herrera por su apoyo durante mi estancia en Costa Rica

A Carolina Cardoso minha querida amiga brasileira que encontrei de novo em Toronto.

A Sheila Dumesh, Anne-Isabel Gravel, Sheila Colla, Cory Sheffield y a todo el equipo del laboratorio del Dr. L. Packer por su amistad durante mi estancia en Toronto.

A Noemi Arnold por su ayuda para conseguir abejas de Oaxaca, por su amistad y por su entusiasmo por las abejas

A todos los que conocí durante mi estancia en la estación de Biología

A María José Dardón por su apoyo, por su amistad y sus consejos

A mis compañeras con las que aprendimos sobre abejas Gaby, Mabel, Natalia, María José y Eunice, por compartir sus conocimientos y momentos interesantes y divertidos

Al personal del Departamento de Estudios y Planificación del CECON

A la Biól. Susana Guzmán del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad, en IBUNAM, por el apoyo brindado para la obtención de fotografías

A mi familia en México en especial a mi tía Ángeles por haberme recibido en su casa

A mi tía Ana Lucía porque siempre me dio ánimos

A los miembros del jurado por haber revisado el trabajo y por sus sugerencias y comentarios para mejorarlo

A Edson, por su apoyo, consejos y paciencia, por sus incontables historias, por transmitirme su curiosidad para conocer sobre las miles de cosas de la vida de la Tierra y principalmente por su compañía durante este tiempo

Dedico este trabajo a mis padres Pablo y María Albertina por su amor, su apoyo incondicional y su paciencia, a mis hermanas y hermano, a mis cuñados y cuñada por su apoyo y a mis sobrinas y sobrinos que me hacen reír y sonreír por sus ocurrencias y por su ternura

Finalmente dedico este trabajo a la Vida y a las abejas por una experiencia más que me enriquece y me gratifica



## INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción general	3
3. Capítulo 1: Distributional analysis of <i>Melipona</i> stingless bees (Apidae: Meliponini) in Central America and Mexico: setting baseline information for their conservation	13
4. Capítulo 2: Species delineation in the Mesoamerican bee <i>Melipona beecheii</i> Bennet 1831 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) based on morphological, ecological and DNA sequence evidence	25
5. Capítulo 3: Detecting species boundaries in the stingless bee species of the genus <i>Melipona</i> of Central America and Mexico using barcode sequences	45
6. Capítulo 4: Revisión taxonómica de las especies de <i>Melipona</i> Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de México y Centroamérica	65
7. Discusión general y conclusiones	123
8. Literatura citada	127

## 1. Resumen

El género *Melipona* forma parte del grupo de las abejas sin aguijón (Apidae, Apinae, Meliponini), y se distribuye exclusivamente en la región Neotropical, encontrándose la mayor riqueza de especies en América del Sur (~78 especies), mientras en México y Centroamérica se han reportado 16 especies. Estas abejas tienen importancia ecológica, económica y cultural; sin embargo, su taxonomía requiere ser mejor estudiada así como su distribución. Esta situación limita el desarrollo de estrategias de conservación efectivas.

Se realizó un análisis de la distribución de las especies de *Melipona* en Centroamérica y México como base para proporcionar información para su conservación en la región (Capítulo 1). Los resultados muestran que las especies del género están débilmente protegidas por los sistemas de áreas naturales protegidas de los países que integran la región, siendo más vulnerables las especies que se distribuyen en vertiente del Pacífico, en donde en general existen menos áreas naturales protegidas. Por lo tanto, se sugiere que las estrategias de conservación deben estar dirigidas a promover agroecosistemas heterogéneos.

También se llevó a cabo un estudio taxonómico, utilizando información geográfica, molecular y morfológica para delimitar especies crípticas dentro del complejo *M. beecheii* s.l. (Capítulo 2). De acuerdo a los resultados obtenidos se propone que las poblaciones localizadas en la Península de Yucatán y norte de Guatemala y las poblaciones de Sinaloa y Oaxaca corresponden a la especie *M. beecheii* mientras las poblaciones morfológicamente distintas localizadas en el sur de Guatemala hasta Costa Rica corresponden a la especie previamente descrita como *M. nigripes* Friese 1900.

Además, se realizó un análisis para delimitar las especies de *Melipona* presentes en la región de Centroamérica y México con base en el método de distancia del 2% y el modelo *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC), utilizando para ello un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (COI) (Capítulo 3). Los resultados muestran que los dos métodos utilizados difieren en relación al número de especies potenciales ambos recuperando un mayor número que las especies morfológicas (GMYC: 49 y 2%: 14).

También se realizó una revisión taxonómica de las especies de *Melipona* presentes en México y Centroamérica (Capítulo 4) con base en información morfológica y molecular (COI). Como resultado de este trabajo se reconocen 15 especies (*Melipona beecheii* Bennett, 1831; *M. nigripes* Friese, 1900; *M. triplaris* Cockerell, 1925; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *M. lupitae* Ayala, 1999; *M. yucatanica* Camargo, Moure, & Roubik, 1988; *M. phenax* Cockerell, 1919; *M. carrikeri* Cockerell, 1919; *M. torrida* Friese, 1917; *Melipona* sp.). La especie *M. nigripes* Friese fue reinstalada, y tres especies fueron sinonimizadas: *M. panamica* Cockerell bajo el nombre de *M. costaricensis* Cockerell, *M. belizeae* Schwarz dentro de *M. solani* Cockerell y *M. micheneri* bajo el nombre de *M. carrikeri* Cockerell.

## Abstract

The genus *Melipona* belongs to the commonly known stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini). It is distributed exclusively in the Neotropical region. Most of the species in this genus are found in South America (~78 species), while in Mexico and Central America only 16 species have been reported. In Mexico and Central America, these bees are ecologically, economically and culturally important however their taxonomy has been little studied and information on their distribution is scarce. This situation limits the establishment of effective conservation strategies.

In this work, a distributional analysis was performed to set baseline information to develop further studies regarding the conservation of these important bees (Chapter 1). According to the results, *Melipona* species are underprotected in the region (~20% of their potential distribution is located within the natural protected areas system), therefore it is suggested to develop conservation strategies that promote heterogeneous agroecosystems.

In addition, an integrative taxonomic approach using morphological, molecular and geographic data was used to delimit species within the *M. beecheii* s.l. complex (Chapter 2). Based on our results, we propose that the populations from the Yucatan Peninsula and northern Guatemala and the populations of Sinaloa and Oaxaca correspond to *M. beecheii*, whereas the morphologically distinct populations from southern Guatemala to Costa Rica correspond to the previously described species *M. nigripes* Friese 1900.

Additionally, we assesses the species limits in the genus *Melipona* from Central America and Mexico using two approaches, that is, the 2% COI distance approach and the single-locus delimitation method (*Generalized Mixed Yule Coalescent* -GMYC) using the cytochrome oxidase I mtDNA barcode sequences as input data (Chapter 3). The results show that the two methods differ with respect to the putative number of species, both yielding a higher number of species than the currently accepted morphological species.

Furthermore, based on morphological and molecular (DNA barcodes) information 15 species are recognized (*Melipona beecheii* Bennett, 1831; *M. nigripes* Friese, 1900; *M. triplaris* Cockerell, 1925; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *M. lupitae* Ayala, 1999; *M. yucatanica* Camargo, Moure, & Roubik, 1988; *M. phenax* Cockerell, 1919; *M. carrikeri* Cockerell, 1919; *M. torrida* Friese, 1917; *Melipona* sp.). The species *M. nigripes* Friese has been resurrected, and 3 species were synonymized: *M. panamica* Cockerell under *M. costaricensis* Cockerell, *M. belizae* Schwarz under *M. solani* Cockerell and *M. micheneri* Schwarz under *M. carrikeri* Cockerell.

## 2. Introducción general

El género *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae, Apinae, Meliponini) pertenece al grupo de las abejas sin aguijón (Michener 2007), y se distribuye exclusivamente en la región Neotropical. La mayor riqueza de especies del género *Melipona* se presenta en América del Sur e incluye alrededor de 78, mientras que para México y Centroamérica han sido reconocidas 16 especies (Camargo & Pedro 2013).

Las abejas de la tribu Meliponini, incluyendo las especies del género *Melipona*, se consideran eusociales porque forman colonias perennes en donde existe diferenciación de castas, traslape de generaciones y cuidado de la cría (Michener 2007). La mayoría de las especies de *Melipona* construyen sus nidos en cavidades pre-existentes, en agujeros localizados en el suelo o nidos de termitas (Kerr et al. 1967), pero principalmente en huecos de árboles maduros (~20 cm de diámetro). Esto hace a las especies de este grupo vulnerables al efecto negativo de la deforestación (Nogueira-Neto 1997; Antonini & Martins 2003; Macías-Macías et al. 2014).

Las abejas se encuentran entre los principales polinizadores tanto de plantas silvestres (Ollerton et al. 2011) como de cultivos (Klein et al. 2007) y por lo tanto son de gran importancia ecológica y económica (Potts et al. 2010). En la región neotropical, las abejas del género *Melipona* son consideradas polinizadores importantes gracias a que presentan poblaciones abundantes (> 1000 individuos por colonia), son visitantes florales poliléticos pero constantes y tienen capacidad vibratoria durante el pecoreo de flores poricidas (Slaa et al. 2006). Varias especies del género tienen además importancia cultural, ya que su miel, polen y cera son frecuentemente usados en la medicina alternativa, como alimento y en prácticas religiosas (Aguilar et al. 2013; Ayala et al. 2013; Yurrita & Vásquez 2013).

La reducción de especies está afectando servicios ecosistémicos esenciales como el de la polinización, por lo que es necesario implementar estrategias de conservación para preservar a las especies involucradas (Cardinale et al. 2012). Actualmente, existen numerosos estudios que ponen en evidencia la disminución de las poblaciones de abejas, tanto de *Apis mellifera* (Oldroyd 2007), como de abejas nativas (William & Osborne 2009; Burkle et al. 2013) y su consecuente efecto negativo sobre la polinización (Aizen et al. 2009; Potts et al. 2010; Tylianakis 2013). En México y Centroamérica se ha sugerido que algunas de las especies de *Melipona* (p. ej. *M. beecheii*) pueden estar en riesgo, al menos en parte de su distribución (Cairns et al. 2005). Por lo tanto, la conservación de las abejas nativas, incluyendo al género *Melipona* favorecerá procesos de polinización de calidad (Garibaldi et al. 2013).

El inadecuado conocimiento taxonómico de las especies y la deficiente información sobre su distribución limitan el desarrollo e implementación de estrategias de conservación efectivas (Whittaker et al. 2005; Diniz-Filho et al. 2010). A pesar de la importancia ecológica, económica y cultural de las especies del género *Melipona*, en México y Centroamérica hay sólo un estudio taxonómico previo que incluye a todas las especies reportadas en esta zona (Schwarz 1932). Posterior a dicho estudio se han publicado sólo descripciones de nuevas especies (Schwarz 1951; Camargo et al. 1988; Ayala 1999; Camargo & Pedro 2008; Roubik & Camargo 2012), y estudios con técnicas moleculares que sugieren que algunas especies conforman en realidad complejos de especies (May-Itzá et al. 2010; May-Itzá et al. 2012). Por otra parte, aunque existen estudios que mencionan con diferente detalle aspectos relacionados con los patrones de distribución (Camargo et al. 1988; Ayala 1999; Roubik & Camargo 2012), se observa una deficiencia en este tema para la mayoría de las especies.

Por lo anterior este trabajo tiene como objetivos: 1) producir modelos de distribución geográfica con la ayuda de los cuales se identifican factores ecológicos claves y se evalúan las condiciones de conservación de las especies, en función de la proporción de la distribución de

las especies que está bajo esquemas de protección en áreas naturales y bajo intervención agrícola (Capítulo 1); 2) proporcionar información sobre la delimitación y reconocimiento de especies de las abejas *Melipona* de México y Centroamérica (Capítulos 2 y 3); y 3) actualizar el conocimiento taxonómico de las especies del género *Melipona* para la región comprendida entre México y Centroamérica (Capítulo 4).

### ***Historia taxonómica del género***

La primera especie de abeja perteneciente al género *Melipona* fue descrita en 1798 por Fabricius como una especie del género *Apis* (*A. favosa*). En 1804 Latreille fue el primero en reconocer a las abejas sin aguijón como un grupo diferenciado, asignando dos especies a una subdivisión de *Apis* (Schwarz 1932). Sin embargo, fue Illiger en 1806 quien propuso que estas dos especies representaban un género diferente que nombró como *Melipona*. En 1807 Jurine colocó esas mismas dos especies en el género *Trigona*, y en 1809, Latreille propuso que ambas especies fueran tratadas como pertenecientes a dos géneros separados (*Melipona* y *Trigona*).

Otros autores posteriormente trataron de diferenciar a las especies de meliponinos con resultados muy ambiguos, por lo que durante un largo período las abejas sin aguijón fueron tratadas como dos géneros separados o como un único género (Schwarz 1932). A lo largo de ese período fueron descubiertos nuevos caracteres, y autores como Spinola en 1840 o Smith en 1854, reconocieron la necesidad de utilizar varios caracteres en conjunto para separar a los géneros. Esa línea de trabajo fue adoptada por otros autores como Lutz en 1924 y Ducke en 1925, quienes dividieron a los meliponinos en varios grupos coincidiendo ambos en la formación de un grupo taxonómico que incluía exclusivamente al género *Melipona* (Schwarz 1932).

A partir, del trabajo de Lutz, Schwarz (1932) publicó la única monografía en extenso del género, en la cual reconoció 12 especies y más de 22 subespecies. En este trabajo Schwarz

compiló los caracteres morfológicos distintivos del género, los cuales fueron complementados posteriormente por Moure (1951, 1961) y Michener (1990). Actualmente, este género se considera como el más fácilmente reconocible dentro de la tribu Meliponini (Michener 2007).

En relación a la taxonomía de *Melipona*, varios estudios posteriores al trabajo de Schwarz intentaron organizar las especies del género. Moure y Kerr (1950) elevaron al nivel de especie varias subespecies. Moure (1951) que consideraba a las abejas sin agujón como una subfamilia de lo que anteriormente se consideraba la familia Apidae, estableció la tribu Meliponini constituida por las especies del género *Melipona*. Posteriormente, el género fue dividido en subgéneros (Kerr et al. 1967; Moure 1992; Silveira et al. 2002). Actualmente, se reconoce que el género *Melipona* forma parte de la familia Apidae, subfamilia Apinae y la tribu Meliponini (Michener 2007; Camargo & Pedro 2013) y consta de 78 especies, incluidas en cuatro subgéneros (Camargo & Pedro 2013).

De acuerdo con Schwarz (1932), Lutz en 1924 y Ducke en 1925 propusieron una aproximación sobre la filogenia de *Melipona* respecto a los demás meliponinos con resultados contradictorios, ya que el primero sugirió que *Melipona* representaba el grupo más derivado, mientras el segundo lo propuso como el grupo más basal. Estudios más recientes también mostraron resultados contradictorios, así Wille (1979) utilizando criterios de la fenética propuso a *Melipona* como el grupo más avanzado de los meliponinos. Michener (1990), con base en el análisis cladístico de 17 caracteres morfológicos, encuentra que *Melipona* es el grupo hermano de todos los demás meliponinos. Otro estudio con 12 de los 17 caracteres usados por Michener (1990) muestra a *Melipona* como un género anidado dentro de los meliponinos neotropicales (Camargo & Pedro 1992). Estudios recientes con datos moleculares llegan a resultados similares a los de Camargo y Pedro (1990), con *Melipona* como un grupo monofilético dentro del clado de los meliponinos neotropicales (Rasmussen & Cameron 2010).

Las relaciones supraespecíficas de *Melipona* también han sido tratadas con base en la morfología y éste ha sido dividido en cuatro subgéneros (*Melipona*, *Melikerria*, *Michmelia* y *Eomelipona*) (Kerr et al. 1967; Moure 1992). Análisis filogenéticos posteriores con datos moleculares refuerzan parcialmente esta clasificación subgenérica (Rasmussen & Cameron 2010; Ramírez et al. 2010). Al igual que Silveira et al. (2002) los autores anteriores encuentran que *Eomelipona* parece ser un grupo polifilético.

En México y Centroamérica son pocos los estudios que incorporan información taxonómica de las especies del género *Melipona*. Estos incluyen la revisión taxonómica de la tribu Meliponini de México (Ayala 1999) y la guía de identificación de las especies de meliponinos de Panamá y Mesoamérica (Roubik 1992) o las descripciones de nuevas especies (Schwarz 1951; Camargo et al. 1988; Ayala 1999; Camargo & Pedro 2008; Roubik & Camargo 2011). Actualmente, para esta región se reconocen 16 especies distribuidas en los cuatro subgéneros reconocidos (Camargo & Pedro 2013). Estudios moleculares recientes sugieren que las especies *M. yucatanica* (May-Itzá et al. 2010) y *M. beecheii* (May-Itzá et al. 2012) forman complejos de especies crípticas. A pesar de que se han realizado análisis tendientes a entender las relaciones filogenéticas entre las especies del género, la representatividad de las especies de México y Centroamérica ha sido limitada (Ramírez et al. 2010).

### ***Taxonomía integradora***

La especie es la unidad de estudio básica en numerosas áreas de investigación biológica (i.e. ecología, biogeografía, biología de la conservación, biología evolutiva y otras) (Dayrat 2005; de Queiroz 2007), por lo tanto, una correcta identificación de las especies es imprescindible, pero existen algunas limitantes.



La taxonomía es la rama de la biología que se encarga de delimitar, nombrar, describir, clasificar y elaborar herramientas para la identificación de especies (Dayrat 2005). Tradicionalmente los taxónomos han delimitado a las especies con base principalmente en caracteres morfológicos, aunque también hacen uso de su conocimiento sobre la historia natural de los grupos que trabajan y otros grupos asociados (Dayrat 2005). Sin embargo, se ha sugerido que los trabajos taxonómicos eminentemente morfológicos pueden sufrir de cierto sesgo subjetivo (Packer et al. 2009; Padial et al. 2010) y que los métodos empleados al ser descriptivos pueden carecer de rigor científico (Wheeler et al. 2004). En relación a esto, el último autor explica que los procesos taxonómicos, sí responden al método científico, ya que las descripciones de las especies deben considerarse hipótesis y sus límites deben re-evaluarse en función de la disponibilidad de nuevos datos (i.e. nuevos ejemplares, nuevos caracteres) (Wheeler et al. 2004).

La investigación taxonómica basada esencialmente en datos morfológicos puede ser un proceso muy largo (Packer et al. 2009), lo cual dificulta el proceso de evaluación de las hipótesis sobre los límites de las especies (Wheeler et al. 2004), y retrasa la producción de información actualizada, más aún considerando la reducción en el número de taxónomos (i.e. impedimento taxonómico; Rodman & Cody 2003) (Dayrat 2005).

Ante la crisis de pérdida de la biodiversidad, urge acelerar los procesos taxonómicos que involucren ya el descubrimiento de nuevas especies o la evaluación de los límites de especies ya propuestas, y para las cuales se ha acumulado información nueva que sugiere la necesidad de una revisión (Packer et al. 2009). Actualmente, la disciplina de la taxonomía se ha beneficiado con el surgimiento de avances tecnológicos (e.g. secuenciación a gran escala de DNA, fotografía digital de alta resolución, sistemas de información geográfica, sistemas de divulgación digital a través de Internet), que favorecen tanto la delimitación e identificación de

las especies, como la divulgación de las herramientas de identificación (Wheeler et al. 2004; Padial et al. 2010).

Hebert et al. (2003) propusieron un sistema de identificación de especies (i.e. código de barras de DNA) basado en la utilización de un fragmento corto (~650 bp) de DNA del gen mitocondrial de la enzima Citocromo C Oxidasa subunidad 1 (CO1), que puede ser usado como un carácter diagnóstico adecuado para identificar especies animales. Debido a la efectividad de esta herramienta para identificar especies ya conocidas, se reconoció su valor como una herramienta auxiliar en el proceso de delimitación de especies (Packer et al. 2009; Goldstein & DeSalle 2011; Hubert & Hanner 2015). Su utilidad ha sido particularmente ventajosa en la delimitación de especies dentro de complejos crípticos (Gibbs 2009; Wielstra et al. 2012).

El fundamento para la identificación de especies propuesto por Hebert et al. (2003), se basa en las diferencias por distancias genéticas entre las secuencias de distintas especies (> 2%) y dentro de la misma especie (~ 0.1%). El hecho de que esas distancias no se sobrelapan, apoya la diferenciación entre especies (Hubert & Hanner 2015). Posteriormente, fue demostrado que este fundamento no es infalible (Hubert & Hanner 2015), por lo que fueron desarrollados otros métodos más robustos con base en la teoría de la coalescencia, que tienen como objetivo descubrir linajes evolutivamente independientes, utilizando información de uno o varios locus (Fujita et al. 2012; Huber & Hanner 2015). A pesar de esto, se ha señalado que el código de barras de DNA, puede ser empleado como un paso inicial en la delimitación de especies que son morfológicamente difíciles de separar (Packer et al. 2009; Goldstein & DeSalle 2011; Fujita et al. 2012).

Actualmente, es ampliamente aceptado que una especie estará mejor definida si se entiende como un linaje que evoluciona independientemente (de Queiroz 2007; Padial et al. 2010) y por lo tanto el uso combinado de múltiples tipos de datos y métodos (i.e. taxonomía

integradora) fortalece el proceso de delimitación de las especies (de Queiroz 2007; Padial et al. 2010; Pante et al. 2015). Uno de los productos importantes en la investigación taxonómica es la descripción de las especies, ya que es el vínculo con el conocimiento disponible de esa especie, y es lo que permite comunicar información entre científicos y con el público en general (Dayrat 2005; Schlick-Steiner et al. 2010; Pante et al. 2015), por ejemplo, para poder incluirla en los listados de conservación (Mace 2004). Sin embargo, como señalan Pante et al. (2015), a pesar del incremento en el número de estudios que resultan en la delimitación de especies, estos no les asignan un nombre, ni la describen y por lo tanto su descubrimiento carece en cierta medida de utilidad.

### ***Modelos de distribución de especies y conservación***

Las regiones tropicales y subtropicales del mundo poseen una elevada diversidad biológica que está altamente amenazada (Bradshaw et al. 2009). Los datos sobre la distribución de las especies son clave para desarrollar iniciativas de conservación eficientes (Kujala et al. 2011). Sin embargo, para la mayoría de las especies, especialmente invertebrados, esta información generalmente es limitada o ausente (Diniz-Filho et al. 2010; Cardoso et al. 2011a), esto a pesar de su papel en los procesos ecológicos esenciales, que además proveen servicios ecosistémicos claves como la polinización (Klein et al. 2007). Los modelos de distribución de especies representan un método efectivo para abordar esta limitante, ya que permiten hacer estimaciones sobre la distribución de las especies con base en información parcial y a veces sesgada (Diniz-Filho et al. 2010). Estos métodos se han empleado para: a) evaluar la representatividad de las especies en los sistemas de áreas protegidas (Rodrigues et al. 2004; Bosso et al. 2013), b) producir información de base para aplicar los criterios de la IUCN (Cardoso et al. 2011b), c) identificar valores óptimos de variables ambientales claves, que favorecen la sobrevivencia de

las especies a gran escala y d) apoyar en la delimitación de especies taxonómicamente problemáticas y entender patrones de especiación (Raxworthy et al. 2007; Peterson et al. 1999).

Las técnicas de modelado de distribución de especies, utilizan algoritmos que identifican las características ambientales (principalmente climáticas y topográficas) en los puntos de ocurrencia de las especies y luego por extrapolación, identifican áreas con características similares en el área de estudio, obteniendo de esta manera modelos de la distribución potencial de las especies de interés (Elith et al. 2006; Soberón & Peterson 2011). Los datos ambientales están disponibles en forma digital y provienen de imágenes de satélite (Elith et al. 2006). Los datos bióticos corresponden a datos de presencia (en la mayoría de casos) de las especies, provenientes de ejemplares colectados para el estudio y/o de ejemplares conservados en colecciones taxonómicas (Graham et al. 2004; Elith et al. 2011).

En general, los modelos de distribución de especies se basan en el concepto de nicho ecológico, y debido a que en general se carece de información sobre los factores bióticos que limitan la sobrevivencia de una especie en un lugar dado, el modelo obtenido es solo una aproximación del nicho fundamental de la especie, es decir del área donde están presentes las condiciones climáticas ambientales (Peterson et al. 2011). Sin embargo, los datos disponibles para modelar la distribución de las especies son principalmente de presencia (raramente los estudios obtienen información que permita afirmar que la especie está realmente ausente del sitio de muestreo). Por otro lado, esos datos representan datos provenientes de poblaciones fuente, cuya área de distribución está definida por la interacción de factores bióticos y abióticos permiten un crecimiento positivo de la especie en un área que ha sido accesible para la misma a través del tiempo (Soberón & Peterson 2005). Para obtener modelos más confiables y evitar sobre-predicciones (e.g. áreas donde no es posible encontrar a las especies debido a la existencia de barreras geográficas que impiden su dispersión), se ha sugerido circunscribir el

área de estudio por ejemplo a regiones bióticas donde la a especie ha sido colectada y áreas adyacentes (Barve et al. 2011).

Existen numerosas técnicas de modelado de especies cada una con supuestos diferentes (Elith et al. 2006). Actualmente, se ha sugerido el uso de un enfoque de consenso en donde se combinan los resultados obtenidos por separado por varios métodos de modelaje. De esta manera se espera que los modelos de distribución de las especies de interés sean más robustos (Aráujo & New 2007; Marmion et al. 2009).

### 3. CAPÍTULO 1

Capítulo publicado en la revista *Apidologie*: DOI 10.1007/s13592-016-0469-z

Apidologie  
© INRA, DIB and Springer-Verlag France, 2016  
DOI: 10.1007/s13592-016-0469-z

Original article

## Distributional analysis of *Melipona* stingless bees (Apidae: Meliponini) in Central America and Mexico: setting baseline information for their conservation

Carmen L. YURRITA<sup>1,2</sup>, Miguel A. ORTEGA-HUERTA<sup>1</sup>, Ricardo AYALA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación de Biología Chamela, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado postal 21, San Patricio, Jalisco 48980, México

<sup>2</sup>Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Guatemala, Guatemala

Received 27 November 2015 – Revised 30 July 2016 – Accepted 17 August 2016

**Abstract** – *Melipona* stingless bee species of Central America and Mexico are important ecologically, culturally, and economically as pollinators and as a source of food and medicine. Despite their importance, however, information on their distribution patterns is limited. We propose potential distribution models for 11 *Melipona* species in the region. Our main findings support previous data which suggest a revision of the taxonomic status of some species (e.g., *M. yucatanica*), and set a baseline on the conservation status of other species, challenging previous reports (e.g., *M. beecheii*). Our models show that 20 % or less of the areas of predicted presence are under protection, with large proportions corresponding to low-intensity cropland, offering conservation alternatives in disturbed landscapes. This information will assist further studies on potential conservation strategies, and will aid in analyzing and formulating hypotheses regarding the biogeography of these species.

*Melipona* / stingless bee / Central America / Mexico / distribution models / conservation

### 1. INTRODUCTION

Species decline is affecting essential ecosystem services (e.g., pollination); thus the development of biodiversity conservation actions toward preservation of affected species is an urgent need (Cardinale et al. 2012). Distribution data are a key component in developing initiatives aimed at species conservation prioritization (Kujala et al. 2011). However, for most species, especially insects and other invertebrates, this type of data is usually limited or absent (the so-called Wallacean shortfall) (Diniz-Filho et al. 2010). Species distribution modeling (SDM)

has been proposed as an effective method for overcoming this shortfall, assisting in estimating the probability of species occurrence using the few available and sometimes biased distribution records (Diniz-Filho et al. 2010).

Species distribution modeling consists in applying algorithms that relate species occurrence to ecological data (mostly climatic and topographic) in order to obtain potential species distribution (Soberón and Peterson 2005). SDM has been applied to address conservation issues including evaluating species representation within natural protected area networks (Nóbrega and De Marco 2011; Bosso et al. 2013) and identifying optimal values of key environmental variables that favor species survival at broad scales (Rojas-Soto et al. 2008). Species potential distribution models have also been used to support the drawing of geographic limits for species considered taxonomically problematic (Raxworthy et al. 2007) and to understand speciation patterns (Peterson et al. 1999).

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s13592-016-0469-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Corresponding author: C. Yurrita,  
clyurrita@gmail.com  
Manuscript editor: James Nieh

Published online: 21 September 2016



Bees are among the most important pollinators of both wild plants (Ollerton et al. 2011) and crops (Klein et al. 2007). In tropical America, stingless bee species of the genus *Melipona* Illiger, 1806 (Meliponini: Apinae), are considered potentially important pollinators due to their perennial nesting behavior, populations size (>1000 individuals per colony), polylecty but constancy in flower visiting and foraging behavior (buzz pollination) (Slaa et al. 2006). *Melipona* species are eusocial bees exclusive to the Neotropical region, reaching ~60 species in South America and 16 species in Central America and Mexico (CAM). Several species of the genus have cultural and economic importance, since their honey, pollen and wax are frequently used as medicine and food supplements and in religious practices (Ayala et al. 2013). Despite their importance, some *Melipona* species may be at risk at least in a portion of their distribution areas (Cairns et al. 2005). In the context of a global decline in bee populations, preserving the diversity of wild bees, including *Melipona* stingless bees, is essential in maintaining high-quality pollination dynamics (Garibaldi et al. 2013).

Studies on *Melipona* species from CAM have evaluated aspects related to meliponiculture and traditional knowledge (Reyes-González et al. 2014), biology (Macías-Macías et al. 2011), taxonomy and diversity (Ayala 1999; Camargo and Pedro 2008), population genetics (May-Itzá et al. 2012), and conservation threats (Cairns et al. 2005). There exists general knowledge about the distribution of the species in the region (Camargo et al. 1988; Ayala 1999; Roubik and Camargo 2012), yet there are no studies focusing on their distribution patterns or describing the associated ecological characteristics on a broad scale.

Considering the lack of knowledge on the distribution and ecology of *Melipona* species in CAM, and aiming to provide data to develop further studies concerning conservation strategies for these important native bees, this study was designed with three objectives: 1) to develop broad-scale species distribution models, identifying potential geographic divergence among taxonomically related species; 2) to identify key ecological factors (climate, topography, ecoregions) affecting species distribution; and 3) to evaluate conservation conditions of the

species, assessing the proportion of potential species distribution under protection and under agricultural interventions.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Species and study area

We applied SDM to analyze the geographic patterns of 11 *Melipona* species occurring in CAM: *Melipona beecheii* s.l. Bennett, 1831; *M. triplariidis* Cockerell, 1925; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *M. lupitae* Ayala, 1999; *M. yucatanica* Camargo Moure, & Roubik, 1988; *M. phenax* Cockerell, 1919, and *M. micheneri* Schwarz, 1951.

It is possible that *M. beecheii* s.l. (hereafter *M. beecheii*) is a species complex (May-Itzá et al. 2012), but here it is treated as a single taxon. Species for which available locality information was insufficient ( $n < 5$ ) were not included in this study (i.e., *M. carrikeri* Cockerell, 1919; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012, and *M. torrida* Friese, 1917).

The study area corresponds to the known distribution of the *Melipona* genus in CAM, which runs from the Mexican states of Sinaloa and Veracruz to southern Panamá. However, because most of these species show restricted distribution patterns within this geographic area, and in order to avoid excessively extrapolated predictions difficult to interpret (Barve et al. 2011), we restricted the total study area for each species based on identifying both the ecoregions where the species have been collected and adjacent ecoregions. Therefore, the entire study region (CAM) was stratified into six modeling zones (Fig. S1, Online Resource 1). *M. beecheii* has been collected in Cuba and Jamaica, but we did not include these islands in our analysis because of a lack of data collection. Even though some species (i.e., *M. fallax*, *M. micheneri*, *M. phenax*) have been reported as occurring in the northern part of South America, this region was not included because of a lack of data on species occurrence and because previous analysis (not included) failed to predict distribution of these species within that area.

### 2.2. Species record data

Locality records were mainly retrieved from label information of specimens belonging to the collections



listed in Table S1 (Online Resource 1). Other record sources included personal fieldwork and donations from scientific collectors (Table S2, Online Resource 1).

When necessary, geographic coordinates were obtained by means of regional and global atlases supported by the use of geographic information systems (GIS) and Google Earth (Google Inc. 2015). A total of 323 unique localities were used to generate the distribution models presented here (Table S3, Online Resource 1).

### 2.3. Predictive variables

Nineteen bioclimatic variables widely used for generating species distribution models (annual and seasonal trends in precipitation and temperature) were retrieved from the WorldClim database (Hijmans et al. 2005; <http://www.worldclim.org/current>) at 30 arc-second ( $\sim 0.01 \times 0.01$  degrees) spatial resolution. This resolution was chosen to match our species occurrence data resolution (Peterson et al. 2011), and also considering that *Melipona* species have a relatively small flight range ( $\leq 2$  km) (Araújo et al. 2004). In addition, four topographic variables (aspect, compound topographic index [CTI], elevation, and slope) were downloaded from the U.S. Geological Survey's HYDRO1k database (<http://eros.usgs.gov>).

An ecoregion layer (Olson et al. 2001) was used as a predictive (categorical) variable for stratifying zones according to the extent of species occurrence, and to identify species' biogeographic affinities. Spatial data were managed and analyzed using ArcGIS v.10.

Principal component analysis was applied to the 19 bioclimatic variables in order to reduce collinearity and to generate a smaller set of uncorrelated predictive variables (Dormann et al. 2013). A total of five principal components (PCs) were generated, accounting for 100 % of the total variation for each modeling zone (Table S4; Online Resource 1).

The five PCs generated from the bioclimatic data set and the four topographic variables previously mentioned were added as prediction variables for developing ecological niche modeling.

### 2.4. Species distribution modeling

To generate the distribution model for each species, a consensus approach was applied (Araújo and New 2007; Marmion et al. 2009), using five algorithms: support vector machine, generalized linear model,

artificial neural network, GARP, and Maxent. Models generated with the first three methods were obtained by calculating "presence vs. background" models using the ModEco software package (Guo and Liu 2010). GARP and Maxent models were generated using the DesktopGarp (Stockwell and Peters 1999) and Maxent v. 3.3.3k (Phillips et al. 2006). software packages. A brief description of each algorithm is provided in Online Resource 2, and Table S9 (Online Resource 2) shows the parameters used for running each of the five predictive algorithms.

### 2.5. Accuracy assessment

Accuracy assessment for each species and each algorithm was performed by calculating the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC), which evaluates commission vs. omission errors (Fielding and Bell 1997). An AUC value of  $\leq 0.5$  indicates that the model performed no better than random, whereas an AUC of 1 indicates a perfect performance, and an AUC of  $\geq 0.7$  reflects an acceptable model. Accuracy was also assessed by the significance in the proportion of areas predicted (Chi-square test; Anderson and Martínez-Meyer 2004). For species with more than 20 records (*M. fallax*, *M. costaricensis*, *M. solani*, *M. becheii*), 25 % of the total was separated as an independent test sample, while for the remaining species, model accuracy was estimated based on the location of training samples.

### 2.6. Model ensemble

The *median* consensus method (Marmion et al. 2009) was applied to integrate the models generated from the five algorithms into one model for each of the 11 species. Before combining the models, a simple method ( $[(\text{cell value} - \text{minimum})/(\text{maximum} - \text{minimum})]$ ) was applied to standardize the continuous range of values to a scale of 0–1. With the exception of GARP, the algorithms generate models with a potential range of continuous values from 0 to 1. Because the ten best models of GARP were added to obtain a model with corresponding values (i.e., 0–10 as potential range), a transformation was applied so that these models would have the same scale as the other four algorithms.

By examination and visualization of thresholds calculated by each of the algorithms, expert opinion was used to determine the thresholds for each species that



would define binary models (presence/absence) of potential distribution (Table S3, Online Resource 1). The presence boundaries of the binary maps were generalized to facilitate posterior analysis. Physiographic features were used to describe distribution patterns: Marshall's classification (2007) was used for Central America and Cervantes-Zamora et al.'s (1990) for Mexico.

### 2.7. Environmental and conservation characterization of species predicted presence

In order to analyze the range of climatic and topographic conditions modeled as suitable for the presence of each species, binary models were overlaid on the climate and topography layers using ArcGIS v.10. Maxent outputs were used to identify the most important variables that predicted each species distribution, and the most closely correlated bioclimatic variables defining each key PC were identified.

Finally, for evaluating the percentages of species potential distribution subject to protection and agricultural interventions, data on natural protected area boundaries (ProtectedPlanet.net 2015) and the proportion of cropland (Ramankutty et al. 2010) were also spatially associated to predicted presence areas for each species.

## 3. RESULTS

We obtained distribution models (maps) for 11 species of the genus *Melipona* in CAM. The information provided by the models, along with further studies, will be useful for understanding the conservation status of the species and identifying priority areas for conservation planning.

### 3.1. Species potential distribution models

Species models for which accuracy assessment was calculated ( $n > 20$ , Table S3) performed better than expected by chance (e.g., AUC > 0.8975, Table S3). According to the location of species records (Fig. S1), core areas identified as having highest habitat suitability for *Melipona* species (darker shaded areas; Figure 1) are scattered and restricted mainly around collecting localities (e.g., Figure 1h, i), although some species models revealed presence areas in regions with no

neighboring collecting records (e.g., *M. beecheii* along the Pacific coast of Mexico, states of Guerrero and Michoacán; Figure 1a).

Models follow particular discontinuous patterns along their respective modeling zone. For example, models for species of the subgenus *Michmelia* reveal that *M. colimana* is clearly distributed north of *M. fasciata* (Figure 1c, d, respectively), with each species occupying distinctive physiographic provinces (Table S5, Online Resource 1).

According to the models, species are expected to occur at distinct elevation ranges (Fig. S2, Online Resource 1). For instance, *M. colimana* and *M. fasciata* tend to be high-elevation species (65 % of distribution at 1650–2750 m and 550–2200 m, respectively), while other species from the same subgenus, such as *M. solani*, seem to be low-elevation species (<419 m) (Fig. S2 c, d, e, respectively).

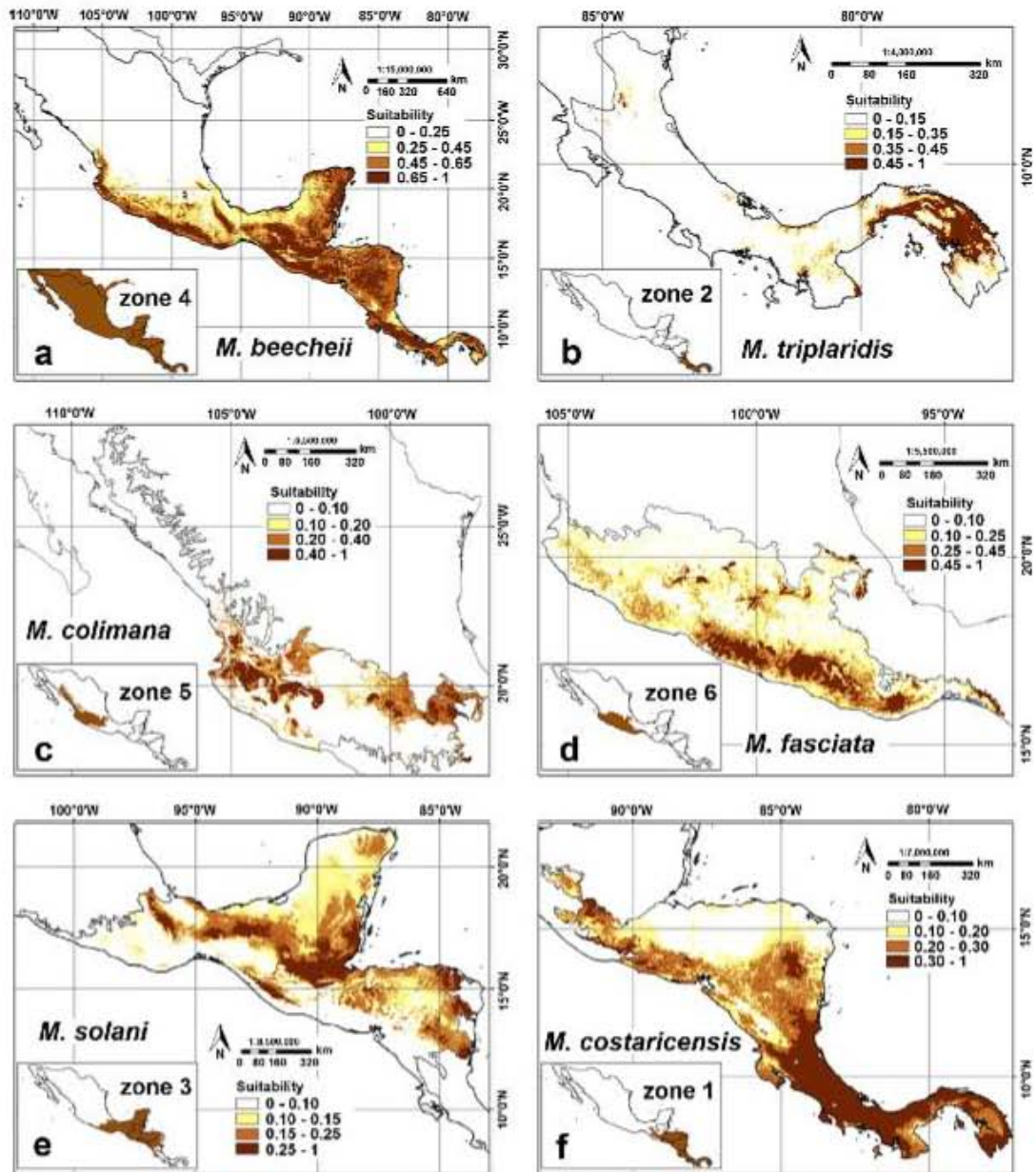
With regard to the biotic conditions associated with the distribution models for each species, potential distribution areas occur in 44 ecoregions (Table S6, Online Resource 1) which correspond to five biomes: deserts and xeric shrublands (DXS), tropical and subtropical coniferous forests (TSCF), tropical and subtropical moist broadleaf forests (TSMBF), tropical and subtropical dry broadleaf forests (TSDBF), and mangroves (M) (Fig. S3, Online Resource 1). Closely related phylogenetic species may share a dominant biome type, yet the variety of ecoregions associated with each species reflects conditions of biotic heterogeneity (Table S6, Fig. S3). For example, models of *M. yucatanica* and *M. lupitae* (subgenus *Melipona*) show a predicted potential distribution mainly within TSDBF (>56 % and >95 %, respectively), but *M. yucatanica* is distributed in a greater variety of ecoregions.

### 3.2. Environmental characterization of species predicted presence

The predictive variables (PC1 to PC5, slope, DEM, aspect, and CTI) that contributed the most in generating the species models differed among species (Table S7, Online Resource 1). However, the most important correlated climatic variables included within the main PCs were recurrent



Distribution of *Melipona* in Central America and Mexico



**Figure 1.** Consensus distribution models of *Melipona* species of CAM. Panels a and b correspond to subgenus *Melikerria*; c to f to subgenus *Michmelia*; h, i and j to subgenus *Melipona*, and k to subgenus *Eomelipona*. Probability estimates of species occurrence is expressed as a continuum; darker colors indicate higher prediction values and lighter colors indicate lower values. The highest prediction interval (darkest shade) was defined using an expert-based threshold (shown as the lower interval limit). Panel l shows the natural protected area (NPA) network within the study region (ProtectedPlanet.net 2015).

among the six geographic zones (Table S4). Examination of Tables S4 and S7 shows that for most of the species, precipitation-related variables (bc12, annual precipitation; bc13, precipitation of

wettest month; and bc16, precipitation of wettest quarter) were the most important in building the models, whereas temperature-related variables (bc4, temperature seasonality; and bc7,

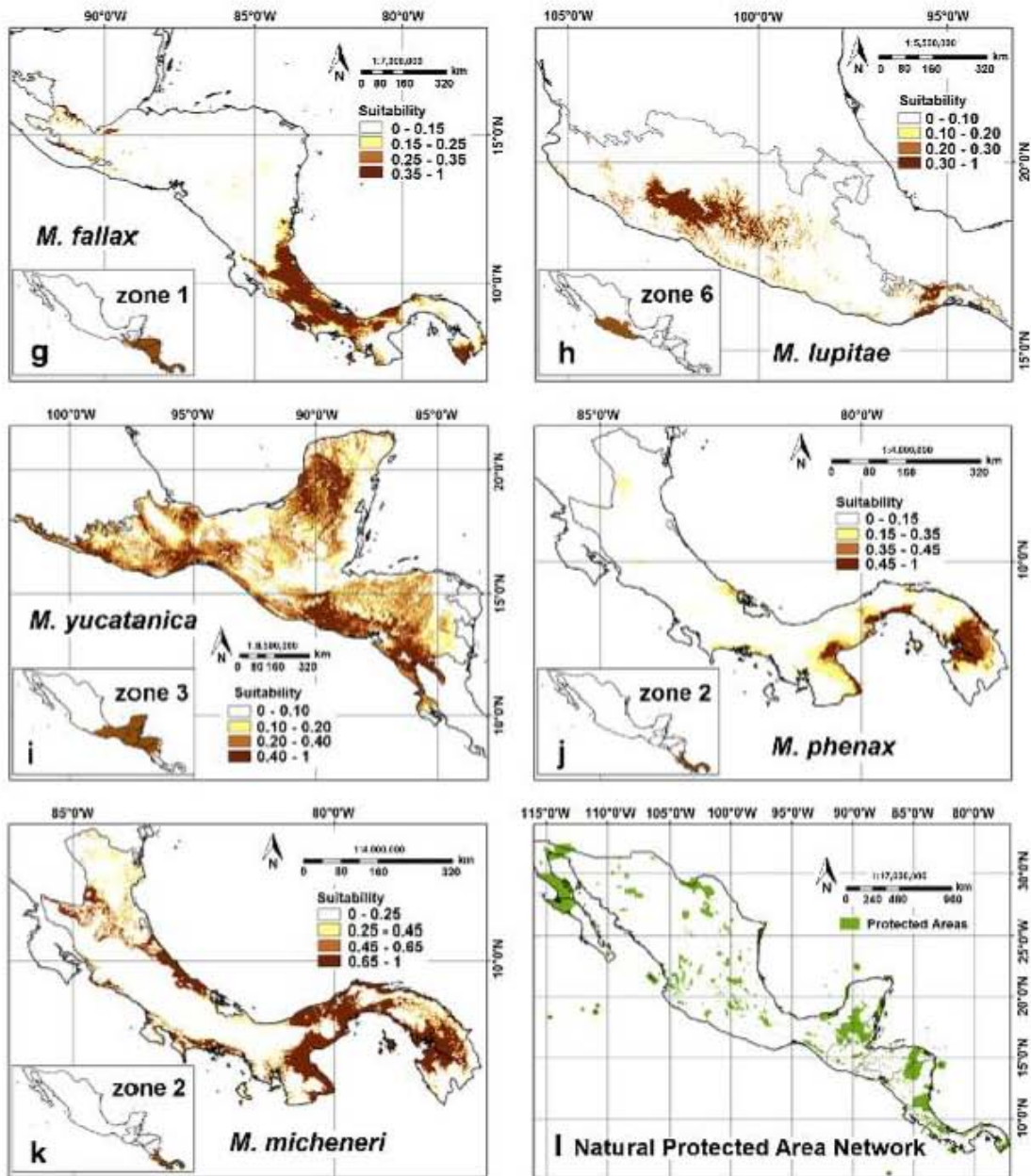


Figure 1 (continued)

temperature annual range) were important only for *M. beecheii*, *M. fasciata*, and *M. yucatanica*. The elevation variable (DEM) accounted for >40 % in producing the models for *M. triplaris*, *M. colimana*, *M. phenax*, and *M. micheneri*.

Patterns regarding the type and values of key bioclimatic variables determining the distribution

model characteristics (e.g., “optimum” habitat values) differed among species (Fig. S4, Online Resource 1). Some species experience a narrow optimal range of climatic conditions, while others seem to be more tolerant, having more widespread distribution along the bioclimatic gradient. Some variables are important in delimiting the potential distribution for several species in the same



subgenus, but each species is expected to be distributed mainly within specific variable intervals (e.g., subgenus *Michmelia* Fig. S4a, b, c, d).

The species *M. yucatanica* shows a specific pattern with respect to variable bc4, having two well-defined “optimal condition” ranges (437–900 and 1825–2288) (Fig. S4t). These intervals roughly correspond spatially to two main areas along the Pacific coast of Mexico, Guatemala, El Salvador, and Nicaragua, and along southeastern Mexico (Veracruz, Campeche, Yucatán, and Quintana Roo states).

### 3.3. Conservation characterization of species predicted presence

For most of the species, less than 20 % of the predicted presence is included within recognized natural protected areas (NPAs) (Fig. S5, Online Resource 1). The species with the lowest proportional area included within NPAs (<1 %) is *M. yucatanica*, while *M. fallax* shows the highest (53 %) (Fig. S5i and g, respectively). Interestingly, a small proportion of protected fragments is larger than 100 km<sup>2</sup> (Table S8, Online Resource 1).

The proportion of predicted areas included in NPAs (Fig. S5) revealed two characteristic scenarios resulting from the combination of extent and location of modeled species occurrence and existing NPAs: For some species, such as *M. fallax* and *M. costaricensis*, for which a large proportion of predicted occurrence is confined to Costa Rica and Panamá (>37 % and >33 % for each species in each country), a large portion of such area (>45 % and >29 %) is under protection (Fig. S5f and g). On the other hand, *M. colimana*, *M. fasciata*, and *M. lupitae*, for which potential distribution is located exclusively in Mexico, exhibit a respective 18 %, 5 %, and 16 % of their distribution under protection (Fig. S5c, d, h).

A large proportion (>60 %) of predicted distribution areas for several species (*M. beecheii*, *M. triplaris*, *M. fasciata*, *M. solani*, *M. costaricensis*, *M. fallax*, *M. lupitae*, *M. phenax*, and *M. Micheneri*) is located in areas with the lowest cropland intensity (0–20 %). In contrast, *M. yucatanica* and *M. colimana* show ~60 % of their distribution in areas with higher

(0–40 %) cropland intervention (Fig. S6; Fig. S7, Online Resource 1).

## 4. DISCUSSION

In this work, we modeled potential distribution for 11 *Melipona* species of CAM, identifying key associated environmental and ecological conditions. The scattered appearance of predicted core areas may be related in part to the merging of the models, but also to the fragmented availability of optimal conditions, as has been suggested for other *Melipona* species (e.g., *M. capixaba*; Serra et al. 2012).

One important assumption in modeling distribution is that the data used to produce models come from source populations (Phillips et al. 2006) whose area of distribution is determined mainly by the interplay of biotic and abiotic characteristics that allow positive growth rates of the species, and the area accessible to the species over time (Soberón and Peterson 2005). It has also been shown that for geographically restricted species, small sample size may yield accurate models provided that the sample is not biased and accurately represents the geographic extent of the species (Tessarolo et al. 2014). Here, models of species with small sample size (e.g., *M. lupitae*, *M. micheneri*) show distribution patterns that appear to be restricted to areas around collection localities, which may be associated with the rarity of the species and their likely narrow environmental tolerance. Moreover, in order to avoid under- or over-prediction (Barve et al. 2011), we stratified the entire study area into zones that may better represent the areas that have been accessible to each species; therefore, we presume that our models are a close approximation to the species’s potential distribution patterns.

In contrast, for species with wider distribution such as *M. beecheii*, areas were predicted for regions where no collection records exist, suggesting poor surveying in those regions or climatic and/or geographic barriers that have prevented species from reaching those areas. Another possible explanation is that some occurrence data may come from sink habitats—that is, habitats that do not meet the required biotic and abiotic conditions for species growth, but that remain within the area



accessible to the species (Soberón and Peterson 2005). Such data may produce models that overestimate the distribution area of a species, predicting its presence, albeit with lower probability, in areas not suitable for its persistence (Soley-Guardia et al. 2014).

Despite the low reliability of models based on spatially biased samples of any size, surveys must be recommended at sites predicted as suitable in order to increase the chance of collection, or at least to confirm their absence at those places (Le Lay et al. 2010). Although these types of models are not appropriate for setting forth conservation strategies (Wisz et al. 2008), they have been useful for discovering new species and new populations of known species (Raxworthy et al. 2003).

Recent surveys of *M. beecheii* and *M. lupitae* carried out at locations where models confirm documented species occurrence (e.g., Chamela, Jalisco, and Balsas basin, Michoacán, respectively) have failed to supply new specimens. Several hypotheses can explain this situation, including a decrease in species population due to intervening factors such as increased competition for floral resources as a result of the relatively recent regional spread of the invasive Africanized honey bee (Cairns et al. 2005).

Some of the modeled species are frequently used in meliponiculture, activity that includes the transport of nests to new localities by humans. These actions should be taken into account because of the “sink records” effect associated with over-predicted distribution areas, which in reality are unsuitable for the species (Soley-Guardia et al. 2014). This may be the case with *M. beecheii*, for which predicted distribution values in the central part of the Yucatán Peninsula seem unexpectedly low, given that it is largely reared in the region. Based on our findings, the suggestion by Cairns et al. (2005) of a possible decline in *M. beecheii* populations in this region could be re-interpreted as a retraction from its actual distribution due to specific environmental and ecological conditions. If that is the case, this supports the importance of employing SDM to better understand the biogeographic patterns of bee species.

The differential contribution of precipitation- and temperature-related variables in building the models of each species may have important

implications for species future survival, as projections based on the MMD-A1B models (multi-model data sets for IPCC scenario A1B) expect a rise in temperature (1.8–5 °C) and a reduction in precipitation in CAM (Christensen et al. 2007).

Some authors have found a high degree of niche conservatism between allopatric closely related species (Peterson et al. 1999), while others have found a considerable niche divergence (Raxworthy et al. 2007). Here, we found that the distribution model for *M. yucatanica* (Figure 1i), shows two clearly divergent areas in both geographic and environmental space which correspond to genetically differentiated populations (May-Itzá et al. 2010). These findings have conservation implications, since specific management strategies could be planned for each population, but also support the suggestion of the existence of two distinct species. Moreover, even when their modeling areas partially overlap, models for some morphologically similar and closely related phylogenetic species show clearly disjunct distribution areas associated with particular environmental variables and ecological conditions (Figure 1c vs. d, d vs. e, e vs. f, and h vs. i; Fig. S4), whereas other closely related species show overlapping distribution (Figure 1f vs. g). Based on this findings, and following other studies that have shown that allopatric sister bee species differ in their potential distribution and realized niche characteristics (Silva et al. 2014), an integrative approach is recommended for reviewing the taxonomic status of these *Melipona* species, including niche analysis methods to assess niche characteristics and explain speciation patterns, in order to produce more robust species hypotheses.

The relatively small proportion of predicted presence in NPAs (<20 %) and the fact that total areas show different levels of crop intensity represent challenging scenarios for the conservation of *Melipona* species in CAM; these species are nest forest-dependent, as they rely on mature trees (>20 cm in diameter) with suitable cavities for nesting (Antonini and Martins 2003). Guatemala, where annual deforestation rates reach 1.53 % (Tuy et al. 2009), is an example of how the areas of low cropland intensity that characterize most of *Melipona* species models are coming under increasing land use transformation linked to crop intensity, which along with the use of



pesticides may negatively affect bee populations (Slaa et al. 2006).

Considering that a large proportion of predicted distribution is located in areas mapped as low cropland intensity (Fig. S6, S7), one might hypothesize that such areas may represent suitable habitats for *Melipona* species because of the interaction between the flowering dynamics of agricultural practices and the availability of nesting cavities necessary for reproduction and colony survival that natural and semi-natural habitats provide. This may be especially important in species with restricted potential distribution (e.g., *M. micheneri*, *M. lupitae*) or with a narrow tolerance of environmental conditions (e.g., *M. fasciata*, *M. colimana*), which may be more vulnerable to environmental changes associated with deforestation, other land use changes, and climate change.

Although *Melipona* species are nest forest-dependent, they are polylectic, and are thus able to exploit floral resources available in transformed habitats (Brown and De Oliveira 2014). Further studies and conservation strategies should focus on evaluating the roles of traditional crop systems (as opposed to industrialized systems) and habitat heterogeneity (Fahrig et al. 2011) along the different core areas of the distribution models proposed here.

*Melipona* species models show three main areas of potential distribution in CAM—southern Central America, inner Central America, and south-central Mexico (north of the Tehuantepec Isthmus)—which correspond approximately to three main areas of terrestrial endemism (Marshall and Liebherr 2000). The fact that these patterns are shared with those of other stingless bee species (Ayala et al. 2013), and that *Melipona* species are able to make use of floral resources existing in transformed habitats, may suggest that conservation strategies could be promoted by favoring landscape heterogeneity in the form of agroforestry systems (Hoehn et al. 2010) or low-intensity cropland (Schüepf et al. 2012). This approach could be combined with the creation of new NPAs such as biosphere reserves for which human interventions are considered part of conservation practices (Guillen-Calvo et al. 2009), particularly on the Pacific coast, since there are only a few scattered NPAs (Figure 11).

A final implication of both size (i.e., the NPAs include individual areas >100 km<sup>2</sup>) and location of NPAs with regard to the proposed species distribution models suggests the potential availability of species distribution “expansion areas”, particularly for scenarios where species distribution patterns may change, whether due to climate change (Thomas et al. 2012) or human economic activities (e.g., expansion of cropland).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Aguilar, J. Ascher, E. Cano, N. Arnold, K. Cantarero, A. Castellanos, E. Enríquez, E. Herrera, S. Javoreck, O. Macías-Macías, M.C. Mayorga, J. Mérida, M. Ortiz, L. Packer, J.J.M. Quezada-Euán, J.M. Rosales, D. Roubik, J. Rozen, and C. Schüepf, for providing samples. This paper fulfills the requirement for the “Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas” of the “Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)”. C.L.Y. thanks Dr. Y. Tabaru and Dr. C. Monroy for financial support; Dr. L. Packer (York University, Canada) and the Foreign Affairs and International Trade Canada (DFAIT) for participating in the Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP), and the “Universidad de San Carlos de Guatemala” for participating in the UNAM-USAC cooperation program. Finally, we thank D. Paiva Silva and an anonymous reviewer for valuable suggestions on previous versions of this manuscript.

**Author contributions** C.L.Y., M.A.OH., and R.A. conceived the ideas; C.L.Y. and M.A.OH. analysed the data; C.L.Y. and M.A.OH. wrote the manuscript; and C.L.Y., M.A.OH., and R.A. participated in the discussion of the results.

**Analyse de la répartition des abeilles sans aiguillon du genre *Melipona* (Apidae: Meliponini) en Amérique centrale et au Mexique: établissement de données de base en vue de leur conservation**

***Melipona* / modèle de distribution / conservation / protection des espèces**

**Untersuchung zur Verbreitung von stachellosen Bienen der Gattung *Melipona* (Apidae: Meliponini) in Zentralamerika und Mexiko: Grundlegende Informationen für den Artenschutz**

***Melipona* / stachellose Biene / Zentralamerika / Mexiko / Verbreitungsmodelle / Artenschutz**



## REFERENCES

- Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E. (2004) Modeling species' geographic distributions for conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biol. Conserv.* **116**, 167–179
- Antonini, Y., Martins, R.P. (2003) The value of a tree species (*Caryocar brasiliense*) for a stingless bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. *J. Insect Conserv.* **7**, 167–174
- Araújo, M.B., New, M. (2007) Ensemble forecasting of species distributions. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 42–47
- Araújo, E.D., Costa, M., Chaud-Netto, J., Fowler, H.G. (2004) Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Braz. J. Biol.* **64** (3B), 563–568
- Ayala, R. (1999) Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomol. Mex.* **106**, 1–123
- Ayala, R., Gonzalez, V.H., Engel, M.S. (2013) Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution and indigenous knowledge. In: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (eds.) *Pot-Honey a Legacy of Stingless Bee*, pp. 135–152. Springer, New York
- Barve, N., Barve, V., Jiménez-Valverde, A., Lira-Noriega, A., Maher, S.P., et al. (2011) The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecol. Model.* **222** (11), 1810–1819
- Bosso, L., Rebelo, H., Garonna, A.P., Russo, D. (2013) Modelling geographic distribution and detecting conservation gaps in Italy for the threatened beetle *Rosalia alpina*. *J. Nat. Conserv.* **21** (2), 72–80
- Brown, J.C., De Oliveira, M.L. (2014) The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. *Apidologie* **45**, 172–188
- Cairns, C.E., Villanueva-Gutiérrez, R., Koptur, S., Bray, D.B. (2005) Bee populations, forest disturbance, and africanization in Mexico. *Biotropica* **37** (4), 686–692
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. (2008) Revision of the species of *Melipona* of the *fuliginosa* group (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Entomol.* **52** (3), 411–427
- Camargo, J.M.F., Moure, J.S., Roubik, D.W. (1988) *Melipona yucatanica* new species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae); stingless bee dispersal across the Caribbean Arc and post-Eocene vicariance. *Pan Pac. Entomol.* **64**, 147–157
- Cardinale, B.J., Duffy, E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., et al. (2012) Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486** (7401), 59–67
- Cervantes-Zamora, Y., Cornejo-Olgín, S.L., Lucero-Márquez, R., Espinoza-Rodríguez, J.M., Miranda-Viquez, E. (1990) 'Provincias Fisiográficas de México'. Extraído de Clasificación de Regiones Naturales de México II, IV.10.2. Atlas Nacional de México. Vol. II. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México. [online] <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=rfisio4mgw> (accessed on 16 november 14)
- Christensen, J.H., Hewitson, B., Busuioc, A., Chen, A., Gao, X., et al. (2007) Regional Climate Projections. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., et al. (eds.) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge
- Diniz-Filho, J.A.F., De Marco Jr., P., Hawkins, B.A. (2010) Defying the curse of ignorance: Perspectives in insect macroecology and conservation biogeography. *Insect Conserv. Divers.* **3**, 172–179
- Dormann, C.F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., et al. (2013) Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography* **36** (1), 27–46
- Fahrig, L., Baudry, J., Brotons, L., Burel, F.G., Crist, T.O., et al. (2011) Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecol. Lett.* **14** (2), 101–112
- Fielding, A.H., Bell, J.F. (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ. Conserv.* **24**, 38–49
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, et al. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* **339** (6127), 1608–1611
- Google Inc. (2015) Google Earth, version 7.1.5.1557
- Guillen-Calvo, G., Fonte, M., Heinemann, J., Ishii-Eiteman, M., Jiggins, J., et al. (2009) *Towards Sustainable Agriculture. Policy Brief No. 8. UNESCO-SCOPE-UNEP*, Paris
- Guo, Q., Liu, Y. (2010) ModEco: An integrated software package for ecological niche modeling. *Ecography* **33**, 637–642
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* **25**, 1965–1978
- Hoehn, P., Steffan-Dewenter, I., Tschardtke, T. (2010) Relative contribution of agroforestry, rainforest and openland to local and regional bee diversity. *Biodivers. Conserv.* **19** (8), 2189–2200
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschardtke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* **274** (1608), 303–313
- Kujala, H., Araújo, M.B., Thuiller, W., Cabeza, M. (2011) Misleading results from conventional gap analysis—Messages from the warming north. *Biol. Conserv.* **144** (10), 2450–2458



## Distribution of *Melipona* in Central America and Mexico

- Le Lay, G., Engler, R., Franc, E., Guisan, A. (2010) Prospective sampling based on model ensembles improves the detection of rare species. *Ecography* **33** (6), 1015–1027
- Macías-Macías, J.O., Quezada-Euán, J.J.G., Contreras-Escareño, F., Tapia González, J.M., Moo-Valle, H., Ayala, R. (2011) Comparative temperature tolerance in stingless bee species from tropical highlands and lowlands of Mexico and implications for their conservation (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Apidologie* **42** (6), 679–689
- Marmion, M., Parviainen, M., Luoto, M., Heikkinen, R.K., Thuiller, W. (2009) Evaluation of consensus methods in predictive species distribution modelling. *Divers. Distrib.* **15**, 59–69
- Marshall, J.S. (2007) Geomorphology and physiographic provinces of Central America. In: Bundschuh, J., Alvarado, G. (eds.) *Central America: Geology, Resources, and Natural Hazards*, pp. 75–122. Balkema, Leiden
- Marshall, C.J., Liebherr, J.K. (2000) Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *J. Biogeogr.* **27** (1), 203–216
- May-Itzá, W.D.J., Quezada-Euán, J.J.G., Medina-Molina, L.A., Enríquez, E., De la Rúa, P. (2010) Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conserv. Genet.* **11**, 2079–2084
- May-Itzá, W.D.J., Quezada-Euán, J.J.G., Ayala, R., De La Rúa, P. (2012) Morphometric and genetic analyses differentiate Mesoamerican populations of the endangered stingless bee *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponidae) and support their conservation as two separate units. *J. Insect Conserv.* **16** (5), 723–731
- Nóbrega, C.C., De Marco Jr., P. (2011) Unprotecting the rare species: a niche-based gap analysis for odonates in a core Cerrado area. *Divers. Distrib.* **17**, 491–505
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S. (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* **120**, 321–326
- Olson, D.M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E.D., Burgess, N.D., Powell, G.V.N., et al. (2001) Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth. *Bioscience* **51** (11), 933–938 [online]: <http://www.worldwildlife.org/publications/terrestrial-ecoregions-of-the-world> (accessed on 16 september 14)
- Peterson, A.T., Soberón, J., Sánchez-Cordero, V. (1999) Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* **285**, 1265–1267
- Peterson, A.T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., et al. (2011) *Ecological Niches and Geographic Distributions* (MPB-49) (No. 49). Princeton University Press, New Jersey
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* **190**, 231–259
- ProtectedPlanet.net (2015) World Database on Protected Areas (WDPA). UNEP, WCMC, IUCN [online]: <http://www.protectedplanet.net/> (accessed on 18 november 14)
- Ramankutty, N., Evan, A.T., Monfreda, C., Foley, J.A. (2010) *Global Agricultural Lands: Croplands, 2000*. Data distributed by the Socioeconomic Data and Applications Center (SEDAC) [online]: <http://sedac.ciesin.columbia.edu/data/set/aglands-croplands-2000> (accessed on 16 november 14)
- Raxworthy, C.J., Martínez-Meyer, E., Horning, N., Nussbaum, R.A., Schneider, G.E., et al. (2003) Predicting distributions of known and unknown reptile species in Madagascar. *Nature* **426**, 837–841
- Raxworthy, C.J., Ingram, C.M., Rabibisoa, N., Pearson, R.G. (2007) Applications of ecological niche modelling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Syst. Biol.* **56**, 907–923
- Reyes-González, A., Camou-Guerrero, A., Reyes-Salas, O., Argueta, A., Casas, A. (2014) Diversity, local knowledge and use of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the municipality of Nocupétaro, Michoacan, Mexico. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **5**, 10–47
- Rojas-Soto, O.R., Martínez-Meyer, E., Navarro-Sigüenza, A.G., Oliveras de Ita, A., Gómez de Silva, H., Peterson, A.T. (2008) Modeling distributions of disjunct populations of the Sierra Madre sparrow. *J. Field Ornithol.* **79** (3), 245–253
- Roubik, D.W., Camargo, J.M.F. (2012) The Panama microplate, island studies and relictual species of *Melipona* (*Melikerria*) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Syst. Entomol.* **37** (1), 189–199
- Schüepf, C., Rittiner, S., Entling, M.H. (2012) High bee and wasp diversity in a heterogeneous tropical farming system compared to protected forest. *PLoS ONE* **7** (12), e52109. doi:10.1371/journal.pone.0052109
- Serra, B.D.V., De Marco, P., Nóbrega, C.C., de Oliveira Campos, L.A. (2012) Modeling potential geographical distribution of the wild nests of *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera, Apidae): Conserving isolated populations in mountain habitats. *Braz. J. Nat. Cons.* **10**, 199–206
- Silva, D.P., Vilela, B., De, M., Jr, P., Nemésio, A. (2014) Using ecological niche models and niche analyses to understand speciation patterns: The case of sister Neotropical orchid bees. *PLoS ONE* **9** (11), e113246. doi:10.1371/journal.pone.0113246
- Slaa, E.J., Sánchez-Chaves, L.A., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* **37** (2), 293–315
- Soberón, J., Peterson, A.T. (2005) Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodivers. Inform.* **2**, 1–10
- Soley-Guardia, M., Radosavljevic, A., Rivera, J.L., Anderson, R.P. (2014) The effect of spatially marginal localities in modelling species niches and distributions. *J. Biogeogr.* **41** (7), 1390–1401



- Stockwell, D.R.B., Peters, D.P. (1999) The GARP modelling system: Problems and solutions to automated spatial prediction. *Int. J. Geogr. Inf. Syst.* **13**, 143–158
- Tessarolo, G., Rangel, T.F., Araújo, M.B., Hortal, J. (2014) Uncertainty associated with survey design in Species Distribution Models. *Divers. Distrib.* **20** (11), 1258–1269
- Thomas, C.D., Gillingham, P.K., Bradbury, R.B., Roy, D.B., Anderson, B.J., et al. (2012) Protected areas facilitate species' range expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (35), 14063–14068
- Tuy, H., Gálvez, J., García, E., Sandoval, C., Pineda, P. (2009) Bosque: la piedra angular de la estabilidad territorial, in: Gálvez, J. and Cleaves, C. (Eds.), *Perfil Ambiental de Guatemala 2008–2009: las señales ambientales críticas y su relación con el desarrollo*. Universidad Rafael Landívar, Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Guatemala, pp. 65–91
- Wisz, M.S., Hijmans, R.J., Li, J., Peterson, A.T., Graham, C.H., Guisan, A., et al. (2008) Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Divers. Distrib.* **14** (5), 763–773

## 4. CAPÍTULO 2

### Species delineation in the Mesoamerican bee *Melipona beecheii* Bennet 1831 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) based on morphological, ecological and DNA sequence evidence

Carmen L. Yurrita<sup>1,2</sup> and Ricardo Ayala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Distrito Federal, México.

<sup>2</sup>Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

<sup>3</sup>Estación de Biología Chamela, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado postal 21, San Patricio, Jalisco 48980, México

#### Abstract

The stingless bee *Melipona beecheii* distributes from Northern Mexico to Costa Rica. This species is important both ecologically and culturally, and it is threatened by its increasing habitat loss. Applying effective conservation strategies requires the accurate definition of this species, but it has been suggested that it actually represents a complex composed of at least two species. Here we applied integrative taxonomy using DNA barcoding sequence, morphological and ecological niche modeling evidence to assess the species boundaries in *M. beecheii*. Molecular evidence supports the existence of at least seven independent lineages while morphological data only recognizes three morphotypes. One of them, the *M. beecheii* morphotype 1, is morphologically very distinctive from the remaining ones, includes four of the seven genetic lineages, and coincides with the taxon formerly identified as *M. nigripes*. The remaining morphotypes on the other hand show slight morphological differences between them, whereas ecological niche models consistently recover the three morphotypes separately. Based on our results, we propose that the name *M. nigripes* Friese 1900 should be resurrected to include the geographically and morphologically distinct *M. beecheii* morphotype 2 populations, whereas the remaining populations remain under the name of *M. beecheii*. The proposed delimitation sets the basis to implement species-specific conservation strategies, and illustrates the benefits of integrative approaches in species delimitation.

**Key words:** *Melipona beecheii*, integrative taxonomy, DNA barcoding, distribution

## Introduction

Species lists are the basis of conservation strategies actions around the world (Rodrigues *et al.*, 2006). In order to apply such strategies, having an accurate delimitation of species is crucial (Mace *et al.* 2007). Recent progress in taxonomic knowledge and the availability of different and more accurate kinds of data and methods have enhanced the discovery of new species (Sangster, 2009). The integrative taxonomic approach, or simultaneous integration of multiple lines of evidence, has particularly led to the discovery of more accurate species boundaries and has produced more robust hypotheses on species delimitation (Gibbs 2009). This approach is especially useful in delimiting boundaries within taxonomically difficult species (Raxworthy *et al.* 2007; Lumley & Sperling, 2010; Ross *et al.* 2010; Reeves & Richards 2011).

In tropical regions, native social bees are among the most important pollinators, making their taxonomic study relevant. However, species identification in this group based on morphology alone is often difficult because of their character uniformity. The use of complementary tools, such as molecular data and ecological niche differentiation, are therefore necessary to have a deeper understanding of species' boundaries.

The stingless bee genus *Melipona* belongs to the tribe Meliponini (Apinae: Apidae). This genus is distributed in the tropical regions of the world. Meliponines are true social insects that form large colonies (100 to up to 100 000 individuals) (Michener 2007). The honey and pollen that they store in their hives have been used as a source of medicine and food for thousands of years by different cultures (Villanueva *et al.* 2005; Posey 1982). Stingless bees are key pollinators of many crops and wild plants (Heard 1999; Slaa *et al.* 2006), and thus their conservation is ecologically and culturally important.

*Melipona beecheii* is a stingless bee species endemic to Mexico and Central America, and it is by far the most exploited stingless bee species in the region. However, the species is threatened in at least some part of its distribution range due to habitat loss (Villanueva *et al.* 2005). Since conservation strategies are determined on the basis of species characteristics (ecological, biological, physiological and others), having a clear understanding of the limits of species' boundaries within *M. beecheii* complex is crucial for their conservation.

*Melipona beecheii* Bennett, 1831 has been previously considered as a complex composed of at least two additional species (Quezada-Euán *et al.* 2007). Along its geographic distribution range, two other similar species have been described, *M. nigripes* Friese, 1900 with an exclusively continental distribution, and *M. fulvipes* Guérin-Meneville, 1844, occurring in

Cuba, Jamaica, northern Guatemala, Belize and Yucatan in Mexico. Schwarz (1932) synonymized the latter two species with *M. beecheii*, and kept *M. b. fulvipes* and *M. b. beecheii* as subspecies. Other authors, however, subsequently combined these two subspecies under the name of *M. beecheii* (Ayala 1999; Camargo & Pedro 2012).

Recent molecular studies offered evidence that show a considerably high genetic variation among populations of *M. beecheii* along its geographic distribution (De La Rua et al. 2007; Quezada-Euán et al. 2007; May-Itzá et al. 2009). Based on a morphometric analysis and a phylogenetic analysis of ITS 1 sequence data of individuals from Yucatan and Central America, May-Itzá et al. (2012) reported the existence of two taxonomic units, one distributed along southern Mexico from the Yucatan peninsula to the north of Guatemala, and the other one in Central American from southern Guatemala to Costa Rica. These authors suggested that the two forms correspond to the two previously recognized subspecies, *M. b. fulvipes* and *M. b. beecheii* respectively. This evidence established the basis for further assessment of the species boundaries in this important stingless bee complex.

The aim of this work is to assess the species boundaries within the culturally and ecologically important but threatened stingless bee complex *M. beecheii*, Bennett, 1831. We followed the general lineage species concept (de Queiroz 2007) to delineate species boundaries. According to this concept a species is understood as a separately evolving metapopulation lineage, which boundaries can be evaluated using multiple criteria such as monophyly, biological isolation and others that appear at different times during the process of speciation.

Based on morphological examination of specimens, DNA barcodes, and geographical distribution data we tested three criteria: 1) diagnosability (group diagnosable by a unique combination of fixed characters) based on morphology (Grismer 1999); 2) genetic distance by using the 2% COI distance approach (Hebert et al. 2003) based on DNA barcoding data, and 3) niche specialization (van Valen, 1976). We also provide a key to the recognized species in the complex and discuss the implications of our results in its taxonomy, and consequently, on its conservation.

## **Methods**

### *Morphology and taxonomy*

A total of 296 specimens belonging to the *M. beecheii* complex were studied from the following collections in order to evaluate the diagnosability criterion based on morphology:

AMNH	American Museum of Natural History, New York	Dr. Jerome Rozen
EBCh	Colección de Abejas, Estación de Biología “Chamela, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México	Dr. Ricardo Ayala
MZFC	Colección de Abejas, Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México	Dra. Olivia Yañez
CNIN	Colección Nacional de Insectos, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México	M.C. Cristina Mayorga
Mushnat	Colección Entomológica, Museo de Historia Natural, Universidad de San Carlos de Guatemala	Dr. Enio Cano
CANG	Colección de Abejas Nativas del Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala	Eunice Enríquez
Cinat	Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales –CINAT, Universidad Nacional de Costa Rica	Dr. Ingrid Aguilar
Inbio	Instituto Nacional de Biodiversidad –INBio-, Costa Rica	Manuel Zumbado
UNAH	Museo de Insectos, Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Karla Cantarero
CNC	Canadian National Collection, Ottawa, Canada	Dr. Andrew Bennett
PCYU	Packer Collection York University, Toronto, Canada	Dr. Laurence Packer

We examined five external characters for morphospecies discrimination (Table 1). *Melipona* species usually are identified based mainly on the color pattern of the pilosity (Schwarz 1932; Roubik 1992; Ayala 1999). Here we employed color patterns of the tegument, and measurements of body and pilosity. Bees were examined using an Olympus SZ61 stereomicroscope. Images of the specimens’ morphological structures were obtained with the high-resolution digital photo imaging system VHX 600 (Digital Microscope, Keyence), and edited using GIMP 2.8.14 (The GIMP team, [www.gimp.org](http://www.gimp.org), 1995-2014). Terminology of the morphological structures followed Michener (2007).

**Table 1.** List of the five features used to discriminate morphospecies within the *M. beecheii* complex. The observed variation is included.

Species	Character				
	Size (mm)	Parocular marks	Clypeus	T5 disc pilosity	Pilosity in T4 apex
<i>M. beecheii</i>	8.8 – 9.8	Evident, bright yellow, widening towards the tentorial pit	With median wide yellow mark	abundant, simple, short, orange	Fringe of simple, short (~0.14 mm), yellowish hairs
<i>M. nigripes</i>	10.1 - 10.2	Not evident, or very thin,	with a very subtle and thin brown-yellow median line	scarce, simple, whitish	Fringe of plumose, large (~0.25 mm), whitish hairs

*Molecular methods and analysis*

We analyzed 58 DNA barcode sequences, two of specimens belonging to outgroup species (*M. costaricensis* Cockerell, 1919 and *M. solani* Cockerell, 1912 and 56 to specimens assigned to the *M. beecheii* complex, which were collected along its entire geographic distribution range. Sequences were uploaded to BOLD (the Barcode of Life Data System) and are publicly available. Specimens were mounted and deposited at the York University, Toronto, Canada (PYUC collection), and the San Carlos University of Guatemala, Guatemala (CANG collection). Specimens from which the DNA samples were extracted bear a green label with the number that links them with the DNA sample. The material used in this study is listed in Table 2.

**Table 2.** *Melipona* species and outgroups included in the phylogenetic inference. DNA barcode information, with BOLD process ID, sequence length and origin (state/province and country using name codes established in ISO 3166-1 and ISO 3166-2) are displayed.

Genus	Species	Process ID	Length (bp)	Country	State or Province
<i>Melipona</i>	<i>M. costaricensis</i>	BOFG138-11	658	NI	JI
	<i>M. solani</i>	BREUG096-11	658	GT	PE
	<i>M. beecheii</i> s.l.	BOFG157-11	614	GT	PE
		BOFG172-11	614	GT	PE
		BEECB179-07	630	CU	
		BOFG167-11	632	GT	PE
		Mel22	640	MX	OC
		BOFG134-11	651	GT	RE
		BWONE202-09	654	GT	QC
		BWONE203-09	654	GT	BV
		BWONE204-09	654	GT	AV
		BEECA768-07	654	CU	
		BEECA769-07	654	CU	
		DRBEE805-11	654	MX	QR
		DRBEE806-11	654	MX	QR
		BOFG163-11	655	NI	JI
		BOTWA1129-11	658	CU	
		BOTWA1134-11	658	MX	CS
		BOWGF985-10	658	BZ	CA
		COFC266-10	658	MX	CS
BOFG096-11	658	GT	CQ		
BOFG104-11	658	MX	QR		
BOFG109-11	658	GT	JU		
BOFG121-11	658	NI	JI		

BOFG125-11	658	GT	SO
BOFG128-11	658	GT	QC
BOFG130-11	658	GT	HU
BOFG135-11	658	GT	QC
BOFG145-11	658	CR	A
BOFG147-11	658	NI	JI
BOFG152-11	658	NI	JI
BOFG190-11	658	CR	A
BREUG101-11	658	NI	JI
BOFG192-11	658	MX	YN
BOFG196-11	658	MX	CS
BOFG204-11	658	BZ	CA
BOFG207-11	658	BZ	CA
BOFG210-11	658	MX	YN
BOFG213-11	658	MX	YN
BOFG215-11	658	BZ	CO
BOFG217-11	658	BZ	BE
BOFG219-11	658	MX	CS
BOFG221-11	658	MX	YN
BOFG222-11	658	MX	YN
BOFG257-11	658	BZ	SC
BEECA754-07	658	CU	
Mel10	658	GT	AV
Mel11	658	MX	OC
Mel12	658	MX	CS
Mel15	658	MX	CS
Mel28	658	BZ	CO
Mel56	658	GT	CM
Mel71	658	BZ	CO
Mel74	658	MX	OC
Mel75	658	GT	SA
Mel80	658	GT	HU

---

Part of the DNA extraction, PCR, and sequencing were carried out at the Canadian Centre for DNA Barcoding at Guelph University (Guelph, Ontario) employing the standard protocols mentioned by Hebert et al. (2003), and are available online at <http://www.dnabarcoding.ca/page/research/protocols>. Primers used for amplification of COI were LepF1 and LepR1 (Hebert et. al. 2004).

Additional samples were processed at the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB UNAM). Genomic DNA was extracted from the middle or hind leg of each individual using the GeneAll® Exgene™ Tissue SV mini kit following the

manufacturer's protocol. Primers used for amplifying DNA were LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and LCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). PCRs were performed using 2-4 µl of DNA sample (40-50 ng) in 19-23 µl of mix. Mix contained 10 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM dNTP, 0.5 µM of each primer and 1 U of Platinum Taq polymerase. The amplification thermal conditions consisted of an initial denaturation of 3 min at 95°C followed by 30 cycles of 40 s at 94°C, 45 s at 50°C and 45 s at 72°C and a final extension of 7 min at 72°C. PCR products were observed in a 1% agarose gel. Sequencing was performed in both directions at the University of Washington (<http://www.htseq.org/index.html>).

Genetic distances were assessed calculating corrected pairwise sequence differences and carrying out a Neighbor-Joining (NJ) analysis using the Kimura 2-parameter model as implemented in MEGA 5 (Tamura et al. 2011). According to Hebert et al. (2003), sequence differences beyond a 2% threshold suggest the existence of two separated lineages. Additionally, we performed a Bayesian Inference analysis (BI) to corroborate the NJ tree. The Bayesian inference analysis was carried out using MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2003; Ronquist & Huelsenbeck 2005). We ran 4 chains, 10 000 000 generations each, and sampled trees every 1000 generations. We partitioned the data set into first, second and third codon positions and used the GTR + G + I as the substitution model. For the consensus tree reconstruction, we discarded the first 2000 trees for each run.

### *Ecological Niche Modeling*

The operational criterion of niche specialization (van Valen 1976) was evaluated using ecological niche modeling. Species distribution models were generated using the maximum entropy method, Maxent (v. 3.3.3; Phillips et al. 2006, available to download at: <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent>). Maxent is a machine-learning method that has been shown to outperform other approaches such as GARP, BIOCLIM or Generalized Linear Methods. This method is particularly useful for small samples, and allows using presence-only data and incomplete ecological information (Elith et al. 2006), features that suit our data. Maxent associates environmental information from bioclimatic layers and geographic coordinates from collected specimens in order to identify environmental features at the locality points. Subsequently, the program extrapolates these environmental features to find similar



characteristics across the study area to estimate the unknown probability distribution in the area (Phillips et al. 2006).

Bioclimatic layers included 15 biological climatic variables of temperature and precipitation, which were obtained from the WorldClim data base (Hijmans et al. 2005). Four topographical variables were recovered from the U.S. Geological Survey's Hydro1k database ([http://eros.usgs.gov/#/Find\\_Data/Products\\_and\\_Data\\_Available/gtopo30\\_info](http://eros.usgs.gov/#/Find_Data/Products_and_Data_Available/gtopo30_info)). All layers were downloaded at 2.5-arc-minute resolution and were cropped for the study area using ArcGis 10. Ecoregions layers for the study area were also included in order to refine the results.

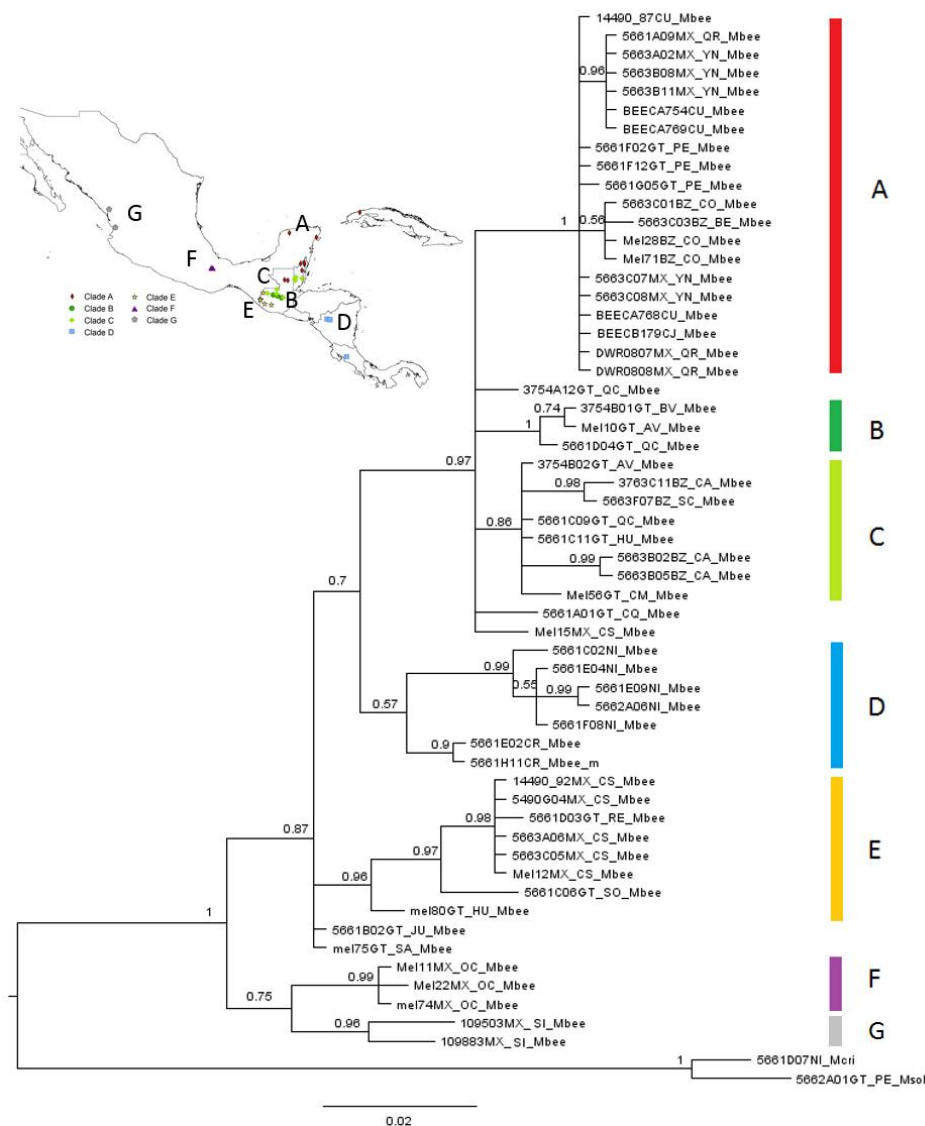
The recommended limits for convergence threshold and a maximum number of iterations of 500 were used to run Maxent (Phillips *et al.*, 2006). Variable selection was set automatically, regularization multiplier followed default rules and duplicates were eliminated. Models were evaluated testing the predicted distribution with 25% of the samples and using a 15 replication subsample test. Locality information was recovered from the specimens' localities. When collecting information, we didn't include geographic coordinates, these were obtained by searching the localities in Google Earth. A total of 87 unique localities were obtained to construct the models.

We followed Raxworthy et al. (2007) to evaluate niche specialization, running the program Maxent under two different scenarios: 1) All forms lumped: *M. beecheii* complex; and 2) nominal species split according to three putative species *M. beecheii* 1 (representing *M. fulvipes* Guérin-Méneville –Yucatan/northern Peten and Belize), *M. beecheii* 2 (representing *M. beecheii* Bennett -North western Mexico) and *M. beecheii* 3 (representing *M. nigripes* Friese –Central America). To facilitate the analysis, the models were transformed to binary maps using ArcGis 10 to show suitable and unsuitable habitat. The tenth percentile training presence logistic threshold was used to define the minimum probability to find suitable habitat thus allowing the inclusion of all data points used to construct the models. The models were overlapped to evaluate graphically whether there were areas of sympatry.

## Results

### *Molecular analysis*

Sequences were 610-658 bp of length and had 61 parsimoniously informative positions. The COI corrected genetic distances (Table 3) and the NJ tree (not shown) revealed deep divergences between sequences within *M. beecheii* complex. The phylogram recovered shows the phylogenetic Bayesian Inference reconstructed for the examined sequences (Figure 1). The Bayesian topology is mostly similar with the one obtained by the NJ analysis. Members of the *M. beecheii* complex were recovered as monophyletic, and were composed of seven clades that were also broadly geographically congruent (Figure 1). Clade A is distributed in the Yucatan peninsula, northern Guatemala, northern Belize, and Cuba. Clade B on the other hand is found in north-central Guatemala; clade C in north-central and central Belize. Clade D corresponds to Jinotega (northern Nicaragua) and Costa Rica. Clade E corresponds to specimens from the Pacific coast of Guatemala and Chiapas, Mexico. Finally, clade F corresponds to specimens from Oaxaca, Mexico and clade G to specimens from Sinaloa, Mexico.



**Figure 1.** Bayesian phylogram of cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (COI) of *Melipona beecheii* complex, using *M. costaricensis* and *M. solani* as outgroups. Numbers at basal node represent posterior probabilities. Names of terminal taxa include the voucher number, the first two capital letters indicate the country and the second two the state/province (ISO standards) where the specimen was collected, the four last letters refer to the species name. Seven well-supported (>75%) clades are highlighted. Each clade corresponds broadly to a particular geographical area (inset map): Clade A (Yucatan/northern Guatemala and northern Belize); clade B (north-central Guatemala); clade C (north-central Guatemala/central Belize), clade D (Jinotega, Nicaragua, and Costa Rica); clade E (Pacific coast of Guatemala/ Chiapas, Mexico); clade F (Oaxaca, Mexico); clade G (Sinaloa, Mexico)

The pairwise sequence differences within the clades were mostly lower than differences between them (Table 3). Excluding clade G, which shows a slightly high difference (1.1%), the average sequence differences within clades was of 0.3%, whereas average distances between clades were of 2.3%.

**Table 3.** Nucleotidic differentiation among sequences of the *Melipona beecheii* complex. Values in diagonal indicate sequences differences within each of the six clades inferred from the Bayesian tree (Figure 1). Numbers in lower triangle indicate average pairwise sequence differences between those clades.

Clade	OG	A	B	C	D	E	F	G
OG	<b>1.1</b>							
A	6.7	<b>0.2</b>						
B	5.8	1.9	<b>0.1</b>					
C	5.5	1.6	1.3	<b>0.6</b>				
D	5.8	2.7	2.0	1.9	<b>0.8</b>			
E	5.3	2.4	2.1	1.7	2.3	<b>0.4</b>		
F	5.5	3.1	2.7	2.6	2.5	2.4	<b>0.1</b>	
G	5.8	2.9	2.6	2.8	2.8	2.7	1.7	<b>1.1</b>

Considering that on average nucleotidic differences between clades were >2% (Table 3), we can infer that most clades may represent different species following Hebert et al.'s (2003) criterion. However, six comparisons showed differences smaller than the 2% threshold. For instance, clade A, which is represented by specimens from Cuba, Yucatan, northern Guatemala and northern Belize, have distances of ~1.9% with respect to Clade B from northern central Guatemala, and ~1.6% with respect to clade C from north-central Guatemala and Belize. Intraspecific differences within each of these clades remains consistently low (< 0.6). Moreover, individuals from each of these clades show an allopatric distribution.

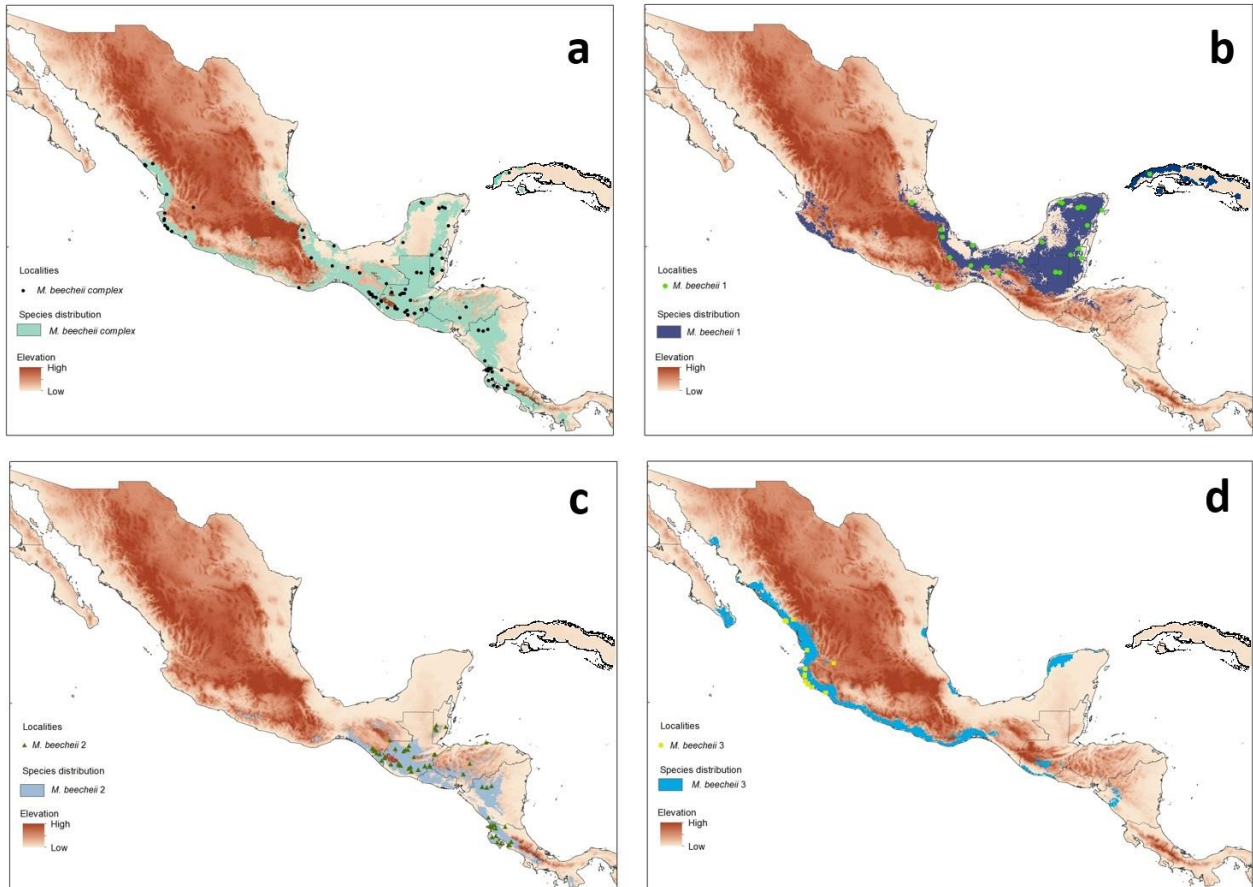
### *Morphological data*

Our morphological examination of 296 specimens, including those used for genetic distance analysis, revealed new diagnostic features that helped to distinguish three morphotypes: morphotypes 1 (genetic clade A) and 3 (genetic clades F and G) can be distinguished from morphotype 2 (genetic clades B, C, D and E) by its consistently smaller size (~9.3 vs. ~10.1 mm), distinct facial yellow marks (larger and evident in morphotypes 1 and 3, Figure 4 c and d, Table 2), lighter color of the integument, presence of a yellow apical band in tergite 6 and a fringe of shorter hairs in the apical border of tergite 4 (Figure E and F, Table 2). Morphotypes 1 and 3 can also be distinguished between them, but their differences are subtle: morphotype 3 has slightly broader yellow band in tergite 6 and slightly larger facial marks than morphotype 1.

### *Ecological Niche modeling*

Niche models were generated for *M. beecheyi* complex as a whole, as well as for the three morphotypes. The AUC values that indicate the ability of the model to distinguish between presence and random background points were higher than 0.8 for all models, suggesting good performance according to Phillips *et al.*, (2006) and Elith *et al.* (2006), who point out that an AUC > 0.7 indicates good precision in identifying suitable sites. AUC values for *M. beecheyi* complex is  $0.884 \pm 0.019$ . When split, the corresponding value for morphotype 1 is  $0.892 \pm 0.50$ , for morphotype 2 is  $0.947 \pm 0.014$ , and for morphotype 3 is  $0.977 \pm 0.018$ . In general, when the complex was divided the predictive power of the models improved.

Ecological niche models are shown in Figure 2. The distribution for the combined model is adjusted to the locality points used to generate the model (Figure 2a) and cover the distributions of the models that were generated when the group is split. Nevertheless, when comparing Figures 2a and 2d, the distribution of the species complex is wider in the region where morphotype 3 is distributed. Morphotype 1 (Figure 2b) covers a wider region when modeled alone and shows a predicted area in the region of the Pacific coast of Mexico.

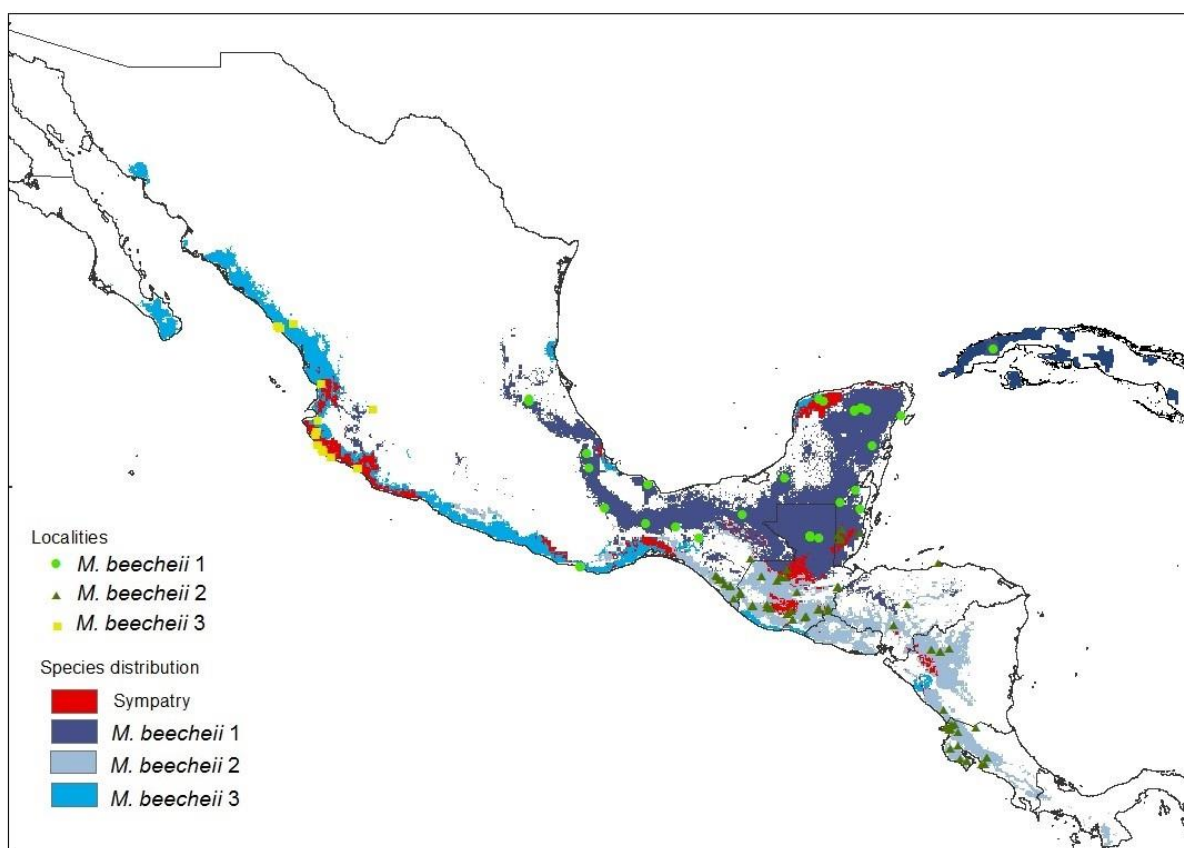


**Figure 2.** Ecological distribution niche models of: a) the whole *M. beecheii* complex, black dots are collecting localities; b) Morphotype 1 (clade A) green dots are collecting localities; c) Morphotype 2 (clades B, C, D and E), yellow squares are collecting localities; and d) Morphotype 3, (clades F and G) green triangles represents localities points. Elevation is indicated in tones of brown.

Morphotype 2 present a higher predicted elevation distribution along the mountainous region of Central America (Figure 2 c). Morphotype 1 expands its distribution at lower elevations in the Atlantic coast of México, northern Guatemala and northern Belize and is even found in Cuba. However, the model generated also predicts that morphotype 1 would be present in the Pacific coast of Mexico (Figure 2 b). Morphotype 3 is exclusively distributed at lower elevations but in the Pacific coast of Mexico, although it shows a portion of distribution in Yucatan (Figure 2 d).

Two regions of sympatry were evident for morphotypes 1 and 3, one in the Pacific coast (area of distribution of the latter) and the other one in Yucatan (area of distribution of the

former). Morphotype 1 also shows two important zones of sympatry with morphotype 2, one in Belize and a second in north-central Guatemala (Figure 3).



**Figure 3.** Zones of sympatry between the morphotypes. The distributions of the three morphotypes are shown, and the locality points for each species and the zones of sympatry (red) between the models

## Discussion

The taxonomic integrative approach has been proved useful for delimiting bee species that were difficult to separate by using solely traditional taxonomy (i.e. morphological data) (Gibbs 2009; Rehan & Sheffield 2011; May-Itza et al. 2012; Lecoq et al. 2014). Some studies have employed a combination of mtDNA barcoding and morphological data to delimit species in the bee genera *Lassioglossum* and *Ceratina* (Gibbs 2009; Rehan & Sheffield 2011). Lecoq et al. (2014) included mtDNA barcoding, nDNA and reproductive eco-chemical data to delimit species of Corsican bumblebees. May-Itzá et al. (2012) used a nuclear molecular marker and morphometrics to suggest differences between populations of *M. beecheii* from the Yucatan peninsula, northern Guatemala, and the rest of Central America. To our knowledge, this is the first study to integrate ecological modelling, molecular analysis and morphological analysis to

delimitate species in the stingless bee complex *M. beecheii*, Bennett, 1803. Our three lines of evidence helped us to consistently delimit two species within the *M. beecheii* complex.

The pairwise distance analysis based on 2% DNA barcoding sequence divergence (Hebert et al. 2003) divided the specimens assigned to *M. beecheii* s.l into seven distinct groups. Pairwise sequence differences between groups were generally lower than the 2% threshold (1.9 – 1.3%), whereas the differences within groups were of 0.1 – 0.8 % (Table 3). Our results are thus consistent with other studies that found that morphological species showed sequence divergences lower than 2% level (Gibbs 2009; Rehan & Sheffield 2011; Hurtado-Burillo et al. 2013). Therefore, our results add support to the existence of a “barcode gap” (van Velzen et al. 2012) for at least two population groups, which are also morphologically congruent, which supports the DNA barcoding’ efficiency to delimit bee species.

Under the criterion of diagnosability, a species is defined as the smallest aggregation of populations that are diagnosable by a unique combination of character states in comparable individuals (see, Mayden, 1997). Morphological species identification is a complicated task when species lack of evident diagnostic characters such as in *Melipona* bees (Schwarz 1932, Moure y Kerr 1950). In this study, the morphological characters observed allow us to separate three distinct morphotypes within *M. beecheii* s.l. The combination of characters found in morphotype 2 are consistent and unique across the geographic distribution of this taxon and correspond to the description of the formerly described species *M. nigripes* Friese 1900.

Morphological differences between *M. beecheii* morphotypes 1 and 3 are very subtle (slightly broader yellow marks of T6 and facial marks in morphotype 3) and they may correspond to *M. fulvipes* Guérin-Meneville, 1844 and *M. beecheii* s. s., respectively. These findings are partially in agreement with May-Itzá et al. (2012), who, based on a morphometric analysis, found that specimens from the Yucatan peninsula and northern Guatemala were smaller than those from the southern part of Guatemala down to Costa Rica, suggesting that, according to Schwarz (1932), the smaller form may correspond to *M. fulvipes* and the larger one to *M. beecheii*. Here, we consider that what these authors assumed as *M. beecheii* actually correspond to *M. nigripes* (morphotype 2). Moreover, based on the taxonomic principle of priority and due to their morphological similarity, *M. fulvipes* (morphotype 1) should be regarded as a synonym of *M. beecheii*.





**Figure. 4** Digital photographs showing the habitus, face and metasoma of representatives of morphotypes belonging to *Melipona beecheii* complex. Morphotypes 1 and 3 (Clades A, F and G): A) habitus; C) face with yellow marks evident, E) metasoma with pilosity in apical T4 and T5 short and yellowish. Morphotype 2 (Clades B, C, D, E): B) habitus; D) face with marks not evident; F) metasoma with pilosity in apical T4 and T5 large and whitish.

Niche distribution models were constructed to help in the delimitation of the species boundaries within the *M. beecheii* complex. To our knowledge this approach has not been yet applied in bee species delimitation, though distribution modeling was previously used to demonstrate that sister bee species show allopatric distributions (Silva et al. 2014)., Raxworthy et al. (2007) applied a niche modelling approach to successfully delimit species of geckos in Madagascar. In our distribution models, morphotype 1 (Yucatan, northern Guatemala, northern Belize and Cuba) and morphotype 3 (northern Pacific coast of Mexico), both restricted to lowlands habitats, showed an allopatric distribution. However, some zones of sympatry were highlighted in either of the two morphotypes' distribution areas (see Figure 2 b and d and Figure 3). Nevertheless, there is a low probability that any of them could move throughout the



Transmexican volcanic belt mountain range which serves as a barrier between these two putative species, moreover meliponines in general show a limited ability to migrate long distances due to their dispersal behavior (colony-dispersing) (Roubik 2006).

Morphotypes 1 and 2 show a parapatric distribution (see Figures 2b, c, and 3); however, according to the models and the locality records, morphotype 2 occurs in higher altitudes than morphotype 1. The areas of sympatry are thus due probably to overprediction in the models. The area of sympatry shown in Belize between morphotype 1 and 2 (Figures 2 b, c and 3) is because there are some Belizean specimens that come from this region which are morphologically similar to morphotype 2. Additionally, a detailed observation of the model constructed for morphotype 2 demonstrates that the localities of origin of the specimens are at a higher elevation than the expected distribution of morphotype 1.

The three criteria used to test the species limits within *M. beecheii* complex (diagnosability, genetic distance, and niche specialization) were congruent in identifying only two species. Despite the genetic distance approach was powerful enough to identified seven putative taxa, morphological information was the limiting factor that guided our decision. According to our morphological analysis, three morphotypes could be identified which were also geographically delimited. However diagnostic characters used to separate morphotypes 1 and 3 are very weak and therefore we consider these two morphotypes as a single species until further molecular and morphological evidence is gathered.

#### *Taxonomic inferences*

Based on the results from ecological niche modeling, molecular evidence, and morphological features, we propose to resurrect the name *M. nigripes* Friese 1900 for the populations of *M. beecheii* s.l. from Central America (clades B, C, D and E, morphotype 2). Although ecological models and DNA barcoding information show evidence for considering the northern Pacific coast and Oaxaca forms as separated species (Clade F and G, morphotype 3), we maintain them as a population of *M. beecheii* s.s. until additional morphological and molecular evidence help to clarify its taxonomic status.

*Key to species of the M. beecheii complex*

1a. Medium size bees (10.1 - 10.2 mm) (Figure 4B). Apical fringe of hairs in T4 with large (~0.25 mm), whitish hair, evidently plumose (Figure 4F). Yellow parocular marks not evident or very thin, clypeus with a very subtle and thin brown-yellow median line (Figure 4D). Pilosity of disc of T5 scarce, whitish ..... *M. nigripes* (Central America)

1b. Small size bees (8.8 – 9.8 mm) (Figure 4A). Apical fringe of hairs in T4 with short (~0.14 mm), yellowish, not evidently plumose (Figure 4E). Yellow parocular marks evident, wider in the basal part, clypeus with a median wide yellow mark (Figure 4C). Pilosity of disc of T5 short, simple, abundant, orange ..... *M. beecheii* (Northern Pacific coast Mexico, Yucatan and Central American Northern Atlantic coast)

**Acknowledgements**

CLY sincerely thanks Dr. Tabaru and Dr. Monroy for financial support for field trips, Laurence Packer, Terry Griswold for advices, Cristof Schüepp, John Ascher, Steve Javorek, Olivia Yáñez, Ingrid Aguilar, Manuel Ortiz, Enio Cano, Eunice Enríquez, for lending specimens, Edson Sandoval-Castellanos and Carolina Ferreira-Cardoso for advice regarding the use of computer programs and analysis. This study was made under the Postgraduate Program in Biological Sciences of UNAM under the Agreement between UNAM and USAC.

**References**

Ayala, R. (1999) Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106, 1-123

Biesmeijer, J.C., Tóth, E. (1998) Individual foraging, activity level and longevity in the stingless bee *Melipona beecheii* in Costa Rica (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Insectes sociaux*, 45, 427–443.

Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I. (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148-133, DOI:10.1016/j.tree.2006.11.004

Camargo, J.M.F. & Pedro, S.R.M. (2012) Meliponini Lepeletier, 1836. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region (ed. by J.S. Moure, D. Urban and

- G.A. Melo). Online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>, Accessed Oct/29/2012.
- De la Rúa, P., May-Itzá, W. J., Serrano, J., Quezada-Euán, J. J. G. (2007) Sequence and RFLP análisis of the ITS2 ribosomal DNA in two neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 54, 418-423.
- Elith, J., C.H. Graham, R.P. Anderson, M. D, S. Ferrier, A. Guisan, R.J. Hijmans, F. Huettmann et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29, 129-151.
- Frézal, L., R. Leblois, R. (2008) Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 727-36.
- Grismer, L. (1999) An evolutionary classification of reptiles on islands in the Gulf of California, México. *Herpetologica*, 55, 446-469.
- Hawlitshchek, O., Porch, N., Hendrich, L., Balke, M. (2011) Ecological niche modelling and nDNA sequencing support a new, morphologically cryptic beetle species unveiled by DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 6, e16662, DOI:10.1371/journal.pone.0016662
- Heard, T.A. (1999) The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44, 183–206.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14812- 14817.
- Hurtado-Burillo, M., Ruiz, C., de Jesús May-Itzá, W., Quezada-Eúan, J. J. G., De la Rúa, P. (2013) Barcoding stingless bees: genetic diversity of the economically important genus *Scaptotrigona* in Mesoamerica. *Apidologie*, 44, 1-10.
- Lecocq, T., Brasero, N., De Meulemeester, T., Michez, D., Dellicour, S., et al. (2014) An integrative taxonomic approach to assess the status of Corsican bumblebees: implications for conservation. *Animal Conservation*, 18, 236-248.
- Lumley, L.M., Sperling, F.A.H. (2010) Integrating morphology and mitochondrial DNA for species delimitation within the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) cryptic species complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Systematic Entomology*, 35, 416-428.

- Mace, G.M., Possingham, H.P., Leader-Williams, N. (2007) Prioritizing choices in conservation. *Key Topics in Conservation Biology*, Macdonald (ed. By D.W. and K. Service), Blackwell Publishing UK, 17-34.
- May-Itza, W.D.J., Quezada-Euan, J.J.G., De la Rúa, P. (2009) Intraspecific variation in the stingless bee *Melipona beecheii* assessed with PCR-RFLP of the ITS1 ribosomal DNA. *Apidologie*, 40, 549–555
- May-Itza, W.D.J., Quezada-Euan, J.J.G., Ayala, R., De la Rúa, P. (2012) Morphometric and genetic analyses differentiate Mesoamerican populations of the endangered stingless bee *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponidae) and support their conservation as two separate units. *Journal of Insect Conservation*, DOI: 10.1007/s10841-012-9457-4
- Michener, C.D. (2007) *The bees of the world*, 2nd edn. The Johns Hopkins University Press, USA.
- Moure, J. S. & W. E. Kerr. 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). *Dusenía* 1, 105-129.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M., Peterson, A.T. (2007) Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*, 34, 102–117.
- Posey, D.A. (1982) The importance of bees to Kayapó Indians of the Brazilian Amazon. *The Florida Entomologist*, 65, 452–458
- Quezada-Euán, J. J., Paxton, R. P., Palmer, K. A. May-Itzá, W. de J., Tay, W. T., Oldroyd, B. P. (2007) Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie*, 38, 247–258.
- Raxworthy, C.J., Ingram, C.M., Rabibisoa, N., Pearson, R.G. (2007) Applications of ecological niche modelling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology*, 56, 907–923.
- Reeves, P.A., Richards, C.H. (2010) Species delimitation under the general lineage concept: An empirical example using wild North American hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). *Systematic Biology*, 60, 45-59.
- Rehan, S.M., Sheffield, C.S. (2011) Morphological and molecular delineation of a new species in the *Ceratina dupla* species-group (Hymenoptera: Apidae: Xylocopinae) of eastern North America. *Zootaxa*. 2873, 35-50
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37, 124-143.

- Sangster, G. (2009) Increasing numbers of bird species result from taxonomic progress, not taxonomic inflation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276, 3185–3191, DOI:10.1098/rspb.2009.0582.
- Schwarz, H.F. (1932) The genus *Melipona* the type genus of the Meliponidae or stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 63, 231-460.
- Silva, D.P., Vilela, B., De, M., Jr, P., Nemésio, A. (2014) Using ecological niche models and niche analyses to understand speciation patterns: The case of sister Neotropical orchid bees. *PLoS ONE* 9, e113246. doi:10.1371/journal.pone.0113246
- Tamura, K., Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, Kumar, S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739
- van Valen, L. (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 25, 233–239.
- van Velzen, R., Weitschek, E., Felici, G., Bakker, F.T. (2012) DNA Barcoding of Recently Diverged Species: Relative Performance of Matching Methods. *PLoS ONE* 7, e30490. DOI:10.1371/journal.pone.0030490
- Villanueva, R., Buchmann S., Donovan A.J., Roubik D.W. (2005) Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatan peninsula. *Bee World*, 86, 35–41

## 5. CAPÍTULO 3.

### **Detecting species boundaries in the stingless bee species of the genus *Melipona* of Central America and Mexico using DNA barcode sequences**

Carmen L. Yurrita<sup>1,2</sup> and Alejandro Zaldívar-Riverón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México City 04510, Distrito Federal, México.*

<sup>2</sup>*Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala*

**Abstract.** We assessed the species boundaries among ten *Melipona* stingless bee species from Central America and Mexico based on the analysis of mtDNA barcodes and using the 2% distance and the *Generalized Mixed Yules-Coalescent* (GMYC) model approaches. Our data show that the 2% method, the GMYC and the morphology are not congruent among them in their delimitation of species. The 2% approach is more conservative than the GMYC method, yielding 14 putative species (GMYC = 49 species). Our data suggest an incipient speciation within the species of *Melipona* of Central America and Mexico. This information must be of importance and taken into consideration this genetic diversity while designing conservation strategies.

#### **Introduction**

Biodiversity is nowadays facing an important decline as a consequence of human activities that cause habitat loss, fragmentation, contamination and other ecological alterations. Conserving biodiversity is important for itself, because it provides ecosystem services essential for life on earth such as pollination (Mace et al. 2005). Conservation strategies rely primarily on species conservation (Mace et al. 2004). Thus, correct species delimitation is crucial to implement

effective strategies. However, defining the limits of a species is a complex task, whose results will depend on the species concept, the type of data and the methods used (de Queiroz 2007). There are a number of species concepts, but in general terms, a species has been defined as a group of individuals that evolves independently from other groups (de Queiroz 2007).

Traditionally taxonomists have delimited species based on morphology and their knowledge on the natural history of the species they are working with (Dayrat 2005). This method has been challenged due to its personal bias (Packer et al. 2009; Padial et al. 2010) and the process may be long, sometimes delaying the production of updated taxonomic information, which limits the implementation of better conservation strategies (Dayrat 2005; Packer et al. 2009). The rising of recent molecular data and the development of novel methods have contributed to enhance the process of delimiting species, offering complementary tools with a more rigorous statistical background (Fujita et al. 2012; Fujisawa and Barraclough 20013).

DNA barcoding has been used as an effective tool for delimiting new species, including cryptic bee species (Gibbs 2009; Rehan & Sheffield 2011; Lecoq et al 2014). Originally, delimiting species based on mtDNA barcodes (a short fragment of mtDNA of the Cytochrome Oxidase subunit 1 (COI) enzyme, for animals) was made on the assumption that the difference among sequences of individuals from different species (~2%) is larger than among sequences of individuals from the same species (Hebert et al. 2003). However, it has been shown that this approach has some failures (Fujisawa & Barraclough 2013). Therefore, recently, new methods based on coalescent theory and phylogenetics, such as the General Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Pons et al. 2006) have been developed to assist in the process of delimiting species boundaries based on DNA data, and produce more robust hypotheses (Fujita et al. 2012).

The evolutionary history of species is ultimately defined by the geological history of the regions where they are distributed. Mexico and Central America have a complex geological



history that led to a heterogeneous topography (Jackson et al. 1996). The combination of mountainous and lowland regions within Central America and Mexico has shaped the patterns of biological diversification, permitting a high biodiversity and endemism by isolating populations to areas with particular ecological conditions (Daza et al. 2010). Moreover, the dynamic process that preceded the complete closure of the Panamanian bridge yielded coincident dispersal patterns among different species (García-Gutiérrez & Vásquez-Domínguez 2013).

*Melipona* is distributed exclusively in tropical and subtropical regions of America (Michener 2007). In Mexico and Central America, species of this genus are considered important pollinators due to their considerably high population size and behavioral characteristics related to buzz pollination, polylecty and flower constancy (Slaa et al. 2006). In addition, some species of *Melipona* are culturally important, because the product of the hives are commonly used as a source of medicine, food complement and in religious practices since prehispanic times (Yurrita & Vásquez 2013; Ocampo-Rosales et al. 2013).

*Melipona* is represented in Mexico and Central America by 16 currently recognized species (Camargo & Pedro 2013), with some occurring in very restricted areas whereas others being widely distributed (Yurrita et al. 2016). Some authors have suggested that within Meliponini (Michener 2007), and especially within *Melipona* (Schwarz 1932; Moure y Kerr 1950), species are difficult to delimit based on morphology alone due to the lack of clearly identifiable diagnostic characters. In fact, some authors have already suggested the presence of cryptic species' complexes among *Melipona* species of Central America and Mexico, as in the case of *M. yucatanica* (May-Itzá et al. 2010) and *M. beecheii* (May-Itzá et al. 2012). Moreover, phylogenetic analyses based on molecular information suggested that a rapid lineage diversification could have occurred within *Melipona* (Ramírez et al. 2010).

Given that some doubts arise over the boundaries of *Melipona* species from Central America and Mexico, and based on the topographic and climatic complexity of the region, here

we hypothesize that DNA sequenced-based species delimitation will provide evidence that helps to determine whether the examined species of *Melipona* actually represent composite taxa.

## **Material and Methods**

### *Material acquisition*

The barcoding region of the cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (COI; 658 bp; Hebert et al., 2003) was examined to evaluate the species limits among specimens assigned to ten *Melipona* species from Mexico and Central America. DNA barcodes (658 bp) were generated from 99 specimens assigned to the following ten *Melipona* species, which were identified based on their morphology: *Melipona beecheii* s.l. Bennett, 1831; *M. triplaridis* Cockerell, 1925; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *M. yucatanica* Camargo, Moure, & Roubik, 1988; and *M. phenax* Cockerell, 1919. We included an additional sequence of the stingless bee *Scaptotrigona pectoralis* Dalla Torre, 1896 (Apinae: Meliponini) as outgroup to root the trees.

Specimens were obtained from various field trips carried out by the senior author as well as by donations (Table 1, Supplementary Material 1). Sequences are publicly available at the Barcode of life data system (BOLD) (Ratnasingham & Hebert 2007). A green label with the BOLD process ID number was added to each specimen. All examined specimens are deposited in York University, Toronto, Canadá (PYUC collection), and San Carlos University of Guatemala, Guatemala (CANG collection). The list of the examined specimens, their locality details and ID number is shown in.

**Table 1.** Material used to perform the analyses, including species name, specimen ID, province and country of origin

Species name	Specimen ID	Process ID	Province	Country	Latitude	Longitude
	Mbee1_CU	BOTWA1129-11	Cuba	Cuba		
	Mbee10_NI_JI	BOFG121-11	Jinotega	Nicaragua	13.30	-86.18
	Mbee11_GT_SO	BOFG125-11	Solola	Guatemala	14.58	-91.13
	Mbee12_GT_QC	BOFG128-11	Quiche	Guatemala	15.55	-90.68
	Mbee13_GT_RE	BOFG134-11	Retalhuleu	Guatemala	14.67	-91.72
	Mbee14_GT_QC	BOFG135-11	Quiche	Guatemala	15.46	-90.94
	Mbee15_CR_A	BOFG145-11	Alajuela	Costa Rica	9.97	-84.43
	Mbee16_NI_JI	BOFG147-11	Jinotega	Nicaragua	13.25	-85.91
	Mbee17_NI_JI	BOFG152-11	Jinotega	Nicaragua	13.25	-85.91
	Mbee18_GT_PE	BOFG157-11	Peten	Guatemala	16.76	-89.66
	Mbee19_NI_JI	BOFG163-11	Jinotega	Nicaragua	13.25	-85.91
	Mbee2_MX_CS	BOTWA1135-11	Chiapas	Mexico	15.10	-92.10
	Mbee20_GT_PE	BOFG167-11	Peten	Guatemala	16.81	-89.94
	Mbee21_GT_PE	BOFG172-11	Peten	Guatemala	16.81	-89.94
	Mbee22_NI_JI	BREUG101-11	Jinotega	Nicaragua	13.25	-85.91
	Mbee23_BZ_CY	BOFG204-11	Cayo district	Belize	17.03	-88.96
	Mbee24_BZ_CZL	BOFG215-11	Corozal	Belize	18.24	-88.53
	Mbee25_BZ_BZ	BOFG217-11	Belize	Belize	17.66	-88.40
	Mbee26_BZ_SC	BOFG257-11	Stann Creek	Belize	16.93	-88.39
<i>M. beechei</i>	Mbee27_CU	BEECA768-07	Cuba	Cuba	22.80	-83.25
	Mbee28_CU	BEECA769-07	Cuba	Cuba		
	Mbee29_CU	BEECB179-07	Cuba	Cuba		
	Mbee3_GT_QC	BWONE202-09	Quiche	Guatemala	15.31	-91.17
	Mbee30_GT_AV	Mel10_GT	Alta Verapaz	Guatemala	15.37	-90.57
	Mbee31_MX_OA	Mel11_MX	Oaxaca	Mexico	17.84	-96.33
	Mbee32_MX_CS	Mel12_MX	Chiapas	Mexico	15.03	-92.08
	Mbee33_MX_CS	Mel15_MX	Chiapas	Mexico	17.37	-93.18
	Mbee34_MX_OA	Mel22_MX	Oaxaca	Mexico	17.88	-96.46
	Mbee35_GT_CM	Mel56_GT	Chimaltenango	Guatemala	15.24	-90.06
	Mbee36_BZ_CZL	Mel71_BZ	Corozal	Belice	18.21	-88.19
	Mbee37_GT_HU	mel80_GT	Huehuetenango	Guatemala	15.67	-91.86
	Mbee38_MX_SI	109503MX_SI	Sinaloa	Mexico	23.08	-105.54
	Mbee39_MX_SI	109883MX_SI	Sinaloa	Mexico	21.46	-105.00
	Mbee4_GT_BV	BWONE203-09	Baja Verapaz	Guatemala	15.21	-90.21
	Mbee5_GT_AV	BWONE204-09	Alta Verapaz	Guatemala	15.95	-90.63
	Mbee6_BZ_CY	03763C11-BLZ	Cayo district	Belice	16.73	-88.99
	Mbee7_GT_CQ	BOFG096-11	Chiquimula	Guatemala	14.55	-89.67
	Mbee8_MX_QR	BOFG104-11	Quintana Roo	Mexico	20.59	-87.12
	Mbee9_GT_JU	BOFG109-11	Jutiapa	Guatemala	14.33	-90.06
	Mcol1_MX_JA	BOFG236-11	Jalisco	Mexico	19.69	-103.45
<i>M. colimana</i>	Mcol2_MX	Mel14_MX		Mexico		
	Mcol3_MX	Mel15_MX		Mexico		
	Mcol4_MX_JA	Mel59_MX	Jalisco	Mexico	20.17	-104.71
	Mcri1_CR_A	BOTWA1136-11	Alajuela	Costa Rica	10.11	-84.27
<i>M. costaricensis</i>	Mcri10_NI_JI	mel43_CR	Jinotega	Nicaragua	13.25	-85.85

	Mcri2_CR_A	BOFG133-11	Alajuela	Costa Rica	10.11	-84.27
	Mcri3_NI_JI	BOFG138-11	Jinotega	Nicaragua	13.24	-85.85
	Mcri4_CR_SJ	BOFG141-11	San Jose	Costa Rica	9.35	-83.63
	Mcri5_CR_SJ	BOFG166-11	San Jose	Costa Rica	9.35	-83.63
	Mcri6_NI_JI	BOFG184-11	Jinotega	Nicaragua	13.24	-85.85
	Mcri7_NI_JI	BREUG119-11	Jinotega	Nicaragua	13.30	-86.18
	Mcri8_CR_L	Mel27_CR	Limon	Costa Rica	9.66	-83.02
	Mcri9_CR_P	Mel38_CR	Puntarenas	Costa Rica	8.54	-83.37
<i>M. fallax</i>	Mfal1_CR_SJ	ARG-14490-86	San Jose	Costa Rica	9.77	-84.53
	Mfal2_PA	DRBEE001-07	Panama	Panama		
	Mfal3_CR_A	Mel26_CR	Alajuela	Costa Rica	9.00	-83.46
	Mfal4_CR_P	Mel53_CR	Puntarenas	Costa Rica	10.12	-84.29
<i>M. fasciata</i>	Mfas1_MX_OA	Mel04_MX	Oaxaca	Mexico	15.88	-96.42
	Mfas2_MX_GR	Mel05_MX	Guerrero	Mexico	17.70	-100.85
	Mfas3_MX	Mel08_MX		Mexico		
	Mfas4_MX	Mel09_MX		Mexico		
	Mfas5_MX_OA	Mel25_MX	Oaxaca	Mexico	17.01	-97.84
	Mfas6_MX_GR	Mel34_MX	Guerrero	Mexico	17.69	-100.53
	Mfas7_MX_GR	Mel41_MX	Guerrero	Mexico	17.65	-100.87
	Mfas8_MX_OA	Mel70_MX	Oaxaca	Mexico	17.01	-97.84
<i>M. insularis</i>	Mins1_PA	DRBEE003-07	Panama	Panama		
	Mins2_PA	DRBEE456-10	Panama	Panama		
	Mins3_PA	DRBEE457-10	Panama	Panama		
<i>M. triplaridis</i>	Mtri1_PA	DRBEE004-07	Panama	Panama		
<i>M. phenax</i>	Mphe1_PA	DRBEE375-10	Panama	Panama		
	Mphe2_PA	DRBEE458-10	Panama	Panama		
	Mphe3_PA	DRBEE373-10	Panama	Panama		
<i>M. solani</i>	Msol1_MX_CS	ARG-14490-88	Chiapas	Mexico	15.10	-92.10
	Msol10_GT_PE	BOFG181-11	Peten	Guatemala	17.07	-89.35
	Msol11_GT_AV	BOFG187-11	Alta Verapaz	Guatemala	15.95	-90.63
	Msol12_GT_PE	BREUG096-11	Peten	Guatemala	15.05	-92.08
	Msol13_GT_PE	BREUG100-11	Peten	Guatemala	16.81	-89.94
	Msol14_BZ_CY	BOFG194-11	Cayo District	Belize	16.73	-88.99
	Msol15_BZ_OW	BOFG198-11	Orange Walk	Belize	17.84	-89.02
	Msol16_BZ_CY	BOFG200-11	Cayo District	Belize	16.74	-88.96
	Msol17_BZ_OW	BOFG202-11	Orange Walk	Belize	17.84	-89.02
	Msol18_BZ_CY	BOFG205-11	Cayo District	Belize	16.74	-88.96
	Msol19_BZ_CY	BOFG209-11	Cayo District	Belize	16.73	-88.99
	Msol2_GT_AV	BWONE205-09	Alta Verapaz	Guatemala	15.95	-90.63
	Msol20_BZ_CY	BOFG211-11	Cayo District	Belize	16.74	-88.96
	Msol21_BZ_SC	BOFG261-11	Stann Creek	Belize	16.93	-88.39
	Msol22_GT_IZ	Mel13_GT	Izabal	Guatemala	15.69	-88.64
	Msol3_BZ_CY	BOWGF988-10	Cayo District	Belize	16.73	-88.99
	Msol4_GT_SM	BOFG097-11	San Marcos	Guatemala	14.81	-91.91
	Msol5_HN_CP	BOFG119-11	Copan	Honduras	14.94	-88.87
	Msol6_GT_QC	BOFG126-11	Quiche	Guatemala	15.55	-90.83
Msol7_HN_CP	BOFG156-11	Copan	Honduras	14.94	-88.87	
Msol8_HN_CP	BOFG175-11	Copan	Honduras	14.94	-88.87	
Msol9_GT_PE	BOFG178-11	Peten	Guatemala	17.07	-89.35	

	Myuc1_GT_CQ	BOFG098-11	Chiquimula	Guatemala	14.55	-89.65
	Myuc2_GT_SR	BOFG113-11	Santa Rosa	Guatemala	14.29	-90.48
<i>M. yucatanica</i>	Myuc3_GT_JU	BOFG144-11	Jutiapa	Guatemala	14.19	-89.79
	Myuc4_MX_YU	BOFG208-11	Yucatan	Mexico	20.03	-89.18
	Myuc5_MX_OA	Mel42_MX	Oaxaca	Mexico	15.75	-96.14
<i>S. pectoralis</i>	Spectoralis_NI_JI	ARG-14490-95	Jinotega	Nicaragua	13.25	-85.85

### *DNA extraction, PCR and sequencing*

Genomic DNA was extracted from the second or third right leg from each individual. DNA extraction, PCR, and sequencing of 74 sequences were done at the Canadian Centre for DNA Barcoding at Guelph University (Guelph, Ontario) employing standard protocols according to Hebert et al. (2003) and available online at <http://www.dnabarcoding.ca/pa/ge/research/protocols>. Primers used for amplifying the DNA barcode sequences were LepF1 and LepR1 (Hebert et. al., 2004).

The remaining 26 DNA samples were processed at the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. DNA was extracted using GeneAll® Exgene™ Tissue SV, mini following producer's protocol. Primers used for amplifying DNA were LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and LCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). Polymerase chain reactions (PCR) were done using 2-4 µl of DNA sample in 19 to 23 µl of mix. Mix used to perform the PCR included 10x PCR buffer, 0.5 µM of each primer, 10 µM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Platinum Taq polymerase (Invitrogen) and 40-50 ng of DNA template. The amplification thermal conditions consisted of an initial denaturation of 3 min at 95°C followed by 30 cycles of 40 s at 94°C, 45 s at 50°C and 45 s at 72°C and a final extension of 7 min at 72°C. PCR products were observed in a 1% agarose gel. Sequencing was performed in both directions at the High-Throughput Genomics Unit at the University of Washington (<http://www.htseq.org/index.html>).

Sequences were assembled using Sequencher version 5.1. (GeneCodesCorporation) and edited and visually checked using Bioedit v. 7.2.3 (Hall 1999). Haplotype diversity and Tajima's D neutrality test were calculated using DNAsp v. 5.10 (Librado & Rozas 2009).

#### *Evaluation of species limits*

*Melipona* species boundaries were assessed using two approaches. The first approach was a genetic distance analysis, which calculates divergences among COI sequences. As proposed by Hebert et al. (2003), the sequences from different species will generally diverge in more than 2 % while sequences from the same species will diverge in ~0.1%. The corrected pairwise distances (*p*-distances) between sequences were calculated with the program MEGA 6 (Tamura et al. 2013) using the Kimura 2-parameter evolutionary model (Kimura 1980). A Neighbor-Joining analysis was performed to visualize the results.

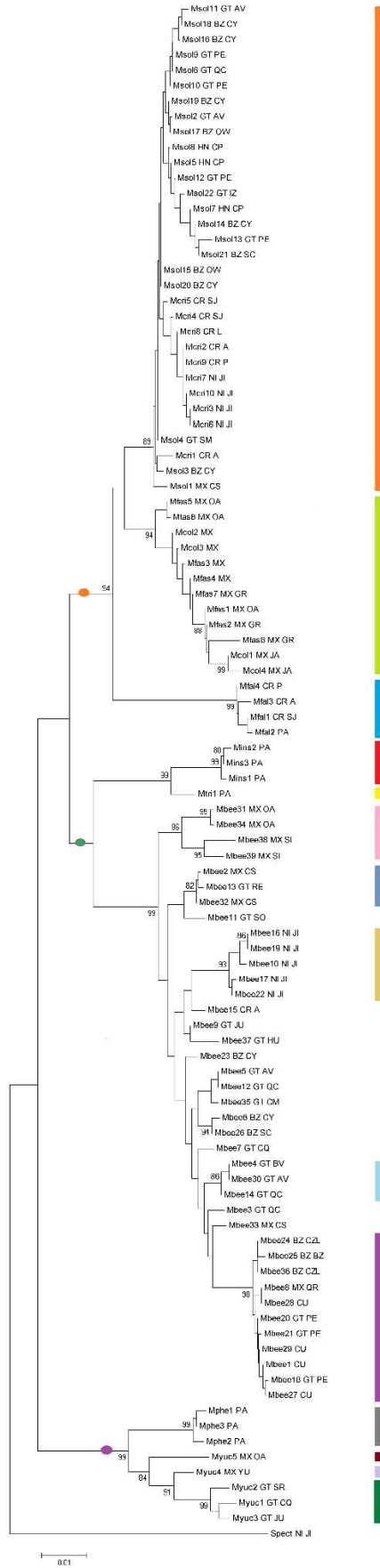
We also carried out a species delimitation analysis using the *Generalized Mixed Yules-Coalescent* (GMYC) model (Pons et al. 2006, Monaghan et al. 2009). The COI locus was partitioned into 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> positions. We selected for each partition the GTR+G evolutionary model using the program JModeltest v. 3.1.3 (Darriba et al. 2012). The ultrametric tree required for the GMYC model was reconstructed using the Bayesian method as implemented in the program BEAST v. 1.7.4 (Drummond et al. 2012). MCMC chains were run for 10 million generations, sampling trees every 1000 generations, obtaining 10 000 trees, from which the first 5000 were discarded as burn-in. Codon positions and clock models were unlinked, and a lognormal relaxed clock and two tree priors (coalescent size and random tree) were applied. The remaining 5000 trees were imported into the Tree Annotator program to reconstruct a maximum clade credibility tree using mean heights and 0.1 as posterior probability to resolve the tree. The reconstructed ultrametric tree was analyzed with the GMYC method using the SPLIT package (<http://rforge.r-project.org/projects/splits/>) implemented in R version 2011 (R Development Core Team, 2011), using the single threshold approach.

## Results

A total of 100 COI sequences (658 bp) were generated for this study. The analyzed sequences included 123 variable sites. A total of 49 unique haplotypes were found with a haplotype diversity of 0.945. The Tajima's D neutrality test was not significant (Tajima's D: -0.50149,  $p > 0.10$ ).

The two methods performed differ in relation to the putative number of species, both yielding a higher number of species than the currently accepted morphology-based taxonomy for *Melipona*. The examined sequences cluster in main clades that correspond to three morphological defined subgenera (*Melipona* s. str., *Michmelia* and *Melikerria*) (Figures 1 and 2). Sequences assigned to identified species form monophyletic groups except for *M. solani* - *M. costaricensis* and *M. fasciata* - *M. colimana*. Pair-wise divergences within sequences assigned to morphological species were, in most of the cases, considerably low (between 0.16 and 0.64%), whereas divergences between sequences from different species were considerably higher (between 2.58 to 8.98 %) (Table 2). However, for two species, intraspecific variation was higher than the average value (*M. beecheii* (1.87%) and *M. yucatanica* (1.92%)), whereas two pair of species showed considerably low interspecific distances (*M. fasciata* - *M. colimana*: 0.76%; and *M. solani* - *M. costaricensis*: 0.92 %).





**Figure 1.** Neighbour-joining tree reconstructed for DNA barcoding sequences. Sequence names include ID number, a two-letter code indicating the country, a two letter-code indicating the state where the specimen was collected, and a three-letter code indicating the name of nominal species to which they are associated: *M. beecheii* s.l.: Mbee; *M. triplaris*: Mtri; *M. insularis*: Mins; *M. fallax*: Mfal; *M. solani*: Msol; *M. costaricensis*: Mcri; *M. colimana*: Mcol; *M. fasciata*: Mfas; *M. yucatanica*: Myuc; *M. phenax*: Mphe. Color bars indicate clades (>80% bootstrap) that might represent putative species under the 2% threshold pairwise distance analysis. Colored dots indicate subgenera: lila: *Melipona*, green: *Melikerria*; orange: *Michmelia*.

According to the NJ tree, we identified five and three well supported clades (>80% bootstrap) within the *M. beecheii* and the *M. yucatanica* clades respectively (Figure 1). Pairwise differences within sequences from these clades give values lower than the 2% threshold (0.8%), though distances between them are considerably higher (1.8 – 3.0%).

The *M. colimana* - *M. fasciata* clade does not show a clear internal structure, and sequences of both species appear intermingled, evidencing a polyphyletic origin. For the *M. solani* - *M. costaricensis* clade, two clusters, each containing exclusively *M. costaricensis* and *M. solani* sequences respectively are formed; however, they are poorly supported (<50% bootstrap).

Accordingly, the 2% distance method delimited 14 species within the genus *Melipona* from Central America and Mexico (Table 3). Two species pairs (*M. costaricensis* – *M. solani* and *M. colimana* – *M. fasciata*) were fused, whereas two species were split (i.e. *M. beecheii* into 5 putative species and *M. yucatanica* into 3) (Table 3).

**Table 2.** Mean pair-wise distance sequence divergence (in percentage) for sequences of 10 morphologically accepted *Melipona* species of Mexico and Central America. Numbers on diagonal indicate intraspecific sequence differences. Numbers in lower triangle represent interspecific sequence divergence.

Species	<i>M. fasciata</i>	<i>M. colimana</i>	<i>M. solani</i>	<i>M. costaricensis</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. beecheii</i>	<i>M. insularis</i>	<i>M. triplaris</i>	<i>M. yucatanica</i>	<i>M. phenax</i>
<i>M. fasciata</i>	0.64									
<i>M. colimana</i>	0.76 <sup>†</sup>	0.53								
<i>M. solani</i>	2.61	2.79	0.51							
<i>M. costaricensis</i>	2.58	2.78	0.92 <sup>†</sup>	0.34						
<i>M. fallax</i>	4.00	4.20	4.15	4.30	0.16					
<i>M. beecheii</i>	6.54	6.92	6.01	5.70	7.84	1.87*				
<i>M. insularis</i>	6.68	6.83	5.73	5.72	7.52	5.95	0.20			
<i>M. triplaris</i>	5.72	5.90	5.18	4.88	6.90	5.29	1.79 <sup>†</sup>	n/c		
<i>M. yucatanica</i>	7.68	8.04	6.77	6.90	8.07	8.98	7.77	7.07	1.92*	
<i>M. phenax</i>	7.70	7.98	6.94	6.69	8.83	7.97	7.38	6.85	3.42	0.32

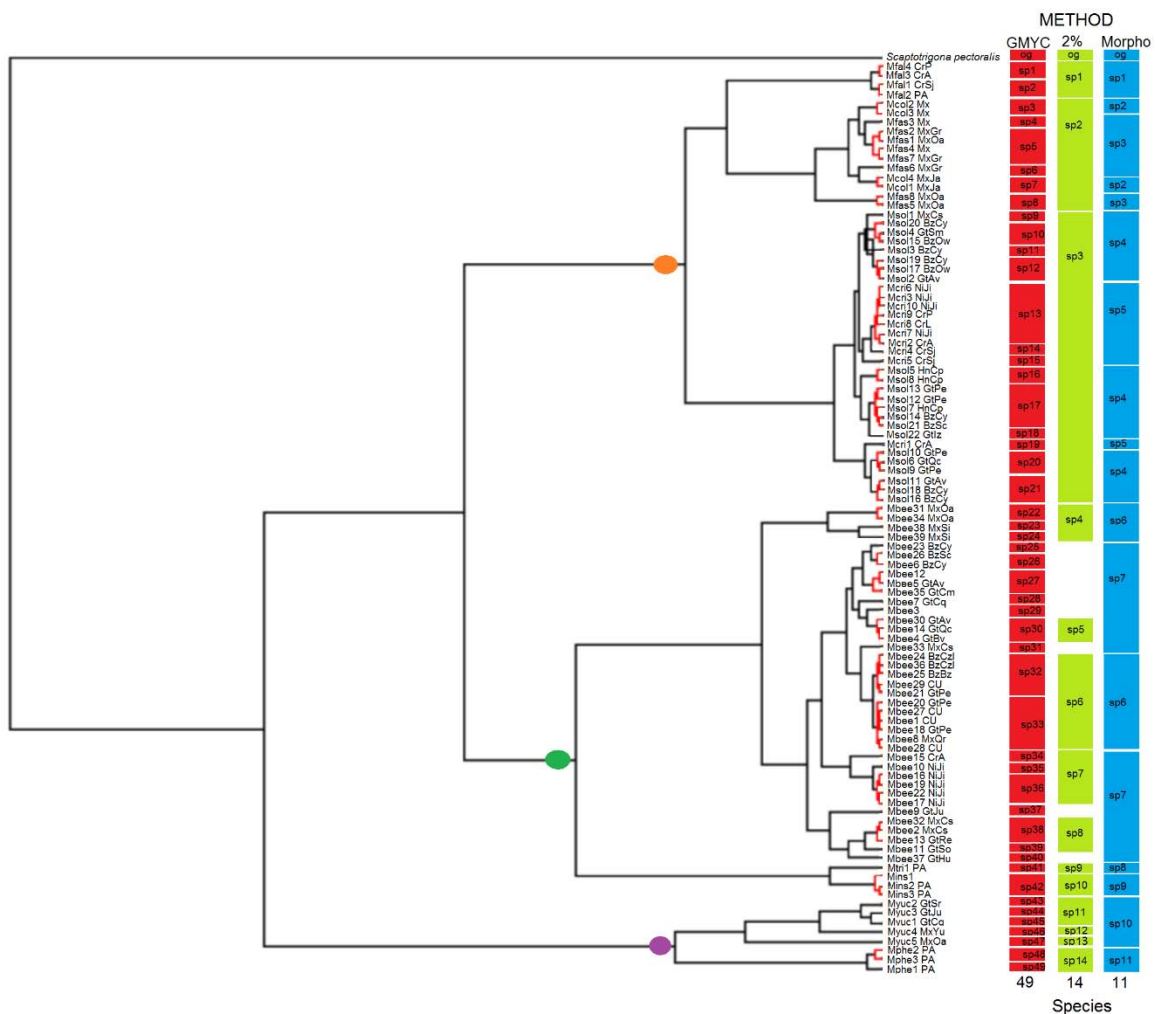
The GMYC single locus-based method recovered 49 “barcoding” species of *Melipona* from Central America and Mexico (CI=1-5, LH of null model= 675.2731, MLH of GMYC model= 677.2625). Of these, 23 are represented by clades with more than one haplotype and 26 by a single one. Accordingly with the results showed in Table 3, all of the morphological defined species contain more than one GMYC species except *M. triplaris* and *M. insularis*. On the other hand, *M. beecheii* is the species for which more putative species were identified.

**Table 3.** Number of putative species recovered with three different approaches (GMYC, 2% distances and morphology) and number of specimens.

Species	Number of specimens	Number of GMYC species	Number of 2% species	Number of Morphological species
<i>M. fallax</i>	4	2	1	1
<i>M. colimana</i>	4	2	1	1
<i>M. fasciata</i>	8	4	1	1
<i>M. solani</i>	22	9	1	1
<i>M. costaricensis</i>	10	4	1	1
<i>M. triplaris</i>	1	1	1	1
<i>M. insularis</i>	3	1	1	1
<i>M. beecheii</i>	39	19	5	2
<i>M. yucatanica</i>	5	5	3	1
<i>M. phenax</i>	3	2	1	1
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>49</b>	<b>14</b>	<b>11</b>

The 2% distance approach and the single locus based GMYC method used to assess species boundaries within *Melipona* species in Central America and Mexico show little congruency in delimiting putative species. The GMYC method retrieved considerably more

potential species than the 2 % distance method or the morphology (Table 3). Just one species (*M. insularis*) was congruently retrieved by the three methods, whereas three species were congruent between the 2% distance method and the morphology (Figure 2). These species are *M. fallax*, *M. insularis*, *M. triplaris*, *M. phenax*. Within the *M. beecheii* complex we can observe a partial congruence between the methods. Within this complex one putative species differentiate from the rest based on diagnostic characters (sp6 in blue band, Figure 2). Additionally, this putative morphospecies show enough genetic differentiation to allow its separation in two putative species (sp4 and sp 6 green band, Figure 1) under the 2% distance method and in five putative GMYC species (sp, 22, 23, 24, 32, and 33 red band, Figure 1).



**Figure 2.** Bayesian ultrametric tree reconstructed for DNA barcoding sequences. Sequences name include ID number, a two-letter code indicating the country, a two letter-code indicating the state where the specimen has been collected, and a three-letter code indicating the name of nominal species to which they are associated: *M. beecheii* s.l.: Mbee; *M. triplaridis*: Mtri; *M. insularis*: Mins; *M. fallax*: Mfal; *M. solani*: Msol; *M. costaricensis*: Mcri; *M. colimana*: Mcol; *M. fasciata*: Mfas; *M. yucatanica*: Myuc; *M. phenax*: Mphe. Black bars indicate singletons, red bars indicate species lineages recovered by the GMYC model. Bands on the left side indicate number of species recovered by each method: red band GMYC, green band: 2% distance and blue band: morphological; species number on each band are not equivalent among methods. Color circles indicate subgenera: lila: *Melipona*, green: *Melikerria*; orange: *Michmelia*.

## Discussion

*Melipona* stingless bee species are important ecologically, culturally and economically, yet some doubts have arisen on the taxonomy of some of the species. In light of the current diversity crisis, this situation turns important because usually conservation strategies rely on the preservation of species and their habitats. DNA-based methods such as the general mixed Yule-coalescent (GMYC) model (Pons et al. 2006) or the 2% distance approach (Hebert et al. 2003) have been proved useful in investigating species limits within social bee species including bumblebees (Lecocq et al. 2015) and stingless bee species (Hurtado-Burillo et al. 2013).

Lecocq et al. (2015) reported only a partial congruence between GMYC method and morphological taxa. Hurtado-Burillo et al. (2013), on the other hand, indicate a total agreement between morphology and DNA-based methods (i.e. GMYC and 2% approaches); however they report some level of genetic differentiation within taxa which suggest the presence of potential species complexes. Here, we assessed the species limits of ten currently recognized species of *Melipona* from Central America and Mexico using both the 2% distance and the single locus based GMYC methods based on mtDNA barcoding sequences. We found little congruence between both methods and morphology, since just one species was recognized by the three methods.



Although most of the species-assigned sequences cluster as monophyletic group, our data show that some of the species might correspond in fact to more than one species. The 2% approach was more conservative in identifying morphological species congruently; however, sequences assigned to *M. beecheii* and *M. yucatanica* show enough genetic differentiation as of suggesting the presence of additional species within each taxa. The GMYC method also divided those same species, however the number of potential species identified is greater. The splitting of the morphological species may be a consequence of the recent radiation of the genus *Melipona* within Central America and Mexico. A most common ancestor for *Melipona* have been proposed during the Miocene (14 -17 My) (Ramírez et al. 2010). Although the origin of the genus is unknown, some authors have suggested that it might have originated in South America (Rasmussen & Cameron 2010). Moreover, there is evidence of mainland connections during the Miocene (i.e. endemic island species – *M. variegatipes* and *M. insularis*) but northward colonization took place until the closing of the Panamian bridge (Roubik & Camargo 2012). Thus the time for diversification of *Melipona* species of Mexico and Central America is relatively recent. As eusocial species, *Melipona* are nest-dispersing species (Roubik 2006), this characteristic also contributes to delay the process of speciation.

Another potential explanation for the high number of potential species, at least within *M. beecheii* is the sample size. Talavera et al. (2013) have shown that the number of potential species may be overestimated within taxa with larger sample size and for which representatives were derived from larger geographic area thus increasing the intraspecific divergence with respect to other taxa. Accordingly, in our data set, the GMYC approach retrieved 19 potential species within the morphological species *M. beecheii*, for which area of geographic distribution, sample size and intraspecific divergences are considerably larger than for the rest of species.

*Melipona* are eusocial bees and have a haplodiploid reproduction (females are product of fertilized eggs while males are of unfertilized eggs) (Michener 2007). This characteristic will reduce their effective population size (Nomura & Takahashi 2012). Whereas population size may be a factor affecting the accuracy of DNA-based species limits such as GMYC (Fujisawa & Barraclough 2013), it has been demonstrated that the actual factor affecting the performance of such methods is the effective population size variability (Ahrens et al. 2016). This issue can be overcome, however, increasing the sample size as well as the geographic extent where specimens are derived.

Fragments of mtDNA within the nuclear genome (*numts*) are non-functional regions which may be accidentally amplified overestimating the number of delimited potential species in DNA-based delimitation analyses (Song et al. 2008). Two kinds of *numts* have been described: The *paleonumts*, which have been transfer before the speciation took place, and which will often cluster together and separated from the orthologues; and the *neonumts* which are of recent integration and did not have accumulated enough mutations so they cluster together with the orthologues (Song et al. 2014). *Neonumts* will not affect strongly the analyses. The presence of *numts* has been reported within species of the *Melipona*, in particular in the subgenus *Michmelia* (Cristiano et al. 2012, Ruiz et al. 2013). Cristiano et al. (2012) have identified *numts* (*paleonumts*) that group together and which they inferred were transfer prior to the species diversification. These authors suggest the presence of additional *numts* (i.e. *neonumts*) based on the misplacement of the species. Our sequences cluster in monophyletic groups corresponding to their assigned morphological species, except for two species pairs, which are from the *Michmelia* subgenus *M. colimana* – *M. fasciata* and *M. solani* – *M. costaricensis* which representative cluster together. This may indicate the presence of *neonumts*, whereas no indication of *paleonumts* is shown.

Our results indicate that barcoding data alone is not enough to delimit boundaries within *Melipona* species of Central America and Mexico, although it is powerful enough to suggest incipient speciation within the genus, especially within the subgenus *Michmelia*. We therefore recommend further analyses using a wider array of data such as nuclear DNA or distribution analysis. Moreover, the data presented here might have an important impact in the conservation of these important bees since it makes evident that conservation strategies must take into account their genetic diversity.

### **Acknowledgements**

CLY sincerely thanks Dr. Tabaru and Dr. Monroy for financial support for field trips, Laurence Packer and the Emerging Leaders for the Americas Program (ELAP), Cristof Schüepp, John Ascher, Steve Javorek, David Roubik, R Ayala, Olivia Yáñez, Ingrid Aguilar, Manuel Ortiz, Enio Cano, Eunice Enríquez, for lending specimens, Edson Sandoval-Castellanos and Carolina Ferreira-Cardoso for advice regarding the use of computer programs and analysis. This study was made under the Postgraduate Program in Biological Sciences of UNAM under the Agreement between UNAM and USAC.

### **References**

- Ahrens, D., Fujisawa, T., Krammer, H.J., Eberle, J., Fabrizi, S., Vogler, A.P. (2016) Rarity and incomplete sampling in DNA-based species delimitation. *Syst. Biol.* 65, 478-94. DOI: 10.1093/sysbio/syw002.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M. (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16, 314–321.
- Cristiano, M.P., Fernandes-Salomão, T.M., Yotoko, K.S.C. (2012) Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*. DOI: 10.1007/s13592-012-0122-4.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., (2012) JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772.

- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linnean Soc.*, 85, 407-415.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Fujisawa, T., Barraclough, T. G. (2013) Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Syst. Biol.* 62, 707–724.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., Moritz, C. (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 27, 480-488.
- Gutiérrez-García, T.A., Vázquez-Domínguez, E. (2013) Concensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quat. Res.* 79, 311–324.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. R. Soc. London B*, 270, 313-321.
- Hurtado-Burillo, M., Ruiz, C., de Jesús May-Itzá, W., Quezada-Eúan, J. J. G., De la Rúa, P. (2013) Barcoding stingless bees: genetic diversity of the economically important genus *Scaptotrigona* in Mesoamerica. *Apidologie*, 44, 1-10.
- Jackson, J. B. C. et al. (eds) 1996. *Evolution and environment in tropical America*. Univ. Chicago Press.
- Kimura, M., (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Lecocq T., Dellicour S., Michez D., Dehon M., Dewulf A., De Meulemeester T., Brasero N., Valterová I., Rasplus J.-Y. Rasmont P. (2015) Methods for species delimitation in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*): towards an integrative approach. *Zoologica Scripta*, 44, 281–297.
- Librado, P., Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452
- Mace, G.M., Baillie, J., Masundire, H., Ricketts, T.H., Brooks, T.M., Hoffmann, M., Stuart, S., Balmford, A., Purvis, A., Reyers, B., Wang, J., Revenga, C., Kennedy, E.T., Naeem, S., Alkemade, R., Allnutt, T., Bakarr, M., Bond, W., Chanson, J., Cox, N., Fonseca, G., Hilton-Taylor, C., Loucks, C., Rodrigues, A., Sechrest, W., Stattersfield, A.J., van Rensburg, B. Whiteman, C. (2005) Biodiversity. In: *Millennium ecosystem assessment. Current states and trends: Findings of the condition and trends working group. Ecosystems and human well-being*, vol. 1. Island press Washington DC, pp. 77-122.

- May-Itzá W. de J., Quezada-Euán, J. J., Medina Medina, L. A., Enríquez, E. De la Rúa, P. (2010) Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conserv. Gen.* DOI 10.1007/s10592-010-0087-7.
- May-Itza, W.D.J., Quezada-Euan, J.J.G., Ayala, R., De la Rúa, P. (2012) Morphometric and genetic analyses differentiate Mesoamerican populations of the endangered stingless bee *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponidae) and support their conservation as two separate units. *J. Insect Conserv.* DOI 10.1007/s10841-012-9457-4
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., et al. (2009) Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Syst. Biol.*, 58, 298–311.
- Moure, J. S. W. E. Kerr. (1950) Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). *Dusenya* 1, 105-129.
- Nomura, T., Takahashi, J. (2012) Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker-produced males. *Heredity*, 109, 261–268. <http://doi.org/10.1038/hdy.2012.11>
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., Hanner, R. (2009) DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Mol. Ecol. Res.*, 9, 42-50.
- Pons J., Barraclough T.G., Gomez-Zurita J., Cardoso A., Duran D.P., Hazell S., Kamoun S., Sumlin W.D., Vogler A.P. (2006) Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol.* 55, 595–609.
- R Development Core Team, (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A. (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* 99, 206–232.
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37, 124-143.
- Roubik, D.W., Camargo, J. M.F. (2012) The Panama microplate, island studies and relictual species of *Melipona* (Melikerria) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Syst. Entomol.* 37, 189-199.
- Ruiz C., May-Itzá W. de J., Quezada-Euán J.J.G., De la Rúa P. 2013. Presence of nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in two related species of stingless bee *Melipona* (Hymenoptera: Meliponini). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* (DOI: 10.1111/jzs.12011



- Schwarz, H. F. 1932. The genus *Melipona*. The type genus of the Meliponidae or stingless bees. B. Am. Mus. Nat. Hist. 63, 231-460.
- Satler, J.D., Carstens, B.C., Hedin, M., (2013) Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Aliatypus*). Syst. Biol. 62, 805–823.
- Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A. (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proc Natl Acad Sci USA 105, 13486–13491.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729.
- van Velzen, R., Weitschek, E., Felici, G., Bakker, F.T., (2012) DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. PLoS ONE 7, e30490.
- Wheeler, Q. D. (2004) Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. Philosophical Trans. R. Soc. L. B., 359, 571-583.
- Yurrita, C.L. Vásquez, M. (2013) Stingless Bees of Guatemala, in: Vit, P., Pedro, S. R. M. and Roubik, D. W. (Eds.), Pot-Honey a legacy of stingless bee. Springer, New York, pp. 99-111.

## 6. CAPÍTULO 4

### Revisión taxonómica de las especies de *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de México y Centroamérica

Carmen L. Yurrita<sup>1,2,3</sup>, Ricardo Ayala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Distrito Federal, México.

<sup>2</sup>Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

<sup>3</sup>Estación de Biología Chamela, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado postal 21, San Patricio, Jalisco 48980, México

#### Resumen

Con base en información morfológica y molecular (código de barras del DNA) se reconocen 14 especies (*Melipona beecheii* Bennett, 1831; *M. nigripes* Friese, 1900; *M. triplaridis* Cockerell, 1925; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *Melipona* n sp. (*sensu* Roubik); *M. lupitae* Ayala, 1999; *M. yucatanica* Camargo, Moure, & Roubik, 1988; *M. phenax* Cockerell, 1919; *M. carrikeri* Cockerell, 1919; *M. torrida* Friese, 1917). *M. beecheii* s.l. es dividida y la especie *M. nigripes* Friese fue reinstalada, y tres especies fueron sinonimizadas, *M. panamica* Cockerell dentro de *M. costaricensis* Cockerell, *M. belizeae* Schwarz en *M. solani* Cockerell y *M. micheneri* Schwarz como parte de *M. carrikeri* Cockerell. El análisis cladístico muestra datos preliminares y será necesaria la búsqueda de nuevos caracteres así como la redifinición de los existentes para obtener una mejor hipótesis filogenética para el género *Melipona*.

*Palabras clave:* Apoidea, Meliponini, taxonomía, Centro America, Meliponicultura

#### Introducción

El bienestar de la humanidad depende entre otros aspectos, de los servicios ecosistémicos como el de la polinización, provistos por la diversidad biológica (Mace et al. 2005). Sin embargo, se ha postulado que el estilo de vida de los humanos modernos ha acelerado la tasa de extinción de manera extrema (Ceballos et al. 2015). Actualmente se estima que se conoce el ~14% de la

biodiversidad terrestre existente (Mora et al. 2011). Para comunicar de manera efectiva la información sobre la biodiversidad de la que dependemos y poder desarrollar con ello mejores estrategias de conservación, es necesario desarrollar estudios faunísticos y taxonómicos que permitan descubrir y nombrar las especies que aún no se conocen (Wheeler 2004; Dayrat 2005), y actualizar con nuevas revisiones taxanómicas lo que ya se conoce (Packer et al. 2009; González y Griswold 2010).

El género *Melipona* Illiger, 1806 pertenece a la tribu Meliponini (Apidae: Apinae) que reúne a las abejas conocidas comúnmente como abejas sin aguijón (Michener 2007). Meliponini integra junto con otras tres tribus (Apini, Bombini y Euglossini) un grupo monofilético, que se caracteriza entre otros aspectos por la presencia de una corbícula en la tibia de la pata posterior de las hembras (Roig-Alsina & Michener 1993). Las abejas de la Tribu Meliponini se distinguen de las otras abejas corbiculadas por los siguientes caracteres: uñas simples, arolium presente, espolones tibiales traseros ausentes, basitarso posterior delgado en la base y tibia trasera con penicilio, venas poco definidas de las alas, estigma grande, pre-estigma pequeño o ausente y ala posterior con un lóbulo yugal bien desarrollado. Además, en las hembras el aguijón y sus estructuras asociadas están muy reducidos y no son funcionales (Michener 1990; 2007).

El género *Melipona* es exclusivamente Neotropical, y se presenta desde México (Tamaulipas y Sinaloa) hasta Argentina (Tucumán y Misiones) (Michener 2007). Estas abejas como los demás meliponinos son consideradas abejas verdaderamente sociales (eusociales), que forman colonias perennes con traslape de generaciones y diferenciación de castas (Michener 2007). La mayoría de las especies del género construyen sus nidos en cavidades, principalmente en árboles maduros (~20 cm de diámetro), lo que las predispone más a los efectos de la pérdida de hábitats naturales (Nogueira-Neto 1997; Antonini & Martins 2003; Macías-Macías et al. 2014). Estas abejas tienen un potencial económico importante porque se

consideran eficientes polinizadores en los ecosistemas tropicales, debido a que son generalistas (polilécticas) pero constantes, tienen poblaciones numerosas (>1000 individuos por colmena) y presentan polinización por vibración (Slaa et al. 2006). Por otra parte, estas abejas también son importantes culturalmente porque los productos de sus colmenas (miel, polen y propóleo) son utilizados como recursos alimenticios y medicinales alternativos, y en prácticas religiosas (Aguilar et al. 2013; Ayala et al. 2013; Yurrita & Vásquez 2013).

El género *Melipona* fue descrito por Illiger en 1806, pero incluyó a un representante de *Trigona* Jurine, 1807. Durante casi un siglo los taxónomos que estudiaron abejas sin aguijón, no establecieron diferencias clara entre los dos géneros (*Melipona* y *Trigona*), utilizando por lo tanto ambos nombres indistintamente para nombrar a especies nuevas. Fue hasta la década de 1920 cuando, gracias al trabajo de Lutz en 1924 y Ducke en 1925, se superó esta situación, con la propuesta de caracteres diagnósticos para separar de manera adecuada los dos géneros (Schwarz 1932).

En 1932, Schwarz publicó una monografía para el género *Melipona* donde reconoció 12 especies y más de 22 subespecies. Posterior a ese trabajo se han nombrado al menos 18 especies nuevas (Camargo & Pedro 2013), incluyendo subespecies elevadas al nivel de especies (Moure & Kerr 1950). Otros estudios han enfocado sus esfuerzos a nivel supraespecífico, presentando una clasificación para *Melipona* que agrupa a las especies en subgéneros (Kerr et al. 1967; Moure 1992; Silveira et al. 2002). De acuerdo a Camargo & Pedro (2013) actualmente, se reconoce que el género *Melipona* consta de 78 especies, divididas en cuatro subgéneros (*Melipona* s.str., *Michmelia* Moure 1975, *Eomelipona* Moure 1992, *Melikerria* Moure 1992). Recientemente, estudios con datos moleculares han corroborado parcialmente esta división (Rasmussen & Cameron 2010; Ramírez et al. 2010), pues encuentran que *Eomelipona* parece ser un grupo polifilético, como señalan Silveira et al. (2002).

Para México y Centroamérica, se han realizado pocos estudios taxonómicos sobre las especies del género *Melipona*. Estos incluyen la revisión taxonómica de la tribu Meliponini de México (Ayala 1999), la guía de identificación de las especies de meliponinos de Panamá y Mesoamérica (Roubik 1992), y publicaciones en las que se describen seis nuevas especies (Schwarz 1951; Camargo et al. 1988; Ayala 1999; Camargo & Pedro 2008; Roubik & Camargo 2012). Actualmente, para el área incluida en este estudio se conocen 16 especies (*Melipona beecheii* s.l. Bennett, 1831; *M. triplaris* Cockerell, 1925; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. belizeae* Schwarz 1932; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. panamica* Cockerell, 1912; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *M. lupitae* Ayala, 1999; *M. yucatanica* Camargo, Moure, & Roubik, 1988; *M. phenax* Cockerell, 1919; *M. micheneri* Schwarz, 1951, *M. carrikeri* Cockerell, 1919; *M. torrida* Friese, 1917) representando a los cuatro subgéneros (Camargo & Pedro 2013). Sin embargo, estudios moleculares sugieren que las especies *M. yucatanica* (May-Itzá et al. 2010) y *M. beecheii* (May-Itzá et al. 2012) forman complejos de especies crípticas. Por otra parte, un estudio sobre las relaciones supraespecíficas de *Melipona* en el que se utilizan varios marcadores moleculares incluye una poca representatividad de las especies de México y Centroamérica (Ramírez et al. 2010).

Recientemente, se han propuesto metodologías que complementan el estudio taxonómico, como la técnica del Código de Barras de DNA. Esta técnica propone, en el caso de los animales, el uso de un fragmento (~650 bp) de DNA del gen mitocondrial de la enzima Citocromo C Oxidasa subunidad 1 (CO1) como información diagnóstica confiable para identificar especies (Hebert et al. 2003). Actualmente se considera que puede ser empleado como un paso inicial para delimitar especies morfológicamente difíciles de separar (Packer et al. 2009; Goldstein & DeSalle 2011; Fujita et al. 2012).



En este trabajo se presenta la revisión taxonómica de las especies del género *Melipona* presentes en la región comprendida entre el norte de México y Panamá, utilizando información de la morfología externa de las obreras y de la genitalia de los machos. Con el fin de obtener información que permita establecer una mejor definición de las especies se incluye información molecular específicamente de la región del código de barras del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) (i.e. código de barras de DNA). Adicionalmente se realizó un análisis cladístico preliminar de inferencia filogenética con base en la morfología de las obreras de las especies presente en el área incluida en este estudio.

## **Material y métodos**

### **Información con base en la morfología**

*Material examinado.* Para este trabajo fueron revisados 844 ejemplares de las especies de *Melipona* registradas para México y Centroamérica, así como especies registradas únicamente para América del Sur, con representantes de los cuatro subgéneros (*Melipona*, *Melikerria*, *Michmelia* y *Eomelipona*). También se revisaron los tipos disponibles en el American Museum of Natural History (AMNH), que corresponde a las especies *M. solani*, *M. belizae*, *M. triplaridis*, *M. micheneri*. Se examinaron ejemplares de los acervos de las 15 colecciones entomológicas que se presentan a continuación (se incluye el acrónimo y en paréntesis el nombre del responsable del préstamo):

**CUIC** - Insect Collection, Department of Entomology, Cornell University, USA (R.Hoebeke)

**USNM** - Smithsonian National Museum of Natural History, USA (B. Harris)

**SEM** - Snow Entomological Museum, University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA (J. Thomas)

**EME** - Essig Museum of Entomology, University of California, Berkeley, USA (C. Barr)

**AMNH** - American Museum of Natural History, USA (J. Ascher, J. Rozen)

**BBSL** - Bee Biology and Systematics Laboratory, Utah State University, USA (T. Griswold)

**EBCh** - Colección de Abejas, Estación de Biología “Chamela, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México (R. Ayala)

**MZFC** - Colección de Abejas, Museo de Zoología, “Alfonos L. Herrera”, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México (O. Yañez)

**CNIN** - Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México (M. C. Mayorga)

**MUSHNAT** - Colección Entomológica, Museo de Historia Natural, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala (E. Cano)

**CANG** - Colección de Abejas Nativas, CECON, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala (E. Enríquez)

**CINAT** - Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica (I. Aguilar)

**INBio** - Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica (M. Solís)

**MZUCR** - Museo de Zoología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica (P. Hanson)

**UNAH** - Museo de Insectos, Universidad Nacional de Honduras, Honduras (K. Cantarero)

**CNC** - Canadian National Collection of Insects, Ontario, Canadá (A. Bennett)

**PCYU** - Packer Collection at York University, Toronto, Canadá (L. Packer)

**NMBE** - Naturhistorisches Museum Bern, Suiza (C. Schüepf)

La información de las etiquetas de los ejemplares fue reunida en una base de datos en formato Excel. En la parte de “material examinado” dentro del tratamiento taxonómico de cada especie, se incluye entre corchetes la palabra “[barcoded]” para los ejemplares a los cuales se les extrajo DNA para obtener el código de barras del gen mitocondrial COI.

Algunas de las especies están representadas por más ejemplares y por lo tanto más localidades. Durante la revisión de ejemplares en colecciones no se encontraron registros de colectas en El Salvador y los de Nicaragua fueron muy escasos.

La terminología morfológica utilizada es la propuesta por Michener (1944; 2007). Se usa T1-T7 para hacer referencia a los tergos metasomales. El tratamiento taxonómico incluye la diagnosis del género *Melipona*, así como una diagnosis para cada especie, la cual se centra en caracteres externos de las obreras. Se incluye el inciso “Observaciones” para comentar sobre las variaciones de los caracteres entre las especies; así como un inciso que incluye información sobre distribución.

El estudio morfológico fue realizado utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZ61. Se incluyen mediciones en mm de lo siguiente: largo del cuerpo (de margen anterior del clípeo hasta ápice del metasoma, en hábito lateral), ancho de la cabeza (entre los márgenes exteriores de los ojos) y largo del ala anterior (entre borde posterior de tégula y punta del ala). Las mediciones incluyen al menos 10 ejemplares para cada especie o los disponibles (para las especies menos representadas). Se utilizó un microscopio estereoscópico marca *Boeco* con una cámara adaptada *AmScope* de 3.1 MP. Las mediciones fueron realizadas usando las imágenes digitales utilizando con el software *ToupView* 3.7.

Se encontraron machos de las especies *M. nigripes*, *M. fasciata*, *M. costaricensis*, *M. solani* y *M. yucatanica* y se extrajo la genitalia para su descripción; para esto las estructuras se aclararon con KOH al 10% por el tiempo necesario para disolver tejidos y se almacenaron en micro viales con glicerina, que fueron insertados en el alfiler del ejemplar. Las imágenes se obtuvieron con un sistema Visionary Digital BK Plus, que usa una cámara Canon EOS 40D o con un microscopio digital VHX 600 (Digital Microscope, Keyence). Las imágenes fueron editadas utilizando el programa de acceso libre GIMP 2.8.

*Análisis cladístico.* En total se encontraron y codificaron 31 caracteres morfológicos externos de obreras (Anexo 1), que se analizaron por el método de parsimonia, utilizando el programa Tree Analysis Using New Technology (TNT 1.5) (Goloboff & Catalano 2016). Todos los caracteres fueron tratados como no-aditivos y con el mismo peso. Se realizó un análisis de búsqueda tradicional, se expandió la memoria a 10000 árboles, se utilizaron árboles iniciales de Wagner, con 1000 réplicas, reteniendo 100 árboles por réplica; el soporte de las ramas se evaluó por medio de un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas y por último, se calculó el árbol de consenso estricto. Como grupo externo se utilizó una especie del género *Bombus* (Apidae: Bombini).

### **Análisis molecular**

Las secuencias de la región de la enzima citocromo oxidasa subunidad I (COI), se obtuvieron de ejemplares identificados a nivel de especie con base en su morfología. En total se obtuvieron 99 secuencias (610 a 658 pares de bases), de ejemplares de 10 especies provenientes de ocho países (34 departamentos, provincias o estados, ver Anexo 2).

Se extrajo DNA genómico, de la segunda o tercera pata derecha, de los ejemplares de abejas. Los fragmentos de mtDNA de la región COI, fueron amplificadas utilizando los marcadores LCO-1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) y HCO-2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA) (Folmer et al. 1994), o LepF1 (ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG) y LepR1 (TAAACTTCTGGATGTCCAAAATCA) (Hebert et. al. 2004).

Parte de los ejemplares para las extracciones de su DNA, se procesó en el “Canadian Centre for DNA Barcoding”, en la Universidad de Guelph, Guelph, Ontario, de acuerdo a los protocolos del proyecto “Código de Barras de la Vida” (<http://ibol.org/> y

<http://www.boldsystems.org/>) y siguiendo la metodología definida por Hebert et al. (2003), en sus versiones específicas para insectos (<http://www.dnabarcoding.ca/page/research/protocols>).

La otra parte, fue procesada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Zoología del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. La secuenciación fue realizada en ambas direcciones, en la Unidad de Alto Rendimiento de Genómica de la Universidad de Washington (<http://www.htseq.org/index.html>). El DNA genómico de cada muestra fue extraído utilizando el kit comercial GeneAll® Exgene™ Tissue SV mini, de acuerdo a las especificaciones del productor. El volumen de la dilución fue de 21 a 27 µl. La solución mix contenía 1x PCR buffer, 0.5 µM de cada marcador, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen) y 40-50 ng de DNA. Las condiciones térmicas de la amplificación consistieron en un período inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 40 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 45 s a 72 °C y un tiempo final de extensión de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 1%.

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW implementado en BioEdit v6.0.7 (Hall 1999). Posteriormente fueron corregidas a mano para eliminar errores de alineamiento obvios utilizando el software MEGA5 (Tamura et al. 2011). Para establecer los marcos de lectura, se utilizó una secuencia completa del gen CO1 de *Bombus hypocrita* obtenida de GeneBank, la cual fue cortada al tamaño del fragmento del COI obtenido para las secuencias de las especies objeto de estudio.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el método Neighbor-Joining (NJ), para reconstruir el árbol de distancias, en el software MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Se utilizó el modelo de 2-parámetros de Kimura, con una mutación modelada con distribución gama y diferentes modelos para la 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> posiciones de los codones, así como para las regiones no codificantes. Las posiciones ambiguas fueron eliminadas del análisis. Para estimar distancias

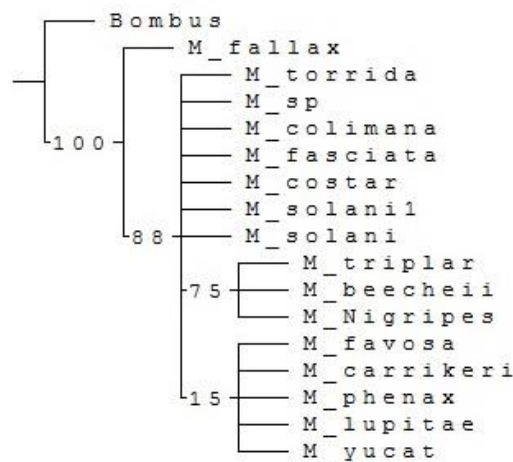
genéticas, se agruparon las secuencias en función de las especies morfológicas a las que pertenecen (i.e. *M. beecheii* s.l.; *M. triplaris*; *M. insularis*; *M. fallax*; *M. solani*; *M. costaricensis*; *M. colimana*; *M. fasciata*; *M. yucatanica*; *M. phenax*). En el caso del complejo *M. beecheii*, se procedió a separarlo en *M. beecheii* y *M. nigripes* (previamente considerada como sinonimia).

Posteriormente, se realizó un análisis bayesiano usando MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) para confirmar los patrones observados con el método de NJ. Se corrieron 30 millones de generaciones, empleando una partición de los datos por posiciones del codón, empleando el modelo GTR+G (General Time Reversible, con distribución gamma). Este modelo fue determinado utilizando el programa Mr. Modeltest. (Nylander 2004). La especie *Scaptotrigona pectoralis* (Meliponini: Apinae: Apidae) se utilizó como grupo externo.

## Resultados

### Análisis cladístico

El análisis cladístico realizado a partir de los 11 taxa y 33 caracteres morfológicos (Anexos 1 y 2), produjo ocho árboles igualmente parsimoniosos (L = 98, CI = 0.54 y RI = 0.62); la mayoría de las ramas tienen un soporte con valores de bootstrap bajo (Figura 1).



**Figura 1.** Cladograma de consenso estricto de ocho árboles igualmente parsimoniosos obtenidos, con los caracteres utilizados presentados en el Anexo 1. En los clados se presentan los valores de Bootstrap.



El análisis muestra a *Melipona* como taxón monofilético, sin embargo las relaciones entre las especies no están claras. Únicamente las especies *M. triplaridis*, *M. beecheyi* y *M. nigripes* forman un clado bien definido, que corresponde al subgénero *Melikerria*. Por otro lado, el subgénero *Melipona* aunque con un soporte muy bajo forma un clado sin embargo este es parafilético con respecto al subgénero *Eomelipona* ya que la especie *M. (Eomelipona) carrikeri* se encuentra inserta dentro de este clado. Las otras especies, que forman parte de los subgéneros *Michmelia* y *Eomelipona* no se agrupan y por lo tanto sus relaciones no están resueltas. La especie *M. fallax* aparece como grupo hermano del resto de especies (Figura 1). Esta especie que forma parte del complejo *fuliginosa* (Camargo y Pedro 2009) está incluida dentro del subgénero *Michmelia* sin embargo los resultados encontrados aquí concuerdan con lo establecido por otros autores que sugieren que *fuliginosa* se separa de las otras especies del subgénero (Silveira et al. 2002).

Aunque existen trabajos moleculares que apoyan la clasificación subgenérica (Rasmussen & Cameron 2010; Ramírez et al. 2010), los trabajos con base en la morfología son escasos (Michener 2007). Este autor cita a Rego (1992) quien con base en la genitalia de machos sugiere que los subgéneros *Melikerria* y *Eomelipona* se diferencian de *Melipona* s.str. Los valores bajos de CI y RI así como los soportes bajos en los clados, sugieren que los caracteres seleccionados son poco informativos para resolver las relaciones entre las especies de *Melipona*, por lo que es necesario realizar una búsqueda más exhaustiva de nuevos caracteres, recodificar los incluidos en este análisis preliminar e incluir más taxa.

### **Análisis molecular**

La divergencia genética entre las secuencias de la región COI, de las especies de *Melipona* de México y Centroamérica analizadas mostraron su utilidad para diferenciar entre las especies definidas previamente con base en la morfología, ya que la diferencia entre taxa es en general

mayor al 3% (Figura 2) y la divergencia dentro de los taxa es menor al 2% (Cuadro 1). Sin embargo, en tres casos puede observarse que las divergencias entre taxa son menores al 2%: entre *M. solani* y *M. costaricensis* es del 0.92%, entre *M. colimana* y *M. fasciata* es del 0.76% y entre *M. triplaris* y *M. insularis* la divergencia es del 1.79%.

**Cuadro 1.** Porcentaje de divergencia genética en 12 especies del género *Melipona* de México y Centroamérica. Los números en la diagonal representan la divergencia dentro de las especies y los números debajo de la diagonal representan la diferencia entre especies. *Scaptotrigona pectoralis* se utilizó como grupo externo.

Species	<i>M. fasciata</i>	<i>M. colimana</i>	<i>M. solani</i>	<i>M. costaricensis</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. beecheii</i>	<i>M. insularis</i>	<i>M. triplaris</i>	<i>M. yucatanica</i>	<i>M. phenax</i>	<i>S. pectoralis</i>
<i>M. fasciata</i>	0.64										
<i>M. colimana</i>	0.76 <sup>†</sup>	0.53									
<i>M. solani</i>	2.61	2.79	0.51								
<i>M. costaricensis</i>	2.58	2.78	0.92 <sup>†</sup>	0.34							
<i>M. fallax</i>	4.00	4.20	4.15	4.30	0.16						
<i>M. beecheii</i>	6.54	6.92	6.01	5.70	7.84	1.87*					
<i>M. insularis</i>	6.68	6.83	5.73	5.72	7.52	5.95	0.20				
<i>M. triplaris</i>	5.72	5.90	5.18	4.88	6.90	5.29	1.79 <sup>†</sup>	n/c			
<i>M. yucatanica</i>	7.68	8.04	6.77	6.90	8.07	8.98	7.77	7.07	1.92*		
<i>M. phenax</i>	7.70	7.98	6.94	6.69	8.83	7.97	7.38	6.85	3.42	0.32	
<i>S. pectoralis</i>	10.06	10.39	9.39	9.33	9.86	10.40	11.32	10.26	10.54	9.84	n/c

† diferencias genéticas inferiores a los esperados entre especies

\* diferencias genéticas muy cercanas a los esperados entre especies

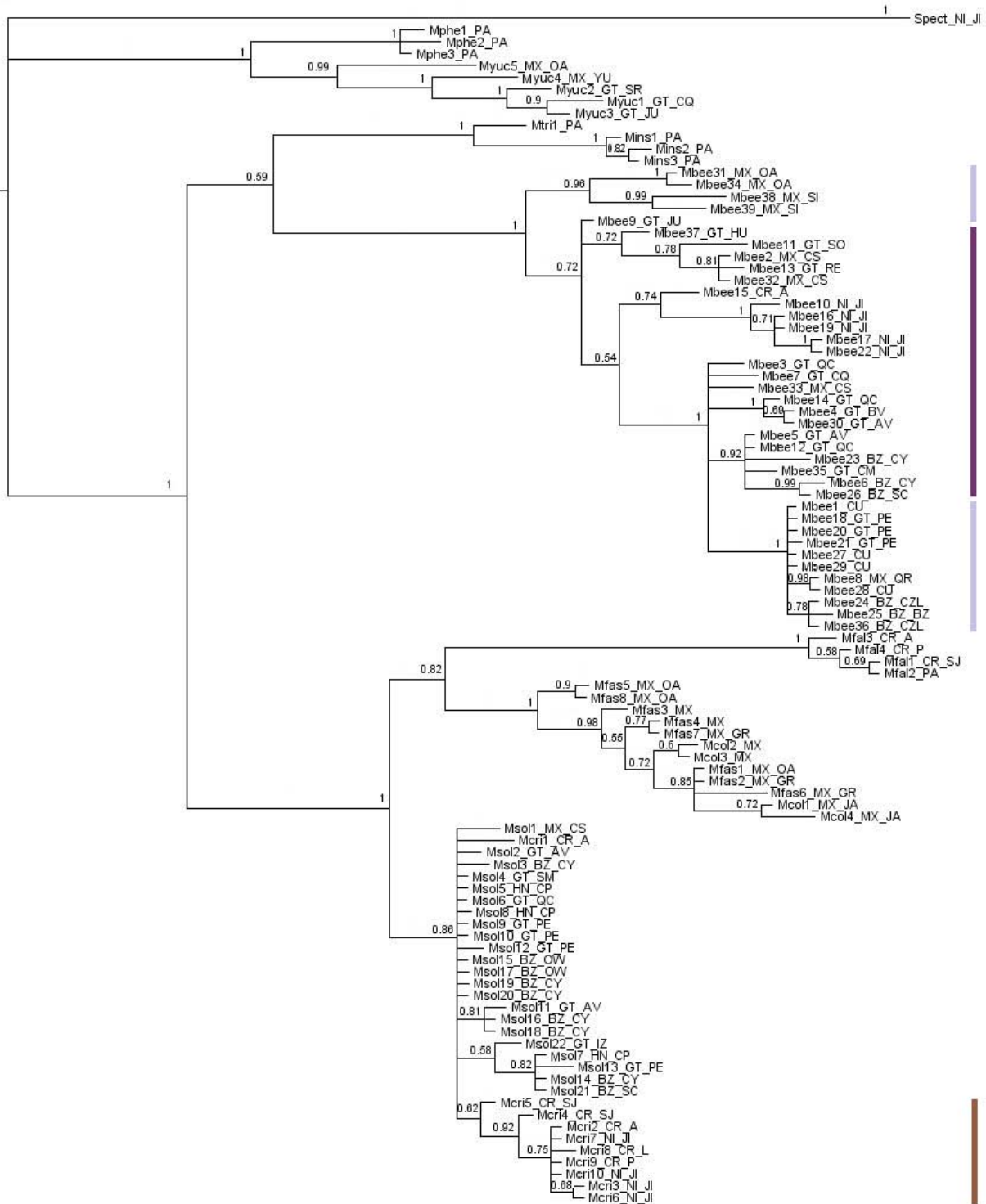
En lo que respecta a las diferencias dentro de las especies, se observa que las secuencias que conforman *M. beecheii s.l.* y *M. yucatanica* presentan una divergencia interna de aproximadamente 1.9%, siendo este valor apenas inferior al límite establecido del 2% que sugiere divergencia entre especies (Cuadro 2). Esta información concuerda con lo expuesto por May-Itzá et al. (2010) y May-Itzá et al. (2012) quienes sugieren que *M. yucatanica* y *M. beecheii* pueden representar complejos de especies.

El análisis bayesiano (Figura 2), confirma los análisis de distancia genética y muestra que los grupos de secuencias de especies reconocidas forman clados con suficiente soporte; sin embargo, también se muestran los conflictos evidenciados en el análisis de distancias genéticas. Por ejemplo, en el clado que corresponde a la especie *M. yucatanica* (cuadro azul, Figura 2) se observa que las secuencias forman al menos dos clados distintos con un soporte

alto cada uno, lo que concuerda con el alto porcentaje de divergencia dentro del grupo (~1.9%, Cuadro 2).

Las secuencias asignadas a las especies *M. costaricensis* y *M. solani* por el contrario forman un clado en donde se observa poca estructuración, lo cual concuerda con el bajo porcentaje de divergencia entre las secuencias de ambas especies (Cuadro 1) aunque dentro de este clado se observa que las secuencias provenientes de Nicaragua y que corresponden a *M. costaricensis* forman un clado con un soporte del 75%.

En relación a las secuencias correspondientes al complejo *M. becheii* s.l. estas también forman un clado sin embargo, aquí se observa una estructuración genética evidenciada por la presencia de varios clados con soporte alto (cuadro lila, Figura 2). Las secuencias que corresponden a *M. becheii* s.str. se encuentran separados formando dos clados polifiléticos que corresponden a dos áreas geográficas (Sinaloa, Jalisco y Yucatán, Norte de Petén y Belice y Cuba).



**Figura 2.** Filograma bayesiano estimado para datos moleculares de secuencias del gen mitocondrial COI. En la base de los nodos se incluye la probabilidad posterior. Las bandas de color corresponden a: Café: *M. solani* / *M. costaricensis* (la banda delgada representa a *M. costaricensis*). Rojo: *M. fasciata* / *M. colimana*. Verde: *M. fallax*. Morado: *M. beecheyi* s.l. (la banda delgada clara representa *M. beecheyi* y la banda delgada oscura *M. nigripes*). Amarillo: *M. triplariidis* / *M. insularis*. Azul: *M. yucatanica*. Anaranjado: *M. phenax*. El árbol de NJ no se incluye por ser similar al bayesiano.

## Tratamiento taxonómico

Con base en información morfológica y molecular (código de barras del DNA) se reconocen 14 especies para México y Centroamérica: *Melipona beecheii* Bennett, 1831; *M. nigripes* Friese, 1900; *M. triplaridis* Cockerell, 1925; *M. insularis* Roubik and Camargo, 2012; *M. colimana* Ayala, 1999; *M. fasciata* Latreille, 1811; *M. solani* Cockerell, 1912; *M. costaricensis* Cockerell, 1919; *M. fallax* Camargo & Pedro, 2009; *Melipona* n sp. (*sensu* Roubik); *M. lupitae* Ayala, 1999; *M. yucatanica* Camargo, Moure, & Roubik, 1988; *M. phenax* Cockerell, 1919; *M. carrikeri* Cockerell, 1919 y *M. torrida* Friese, 1917. De las anteriores, *M. beecheii* s.l. se considera que conforma un grupo de especies y se reinstala como válida a la especie *M. nigripes* Friese antes considera como sinónimo (Ayala, 1999). Tres especies fueron sinonimizadas, *M. panamica* Cockerell dentro de *M. costaricensis* Cockerell, *M. belizeae* Schwarz en *M. solani* Cockerell y *M. micheneri* Schwarz como parte de *M. carrikeri* Cockerell. De esta forma a continuación se presentan diagnosis del género *Melipona*, una clave para las especies incluidas en este estudio, ilustraciones, registros de localidades en donde se han colectado los ejemplares de cada especie, mapas con la distribución y se discute sobre diferencias entre especies utilizando información morfológica, molecular y de distribución.

### ***Melipona* Illiger, 1806**

*Melipona* Illiger, 1806

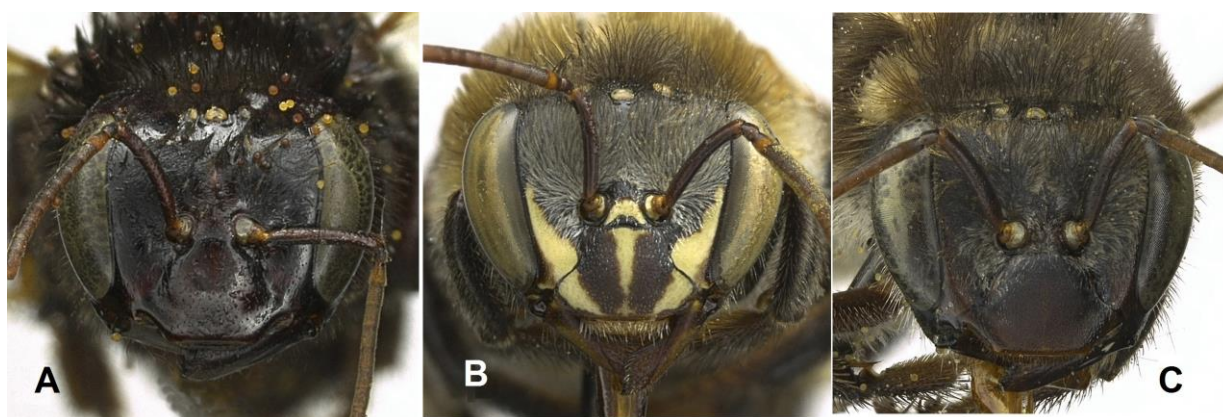
*Melipona* (*Michmelia*) Moure, 1975: 621, substituye a *Micheneria* Kerr, Pisani, e Aily, 1967

**Diagnosis.** Las abejas de este género son de aspecto robusto, con un tamaño entre 6.5 a 15 mm de longitud; cabeza más ancha que larga; área frontal y vértice con integumento opaco debido al micro-reticulado denso y con pilosidad plumosa, larga y abundante; mandíbula sin dientes o si con dientes, solamente en el ápice; mesosoma con pilosidad larga y plumosa, al contrario de otros meliponinos; alas relativamente cortas, en general no sobrepasando ápice del metasoma, o solo un poco; pterostigma estrecho y linear; ángulo submarginal entre Rs y M muy agudo;

con 9 a 14 hámulos; metasoma robusto convexo ventral y dorsalmente; tibia posterior triangular, con esquina posterior terminando en punta o ángulo; penicilo presente; rastelo muy desarrollado; superficie interna de tibia a un mismo nivel, cubierta enteramente con pilosidad fina y corta. Desde el punto de vista de su biología las especies del género *Melipona* difieren del resto de los Meliponini porque las reinas vírgenes son menores que las obreras y los machos, y son criadas en celdas de tamaño y forma idénticos a los de las otras castas (Schwarz 1932; Moure 1951; Moure 1961; Michener 1990; Silveira et al. 2002).

**Clave para obreras de las especies del género *Meliponas* de México y Centroamérica**

- 1. Abeja grande (12 mm), con aspecto general oscuro casi negro (Figura 13 C). Clípeo con integumento liso y brillante, pardo oscuro rojizo (Figura 3 A). Pilosidad del escuto negra. Tergos con pilosidad negra simple predominante, pilosidad plumosa si presente muy escasa. .... *Melipona fallax*
- Abeja de tamaño medio (6.5 – 9 mm) algunas hasta 11 mm, con aspecto general pardo o pardo claro. Clípeo con integumento con puntuado fino y uniforme, opaco y de coloración variable. Pilosidad del escuto clara, anaranjada, amarilla o blanquecina. Tergos con pilosidad variable, pero pilosidad plumosa evidente. .... 2



**Figura 3.** Cabezas en las que se muestra el integumento del clípeo: A. clípeo brillante en *M. fallax*. B. Clípeo opaco en *M. lupitae*. C. Clípeo opaco en *M. costaricensis*.

- 2(1). Escuto en los ángulos antero-laterales con mechones de pubescencia pardo rojiza (Figura 4 A), contrastante con la del resto del escuto; ápice de la mandíbula con dos dientes; parte anterior del escapo amarilla. .... 3

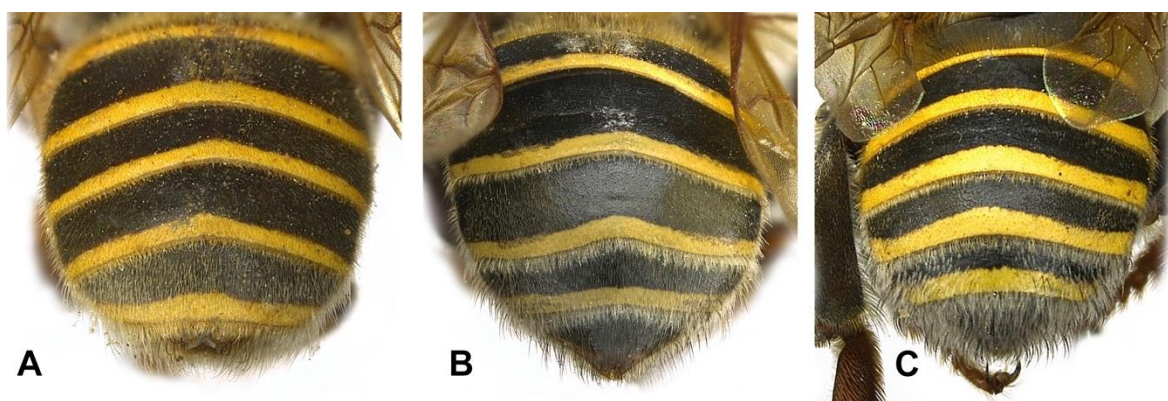


- Escuto con ángulos antero-laterales con pubescencia uniforme, similar a la del resto del escuto (sin mechón de pubescencia pardo rojiza) (Figura 4 B); parte anterior del escapo pardo, si escapo presenta la parte anterior amarilla abeja pequeña (6 mm). ..... 6
- 3(2). Abeja grande (largo del cuerpo 10 a 11 mm). ..... 4
- Abeja mediana (8 a 9 o hasta 10 mm). ..... 5



**Figura 4.** Ángulo antero-lateral del escuto: A. la presencia del mechón rojizo contrastante en *M. beecheii* y B. la ausencia de este mechón en *M. solani*.

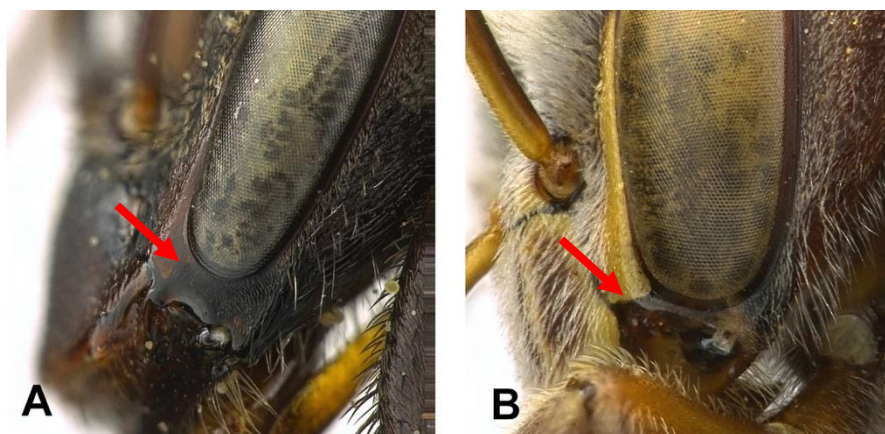
- 4(3). T6 con pilosidad discal blanquecina, plumosa densa (Figura 5 C); el margen posterior de T4 y T 5 con franja densa de pelos plumosos blanquecinos largos (1/3 de la banda amarilla), con algunos pelos negros simples entremezclados; mesosoma con pilosidad amarillenta con áreas rojizas (escutelo, márgenes de mesoscuto). Abeja grande (11 mm), presente en la parte continental de Panamá. .... *Melipona triplaris*
- T6 con pelos negros simples entremezclados con pilosidad blanquecina, plumosa, escasa, más abundantes en T7; margen posterior de T4 y T5 con franjas densa de pelos plumosos blanquecinos largos (menor a 1/3 de la banda amarilla); mesosoma con pilosidad blanquecina (excepto por el mechón pardo rojizo antero-lateral). Abeja grande (10 mm), endémica de las islas de Coiba y Ranchería, Panamá. .... *Melipona insularis*



**Figura 5 A–C.** Pilosidad de metasoma en subgénero *Melikerria*: A. Franja de pelos corta en ápice de T4 y pilosidad amarillenta simple decumbente poco perceptible en tergos de *M. beecheii*; B. Franja de pelos larga en ápice de T4 y pilosidad no evidente en tergos de *M. nigripes*; C. Pilosidad blanquecina plumosa abundante en T6 de *M. triplaridis*.

- 5(3). Tergos, principalmente T6 con pilosidad simple decumbente abundante, anaranjada, relativamente larga; metasoma pardo oscuro, margen posterior de T4 y T5 con franjas densas de pelos plumosos blanquecinos cortos (0.16 y 0.14 mm) (Figura 5 A); abeja mediana (8 a 9 mm). ..... *Melipona beecheii*
- Tergos, principalmente T6 con pilosidad simple poco abundante, blanquecina y corta (Figura 5 B); metasoma pardo anaranjado, margen posterior de los T4 y T5 con franjas densas de pelos plumosos blanquecinos largos (0.24 mm y 0.18 mm); abeja mediana. .... *Melipona nigripes*

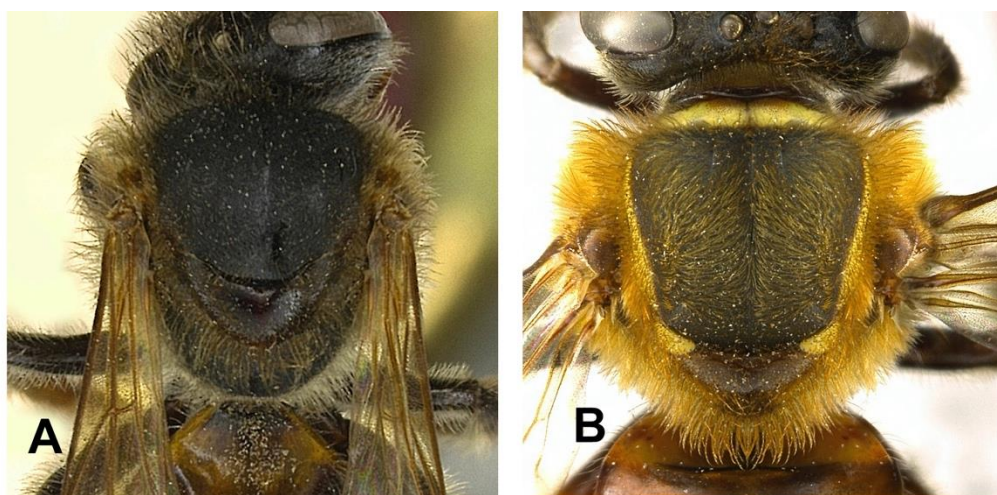
- 6 (2). Espacio malar angosto (Figura 6 B). Abejas pequeñas. .... 7
- Espacio malar amplio (Figura 6.A). Abejas medianas. .... 11



**Figura 6.** Tamaño de espacio malar: A. Espacio malar grande (flecha roja) en *M. costaricensis*. B. Espacio malar pequeño (flecha roja) en *M. beecheii*.

- 7 (6). Integumento de metasoma negro, opaco con puntuado denso. .... 8

- Integumento de metasoma oscuro de coloración variable, brillante con puntuado laxo. .... 9
- 8 (7). Tibia posterior con bordes anterior y posterior con pilosidad simple clara; con integumento pardo frecuentemente con área oscura sobre la superficie externa distal. Vértex con pilosidad clara. .... *Melipona yucatanica*
- Tibia posterior con bordes anterior y posterior con pilosidad simple oscura; con integumento pardo oscuro rojizo, frecuentemente con área oscura sobre la superficie externa distal poco perceptible. Vértex con pilosidad oscura predominante. .... *Melipona lupitae*
- 9 (7). Pronoto negro, escuto completamente oscuro (Figura 7 A). .... 10
- Pronoto amarillo, bandas amarillas en laterales del escuto (Figura 7 B), pilosidad alrededor del lóbulo pronotal, pardo claro o más oscuro, espacio malar reducido. .... *Melipona carrikeri*



**Figura 7.** Color del integumento del pronoto: A. *M. torrida*, negro al igual que el escuto. B. *M. carrikeri*, amarillo en contraste con el color de escuto.

- 10 (9). Escutelo corto, no sobresale sobre el posnoto. T1 a T6 con bandas apicales no evidentes. .... *Melipona torrida*
- Escutelo largo, sobresale del posnoto. T1-T6 con bandas apicales muy evidentes. .... *Melipona phenax*
- 11 (6). Metasoma con pelos negros simples finos cortos, muy esparcidos, integumento anaranjado, muy opaco con puntuado muy fino y denso. .... *Melipona sp.*
- Metasoma con pelos negros simples gruesos y largos, a veces muy abundantes, integumento de coloración variable, opaco o brillante. .... 12

- 12 (11). Metasoma con integumento anaranjado, brillante, de aspecto rugoso, con puntuado laxo, pelos simples negros, gruesos, esparcidos. T2 con un abultamiento lateral. ....  
 ..... *Melipona fasciata*
- Metasoma con integumento opaco, de aspecto liso, con puntuado denso, pelos negros simples finos o gruesos, muy abundantes. T2 uniforme en su estructura. .... 13
- 13 (12). Integumento en T2 y T3 opaco con puntuado denso. T3 a T6 con pelos negros simples muy gruesos y largos muy abundantes, pelos plumosos amarillos y cortos también muy abundantes. .... *Melipona solani*
- Integumento en T2 y T3 brillante con puntuado laxo. T3 a T6 con pelos negros simples gruesos y largos abundantes, pelos plumosos muy escasos. .... 14
- 14 (13). T1 a T5 con bandas amarillas apicales anchas y bien definidas; T3 y T4 sin franjas densas de pelos plumosos largos amarillentos en margen apical. .... *Melipona colimana*
- T1 a T5 con bandas amarillas apicales finas o mal definidas; T3 y T4 con franja densa de pelos plumosos largos amarillentos en margen apical. .... *Melipona costaricensis*

### Subgénero *Melikerria* Moure 1992

#### *Melipona (Melikerria) beecheii* Bennett (Figuras 4A, 5A, 6B, 8A, 9A)

- Melipona beecheii* Bennett 1831  
*Melipona fulvipes* Guérin-Méneville, 1835  
*Trigona ligata* Say, 1837  
*Melipona zonulata* Spinola, 1840  
*Melipona domestica* Darwin, 1859

**Tipo.** no se conoce

**Localidad tipo.** Algún sitio entre en la Costa del Pacífico entre Mazatlán y Acapulco, México

**Diagnosis.** Abeja de tamaño mediano, de aspecto robusto con pilosidad amarillenta, tegumento pardo oscuro con bandas amarillas en metasoma (Figura 8 A). Largo total 8.8 - 9.8 mm; largo del ala anterior 6.5 - 7.1 mm, ancho de la cabeza 3.5 - 3.7 mm. Pilosidad en clipeo muy

abundante, marcas amarillas en clípeo formando una T invertida; marcas amarillas paroculares evidentes y bien definidas, más fina en la parte superior; espacio malar reducido; escapo con margen anterior amarillo. Metasoma con ángulo antero-lateral del escuto con mechón de pubescencia rojiza, contrastante con la del resto del escuto. Metasoma con integumento pardo oscuro; T1 a T5 y T6 con bandas apicales amarillas anchas bien definidas, pilosidad decumbente del metasoma, simple, abundante, predominantemente amarillenta, corta y fina, muy abundante en disco de T5 y T6, con numerosos pelos negros simples entremezclados, principalmente en los bordes lateral y apical; márgenes apicales de T4 y T5 con una franja de pelos cortos (~0.14 mm, evidentemente más cortos que el ancho de la banda apical amarilla) amarillos densos (Figura 5A). Patas posteriores con la pilosidad de bordes anterior y posterior simple y amarilla.

**Material examinado.** BELIZE: 1 ♂Belize District, Lucky Strike Village, 29.xi.2007 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 1♀Corozal District, Buena Vista, 28.xi.2007 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 1♀Corozal District, Sarteneja, Fireburn forest 28.i.2010 (*C Schuepp*) (NMBE) [Barcoded]; 1♀Corozal District, Sarteneja, Shipstern NR Headquarters 20.ii.2010 (*C Schuepp*) (NMBE) [Barcoded]; 1♀Orange Walk District, La Milpa, 07.iii.2011 (*JS Ascher*) (AMNH). CUBA: 2 ♀, Pinar del Río, Sierra del Rosario, 01.iii.2006 (*JA Genaro*) (PCYU) [Barcoded]. GUATEMALA: 17 ♀, 1 ♀, Petén, San Benito, casa ACastellanos, ex. nest, 10.ii.2009 (*G Armas*) (CANG); Petén, San Francisco, 16.80068, -89.941425, ex. nest, 28.ii.2011 (*A Castellanos*) (CANG); 1 ♀, Petén, San José, Sitio Arqueológico El Mirador, 31.xii.2008 (*CL Yurrita*) (CANG); 5 ♀, Petén, Santa Ana, El Mango, 16.76466944, -89.661381, ex. nest, 28.ii.2011 (*A Castellanos*) (CANG). MEXICO: 1 ♀, Campeche, Escárcega, 1.xii.1944 (*M Guerra*) (AMNH); 1 ♀, Chiapas, Palenque, las ruinas, 13.ii.1989 (*R Ayala*) (CHAMELA); 3 ♀, Hidalgo, Tlanchinol, Tlanchinol-Apantlazol km. 4, 20.i ii.1994 (*L Godinez*) (MZFC); 3 ♀, Hidalgo, Huahutla, Ejido la Puerta, 21.iii.1994 (*L Godinez*) (MZFC); 2 ♀, Oaxaca, Santa María Chimalapa, San Isidro, La Gringa, Rio Chalchijapa, ex. Solanum, 24.vi.1995 (*JL Salinas*) (MZFC); 1 ♀, Oaxaca, Santa María Chimalapa, San Isidro, La Gringa, Rio Chalchijapa, ex. drinking water, 24.vi.1995 (*JL Salinas*) (MZFC); 3 ♀, Oaxaca, Santiago Comaltepec, Metates, 10.vi.1986 (*O Morales*) (MZFC); 1 ♀, Oaxaca, Tolosa, 23.viii.1947 (*B Malkin*) (AMNH); 1 ♀, Oaxaca, Tuxtepec, La Chinantla, ix.2011 (*N Arnold*) (CANG); 1 ♀, Oaxaca, Cerro Armadillo Grande (*N Arnold*) (CANG); 1 ♀, Quintana Roo, 6km E de F. Carrillo Puerto, 11.x.1981 (*R Ayala*) (CHAMELA); 1 ♀, Quintana Roo, Solidaridad, Xcaret,



22.ii.2009 (*A Rodas*) (CANG) [Barcoded]; 1 ♀, Tabasco, Rancho Grande, 27.ii.1998 (*R Murillo*) (MZFC); 1 ♀, Veracruz, Atoyac, iv (*HHS*) (AMNH); 1 ♀, Veracruz, Los Tuxtlas, 17.iii.1989 (*A Noguera*) (CHAMELA); 3 ♀, Veracruz, Teocelo, 11.iii.1989 (*G Monjarrez*) (MZFC); 1 ♀, Veracruz, 25 km RR from SW V.C, viii.1944 (*M Guerra*) (AMNH); 1 ♀, Veracruz (?), Orizaba, xii.1887 (AMNH); 5 ♀, Yucatán, Mérida, ex. Nest, (*J Quezada-Euán*) (CANG), (PCYU) [Barcoded]; 1 ♀, Yucatán, Piste, 12.ix.1952 (*J & D Pallister*) (AMNH); 3 ♀, Yucatán, Tinum, Rancho San Pedro Uayma, 19.xi.1983 (*P Galván*) (MZFC); 1 ♀, Yucatán, Valladolid, N. Yucatán, 1913 (*Gaumer*) (AMNH); 4 ♀, Yucatán, Near Chichén Itzá (*M Staggerda*) (AMNH); MEXICO: 1 ♀, Chiapas, El Triunfo, 10.iii.1987 (*G Rodríguez*) (MZFC); 2 ♀, Chiapas, Ocozocoautla, 1948 (*T MacDougal*) (AMNH); 2 ♀, Colima, Armeria, viii.1954 (*W Gertsch*) (AMNH); 1 ♀, Jalisco, La Huerta, Chamela, 25.v.1983, (*H Estrada*) (MZFC); 6 ♀, Jalisco, Guadalajara, Environ. of Guadalajara, 15.iii.1905 (*M Diguét*) (AMNH); 1 ♀, Jalisco, La Huerta, Río San Nicolás, 26.iv.1986 (*O Morales*) (MZFC); 3 ♀, Oaxaca, San Pedro Mixtepec, Puerto Escondido, 2.x.1990 (*R Delgadillo*) (MZFC).

**Distribución.** Esta especie está presente en los estado de Yucatán, Veracruz, Campeche, Hidalgo (México), norte de Petén (Guatemala), Belice y Cuba, y en la vertiente de Pacífico de México en los estados de Sinaloa, Jalisco y Colima, Oaxaca, en hábitats de bosque tropical perennifolio o subperenifolio, en algunos casos en areas mas húmedas de bosques tropicales secos, y generalmerne en tierras bajas, a diferencia de *M. nigripes* que puede encontrarse en mayores altitudes (Figura 9A). Se considera que los ejemplares de Cuba, corresponden a esta especie.

**Comentarios.** Esta especie se distingue de *M. nigripes* porque es de menor tamaño, su pilosidad es en apariencia general más anaranjada, las marcas faciales son más definidas y más amplias, el integumento del metasoma es más claro; la pilosidad decumbente del metasoma es más abundante, más larga y más amarilla-dorada, principalmente en T5, y la franja de pelos plumosos del margen apical de T4 y T5 son más amarillas y evidentemente más corta, que el ancho de la banda apical amarilla (Figura 5A). La información molecular del código de barras del COI, muestra una divergencia genética de 2.2%. En este trabajo se considera que *M. beecheii* es una especie diferente de *M. nigripes*.

En un estudio que combina datos moleculares y morfométricos May-Itzá et al. (2012), sugieren que las poblaciones de *M. beecheii* s.l. de Yucatán corresponden a la subespecie *M.*



*fulvipes* Guérin-Ménéville sensu Schwarz 1932. En el presente trabajo la distribución de *M. beecheii* s.str. aparece como discontinua con poblaciones separadas en la costa del Pacífico y en el área del Golfo de México y Caribe (Figura 9 A). Sin embargo, aunque se observan diferencias en el tamaño de los individuos de las dos áreas, no se encontraron caracteres diagnósticos evidentes que sugieran su separación.



**Figura 8A–B.** Habitus lateral de obreras del género *Melipona* subgénero *Melikerria*: A: *M. beecheii*; B: *M. nigripes*; C: *M. triplaridis*. Se observa diferencia en la coloración de las alas y tibias posteriores.

***Melipona (Melikerria) nigripes* Friese, 1900 reinstalado**  
(Figuras 5 B, 8 B, 9 B, 12 A, 12 B)

*Melipona beecheii* Bennett, 1831, sensu Ayala 1999

*Melipona fulvipes* Guérin-Ménéville, 1835

*Trigona ligata* Say, 1837

*Melipona zonulata* Spinola, 1840

*Melipona domestica* Darwin, 1859

*Trigona fulvipes obscuripes* Friese, 1916

**Tipo.** sintipo ZMB, sintipo AMNH

**Localidad tipo.** Guatemala

**Diagnosis.** Abeja de tamaño medio, de aspecto robusto con pilosidad amarillenta, tegumento pardo oscuro (Figura 8 B). Largo del cuerpo 10.1 - 10.2 mm, largo del ala anterior 7.2 - 7.8 mm, ancho cabeza 3.5 - 4.1 mm. Espacio malar reducido. Escapo con margen anterior amarillo. Ángulos antero-laterales del escuto con mechones densos de pubescencia rojiza, contrastante con la del resto de la del escuto. Metasoma con integumento oscuro, T1 a T5 con bandas apicales amarillas bien definidas y anchas, casi tan anchas como 1/3 del ancho del tergo, T6 puede presentar una marca amarilla pero esta no es bien definida; pilosidad del metasoma

simple, abundante, predominantemente amarillenta, corta y fina; T5 y T6 con numerosos pelos negros simples entremezclados, principalmente en los bordes lateral y apical, T4 y T5 con franja de pelos apical muy evidente, con pelos largos blanquecinos (0.24 mm, casi tan larga como el ancho de la banda amarilla) (Figura 5b). Macho: similar a obrera, cápsula genital y esterno 7 respectivamente como en las Figuras 12 A y B.

**Material examinado.** BELIZE: 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, trail to Monkey Tail River, 25/02/2007 (*JS Ascher*) (PCYU) [Barcoded]; 1♀, Cayo District, Pine ridge, Cooma Cairn, 30/04/2009 (*JS Ascher*) (AMNH); 1♀, Cayo District, Las Cuevas-Caracol junction, 11/03/2011 (*JS Ascher*) (AMNH); 1♀, Cayo District, 4.5km E of San Antonio, 20/11/2007 (*JS Ascher*) (AMNH); 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, 02/05/2007 (*JS Ascher*) (AMNH); 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, trail to Monkey Tail River, 02/05/2007 (*JS Ascher*) (AMNH); 1♀, Stann Creek District, Mayflower Nat. Park, 01/05/2009 (*S Javorek*) (PCYU); 1♀, Corozal District, Buena Vista, 28/11/2007 (*JS Ascher*) (AMNH); GUATEMALA: 1♀, Guatemala, Villa Canales, Casa F. Nájera, ex. colmena, 12/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Quiché, Uspantán, La Gloria, casa Juana Ical, ex. colmena 1, 06/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Quiché, Uspantán, La Gloria, casa Domingo Chen Tot, ex. colmena 3, 06/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Sololá, San Marcos la Laguna, Sununá, orilla del río, ex. *Solanum atitlanum*, 24/05/2009 (*M Vásquez*) (CANG); 2♀, Alta Verapaz, Cobán, Pataté, bosque 30/01/2007 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Pataté, en camino colectando barro, 20/03/2007 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Pataté, maíz, 23/08/2006 (*M Vásquez*) (CANG); 1♀, Izabal, Los Amates, Aldea Nueva, RBSM, 16/06/2005 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Jutiapa, Quezada, El Jobo, colmena en casa de C. Monroy zona 2 llevada en 2005, 27/02/2011 (*CL Yurrita*) (CANG); 8♀, Jutiapa, Quezada, La Brea, colmena en casa de C. Monroy zona 2 llevada en 2005, 27/02/2011 (*CL Yurrita*) (CANG); 1♀, Chiquimula, Esquipulas, La Cuestona, café-banano, volando, 05/03/2003 (*Proyecto Chiquimula*) (CANG); 1♀, Chiquimula, Esquipulas, La Cuestona, café-banano, volando, 03/12/2003 (*Proyecto Chiquimula*) (CANG); 1♀, Chiquimula, Esquipulas, La Cuestona, café-banano, volando, 25/02/2004 (*Proyecto Chiquimula*) (CANG); 1♀, Baja Verapaz, Salamá, Santa Bárbara, 25/04/2007 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Huehuetenango, San Juan Ixcoy, Ixquisis, 12/04/2007 (*E Enríquez*) (CANG); ); 2♀, Quetzaltenango, Colomba, Costa Cuca, 28/03/2006 (*E Enríquez*) (CANG); ); 2♀, Chiquimula, Ipala, Los Sauces, colmena, 16/02/2009 (*G Armas*) (CANG); ); 4♀, Chiquimula, Ipala, Chaguitón, colmena

16/02/2009 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Retalhuleu, El Asintal, Finca los Recuerdos, 03/03/2009 (*M Vásquez*) (CANG); 1♀, Jutiapa, Quezada, Ojo de Agua, Casa Israel Ramírez, 03/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Jutiapa, Quezada, La Brea, Casa Bonifacio Ros, 23/02/2009 (*G Armas*) (CANG); 5♀, Sololá, San Lucas Tolimán, Finca Santo Tomás, Colmena 3, 31/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Sololá, Santiago Atitlán, San Antonio Chacaya, Colmena, 31/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, El Cuje, Casa don Rubén, Colmena 1, 20/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, El Cuje, Casa don Rubén, Colmena 2, 20/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, El Cuje, Casa don Rubén, Colmena 3, 20/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, El Cuje, Casa don Álvaro, Colmena 2, 20/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, El Cuje, Casa don Ramón del Cid, Colmena 1, 25/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Escuintla, San Vicente Pacaya, Volcán de Pacaya, Casa J. Ramírez, colmena 1, 02/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 2♀, Escuintla, San Vicente Pacaya, Volcán de Pacaya, Casa J. Ramírez, colmena 2, 02/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Guatemala, Villa Canales, Villa Canales, Casa F. Nájera, colmena 1, 12/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Guatemala, Villa Canales, Villa Canales, Casa F. Nájera, colmena 2, 12/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Quiché, Uspantán, La Gloria, Casa Juana Ical colmena 1, 06/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Quiché, Uspantán, La Gloria, Casa Domingo Chen Tot colmena 06/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Quiché, San Juan Cotzal, El Pinal, Casa Cruz Pérez colmena 08/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Chiquimula, Ipala, Los Sauces, colmena, 16/02/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Sololá, San Lucas Tolimán, Finca Santo Tomás, Colmena 3, 31/03/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Quiché, Pancús, 07/05/2009 (*CL Yurrita*) (CANG); 1♀, Retalhuleu, Finca Los Recuerdos, 03/03/2009 (*M Vásquez*) (CANG); 1♀, Chiquimula, Esquipulas, Finca Maco Moreno, 03/12/2003 (*E Enríquez*) (CANG); 1♀, Pochuta, Sa. Emilia, on flowers of *Acacia*, feb-mar 1931 (*Bequaert*) (AMNH); 2♀, Quirigua? (*WP Cockerell*) (AMNH); 1♀, Esmeralda,? (*WP Cockerell*) (AMNH); NICARAGUA: 4♀, Jinotega, Jinotega, Casa de Asunción Altamirano, Colmena A, 19/02/2011 (*CL Yurrita*) (CANG); 4♀, Jinotega, Jinotega, Casa de Asunción Altamirano, Colmena B, 19/02/2011 (*CL Yurrita*) (CANG); 2♀, Jinotega, Jinotega, zona 5 urbano, 18/08/2010 (*CL Yurrita*) (CANG). COSTA RICA: 2♀, San José, Turubares, Carara, Rio del Sur, 1.i.1997 (INBIO); 3♀, Alajuela, Atenas, B. Jesús, 22.ii.2011 (*E Herrera*) (CINAT); 3♀, Guanacaste, Santa Cruz, 22.ii.2011, (*E Herrera*) (CINAT); 1♀, Alajuela, Los Chiles, Cano Negro, 6.iii.1993 (*K Flores*) (INBIO).

**Distribución.** Esta especie tiene distribución amplia, estando presente desde el sur de México hasta Costa Rica (Figura 9 B). Se encuentra habitando en una amplia diversidad de tipos de vegetación tanto tropical como de montaña y altitudes tanto de tierras bajas como de las montañas de Centroamérica.

**Comentarios:** Con base en los resultados del análisis molecular, de la información morfológica y de aspectos de su distribución, se propone considerar a esta especie como diferente de *M. beecheii*, en la que fue incluida como sinónimo. Siguiendo la descripción de *M. nigripes* Friese 1900 este nombre es reinstalado. Esta especie se distingue de *M. beecheii* por su mayor tamaño, las marcas faciales amarillas más delgadas y menos evidentes y la pilosidad de los tergos, principalmente del T5, que es menos abundante, más corta y más amarillenta, T4 y T5 presentan una franja apical de pelos plumosos muy densa y con pelos más largos (0.25 mm, casi tan largos como el ancho de la banda amarilla) (Figura 5 B). La información molecular indica que la divergencia genética entre las secuencias de ambas especies es de 2.2% y sus distribuciones son discontinuas.

***Melipona (Melikerria) triplaridis* Cockerell**  
(Figuras 5 C, 8 C, 9 C)

***Melipona fulvipes triplaridis* Cockerell, 1925**

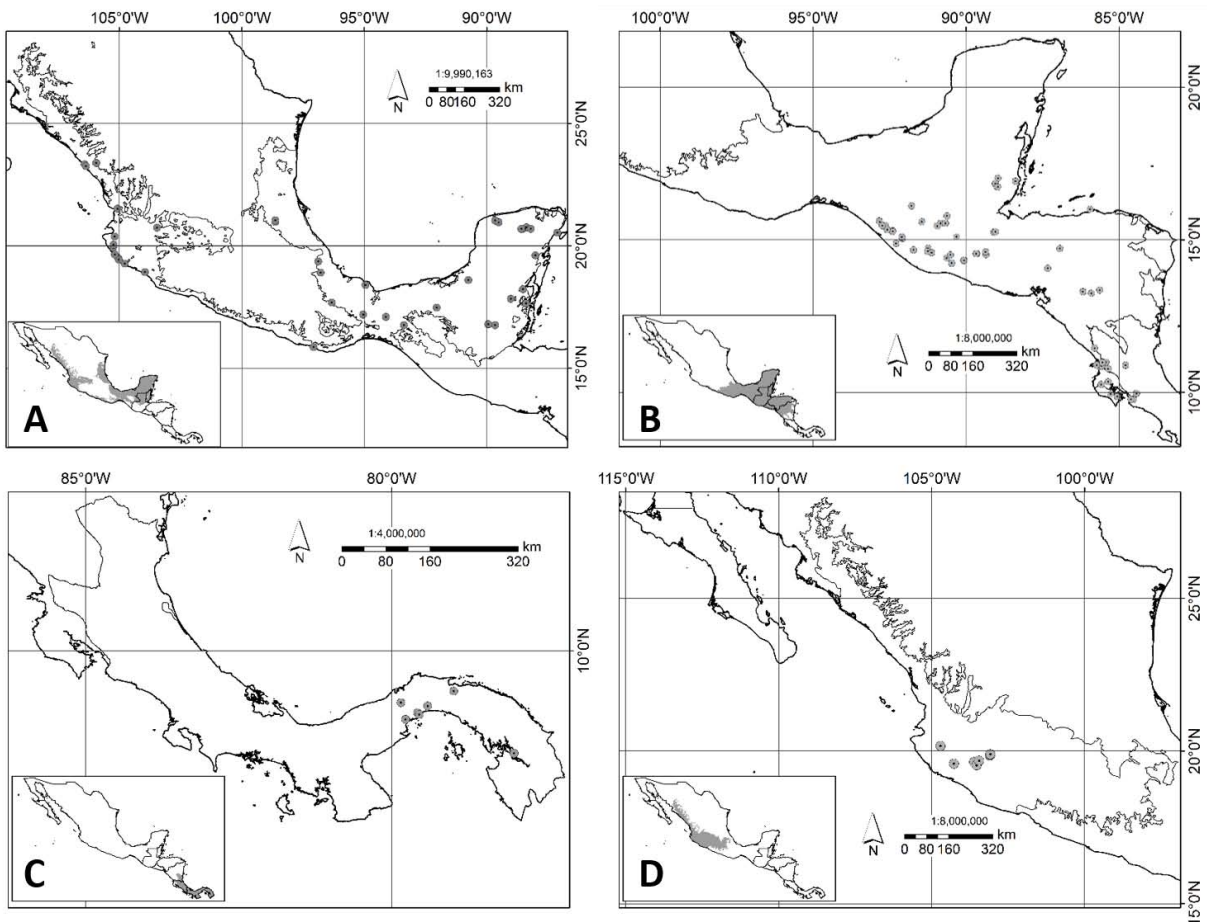
**Sintipo.** AMNH

**Localidad Tipo.** Balboa, Zona del Canal, Panamá

**Diagnosis.** Abeja grande (10.0 - 12.0 mm); de aspecto robusto con abundante pilosidad en área facial y mesosoma; integumento predominantemente negro y opaco (Figura 8 C), largo del ala anterior 7.77 – 8.67 mm, ancho de la cabeza 4.34 – 4.38 mm; con marcas amarillas delgadas en región parocular y clipeo; escapo con margen anterior amarillo; espacio malar angosto (menor al diámetro del escapo); ángulo antero-lateral del escuto con mechón de pelos rojizos contrastante con el resto de la pilosidad del escuto; mesosoma con pilosidad amarillenta con regiones rojizas; mesepisterno con integumento de aspecto opaco, con puntuado muy fino. Metasoma pardo oscuro; T1-T5 con bandas apicales amarillas completas y anchas (casi 1/3 del ancho del tergo); T6 completamente pardo oscuro; T1-T3 con pelos finos decumbentes cortos abundantes; margen posterior de T2-T5 con línea de pelos densos, blanquecinos amarillentos,

plumosos, de tamaño mediano, más evidente en T4 y T5; área discal de T6 con pilosidad plumosa, blanquecina muy abundante y evidente, con pocos pelos negros simples entremezclados (Figura 5 C).

**Material examinado:** PANAMA: TIPO: Panama, Balboa, Cz, March 26.23. *Melipona fulvipes triplaridis*, (Ckll Type Ac33175) (AMNH), 1 ♀, Darién, Carrigion 168 km E Lake Bayano ex. *Mimosa*, 04-xi-1982, (*D Roubik*) (CINAT); 1 ♀, Panama, Chepo, 17 km Coti Rd neal, 12-v-1982, (*D Roubik*) (CINAT); 1 ♀, Barro Colorado Island, 28-vii-1934, (*OE Shattuck*) (AMNH); 1 ♀, Barro Colorado Island, 21-ii-1955, (*C Rettenmeyer*) (AMNH); 2 ♀, Barro Colorado Island, 06-ii-1936, (*WJ Gertsch*) (AMNH); 1 ♀, Barro Colorado Island, 08-ii-1936, (*WJ Gertsch*) (AMNH); 4 ♀, Barro Colorado Island, 09-ii-1936, (*WJ Gertsch*) (AMNH); 1 ♀, Chorrera, 06-v-1945, (*CD Michener*) (AMNH); 1 ♀, Tocumen, 01-i-1945, (*CD Michener*) (AMNH); 1 ♀, Balboa, 28-i-1915, (*T Hallinan*) (AMNH); 1 ♀, Ancon, 05-xii-1915, (*T Hallinan*) (AMNH); 1 ♀, Chiva Chiva trail, Canal Zone, 24-xi-1930, (*EI Huntington*) (AMNH)



**Figura 9 A-D.** Localidades registradas para las especies: A: *M. beecheii*; B: *M. nigripes*; C: *M. triplaris*; D: *M. colimana*.

**Distribución.** Esta abeja ha sido colectada únicamente en la región este de la parte continental de Panamá (Figura 9 C), principalmente en los bosques tropicales húmedos del Chocó Darién y la zona atlántica del istmo (Roubik y Camargo 2011).

**Comentario.** Se puede diferenciar de la especie *M. insularis* que habita exclusivamente las islas de Coiba y Ranchería en Veraguas, en el Pacífico de Panamá, por su tamaño que es ligeramente mayor; por la presencia de abundante pilosidad en disco del T6. Por otra parte, la pilosidad del mesosoma de *M. insularis* es blanca, mientras que en *M. triplaris* es amarillento con áreas más rojizas.

### ***Melipona (Melikerria) insularis* Roubik & Camargo**

*Melipona insularis* Roubik y Camargo, 2011

**Tipo:** Holotipo, obrera, USNM

**Localidad tipo:** Panamá: Prov. Veraguas, Isla Coiba, Playa Hermosa, 1.6 km W, 17 diciembre 2007.

**Diagnosis.** Abeja grande (11 mm), de aspecto robusto, con pilosidad abundante en área facial y mesosoma e integumento predominantemente negro opaco; longitud del ala anterior 8.32 mm, ancho cabeza 4.22 mm; con marcas amarillas delgadas en región parocular (ensanchándose hacia la parte inferior) y clípeo; escapo con margen anterior amarillo; área malar angosta (menor al diámetro del escapo); ángulos antero-laterales del escuto, con mechones rojizos, contrastantes con el resto de la pilosidad del escuto; pilosidad de cabeza y tórax blanquecina; metasoma pardo oscuro; integumento de T1-T4 con bandas apicales amarillas completas y anchas (casi 1/5 del ancho del tergo); las bandas de T1 y T2 con leve interrupción en parte media; bandas de T3 y T4 con interrupción en parte media evidente; banda de T5 más delgada, no llegando a los bordes laterales del tergo, y con interrupción ancha en parte media; T6 completamente pardo oscuro; margen posterior de T4-T5 con una línea de pelos blanquecinos amarillentos plumosos de pequeños muy densa; área discal de T6 con pilosidad plumosa, esparsa, entremezclada con pelos negros.



**Material examinado.** No se examinó ningún ejemplar de esta especie, por lo que se utilizó información de Roubik & Camargo (2011).

**Distribución.** Solo ha sido registrada en las Islas Coiba y Ranchería, en la provincia de Veraguas, Panamá (Roubik y Camargo 2011).

**Comentario.** De acuerdo a Roubik y Camargo (2011), esta especie se diferencia de *M. triplaridis* porque que es ligeramente menor en tamaño; también porque la pilosidad del mesosoma de *M. insularis* es blanquecina mientras que en *M. triplaridis* es amarillenta, con áreas rojizas y porque el T6 tiene pilosidad plumosa blanquecina escasa. De acuerdo a estos autores estas dos especies presentan distribución disyunta en la cual *M. insularis* está presente en las islas de Coiba y Ranchería en el Pacífico panameño, mientras *M. triplaridis* se distribuye en la región continental del este de Panamá, principalmente en los bosques tropicales húmedos del Chocó Darién y la zona atlántica del istmo.

### **Subgénero *Michmelia* Moure, 1975**

#### ***Melipona (Michmelia) colimana* Ayala**

(Figuras 9 D, 10 A, 11 D)

*Melipona colimana* Ayala, 1999

**Tipo.** CNIN

**Localidad tipo.** México: Jalisco: Lab. Natural Las Joyas, Sierra de Manantlán, al sur de Autlán.

**Diagnosis.** Abeja de tamaño mediano (8.5 – 9.5 mm); con aspecto robusto, pilosidad abundante e integumento pardo oscuro (Figura 10 A); largo del ala anterior 6.8 – 7.1 mm, ancho de la cabeza 3.7 – 3.9 mm; con marcas paroculares ambarinas poco definidas, más amplias hacia la parte inferior; área malar amplio (igual o mayor que diámetro de escapo); mesosoma con pilosidad predominante parda amarillenta; integumento del mesepisterno con puntuado denso pero brillante, parte inferior de aspecto rugoso, con pilosidad anaranjada con una porción central más oscura; integumento de metasoma rojizo oscuro; T1 amarillento hacia

la parte anterior; integumento de los T1-T5 con bandas apicales amarillas bien evidentes, menos anchas que la mitad del largo del tergo.

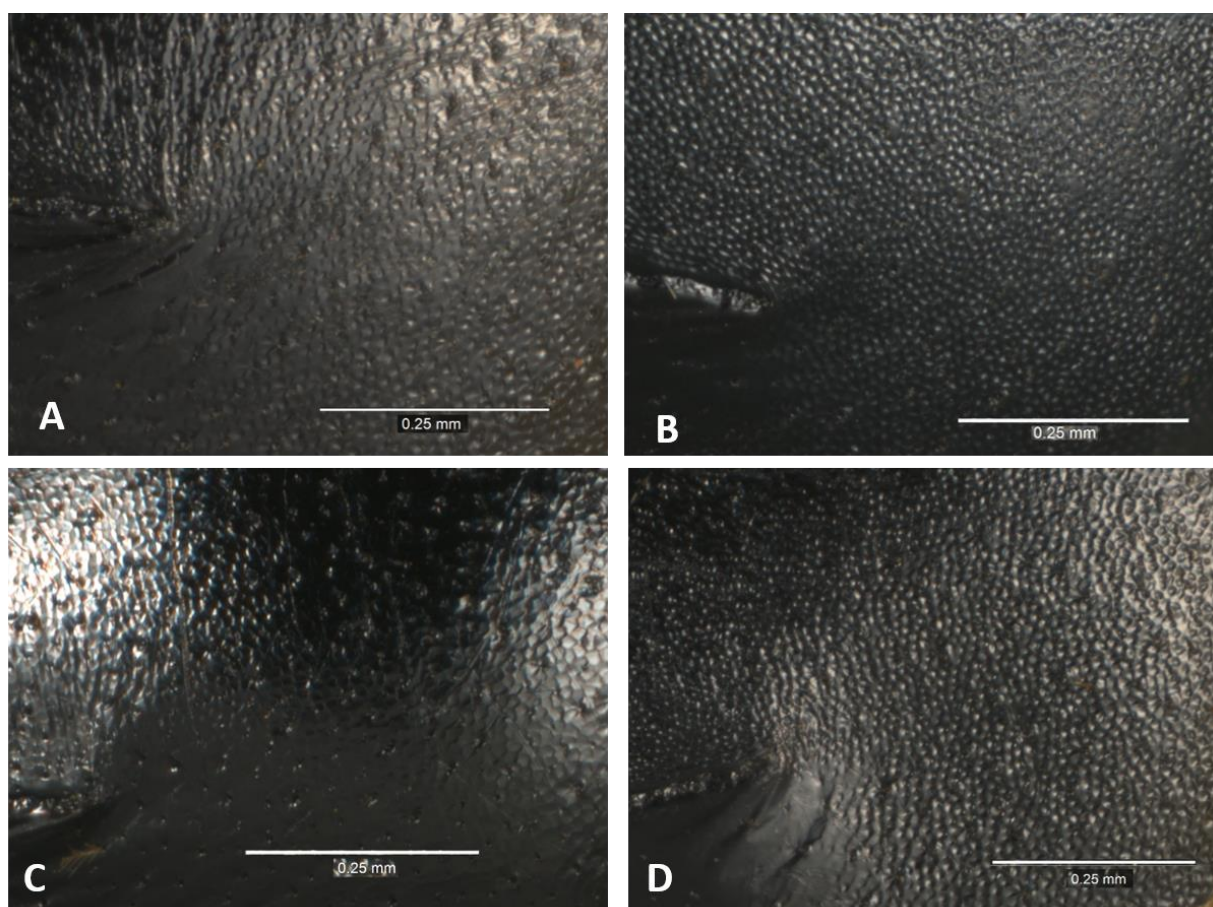


**Figura 10 A–C.** Habitus lateral de obreras del género *Melipona* subgénero *Michmelia*: A: *M. colimana*; B: *M. fasciata*, y C: *M. solani*. Se aprecia las diferencias en el color de la pubescencia en el mesosoma, las tibias posteriores y los terguitos.

**Material examinado.** MEXICO: 1 ♀, Jalisco, Manantlán, 12-vii-1988 (*FA Noguera*) (EBCh); 2 ♀, Jalisco, Tecalitlán, Sierra del Halo, ex. nido, 01-vii-2011 (*O Macías*) (PCYU) [Barcoded]; 1 ♀, Jalisco, Manzanmitla, 17km S, 20-iii-1990 (*CM Estrada*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Manantlán, Est. Biol. Las Joyas, 12-vii-1986 (*FA Noguera*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Ladera SE del volcán Colima, Dec. 1948 (*ES Ross*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Manzanmitla, 7millas S. Manzanmitla (11.2 km), Dec. 1948 (*ES Ross*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Manzanmitla, 15 km SO Manzanmitla, Las Puertas Cuatas, 7-viii-1990 (*CM Estrada*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Ciudad Guzmán, 18 km SO, ex. *Verbesina*, 18-vii-1989 (*C Everaert*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Manzanmitla, 15 km SO, Manzanmitla, El Colomo, 25-x-1990 (*CM Estrada*) (EBCh); 1 ♀, Jalisco, Manzanmitla, 10 km SO, Manzanmitla, El Terreno, 5-xi-1990 (*R Ayala*). (EBCh).

**Distribución.** Esta abeja es endémica y conocida sólo para el estado de Jalisco, en la Sierra de Manantlán, la Sierra del Halo, la Sierra del Tigre y el Parque Nacional Volcán de Colima en México (Figura 9 D). Se encuentra principalmente en bosques de pino-encino, en el cinturón volcánico Trans-Mexicano, en altitudes entre 1100 y 2200 m. Prefieren sitios húmedos y más conservados. La distribución de esta abeja no se sobrelapa con la de *M. fasciata* que es la especie hermana y se distribuye principalmente en los bosques de pino-encino de la Sierra Madre del Sur dentro de un rango altitudinal más amplio (550 – 2200 m).

**Comentarios.** Esta especie se distingue fácilmente de *M. fasciata*, por la presentar los T2 – T5 con integumento mas oscuro, con bandas apicales amarillas bien definidas, en contraste con *M. fasciata* que presenta tergos mas claros (anaranjados rojizos) con bandas anaranjadas y poco intensas. Adicionalmente, el integumento del escudo de *M. colimana* tiene un puntuado más denso y profundo que el de *M. fasciata* (Figuras 11 A y D). A pesar de que la información molecular proporcionada por el análisis del COI muestra una diferencia genética entre las secuencias de ambas especies de apenas 0.8%, en este trabajo se consideran dos especies separadas con base en la información biológica, morfológica y geográfica.



**Figura 11 A–D.** Puntuado del integumento en el escudo en especies de *Melipona* subgénero *Michmelia*: A: *M. fasciata*; B: *M. costaricensis*; C: *M. solani*; D: *M. colimana*.

***Melipona (Michmelia) fasciata* Latreille**

(Figuras 10 B, 11 A, 12 E y F, 14 A)

*Melipona fasciata* Latreille, 1811 sensu Moure (1971), Ayala (1999)

*Melipona ligata* (Say, 1937); sensu Dalla Torre (1896), Cockerell (1899), Lutz y Cockerell (1920)

*Melipona fuscipes* Friese, 1900, sensu Moure (1971)

*M. fasciata guerreroensis* Schwarz, 1936, 1949 sensu Ayala (1999)

**Tipo.** MHNP

**Localidad tipo.** México: Veracruz.

**Diagnosis.** Abeja de tamaño mediano (8.5 - 9.5 mm); con aspecto robusto, pilosidad abundante y tegumento pardo oscuro en cabeza y mesosoma; metasoma anaranjado rojizo (Figura 10 B); largo longitud del ala anterior 6.8-7.4 mm, ancho de la cabeza 3.7 - 4.0 mm; con marcas paroculares ambarinas poco perceptibles, más amplias hacia la base; vértex con pilosidad parda predominante; espacio malar amplio (igual o mayor que diámetro de escapo). Mesosoma con integumento opaco; con puntuado denso; pilosidad predominante amarillenta; pelos negros muy escasos y esparcidos; mesepisterno con pilosidad amarillenta y un mechón de pelos anaranjados rojizos. Metasoma con integumento anaranjado, brillante, de aspecto rugoso, con puntuado poco denso; integumento de los tergos con bandas apicales amarillentas no bien definidas, finas variables; T2 presenta con abultamientos laterales; pilosidad amarilla fina y simple separada; T2-T4 con pelos negros simples finos, cortos y largos, separados, más abundantes en bordes de los tergos y más largos en T4; T5-T6 con pocos pelos negros simples; margen distal del T6 puntuado y curvo hacia arriba. Machos: similar a obrera, cápsula genital y S7 como se ilustra en las Figuras 12 E y F.

**Material examinado.** MEXICO: 2♀, Morelos, km 4.5 autopista México Cuautla, Tepoztlán, ex *Montanoa*, bosque de encino, 05.x.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 4.5 autopista Cuautla, Tepoztlán, ex. *Juniperus*, bosque de encino, 05.x.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 2♀, Morelos, km 19.5 autopista México Cuautla, Tepoztlán, ex. *Phithecoctenium crusigerum*, selva baja caducifolia, 20.vii.1997 (*I Hinojosa*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 19.5 autopista México Cuautla, Tepoztlán, Bosque encino, 20.vii.1997 (*I Hinojosa*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 12 autopista México Cuautla, Tepoztlán, ex. *Verbena virgata*, Cultivo de temporal, 10.xi.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 12 autopista México Cuautla, Tepoztlán, Cultivo de temporal, 28.i.1996 (*I Hinojosa*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 12, autopista México Cuautla, Tepoztlán, ex. *Buddleia sessiliflora*, cultivo de temporal, 18.ii.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 1♀,

Morelos, km 86.5 Huitzilac, Derrame del Chichinautzin, matorral crassicaule, 26.x.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 2♀, Morelos, km 4.5 autopista México – Cuautla, Tepoztlán, ex *Montanoa*, bosque de encino, 22.ix.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 4.5 autopista México – Cuautla, Tepoztlán, ex *Montanoa*, bosque de encino, 14.x.1995 (*O Yañez*) (MZFC); 3♀, Morelos, km 86.5 Huitzilac, Derrame del Chichinautzin, ex *Aesclepias linearis*, matorral crassicaule, 8.vi.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 4.5 autopista México – Cuautla, Tepoztlán, ex *Verbena carolina*, bosque de encino, 7.vii.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 4.5 autopista México – Cuautla, Tepoztlán, ex *Hyptis mutabilis*, Bosque de encino, 5.x.1996 (*O Yañez*) (MZFC); 2♀, Oaxaca, Comaltepec, Cantil-Puerto Eligio, 600 msnm, 10.iv.1986 (*O Morales*) (MZFC); 2♀, Guerrero, Potrerillo, Omiltemi, 22.x.1985 (*O Morales*) (MZFC); 1♀, Guerrero, 14 km S de Puerto del Gallo, 7.vii.1983 (*R Ayala*) (MZFC); 1♀, Morelos, Chichinautzin, ex. compuesta, matorral crassicaule, 8.x.1983 (*R Ayala*) (MZFC); 1♀, Guerrero, km 55 Carretera Zihuatanejo, s.f (*C Altamirano*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, Juchatengo, 17.6 km S, bosque de pino, 8.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 2♀, Guerrero, Mexcala, 4-5000ft, 18.vii.1962 (*HE Milliron*) (CNC); 2♀, Oaxaca, Putla, Villa de Guerrero, Río de las Peñas, ex. nido, 1.v.2011 (*I Pérez-España*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Guerrero, Ajuchitán del Progreso, Ejido El Balcón, 22.11.2012 (*J Mérida*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Guerrero, Coyuca de Catalán, El Crucero, 19.11.2012 (*J Mérida*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Guerrero, Tecpán, La Ola, 20.11.2012 (*J Mérida*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Oaxaca, Pluma Hidalgo, Santa María Huatulco, tronco, finca San Rafael, cafetal en selva mediana, 27.10.2012 (*N Arnold*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Oaxaca, Pluma Hidalgo, Santa María Huatulco, ex tronco (nido), finca San Rafael, cafetal en selva mediana, 27.10.2012 (*N Arnold*) (CANG); 1♀, Oaxaca, Pluma Hidalgo, Pluma Hidalgo, tronco, casa Adrián Martínez, zona urbana rodeada de selva mediana, 27.10.2012 (*N Arnold*) (CANG) [Barcoded]; ); 1♀, Oaxaca, Sn Pedro Mixtepec, 17 km N, 27.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, Putla, 14.6 km S, bosque de pinos, 5.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, S. Gr. Mixtepec, 13 km N, bosque mesófilo (bosque de neblina), 1100 msnm, 17.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, Pinotepla-Putla, km 112, 5.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, Mixtepec, 7 km S, 4.iii.1989 (*G Rodríguez*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, La Candelaria, 18 km N, bosque mesófilo (Bosque de neblina), 1350 msnm, 9.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, Puerto Ángel, SBC, 80 msnm, 9.iii.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Oaxaca, La Esperanza, 5.xi.1987 (*G Rodríguez*) (EBCh); ); 1♀, Oaxaca, San Mateo Yotla, 30 km S, 22.ix.1989 (*FA Noguera*) (EBCh); 1♀, Morelos, Los Robles, km 49 Carretera Xochimilco-Oaxtepec, 25.ix.1983 (*JC Morales*) (EBCh); 1♀, Guerrero, km 32 carretera Pto

del Gallo, El Paraíso, 3.x.1983 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Michoacán, 17 km SO Ario de Rosales, 3.xi.1992 (*R Ayala*) (EBCh); 1♀, Michoacán, La Suada, 9.vii.1988 (*G Rodríguez*) (EBCh); 1♀, México, Desierto de los Leones, 24.i.1981 (*sin colector*) (IBUNAM); 1♀, Morelos, Cuernavaca, s/f (*sin colector*) (IBUNAM); 1♀, Guerrero, Campo Morado, Arcelia, La Parda, 29.iv.1978 (*J Hendricks*) (IBUNAM); 1♀, Guerrero, km 109 carretera Taxco-Iguala, 3.ii.1989 (*E Barrera, A Cadena*) (IBUNAM); 1♀, Morelos, km 85.6 Huitzilac, Derrame del Chichinautzin, 8.vi.1996 (*I Hinojosa*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Puente del Rey 8 km al S El Paraíso, 29.x.1983 (*R Ayala*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Retroceso Atoyac, 28.iii.1984 (*R Ayala*) (MZFC); 1♀, Guerrero, km 23 carretera Pto del gallo, El Paraíso, El Retroceso, 28.iii.1984 (*R Ayala*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Rancho Omitemi, 3.xi.1985 (*A Luis*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Cueva del Borrego, Omitemi, 5.vii.1985 (*A Luis*) (MZFC); 1♀, Guerrero, El Iris, Tlacotepec, Bosque encino, 10.iv.1982 (*A Luis*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Atoyac, Álvarez Nva. Delhi, Bosque encino, 22.i.1987 (*G Rodríguez*) (MZFC); 1♀, Guerrero, 3 km E. Ixcateopan, 18.xi.1986 (*G Rodríguez*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Pto. Oscuro, 28.ii.1987 (*G Rodríguez*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Pto. Oscuro, Bosque conífera, 15.viii.1986 (*G Rodríguez*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Cruz Alta, 17.viii.1986 (*G Rodríguez*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Hortiguillas, Omitemi, 3.ix.1985 (*I Vargas*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Toro Muerto San Miguel, Tofolopán, 12.xii.1982 (*J Llorente*) (MZFC); 1♀, Guerrero, Río Santiago, Atoyac, 1.v.1985 (*O Morales*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 85.6 Hutzilac, Derrame del Chichinautzin, Cultivo de temporal, 26.x.1986 (*sin colector*) (MZFC); 1♀, Morelos, km 12 autopista México Cuautla, Tepoztlán, 10.xi.1996 (*sin colector*) (MZFC).

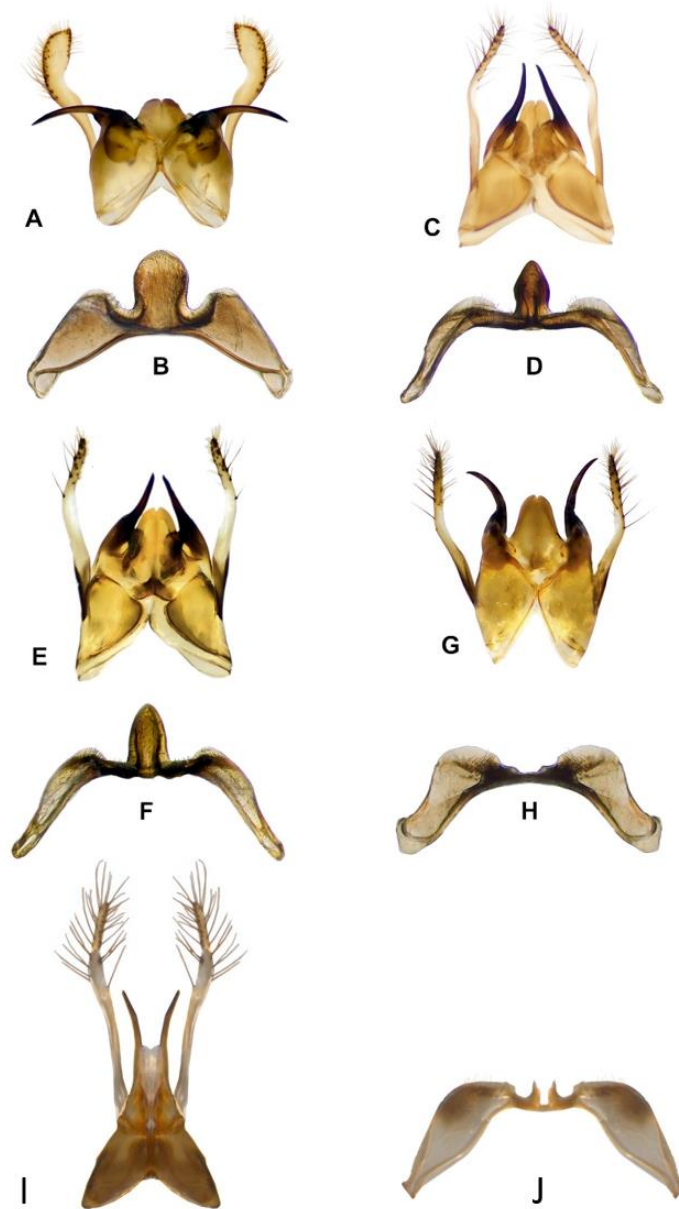
**Distribución.** Esta abeja es endémica de México, se presenta principalmente en los bosques de pino-encino de la Sierra Madre del Sur, aunque también ha sido colectada en el Eje Volcánico Transversal, en los estados de Morelos y Michoacán, estando su distribución separada por la depresión del Balsas (Figura 14 A). Se encuentran en un rango altitudinal amplio (550 – 2200 m). Esta especie presenta distribución disyunta respecto a la de *M. colimana*, esta última restringida al extremo oeste del Eje Vocanico Transversal.

**Comentarios.** Morfológicamente esta abeja se diferencia de *M. colimana* por que presenta integumento de los tergos naranja rojizo y bandas apicales amarillas poco definidas y el puntuado del integumento del escuto es más denso y profundo (Figuras 11 A). La información molecular no muestra una separación clara entre las secuencias de COI, siendo de sólo ~0.8 %



(de diferencia genética), sin embargo, con base en la información biológica, morfológica, geográfica en este trabajo se consideran que son dos linajes y se mantienen como especies válidas.

Esta especie se diferencia morfológicamente de *M. costaricensis*, porque en esta última el puntuado del escuto es menos denso y profundo (Figuras 11 B) y los pelos esternales son más cortos y abundantes. Además, *M. costaricensis* habita zonas más bajas en bosques tropicales (Yurrita et al. 2016). Por último, la información molecular muestra una clara diferenciación entre ambas especies (~2.6% de diferencia genética). Si bien Schwarz (1932) consideró que esta especie estaba presente en Costa Rica, en el presente trabajo se apoya la hipótesis de Ayala (1999) que señala que *M. fasciata* y *M. costaricensis* son especies diferentes.



**Figura 12.** Cápsula genital y esternito 7 respectivamente de: A y B: *M. nigripes* (vista ventral); C y D: *M. costaricensis* (vista dorsal); E y F: *M. fasciata* (vista dorsal); G y H: *M. solani* (vista ventral); I y J: *M. yucatanica* (vista ventral).

Respecto a *M. solani* esta especie se diferencia porque en general presentan una pilosidad más anaranjada y en los tergos la pilosidad es más fina y menos abundante y el puntuado del escuto es más denso y profundo (Figuras 11 A y C). Además *M. solani* habita en el bosque tropical perennifolio en tierras bajas. La información molecular también muestra una clara diferencia entre las especies (~2.6 % de diferencia genética). Por lo que es claro que *M. fasciata* y *M. solani* constituyen linajes diferentes

### ***Melipona (Michmelia) solani* Cockerell**

(Figuras 4 B, 10 C, 11 C, 12 G y H, 14 B)

*Melipona solani* Cockerell, 1912 y sensu Ayala (1999)

*Melipona belizeae* Schwarz, 1932, nuevo sinónimo

*Melipona belizeae* Schwarz, sensu Ayala (1999)

*Melipona fasciata solani* Cockerell sensu Schwarz, 1932; Moure, 1971

*Melipona fasciata belizeae* Schwarz, sensu Moure, 1971

*Melipona fuscipes* Friese, 1900, sensu Moure, 1971

*Melipona melanopleura* Cockerell, 1920, sensu Schwarz, 1936

**Tipo.** AMNH

**Localidad tipo.** Quiriguá, Guatemala

**Diagnosis.** Abeja de tamaño mediano (8.0 - 9.0 mm), de aspecto robusto, pilosidad abundante y tegumento pardo oscuro en cabeza; mesosoma, metasoma anaranjado (Figura 10 C); longitud del ala anterior 6.5 - 7.0 mm; ancho de la cabeza 3.6 - 3.8 mm; marcas faciales paraoculares muy diluidas; espacio malar amplio (igual o mayor que diámetro de escapo); vértex con pilosidad predominante anaranjada, con algunos pelos negros entremezclados; mesosoma con integumento puntuado, separado de aspecto rugoso; pilosidad anaranjada predominante con numerosos pelos negros entremezclados, más abundantes en el ángulo antero-lateral del escuto; mesepisterno con pilosidad anaranjada con pelos más oscuro en área central, contrastante con el resto de la pilosidad (más oscuro en algunas localidades: Chiapas,

Laguna Bélgica). Metasoma con tergos anaranjados oscuros, integumento con bandas amarillas poco evidentes, integumento de los tergos mate, de aspecto rugoso, con puntuado denso; T3-T6 con pelos plumosos, amarillos y negros cortos, más abundantes hacia T5; T2-T6 con abundantes pelos negros, simples, abundante, más largos y gruesos (casi tan gruesos como las setas de los márgenes de las corbículas) en T4-T6; margen posterior de los tergos con líneas de pelos amarillos plumosos entremezclados con pelos negros, gruesos, simples; margen apical de T6 truncado (no puntuado); pelos principalmente negros en los márgenes anterior y posterior de la tibia posterior. Macho: similar a las obreras pero un poco más pequeños. Cápsula genital y el S7 (incompleto) se ilustran en las Figuras 12 G y H respectivamente.

**Material examinado.** TIPO: *Melipona solani*: feb.20.12/solanum//Quirigua/Guatemala/W.R. Ckll./Melipona/solani/Ckll. TYPE//Ac 31909 (AMNH). *Melipona fasciata belizae*: etiqueta: Belize// Typus (etiqueta roja)/Melipona/xanthopus/Friese det 25//Holotype (etiqueta purpura)/Melipona fasciata subsp. belizae/ H.F. Schwarz (AMNH); BELICE: 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, 28.05.2007 (*JS Ascher*) (PCYU) [Barcoded]; 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, 22.11.2007 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 2♀, Orange Walk, La Milpa, La Milpa vicinity, 07.03.2011 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 2♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, trail to Monkey Tail River, 25.02.2007 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, 2.05.2005 (*SK Javorek*) (AMNH); 1♀, Cayo District, Mountain Pine Ridge, 29.11.2004 (*JS Ascher*) (AMNH); 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, trail to Monkey Tail River, 21.02.2007 (*JS Ascher, SK Javorek*) (AMNH); 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, trail to Monkey Tail River, 28.04.2009 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 1♀, Cayo District, Las Cuevas Research Station, 27.04.2009 (*JS Ascher*) (AMNH) [Barcoded]; 1♀, Stann Creek District, Middlesex, 125 m., 25.iii.1965 (*EC Welling*) (CNC); ]; 1♀, Stann Creek District, Middlesex, 125 m., 4.iv.1965 (*EC Welling*) (CNC); ]; 1♀, Stann Creek District, Middlesex, 125 m., 29.iii.1965 (*EC Welling*) (CNC); 2♀, Stann Creek District, Middlesex, 125 m., 29.iv.1965 (*EC Welling*) (CNC); 1♀, Stann Creek District, Middlesex, 125 m., 25.iv.1965 (*EC Welling*) (CNC); 1♀, Stann Creek District, Mayflower Nat. Park, 01.5.2009 (*SK Javorek*) (PCYU) [Barcoded]; GUATEMALA: 1♀, Izabal, Morales, Tenedores, 25.vi.1965 (*sin colector*) (CNC); 2♀, Quiché, Uspantán, Lote Tres, ex. nido, 7.5.2009 (*G Armas*) (CANG); 4♀, El Petén, San Francisco, Casa A. Castellanos llevado en 2007, ex. nido 6, 28.02.2011 (*A Castellanos*) (CANG); 2♀, El Petén, Melchor de Mencos, Yaxhá, fin calzada al Lago, ex. nido

pie de árbol, 15.7.2010 (*CL Yurrita*) (CANG); 2♀, Alta Verapaz, Cobán, San Benito, ex. *Bixa Orellana*, 2006 (*Proyecto Lachúa*) (CANG); 4♀, Alta Verapaz, Cobán, Santa Lucía Lachúa, ex. *Bixa Orellana*, 2006 (*Proyecto Lachúa*) (CANG); 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Pataté, ex. *Bixa Orellana*, 2006 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Tzetoc, 2006 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Cotzal-Pataté, ex. *Bixa Orellana*, 2006 (*Proyecto Lachúa*) (CANG); 1♀, Quiché, Pachalum, Parte Alta de los Cipresales, 2006 (*M Vásquez*) (CANG); 1♀, El Petén, Flores, El Caoba, 2009 (*Proyecto Melipona*) (CANG); 4♀, El Petén, Poptún, Poptún, 2009 (*Proyecto Melipona*) (CANG); 3♀, Izabal, Livingston, Río Dulce, 11/02/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, Izabal, Livingston, Cerro San Gil, 02/02/2009 (*G Armas*) (CANG); 5♀, San Marcos, Nuevo Progreso, Comunidad Emanuel, 05/03/2009 (*M Vásquez*) (CANG); 3♀, Quiché, Uspantán, La Gloria, 06/05/2009 (*G Armas*) (CANG); 1♀, El Petén, Flores, Tikal, volando 1/04/2001 (*E Enríquez*) (CANG); 1♀, Izabal, Livingston, Biotopo Chocón Machacas, La Lámpara, volando, 14/03/2005 (*CL Yurrita*) (CANG); 1♀, Izabal, Livingston, Cerro San Gil, 11.02.2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Quiché, Uspantán, La Gloria, 06.05.2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Izabal, Livingston, Río Dulce, 11/02/2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Izabal, Livingston, Cerro San Gil, 02.02.2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Izabal, Livingston, Río Dulce, 11.02.2009 (*M Vásquez*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, San Marcos, Nuevo Progreso, Comunidad Emanuel, 05.03.2009 (*M Vásquez*) (CANG) [Barcoded]; 2♀, Retalhuleu, El Asintal, Finca Santa Margarita, ex. *Vernonia canaescens*, 24.02.2010 (*P Landaverde*) (CANG); 1♀, El Petén, San Francisco, Colmena 4, 28/02/2011 (*A Castellanos*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, El Petén, San Francisco, Colmena 6, 28/02/2011 (*A Castellanos*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Tzetoc, 20/02/2007 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; ; 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Pataté, 23/08/2006 (*X Armas*) (CANG) [Barcoded]; 2♀, El Petén, Melchor de Mencos, Yaxhá, fin calzada al Lago, ex nido pie de árbol, 15.7.2010 (*CL Yurrita*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Alta Verapaz, Cobán, Santa Lucía Lachúa, 04/11/2008 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]. HONDURAS: 3♀, Copán, Sesmil, Copán Ruinas, 11.02.2009 (*A Rodas*) (CANG)[Barcoded]; 1♀, Copán, Sesmil, Copán Ruinas, 11.02.2009 (*A Rodas*) (CANG). MEXICO: 1♀, Oaxaca, Chalchijapa, Santa María Chimalapa, selva alta perennifolia, ex. nido 24.8.1995 (*JL Salinas*) (MZFC); 1♀, Oaxaca, San Isidro, La Gringa, Santa María Chimalapa, selva alta perennifolia, ex. *Solanum*, 24.6.1995 (*JL Salinas*) (MZFC); 1♀, Oaxaca, Chalchijapa, Santa María Chimalapa, selva alta perennifolia, ex. nido 28.5.1995 (*JL Salinas*) (MZFC); 1♀, Chiapas, Palenque, Palenque Ruinas, 13.02.1989 (*R Ayala*) (EBCh); 2♀, Chiapas, Acacoyagua, Ejido Rosario Zacatonales, 30.11.2004 (*M*

*Rincón, R Ayala, M Guzmán*) (EBCh); 3♀, Chiapas, Acacoyagua, Las Golondrinas Zacatonales, 24.11.2004 (*C Balboa, J Mérida, M Guzmán*) (EBCh); 1♀, Chiapas, Mapastepec, Unión Los Olivos, 23.10.2004 (*M Rincón, R Ayala, M Guzmán*) (EBCh); 2♀, Chiapas, Unión Juárez, casa de Felipe Pérez, ex. nido, 09.4.2011 (*J Mérida*) (PCYU) [Barcoded]; 1♀, Chiapas, Chiquihuite, 24.11.2009 (*C Balboa*) (PCYU) [Barcoded].

**Distribución:** Se encuentra principalmente en zonas con vegetación de bosque tropical perennifolio del suroeste de México (estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas) y la vertiente Atlántica de Guatemala y Honduras, también existen poblaciones de esta especie en la serranías del norte de Chiapas, si bien es una especie de tierras bajas (Figura 14 B).

**Comentarios.** Esta abeja se puede diferenciar de *M. fasciata*, porque el integumento en el escudo es menos opaco, con puntuado más separado y menos profundo (Figuras 11 A y C); la pilosidad en general es menos anaranjada y en los tergos más gruesa y abundante. Además, *M. fasciata* se encuentra en altitudes mayores a los 500 m, asociada a bosques de pino y pino-encino de la Sierra Madre del Sur y del Eje Volcánico Transversal, en México. Estas especies muestran una clara divergencia genética a nivel de COI (~2.6 % de diferencia genética) por lo que se puede mantener como un linaje independiente dentro del este grupo de especies. Esta especie, se diferencia de *M. costaricensis* porque el escudo es más brillante y el puntuado es más separado, menos profundo y de aspecto más rugoso (Figuras 11 B y C). *M. costaricensis* se presenta principalmente entre Nicaragua y la región sur de Centroamérica. Aunque la divergencia genética con COI entre estas dos especies es muy baja (0.9 %) en este trabajo se consideran como dos linajes distintos, con base en su distribución y las diferencias morfológicas. Se considera a *M. belizeae* como un sinónimo de *M. solani*, el tipo de *M. belizeae* es en apariencia general más clara que *M. solani*, los pelos negros de los tergos son un poco más finos y los pelos del margen anterior de la tibia posterior son negros y anaranjados; en la revisión de los ejemplares de Belice y norte de Petén, no se observaron diferencias con *M. solani* por lo que se considera aquí como pertenecientes la misma especie, contrariamente a lo sugerido por Ayala (1999). Además, el análisis molecular con secuencias de COI, no mostró diferencias genéticas significativas, entre los ejemplares de Belice y Norte de Guatemala.

***Melipona (Michmelia) costaricensis* Cockerell**

(Figuras 3 C, 6 A, 11 B, 12 C y D, 13 A, 14 C)

***Melipona (Michmelia) panamica* Cockerell, 1912, nuevo sinónimo**

*Melipona costaricensis* Cockerell, 1919

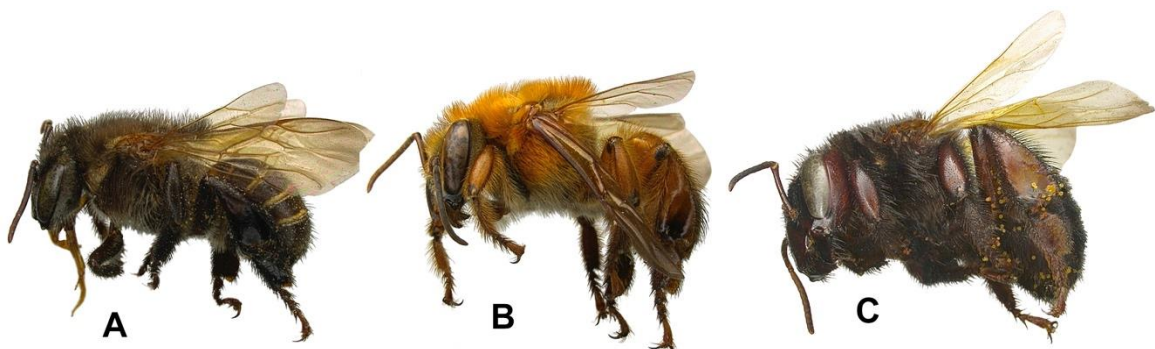
*Melipona fasciata costaricensis* Cockerell, 1919

*Melipona fasciata melanopleura* Cockerell, 1919

**Holotipo.** USNM

**Localidad tipo.** Pozo Azul, Costa Rica.

**Diagnosis.** Abeja de tamaño mediano (8.3 - 9.3 mm); de aspecto robusto, pilosidad abundante y tegumento pardo oscuro en cabeza, mesosoma y metasoma (Figura 13 A); largo ala anterior 6.6 - 7.3 mm; ancho de la cabeza 3.6 - 3.8 mm; marcas faciales no evidentes; espacio malar amplio; vértex con pilosidad parda predominante. Mesosoma con pilosidad anaranjada y pelos negros abundantes entremezclados; mesepisterno con un área con pelos más oscuro, contrastando con el resto; integumento con puntuado denso, de aspecto brillante; escutelo con pilosidad negra abundante. Metasoma con integumento rojizo en los tergos rojizo, con pilosidad negra simple; con bandas amarillas finas y poco definidas. Macho: similar a las obreras, pero de menor tamaño. Cápsula genital y el esterno 7 como se muestran en las Figuras 12 C y D respectivamente.



**Figura 13 A–C.** Habitus lateral de obreras del género *Melipona* subgénero *Michmelia*: A: *M. costaricensis*; B: *Melipona* sp.; C: *M. fallax*, en los que se muestran las diferencias en color de integumento y coloración de estas especies.

**Material examinado.** COSTA RICA: 2♀, San José, Montecarlo, Bonilla Farm, 13.02.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 1♀, San José, Montecarlo, Mora ref. site, ex. Tw/mint, 23.05.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 1♀, San José, Quizarra Helga's Farm, ex. coffee 16.03.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 2♀, San José, Quizarra O. Vásquez Farm, ex. coffee, 7.03.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 1♀, San José, Montecarlo, Bonilla Farm, 8.02.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 6♀, Alajuela, Grecia-San Isidro, ex. nido, 28.01.2011 (*E Herrera*) (CANG); 2♀, San José, Pérez-Zeledón, Santa Elena, ex. nido, 28.01.2011 (*E Herrera*) (CANG); 1♀, San José, Pérez-Zeledón, 01.12.1997 (*N Siles*) (CINAT); 2♀, San José, Pérez-Zeledón, 01.01.1990 (*H Arce*) (CINAT); 1♀, San José, Puriscal, 17.07.1992 (*H Arce*) (CINAT); 2♀, Puntarenas, Golfito, Jiménez, Río Tigre, 19.12.2001 (*JA Azofeita*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Santa Elena, 27.08.1991 (*A Ortiz*) (CINAT); 1♀, Heredia, Puerto Viejo, 11.05.1994 (*A Ortiz*) (CINAT); 2♀, Puntarenas, Quepos, 10km W, ex. baits and Bixa, 12.07.1992 (*D Roubik*) (CANG); 1♀, Puntarenas, Monteverde, Estación Biol Monteverde, 18.08.1997 (*C O'Flaherty*) (PCYU) [Barcoded]; 2♀, San José, Quizarra O. Vásquez Farm, ex. malaise, 9.03.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 4♀, San José, Montecarlo Bonilla Farm, ex malaise, 24.02.2005 (*HT Ngo*) (PCYU); 1♀, San José, Montecarlo Bonilla Farm, ex. malaise, 10.02.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 1♀, San José, Montecarlo Bonilla Farm, ex. malaise, 09.02.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); PANAMÁ: 2♀, Chiriquí, Ojo de Agua, Santa Clara to Finca Hartland Ojo de Agua, 29.06.1996 (*L Packer, W.T. Wisclo*) (PCYU); 2♀, road fr. Sant Clara to volcan, 6.3km WNW Rio Chiriquí, Viejo, 3/7/1996 (*L Packer, W.T. Wisclo*) (PCYU); 1♀, Panamá, Curundu, ex nido, oct.1981 (*D Roubik*) (CINAT); 1♀, Colón, Portobelo, 12km SW Santa Rita Ridge, 20.12.1988 (*D Roubik*) (CINAT); 1♀, Panamá, Curundú, ex nido, 19.05.1985 (*D Roubik*) (CINAT); NICARAGUA: 5♀, Jinotega, El Dorado, Casa Martiniano Chavarría, ex. nido, 19.2.2011 (*CL Yurrita*) (CANG); 1♀, Jinotega, Pantasma, Quebrada del Hure, Fca. La Concepción, 09.3.2010 (*sin colector*) (INBIO) [Barcoded]

**Distribución.** *M. costaricensis* se distribuyen entre Nicaragua y el sur de Centroamérica incluyendo Panamá (Figura 14 C), principalmente en bosques tropicales húmedos latifoliados, del istmo de Panamá en las vertientes Atlántica y Pacífica, aunque también pueden encontrarse en bosques montanos latifoliados.

**Comentarios.** Esta especie también se puede diferenciar de *M. solani* y *M. fasciata* porque presenta escudo menos brillante con puntuado más denso y profundo (Figuras 11 A, B y C),



también el margen posterior del escutelo es más proyectado que en *M. fasciata*, el basitarso posterior es más ancho que en *M. fasciata* y *M. solani* y la proyección media de S7 tiene una forma menos alargada que la de *M. fasciata* (Figuras 12 D y F). Algunos representantes de Panamá tienen una línea densa de pelos plumosos amarillentos más cortos en margen apical de los T3- T4, mientras representantes de Costa Rica, presentan una línea de pelos negros simples muy densa en el margen apical de los T3 y T4. En este trabajo se considera a la especie *M. panamica* como sinónimo de *M. costaricensis*, debido a que no se pudo diferenciar por su morfología, y geográficamente las ejemplares que corresponden a las dos especies nominadas tiene distribución simpátrica.

***Melipona (Michmelia) n sp. (sensu Roubik)***

(Figura 13 B)

*Melipona crinita sensu* Moure y Kerr, 1950

*Melipona fuscata crinita sensu* Moure y Kerr 1950

**Tipo.** No designado

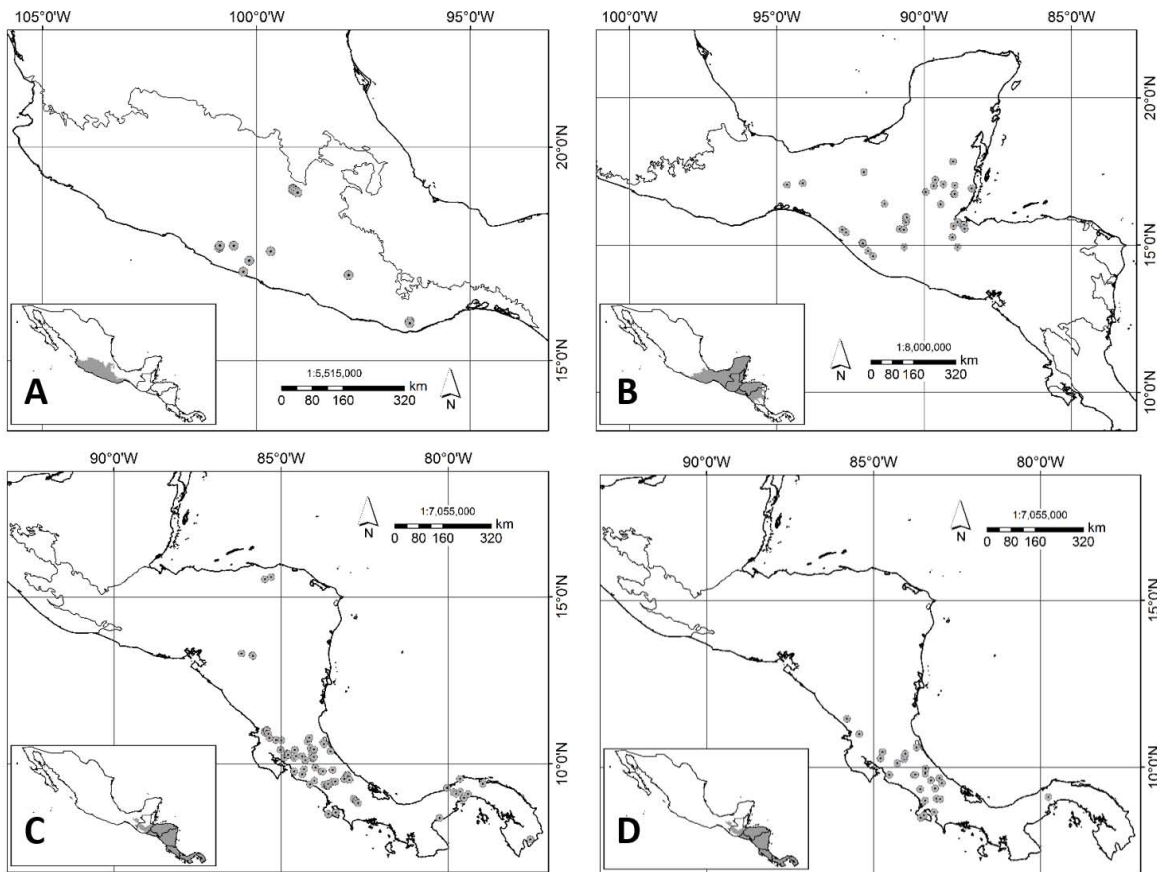
**Localidad tipo.** No designado

**Diagnosis.** Abeja de tamaño mediano (8.7 mm), de aspecto robusto, con abundante pilosidad anaranjada, integumento anaranjando (Figura 13 B); largo ala anterior 7.3 mm; ancho de la cabaza 4.1 mm; espacio malar amplio; pilosidad del vértex anaranjada, poco abundante; mesosoma anaranjando, con integumento opaco con puntuado denso muy fino; pronoto con mancha amarilla, pilosidad del escuto y del escutelo anaranjada, mesepisterno con pilosidad anaranjada, integumento brillante liso con puntuado fino en la parte inferior y más rugoso en la parte superior. Metasoma con integumento opaco, con puntuado denso muy fino, casi glabro, pilosidad decumbente amarilla simple corta presente pero no muy abundante; T1-T6 con pelos negros finos simples muy escasos y dispersos; margen apical lateral de T5 con pelos negros simples; T6 con margen apical con abundantes pelos negros simples; tibia posterior con margen anterior con pilosidad amarilla y margen posterior con pilosidad negra evidente.

**Material examinado.** PANAMA: 1 ♀, Darien Prov, Cana Field Sta. 450 m, 6-feb-2000 (*D Roubik*) (Panamá); 1 ♀, Kuna Yala, Carti rd., 17-oct-1980 (*D Roubik*) (CINAT).

**Distribución.** Panamá.

**Comentarios.** De acuerdo con Camargo y Pedro (2008) esta especie forma parte del grupo “crinita” y es endémica de Panamá. Esta es una nueva especie de acuerdo a la opinión de D. Roubik quien la nominará y publicará en un trabajo independiente.



**Figuras14 A–D.** Localidades registradas para las especies del género *Melipona*: A: *M. fasciata*; B: *M. solani*; C: *M. costaricensis*; D: *M. fallax*. El área delineada (resaltada en gris en mapa inserto) muestra las ecorregiones de las colectas.

***Melipona (Michmelia) fallax* Camargo y Pedro**

(Figuras 3 a, 13 C, 14 D)

*Melipona fallax* Camargo y Pedro, 2009

*Melipona flavipennis* Cockerell, 1919

*Melipona nigra* Wille 1979

**Tipo.** STRI

**Localidad tipo.** Colón, Panamá

**Diagnosis.** Abeja grande (10.7 - 11.84 mm); de aspecto robusto, con integumento y pilosidad negros (Figura 13 C). , largo del ala anterior 8.1 - 8.3 mm; ancho de la cabeza 4.4 - 4.5 mm; integumento y pilosidad negros; clípeo con integumento liso, brillante, rojizo oscuro y casi glabro, sin dibujos faciales. Mesosoma con pilosidad abundante, negra incluyendo el mesepisterno y el escuto; escutelo con integumento pardo oscuro y pilosidad negra. Metasoma completamente negro con tinte rojizo; integumento de los T2-T6 sin bandas apicales evidentes, pilosidad negra en algunos ejemplares se observan algunos pelos plumosos, pero predominan los simples cortos; tibia posterior con márgenes anterior y posterior con pilosidad negra.

**Material examinado.** COSTA RICA: 1♀, San José, near arbofilia, El sur de Turrubares, 16.ii.2001 (*C Sheffield*) (PCYU) [Barcoded]; 1♀, San José, Montecarlo, Mora ref. site, sweep net, 28.v.2006 (*HT Ngo*) (PCYU); 1♀, Alajuela, San Carlos, Fortuna, Reserva Ftal Arenal, Send Colada, 11-19.FEB.1999 (*I Jiménez*) (INBIO); 1♀, Cartago, Jiménez, Pejibaye, Estación Biológica Copal, Sendero Ron Ron, 1090 m, 5-13.iv.2005 (*JD Gutiérrez*) (INBIO); 1♀, Cartago, Paraíso, Orori, P.N. Tapanti, 1300 m, Abr 1994 (*G Mora*) (INBIO); 2♀, Cartago, Paraíso, Orori, Pque Nal Tapanti, Queb Segunda, 100 m W de la Oficina del Área, 1200-1250 m, 5-12.iv.1999 (*G Carballo*) (INBIO); 1♀, Cartago, Turriabla, Tayutic, Grano de Oro, Chirripo, 1100m, Nov 1993 (*P Campos*) (INBIO); 1♀, Cartago, Turrialba, Tres Equis, P.N. Barbilla, Send pprincipal, 485 m, 10-13 DEC 2002 (*E León*) (INBIO); ); 1♀, Guanacaste, La Cruz, Santa Cecilia, Estac. Pitilla, 9 km S. Santa Cecilia, 700m, jun 1988 (*GNP Biodiversity Survey*) (INBIO); 2♀, Guanacaste, La Cruz, Santa Cecilia, Estac. Pitilla, 9 km S. Sta. Cecilia, Mar 1990 (*P. Rios, C. Moraga y R. Blanco*) (INBIO); 1♀, Heredia, Sarapiquí, La Virgen, Est. El Ceibo, Braulio Carrillo N.P., 400-600 m, Jan 1990 (*C Chaves*) (INBIO); 1♀, Heredia,

Sarapiquí, La Virgen, Est. Magsasay, P.N. Braulio Carrillo, 200 m, Oct 1990 (*R Aguilar*) (INBIO); 1♀, Limón, Valle la Estrella, Est. Hitoy Cerere, Res Biol. Hitoy Cerere, Rio Cerere, 200 m, Dic 1990 (*G Carballo*) (INBIO); 1♀, Limón, Valle la Estrella, Est. Hitoy Cerere, Res Biol. Hitoy Cerere, R Cerere, 200m, Oct 1990 (*M Barrelier*) (INBIO); 1♀, Limón, Pococi, Colorado, Sector Cerro Cocori, Fca. de E. Rojas, Mar 1991 (*E Rojas*) (INBIO); 1♀, Limón, Talamanca, Brastsi, Amubri, A.C. Amistad, 70 m, 1-19 Feb 1994 (*G Gallardo*) (INBIO); 1♀, Talamanca, Brastsi, P.N La Amistad, Laguna Dabagri, 1400-1500 m, 26 JUL 2007 (*A Solis, M Moraga*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Buenos Aires, Potrero Grande, Los Angeles, Camino Potrero Gde. a Helechales, 21 jul 1992 (*MA Zumado*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Buenos Aires, Potrero Grande, La Amistad, Sector Altamira, Cerro Biolley, 1800 m, Ene 1994 (*R Delgado*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Golfito Jiménez, Est. Sirena, Pen. Osa, P.N. Corcovado, Set-Oct 1977 (*DH Hanzen*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Buenos Aires, Colinas (Maíz de los Uvas), Alto Jalisco, 900-1000 m, 22-26 FEB 2009 (*E. Ulate, J. A. Azofeifa, M. Moraga*) (INBIO) [Barcoded]; 1♀, Puntarenas, Golfito, Jiménez, Rio Nino (ACOSA), Golfo Dulce, 140 m, 6 MAY 1995 (*L Angulo*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Golfito, Golfito, RVS Golfito, Estación Naranjales, 64m, 27 ABR 2004 (*M Moraga*) (INBIO); 1♀, Puntarenas, Guacimal, Est. G. Brenes, Res. Biol. Monteverde, 1300 m, jun 1991 (*E Bello*) (INBIO); 1♀, Alajuela, San Ramón, Est Biol. Villa Blanca, 1115m, 28 FEB-15 MAR 2010 (*B Hernández*) (INBIO) [Barcoded]; 2♀, Alajuela, Muelle San Carlos, 1990 (*H Arce*) (CINAT). PANAMA: 1♀, Barro Colorado, Canal Zone, 12/11/1923 (*sin colector*) (AMNH). NICARAGUA: Chontales, Goldman-Salvin collection, 1911-24 (*Jason*) (AMNH).

**Distribución.** Esta especie se distribuye entre Nicaragua, Costa Rica y Panamá, aunque también existen reportes para Colombia y Ecuador (Camargo y Pedro 2008) (Figura 14 D). En Centroamérica está presente en la vertiente del Pacífico, pero principalmente en la vertiente Atlántica, en bosques húmedos latifoliados, pero también en bosques montanos latifoliados. Esta especie está presente en un amplio rango altitudinal entre 100 a 1800 m, pero los datos de las localidades muestran que la especie puede ser más común en altitudes medias y las montañas entre 900 y 1500 m.

**Comentarios.** Camargo y Pedro (2008), consideran que los ejemplares de la especie del grupo “fuliginosa” que se presentan en Centroamérica corresponden a una especie diferente que describen como *Melipona fallax* Camargo y Pedro, 2008. La distinguen de *M. titania* por la

forma del penicilo. Estos autores separan a *M. fallax* y *M. titania* de *M. fuliginosa* porque las primeras carecen de pelos plumosos sobre los tergos.

### Subgénero *Melipona* Illiger, 1806

#### *Melipona (Melipona) lupitae* Ayala

(Figuras 3 B, 15 A, 16 A)

*Melipona lupitae* Ayala, 1999

**Tipo.** UNAM

**Localidad tipo.** México, Las Cañas, Michoacán.

**Diagnosis.** Abeja relativamente pequeña (7.9 mm); de aspecto robusto, con pilosidad anaranjada abundante (Figura 15 A); largo del ala anterior 7.2 mm; ancho de la cabeza 3.2 mm; clípeo con integumento opaco, oscuro; espacio malar reducido; manchas faciales evidentes y bien definidas; vértex con pilosidad oscura. Mesosoma con pilosidad oscura predominante; mesepisterno con pilosidad blanquecina amarillenta; escuto opaco, completamente negro; tibia posterior rojiza, con márgenes anterior y posterior con pelos negros simples. Metasoma con integumento oscuro; T1 a T5 con bandas apicales amarillas bien definidas.

**Material examinado.** MEXICO: 1 ♀, Michoacán, Zicuirán, 30-X-1987 (*R Ayala*) (EBCh); 1 ♀, Michoacán, Zicuirán, 7-X-1988 (*R Ayala*) (EBCh); 1 ♀, Michoacán, La Huacana, 12-X-1988 (*G Rodríguez*) (EBCh); 1 ♀, Michoacán, La Zauda, 9-VII-1988 (*G Rodríguez*) (EBCh); 1 ♀, Michoacán, La Huacana, 6 km S (SO), 30-X-198 (*R Ayala*) (EBCh); 1 ♀, Michoacán, La Laja, 8-X-1988 (*R Ayala*) (EBCh).

**Distribución.** Especie endémica de México, con distribución asociada a zonas mas secas con bosque tropical caducifolio de la Cuenca del Río Balsas en sus porción oeste en el estado de Michoacán (Figura 16 A). Su distribución es discontinua (disjunta) respecto a la de *M. yucatanica* que es su especie hermana.

**Comentarios.** Esta especie es muy cercana morfológicamente a *M. yucatanica*, pero se puede distinguir de ésta porque su pilosidad es en general menos abundante y el integumento es más brillante.

***Melipona (Melipona) yucatanica* Camargo, Moure y Roubik**

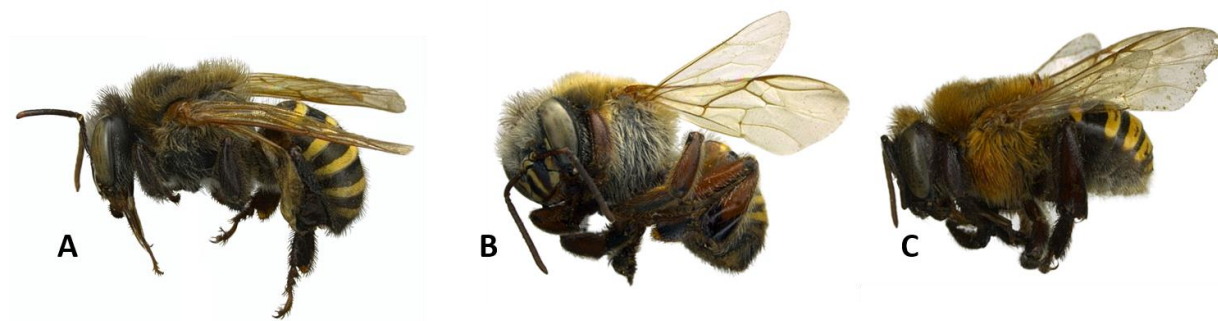
(Figuras 12 I y J, 15 B, 16 B)

*Melipona yucatanica* Camargo, Moure, y Roubik, 1988

**Tipo.** RPSP

**Localidad tipo.** Mérida, Yucatán, México

**Diagnosis.** Abeja de tamaño relativamente pequeño (7.4 - 8.4 mm), de aspecto robusto y con abundante pilosidad (Figura 15 B); largo del ala anterior 6.3 - 7.3 mm; ancho de la cabeza 3.1 – 3.3 mm; clípeo con integumento opaco, oscuro; espacio malar reducido; manchas faciales evidentes y bien definidas; vértex con pelos anaranjados predominantes. Mesosoma con pilosidad parda rojiza; mesepisterno con pilosidad blanquecina amarillenta. Metasoma con integumento pardo oscuro; T1 a T5 con bandas apicales amarillas bien definidas; pilosidad del metasoma dispersa, negra, simple, fina poco abundante y con pilosidad amarilla decumbente más abundante; tibia posterior pardo rojiza, en algunos ejemplares oscura hacia el extremo distal; los márgenes anterior y posterior con pilosidad simple amarilla. Macho: similar a las obreras. Cápsula genital y el esterno 7 como se muestran en las Figuras 12 I y J respectivamente.



**Figura 15 A–C.** Habitus lateral de obreras del género *Melipona* subgenere *Melipona*: A: *M. lupitae*; B: *M. yucatanica*; C: *M. phenax*. Se pueden observar las diferencias en la coloración entre estas especies.

**Material examinado:** GUATEMALA: 1♀, Chiquimula, Ipala, Chaguitón, casa A. Aguilar, 16.02.2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, Casa Victor Morales, 25.03.2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Huehuetenango, Camojalito, Meliponario la Candelaria, ex. nido, 20.04.2009 (*G Armas*) (CANG) [Barcoded]; 2♀, Jutiapa, Aldea la Pajarita, 02.02.2011 (*CL Yurrita*) (CANG) [Barcoded]; 2♀, Jutiapa, Moyuta, Las Cofradías, 02.02.2011 (*CL Yurrita*) (CANG) [Barcoded]; 1♀, Jutiapa, Moyuta, Las Cofradías, 02.02.2011 (*CL Yurrita*) (CANG) [Barcoded]; MEXICO: 1♀, Yucatán, Tekax, Bacax 20 km SW Tzucacab, ex nido, 12.x.1986 (*R Ayala*) (INBIO); 2♀, Yucatán, Tekax, Bacax 20 km SW Tzucacab, ex nido, 26.06.2011 (*J Quezada, J González*) (PCYU); 1♀, Campeche, Calakmul, Zoh-Laguna, Parque de la Vida Silvestre, sf (*sin colector*) (MZFC); 1♀, Campeche, Holpechén, Dziblachén, sf (*sin colector*) (MZFC); 1♀, Campeche, Holpechén, 7,22 km al NE de Dziblachén, sf (*sin colector*) (MZFC); 1♀, Oaxaca, Huatulco, Santa María Huatulco, en camino a Playa Cacaluta ex. Maguey, Parque Nacional Huatulco, selva baja, 25.x.2008, (*N Arnold*) (CANG) [Barcoded].

**Distribución:** Esta especie presenta distribución disjunta respecto a *M. lupitae* que es cercana morfológicamente, encontrándose al sur de la península de Yucatán y la vertiente en el Pacífico del Istmo de Tehuantepec en México, y en Petén en el norte y en Jutiapa al sur de Guatemala (Figura 16 B). Esta especie tiene distribución asociada al bosque tropical caducifolio en México y a los bosques latifoliados húmedos y secos en la región de la costa Atlántica de Guatemala, mientras en la zona del Pacífico se encuentra principalmente en bosques secos latifoliados en Guatemala y El Salvador.

**Comentarios:** El análisis molecular con el código de barras de DNA usando COI, muestra que la divergencia dentro del grupo de secuencias analizadas que pertenecen a representantes de la región de Yucatán y de la región de Jutiapa es de 1.9%, valor que se encuentra en el límite para ser considerada como un linaje independiente respecto a las otras especies cercanas. Igualmente, de acuerdo a Yurrita et al. (2016) se observa una distribución disjunta entre las poblaciones de Yucatán y Jutiapa, sin embargo, en este trabajo no se considera separarlas por falta de caracteres morfológicos diagnósticos.



***Melipona (Melipona) phenax* Cockerell**

(Figuras 15 C, 16 C)

*Melipona phenax* Cockerell, 1919

*Melipona orbignyi jenningsi* Cockerell, 1919

**Tipo.** USNM

**Localidad tipo.** Las Cascadas, zona del Canal Panamá

**Diagnosis.** Abeja de tamaño relativamente pequeño (7.8 - 7.9 mm), de aspecto robusto y con abundante pilosidad (Figura 15 C); largo del ala anterior 6.0 - 7.1 mm; ancho de la cabeza 3.5 - 3.6 mm; espacio malar reducido; vértex con pilosidad anaranjada; manchas faciales no evidentes. Mesepisterno con pilosidad anaranjada, abundante; pronoto negro; escuto opaco con puntuado denso y fino, completamente negro, con pilosidad anaranjada; escutelo pequeño, que se proyecta sobre el posnoto, con pilosidad anaranjada. Metasoma con integumento brillante, con puntuado fino; T1-T5 con bandas amarillas evidentes, gruesas y con pilosidad poco abundante.

**Material examinado.** PANAMA: 31 ♀, Pueblo Nuevo, 22.ii. 1945 (*CD Michener*) (AMNH); 3 ♀, Ancon Hill, Canal Zone, 20.xii. 1944 (*CD Michener*) (AMNH); 1 ♀, Contadora Island, ex. *Senna reticulata*, 09.xi. 1988 (*D Roubik*) (CINAT); 1 ♀, Panamá, Balboa, Balboa Canal Zone, 28.i. 1915 (*T Hallinan*) (AMNH); 4 ♂, Panamá, Balboa, Balboa Canal Zone, 28.i. 1915 (*T Hallinan*) (AMNH); 1 ♀, Corozal, Canal Zone, 31.i. 1929 (*CH Curran*) (AMNH); 1 ♀, Ancon, Canal Zone, 21.xi. 1923 (*sin colector*) (AMNH); 1 ♀, Ancon Hill, Canal Zone, 21.xii. 1944 (*CD Michener*) (AMNH); 1 ♀, Panama, Panama City, 16.ix. 1945 (*CD Michener*) (AMNH); 1 ♂, Panama, Old Panama, 04.ii. 1945, (*CD Michener*) (AMNH); ♂♀, Balboa, Balboa, Canal Zone, 21.xi. 1923 (*sin colector*) (AMNH); 1 ♀, Capira, Cerro Campana, 08.viii. 1980 (*D Roubik*) (CINAT); 1 ♀, Curundu Home, 13.ii. 1983 (*D Roubik*) (Panamá).

**Distribución.** Panamá (fig, 16 C)

**Comentarios.** Esta especie es muy similar a *M. favosa* de América del Sur la cual presenta vértex con pilosidad más amarillenta y menos abundante. Los ejemplares de *M. favosa*

revisados no presentan manchas faciales bien evidentes y la pilosidad del mesepistermo es predominantemente amarillenta, con una porción central de pelos anaranjados.

**Subgénero *Eomelipona* Moure, 1992**

***Melipona (Eomelipona) carrikeri* Cockerell 1919**

(Figuras 7 B, 16 D, 17 A)

*Melipona marginata micheneri* Schwarz, 1951, nuevo sinónimo.

*Melipona marginata carrikeri* Cockerell, 1919

*Melipona micheneri* Schwarz, 1951

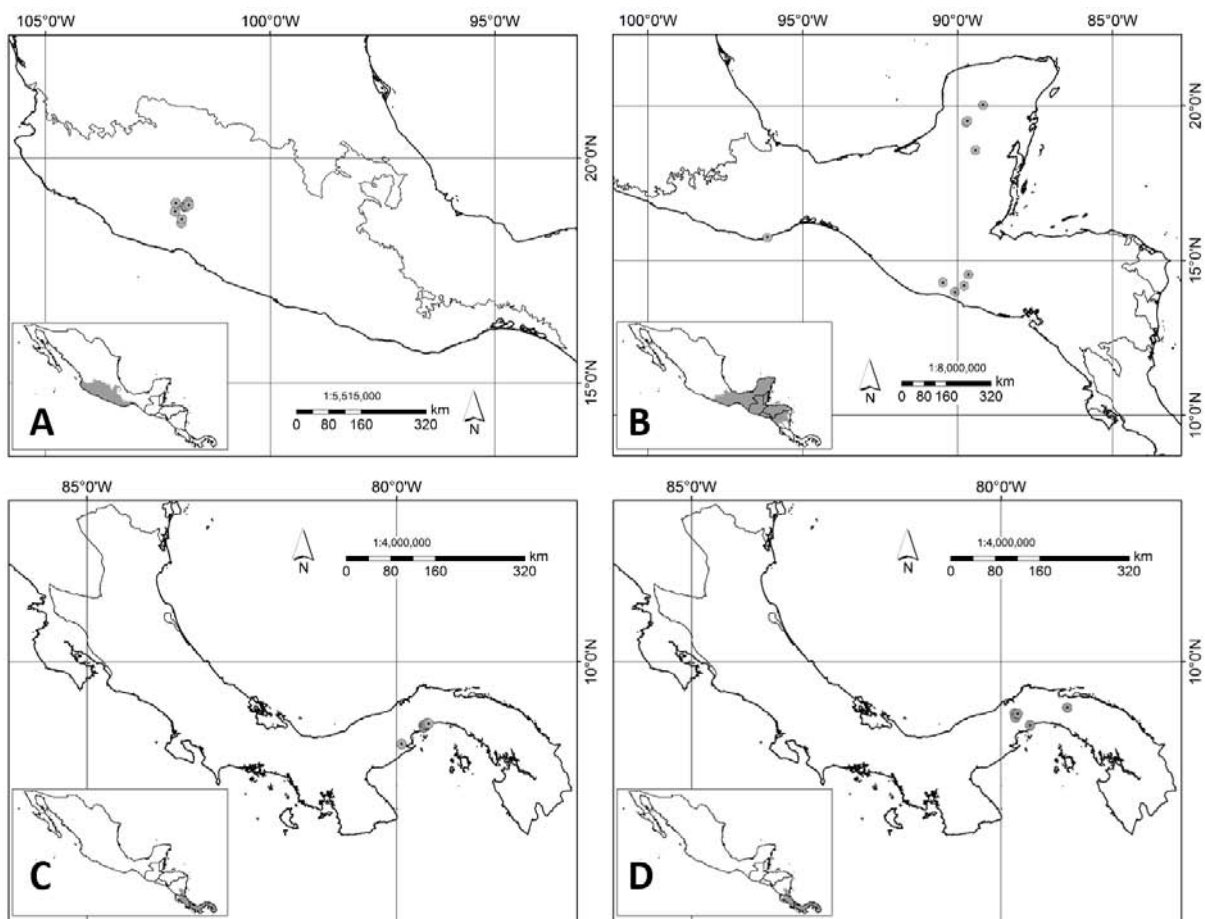
*Melipona marginata micheneri* Schwarz, 1951

**Tipo.** USNM

**Localidad tipo.** Pozo Azul, Costa Rica

**Diagnosis.** Abeja de tamaño pequeño (6.9 – 7.5 mm) (Figura 17 A); largo del ala anterior 5.5 – 5.7 mm; ancho de la cabeza 3.2 – 3.3 mm; espacio malar reducido; pilosidad del vértex predominantemente parda, con algunos pelos negros cerca de los ocelos. Mesosoma con pilosidad predominantemente amarilla, pelos pardo abundantes; integumento negro, opaco, con puntuado denso y fino; mesepistermo con integumento rojizo, opaco, con puntuado fino; pronoto amarillo, pilosidad en los lóbulos pronotales parda; escuto con bandas laterales amarillas; escutelo proyectado sobre el posnoto, amarillo, con pilosidad predominante parda. Metasoma opaco con reticulado fino.

**Material examinado.** PANAMÁ: Holotipo: 1 ♀, Barro Colorado, C.Z., (AMNH); 1 ♀, Colón, Parque Nacional Soberanía Pipeline Road, km 8 N Gamboa, 15/05/1982 (*D Roubik*) (CINAT); 1 ♀, Darién, Bayano Bridge 1km E, 16/05/1980 (*D Roubik*) (CINAT); 1 ♀, Panamá, Chepo, 6 km NE Carti Rod., 11/02/1981 (*D Roubik*) (STRI); 1 ♀, Panamá, Panamá, Curundu, 02/08/1987 (*D Roubik*) (STRI).



Figuras 16 A–D. Mapas que muestran las localidades registradas para las especies: A: *M. lupitae*; B: *M. yucatanica*; C: *M. phenax*; D: *M. carrikeri*. El área delineada (resaltada en gris en mapa inserto) muestra las ecorregiones de las colectas.

**Distribución.** Esta especie se distribuye entre Costa Rica y Panamá, siguiendo los bosques latifoliados húmedos y secos (Figura 16 D).

**Comentarios.** El metasoma de *M. carrikeri* presenta más pilosidad que los ejemplares revisados de de *M. micheneri*. Aunque se encontraron algunas pequeñas diferencias morfológicas con los ejemplares considerados como pertenecientes a la especie *M. micheneri*, consideramos que no representa un lineaje independiente y *M. micheneri* es asignará como sinónimo dentro de *M. carrikeri*.



**Figura 17 A–B.** Habitus lateral de obreras del género *Melipona* subgéneros *Eomelipona*: A: *M. carrikeri*; B: *M. torrida*. Se pueden observar las diferencias en la coloración entre estas especies.

***Melipona (Eomelipona) torrida* Friese**

(Figuras 7 A, 17 B)

*Melipona marginata torrida* Friese, 1916

**Tipo.** AMNH

**Localidad tipo.** San José, Costa Rica

**Diagnosis.** Abeja de tamaño relativamente pequeño (8.2 mm) (Figura 17 B), largo del ala anterior 6.7 mm; ancho de la cabeza 3.6 mm; espacio malar muy reducido; vértex con pilosidad parda poco densa; manchas faciales evidentes. Mesosoma con pilosidad muy escasa, de color pardo; mesepisterno con integumento pardo, opaco, con puntuado muy denso y pilosidad escasa, parda; pronoto negro; escuto con integumento opaco, con puntuado denso y fino, completamente negro; escutelo pardo, que no sobresale sobre el posnoto; tibia posterior con margen anterior con pelos amarillos y negros en el posterior. Tergos con integumento brillante, con reticulado laxo; pelos dispersos; con bandas amarillas poco evidentes.

**Material examinado.** 1 ♀, San José, 1913 (*sin colector*) (AMNH)

**Distribución.** Panamá

**Comentarios.** El mesepistermo opaco como en *M. carrikeri*. El escutelo no sobresale sobre el posnoto, como *M. carrikeri*. El basitarso posterior menos ancho que la tibia. El clípeo en vista lateral sensiblemente más cóncavo que en *M. phenax*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las personas que amablemente aportaron el material utilizado para el desarrollo de este trabajo. CLY a: Dra. Carlota Monroy y Dr. Tabaru por el apoyo financiero otorgado, al Dr. Laurence Packer y al programa Emerging Leaders for the Americas (ELAP) por el apoyo recibido para realizar una estancia de investigación en la York University, Toronto, Canadá, al Barcode of Life Project, de la Universidad de Guelph, Canadá y al Dr. Alejandro Zaldívar del IBUNAM por el procesamiento de las secuencias, a la Biól. S. Guzmán del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (IBUNAM), al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM) y a la Universidad de San Carlos de Guatemala

## ANEXO 2. Caracteres utilizados para realizar análisis cladístico y codificación de sus estados.

1. Cerdas de labro: 0) cerdas amarillas; 1) cerdas negras
2. Pilosidad de clípeo: 0) pilosidad ausente o muy escasa y simple; 1) pilosidad plumosa, abundante; 2) cerdas negras simples
3. Pilosidad de frente: 0) pilosidad larga y plumosa predominante; 1) pilosidad larga y plumosa con numerosos pelos simples entremezclados
4. Mechón de pelos rojizos contrastante en ángulo antero-lateral de escuto: 0) ausente; 1) presente
5. Pilosidad del escuto: 0) pilosidad escasa, dejando ver el integumento; 1) pilosidad abundante, ocultando el integumento
6. Pilosidad de tergos: 0) pilosidad negra, gruesa y simple predominante; 1) pilosidad amarillenta, fina y simple predominante con algunos pelos negros entremezclados
7. Pilosidad gruesa y simple de tergos: 0) T4-T6 con pilosidad gruesa muy abundante; 1) T4-T6 con pilosidad gruesa relativamente escasa; 2) ausente
8. Pilosidad de margen de T3-T5: 0) ausente; 1) pilosidad corta; 2) pilosidad larga
9. Pilosidad del disco de T6: 0) con abundantes pelos plumosos blanquecinos; 1) con pelos simples amarillentos numerosos o escasos; 2) con pelos simples blanquecinos; 3) con pelos simples negros esparcos
10. Pilosidad de margen de T6: 0) pelos simples negros abundantes; 1) pelos simples negros escasos
11. Pilosidad en el margen posterior de tibia posterior: 0) amarillenta; 1) negra
12. Coloración de la superficie anterior del escapo: 0) amarillo; 1) igual al resto de la antena
13. Manchas faciales amarillas: 0) difusas, casi imperceptibles; 1) finas bien definidas; 2) gruesas bien definidas; 3) ausentes
14. Coloración del pronoto: 0) amarillo; 1) igual al resto del escuto
15. Coloración del labro: 0) amarillo; 1) pardo
16. Bandas apicales en T1-T5: 0) bandas amarillas difusas o ausentes; 1) bandas amarillas bien definidas
17. Textura de integumento del clípeo: 0) liso; 2) con puntuado fino; 3) con puntuado fino y con foveas dispersas
18. Textura de integumento sobre el espacio ocelo-ocular: 0) puntuado evidente; 1) puntuado muy leve

19. Textura de integumento en el mesosoma: 0) liso y brillante; 1) integumento opaco
20. Textura de integumento de mesepisterno: 0) puntuado denso; 1) puntuado laxo
21. Textura de integumento de escuto: 0) puntuado laxo y fino; 1) puntuado denso y fino
22. Forma de margen anterior del escutelo: 0) muesca en parte media de margen anterior ; 1) sin muesca en margen anterior
23. Forma de superficie interna de tibia posterior: 0) superficie a un mismo nivel y con queirotriquia (pilosidad corta, fina y densa); 1) superficie interna con una parte media elevada y con queirotriquia
24. Forma de borde apical de tibia posterior: 0) esquina externa termina en forma de gancho; 1) esquina externa termina al mismo nivel que todo el borde
25. Forma de la tibia posterior: 0) forma sub-triangular; 1) forma variable
26. Textura de integumento de metasoma: 0) opaco con puntuado muy denso; 1) brillante con puntuado medio; 2) brillante con puntuado laxo
27. Tamaño relativo de cuerpo de la abeja: 0) grande; 1) medio; 2) pequeño; 3) muy grande
28. Tamaño de ala anterior: 0) ala que sobrepasando el ápice del metasoma; 1) ala corta no sobrepasando el ápice del metasoma
29. Ancho del espacio malar: 0) muy amplio; 1) amplio; 2) angosto (estrecho)
30. Relación de tamaño entre tibia y basitarso posterior: 0) ancho de basitarso mayor que la mitad del ancho de la tibia; 1) ancho de basitarso menor que la mitad del ancho de la tibia
31. Coloración de integumento de T1: 0) igual que el resto de los tergos; 1) amarillo

ANEXO 2. Matriz de caracteres para análisis cladístico de las especies de *Melipona* presentes en el área comprendida entre México y Centroamérica.

	123456789111111111122222222233
	0123456789012345678901
B_sapor	0210133040113132001211431000000
P_bilineata	1220002000111112002220320110110
M_nigripes	0101111221001001110101011210110
M_beecheii	010111110002001110101011210110
M_yucat	0000112021012101210101021211110
M_solani	0010100230110010112011011110110
M_fasciata	1000101030110010100011011110110
M_colimana	1010101131111011100101211110111
M_lupitae	0000102330112111210101021211110
M_costar	202010135111011011111111110110
M_sp	0110112110010110111011011110110
M_tripilar	0101112000201001111101011210110
M_fallax	1210100030113112001011021110110
M_phenax	0000112021113111211001011211110
M_torrída	0010112211111110111101121210110
M_carrikeri	0300102031101011210111021211110
M_favosa	0000112011111101210111221211110

## Referencias

- Aguilar, I., Herrera, E. & Zamora, G. (2013) Stingless Bees of Costa Rica. in: Vit, P., Pedro, S.R.M. and Roubik, D.W. (Eds.), Pot-Honey a legacy of stingless bee. Springer, New York, pp. 113-124
- Antonini, Y., Martins, R.P. (2003) The value of a tree species (*Caryocar brasiliense*) for a stingless bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. *J Insect Conser* 7, 167–174

- Ayala, R. 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* 106, 1-123.
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Sep/08/2016
- Camargo, J. M. F., Moure, J. S., Roubik, S.W. (1988) *Melipona yucatanica* new species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae); stingless bee dispersal across the caribbean arc and post-eocene vicariance. *The Pan-Pacific Entomologist* 64, 147-157.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. (2008) Revision of the species of *Melipona* of the fuliginosa group (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Entomol.* 52, 411-427
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., Palmer, T. M. (2015) Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances*, 1, e1400253.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linnean Soc.*, 85, 407-415.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., Moritz, C. (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 27, 480-488.
- Goldstein, P. Z., & DeSalle, R. (2011) Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33, 135-147.
- Goloboff, P., S. Catalano (2016) TNT, versión 1.5, with a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics* DOI 10.1111/cla.12160
- Gonzalez, V.H. & Griswold, T.L. (2013) Wool carder bees of the genus *Anthidium* in the Western Hemisphere (Hymenoptera: Megachilidae): diversity, host plant associations, phylogeny, and biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 168, 221–425.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B*: 270, 313-321.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.



- Kerr, W. E., Pisani, J. F. Aily, D. (1967) Aplicação de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona* Illiger, com a divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). *Papéis Avulsos de Zoologia* 20, 135-145.
- Macías-Macías, J.O., Quezada-Euán, J.J.G., Tapia-Gonzalez, J.M., Contreras-Escareño, F. (2014) Nesting sites, nest density and spatial distribution of *Melipona colimana* Ayala (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in two highland zones of Western Mexico. *Sociobiology*. 61, 423-427
- May-Itzá W. de J., Quezada-Euán, J. J. G., Medina Medina, L. A., Enríquez, E. De la Rúa, P. (2010) Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics* DOI 10.1007/s10592-010-0087-7.
- May-Itzá, W.D.J., Quezada-Euán, J. J.G., Ayala, R., De La Rúa, P. (2012) Morphometric and genetic analyses differentiate Mesoamerican populations of the endangered stingless bee *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponidae) and support their conservation as two separate units. *J. Insect Conserv.* 16, 723-731
- Michener, C. D. (1990) Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univ. Kansas Sci. Bull.* 54, 75–164.
- Michener, C. D. (2007) *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press USA. 972 p.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol* 9: e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127
- Moure, J. S., Kerr, W. E. (1950) Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). *Dusenian* 1, 105-129.
- Moure, J. S. (1992) *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806. (Hymenoptera –Apidae). In: Cruz-Landin C., Chaud-Netto, J (eds.) *Anais do Encontro Brasileiro de Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais*. Editora UNESP. São Paulo, Brasil, pp. 32-38.
- Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão* Editora Nogueirapis, São Paulo, Brasil. 445p
- Nylander, J. A. A. (2004). *MrModeltest v2*. Program. Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., Hanner, R. (2009) DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Mol. Ecol. Res.* 9, 42-50.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7, 16.
- Ramírez R., Nieh, J. C., Quental, T. B., Roubik, D. W., Imperatriz-Fonseca, V. L., Pierce, N. E. (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 56, 519-525.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A., (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* 99, 206–232.
- Rodman, J. E., Cody, J. H. (2003) The taxonomic impediment overcome: NSF's partnerships for enhancing expertise in taxonomy (PEET) as a model. *Systematic biology* 52, 428-435.
- Roig-Alsina, A., Michener, C. D. (1993) Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *Univ. Kansas Sci. Bull.* 55, 123–162.
- Roubik D.W. (1992) Stingless bees (Apidae: Meliponinae): a guide to Panamanian and Mesoamerican species and their nests. pp. 495-524. In: Quintero D, Aiello A. eds. *Insects in Panama and Mesoamerica: Selected Studies*. Oxford University Press; Oxford, England.
- Roubik, D.W., Camargo, J. M.F. (2012) The Panama microplate, island studies and relictual species of *Melipona* (*Melikerria*) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Syst. Entomol.* 37, 189-199
- Schwarz, H. F. (1951) New stingless bees (meliponidae) from Panama and the canal zone. *American Museum Novitates* 1505, 1-16
- Schwarz, H. F. (1932) The genus *Melipona*. The type genus of the Meliponidae or stingless bees. *Bul. Am. Mus.Nat. Hist.* 63, 231-460.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B. (2002) *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira. 253 p.
- Slaa, E. J., Sánchez, L. A., Malagodi-Braga, K. S., Hofstede, F. E. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37, 293-315.
- Tamura K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Wheeler, Q. D. (2004) Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359, 571-583.

Yurrita-Obiols, C.L. Vásquez, M. (2013) Stingless Bees of Guatemala, in: Vit, P., Pedro, S. R. M. and Roubik, D. W. (Eds.), Pot-Honey a legacy of stingless bee. Springer, New York, pp. 99-111

## 7. Discusión general y conclusiones

La diversidad biológica y en consecuencia los servicios ecosistémicos que éstos proporcionan a la humanidad (i.e. polinización), se ve afectada por las altas tasas de extinción que se han acelerado de manera extrema debido a actividades antrópicas poco controladas (Mace et al. 2005, Ceballos et al. 2015). Para desarrollar programas de conservación eficientes y también para comunicar información sobre la diversidad, incluyendo la que aún falta por descubrir, es necesario tener un conocimiento confiable de las especies y su distribución (Wheeler 2004; Packer et al. 2009).

Considerando lo anterior, en este trabajo se presenta una revisión taxonómica de las especies del género *Melipona* de México y Centroamérica, con el objetivo de proporcionar información actualizada, que pueda ser utilizada para desarrollar estrategias de conservación efectivas, de estas abejas de importancia ecológica, económica y cultural.

Usando como base la información de caracteres morfológicos y moleculares del gen mitocondrial de la enzima citocromo oxidasa I (COI) (Código de Barras de la Vida), en este trabajo se sinonimizaron tres especies de *Melipona* y una es reinstalada como especie válida. Así de las 16 reconocidas anteriormente para México y Centroamérica, como resultado de este estudio se reconocen sólo 15 especies. A pesar de la importancia de estas abejas, se observaron pocas localidades de colecta, siendo los países con mayor número de ejemplares y localidades México, Guatemala y Costa Rica, países donde se han desarrollado trabajos faunísticos (Ayala 1999; Yurrita & Vásquez 2013; Aguilar et al. 2013). No fueron encontrados ejemplares de El Salvador, y para Honduras y Nicaragua, son escasos los registros. Para Panamá existen publicaciones con datos de localidades de especies de *Melipona* (Roubik 1992), sin embargo no se tuvo acceso directo a las colecciones y solo se consultaron pocos ejemplares. Para Belice existen trabajos recientes que incluyen la colecta de *Melipona* sin embargo los registros son escasos (Schüepp 2012).

Por otra parte, se observó que algunas especies están menos representadas en cuanto a número de ejemplares y localidades, lo que refleja un escaso esfuerzo de colecta, pero también una distribución geográfica restringida que puede ser atribuida al nivel de rareza de dichas especies y a que tienen requerimientos ambientales restrictos. Los modelos de distribución potencial generados para especies con pocas localidades (e.g. *M. lupitae*), restringen las áreas de distribución alrededor de los puntos de colecta, lo cual concuerda con otros trabajos, que indican que para especies con distribución restricta, las muestras pequeñas (pero representativas del área real de distribución y sin sesgo) puede generar modelos precisos (Tessarolo et al. 2014).

El análisis cladístico incluyendo sólo las especies de México y Centroamérica produjo un cladograma con baja resolución en cuanto a las relaciones entre las especies y muestra politomías (Figura 1, capítulo 4), y los índices de consistencia y de retención son bajos (CI = 0.54 y RI= 0.62). Lo anterior sugiere, que los caracteres seleccionados y su codificación, no fueron suficientes y adecuados. Existen trabajos taxonómicos a nivel supraespecífico que agrupan a las especies en subgéneros morfológicamente reconocibles (Kerr et al. 1967, Moure 1992). Recientemente, se han desarrollado estudios con varios marcadores moleculares que apoyan, al menos parcialmente, estos grupos taxonómicos (Rasmussen y Cameron 2010, Ramírez et al. 2010). Por otra parte, no existen trabajos morfológicos que exploren las relaciones entre las especies, aunque Michener (2007) cita que Rego (1992) con base en la morfología de la genitalia de machos sugiere que al menos algunos de los subgéneros forman clados diferenciados. En el presente trabajo se observa que el subgénero *Melikerria* conforma un clado separado del resto de las especies (Figura 1, capítulo 4). Debido a la baja resolución obtenida se sugiere realizar una búsqueda más exhaustiva de caracteres sinapomórficos adecuados, y mejorar la codificación de algunos de los utilizados, además de incrementar el número de especies utilizadas para poder

obtener un mejor panorama de las relaciones entre las especies de *Melipona* presentes en México y Centroamérica.

Para apoyar una mejor definición de las especies presentadas en este trabajo, además de la información de los caracteres morfológicos, se empleó información molecular (código de barras de DNA, COI), y los patrones generales de distribución de cada especie de *Melipona*, resaltando de esta manera la importancia de integrar diversos tipos de datos para apoyar los límites de las especies (i.e. taxonomía integradora). El código de barras de DNA fue propuesto inicialmente como una herramienta útil para identificación de especies (Hebert et al. 2003). En este trabajo, se evidencia su utilidad confirmando la asociación entre las secuencias y las especies morfológicas a las que fueron asignadas. Sin embargo, en algunos casos la asociación no es tan precisa, evidenciando poca diferenciación entre especies (i.e. *M. solani*, *M. costaricensis*) o sugiriendo que una especie puede estar constituida por varias especies (i. e. *M. yucatanica*, *M. beecheyi*). Estos hallazgos concuerdan con lo sugerido por diversos autores quienes señalan que el código de barras de DNA, puede ser empleado como un paso inicial en la delimitación especies que son morfológicamente difíciles de separar (Packer et al. 2009; Goldstein & DeSalle 2011; Fujita et al. 2012).

El análisis de inferencia bayesiana de las secuencias del código de barras del DNA confirma los resultados de distancia genética y evidencia conflictos dentro de las especies. Ante esto, se desarrolló un análisis para aportar información más robusta, sobre los límites entre las especies de *Melipona* de México y Centroamérica, con el método GYMC, que mostró que las especies del género *Melipona* de la región, probablemente son resultado de un proceso especiación reciente, con linajes en proceso de diferenciación.

Con la información de las localidades de los ejemplares, se generaron modelos de distribución potencial con el algoritmo Maxent (Phillips et al. 2006) para 11 de las 15

especies del género *Melipona* presentes en México y Centroamérica. Los cuales muestran que algunas especies morfológica y genéticamente cercanas son simpátricas en toda, o en parte de su área geográfica de distribución. Mientras especies como *M. yucatanica* o *M. colimana* presentan una distribución disjunta respecto a las especies hermanas. Esta información, sugiere por lo tanto, la necesidad de considerar el uso de análisis de distribución (modelos de nicho) en el proceso de definición de linajes de especies.

Para la mayoría de las especies del género *Melipona*, menos del 20% de su distribución potencial, se encuentra bajo algún esquema de protección de Áreas Naturales Protegidas. Sin embargo, de la proporción que se encuentra fuera de esas áreas, la mayoría está en áreas con intensidad de manejo agrícola baja, que sugiere una heterogeneidad de hábitats incluyendo áreas agrícolas y fragmentos de bosque. Esto permite predecir que estas áreas representan hábitats adecuados, para las especies de *Melipona*, probablemente gracias a la combinación de la presencia de micro hábitats, donde las abejas encuentran los recursos básicos para su subsistencia, como alimento y sitios para anidar. Por lo tanto, se sugiere favorecer la conservación de hábitats heterogéneos como una estrategia alternativa a la creación de Áreas Protegidas Naturales.



## 8. Literatura Citada

- Aguilar, I., Herrera, E., Zamora, G. (2013) Stingless Bees of Costa Rica. in: Vit, P., Pedro, S.R.M. and Roubik, D.W. (Eds.), Pot-Honey a legacy of stingless bee. Springer, New York, pp. 113-124
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., Klein, A. M. (2009) How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany* 103, 1579-1588
- Antonini, Y., Martins, R.P. (2003) The value of a tree species (*Caryocar brasiliense*) for a stingless bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. *J Insect Conser* 7, 167–174
- Araújo, M.B., New, M. (2007) Ensemble forecasting of species distributions. *Trends Ecol. Evol.* 22, 42-47
- Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* 106, 1-123.
- Barve, N., Barve, V., Jiménez-Valverde, A., Lira-Noriega, A., Maher, S. P., et al. (2011) The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecol. Model.* 222, 1810-1819
- Bosso, L., Rebelo, H., Garonna, A.P., Russo, D. (2013) Modelling geographic distribution and detecting conservation gaps in Italy for the threatened beetle *Rosalia alpina*. *J. Nat. Conserv.* 21, 72-80.
- Bradshaw, C. J. A., Sodhi, N. S., Brook, B. W. (2009) Tropical turmoil—a biodiversity tragedy in progress. *Front. Ecol. Environ* 7, 79–87.
- Burkle, L.A., Marlin, J.C., Knight, T.M. (2013) Plant-pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. *Science* 339 (6127), 1611-1615
- Cairns, C.E., Villanueva-Gutiérrez, R., Koptur, S., Bray, D. B. (2005) Bee populations, forest disturbance, and africanization in Mexico. *Biotropica* 37, 686-692
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Sep/08/2016
- Camargo, J. M. F., S. R. de M. Pedro. (1992) Sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): Sobre a polaridade e significado de alguns caracteres morfológicos, pp. 45-49 in

- Anais do Encontro Brasileiro sobre Biologia de Abelhas e Outros Insetos Sociais. Naturalia, edição especial.
- Camargo, J. M. F., Moure, J. S. Roubik, S.W. (1988) *Melipona yucatanica* new species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae); stingless bee dispersal across the caribbean arc and post-eocene vicariance. *The Pan-Pacific Entomologist* 64, 147-157.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. (2008) Revision of the species of *Melipona* of the fuliginosa group (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Entomol.* 52, 411-427
- Cardinale, B.J., Duffy, E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., et al. (2012) Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature.* 486, 59-67
- Cardoso, P., Borges, P.A.V., Triantis, K.A., Ferrández, M.A., Martín, J.L. (2011b) Adapting the IUCN Red List criteria for invertebrates. *Biol. Conserv.* 144, 2432–2440
- Cardoso, P., Erwin T.L., Borges, P.A.V., New, T.R. (2011a) The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. *Biol. Conserv.* 144, 2647-2655
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015) Accelerated modern human–induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances*, 1, e1400253.
- Dayrat, B. (2005) Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linnean Soc.*, 85, 407-415.
- De Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56, 879-886.
- DeSalle, R., Egan, M.G., Siddall, M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London B-Biological Science*, 360, 1905–1916.
- Diniz-Filho, J.A.F., De Marco Jr., P., Hawkins, B.A. (2010) Defying the curse of ignorance: Perspectives in insect macroecology and conservation biogeography. *Insect Conserv Divers.* 3, 172–179 e52109. DOI:10.1371/journal.pone.0052109
- Elith J., Phillips, S. J., Hastie, T., Dudi'k, M., Chee, Y. E., Yate, C. J. (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distribution*, 17, 43-57.
- Elith, J., C.H. Graham, R.P. Anderson, M. D, S. Ferrier, A. Guisan, R.J. Hijmans, F. Huettmann et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29, 129-151.

- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 27, 480-488.
- Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. A., Bommarco, et al. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339, 1608-1611
- Gibbs J. (2009) Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) *tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). *Zootaxa* 2032, 1–38
- Goldstein, P. Z., DeSalle, R. (2011) Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33, 135-147.
- Graham, C.H., Ferrier, S., Huettman, F., Moritz, C., Peterson, A. T. (2004). New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 497-503.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B*: 270, 313-321.
- Hubert, N., Hanner, R. (2015) DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *DNA Barcodes*, 3, 44-58.
- Kerr, W. E., Pisani, J. F., Aily, D. (1967). Aplicação de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona* Illiger, com a divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). *Papéis Avulsos de Zoologia* 20, 135-145.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* 274, 303-313
- Kujala, H., Araújo, M.B., Thuiller, W., Cabeza, M. (2011) Misleading results from conventional gap analysis—Messages from the warming north. *Biol. Conserv.* 144, 2450-2458
- Mace, G. M. (2004) The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 359, 711-719.
- Mace, G.M., Baillie, J., Masundire, H., Ricketts, T.H., Brooks, T.M., et al. (2005) Biodiversity. In: *Millennium ecosystem assessment. Current states and trends: Findings of the condition and trends working group. Ecosystems and human well-being*, vol. 1. Island press Washington DC, pp. 77-122.

- Macías-Macías, J.O., Quezada-Euán, J.J.G., Tapia-Gonzalez, J.M., Contreras-Escareño, F. (2014) Nesting sites, nest density and spatial distribution of *Melipona colimana* Ayala (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in two highland zones of Western Mexico. *Sociobiology*. 61, 423-427
- Marmion, M., Parviainen, M., Luoto, M., Heikkinen, R.K., Thuiller, W. (2009) Evaluation of consensus methods in predictive species distribution modelling. *Divers. Distrib.* 15, 59-69
- May-Itzá W. de J., J. J. Quezada-Euán, L. A. Medina Medina, E. Enríquez, P. De la Rúa. (2010) Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics* DOI 10.1007/s10592-010-0087-7.
- May-Itzá, W.D.J., Quezada-Euán, J. J.G., Ayala, R., De La Rúa, P. (2012) Morphometric and genetic analyses differentiate Mesoamerican populations of the endangered stingless bee *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponidae) and support their conservation as two separate units. *J. Insect Conserv.* 16, 723-731
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., & Hanner, R. (2009) DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Mol. Ecol. Res.*, 9, 42-50.
- Rodrigues, A. S. L., Akçakaya, H. R., Andelman, S.J., Bakarr, M. I., Boitani, L. et al. (2004) Global gap analysis: Priority regions for expanding the global protected-area network. *Bioscience*, 4, 1092-1100.
- Roubik, D.W. (1992) Stingless bees (Apidae: Meliponinae): a guide to Panamanian and Mesoamerican species and their nests. pp. 495-524. In Quintero D, Aiello A. eds. *Insects in Panama and Mesoamerica: Selected Studies*. Oxford University Press; Oxford, England.
- Roubik, D.W., Camargo, J. M.F. (2012) The Panama microplate, island studies and relictual species of *Melipona* (*Melikerria*) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Syst. Entomol.* 37, 189-199
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H. (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual review of entomology*, 55, 421-438.
- Schüepp, C., Rittiner, S., Entling, M.H. (2012) High bee and wasp diversity in a heterogeneous tropical farming system compared to protected forest. *PLoS ONE* 7: e52109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052109>

- Schwarz, H. F. (1951) New stingless bees (meliponidae) from Panama and the canal zone. American Museum Novitates 1505, 1-16
- Schwarz, H. F. (1932) The genus *Melipona*. The type genus of the Meliponidae or stingless bees. Bulletin of the American Museum of Natural History 63,231-460.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B. (2002) Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira. 253 p.
- Slaa, E. J., Sánchez, L. A., Malagodi-Braga, F. E. Hofstede. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. Apidologie 37:293-315.
- Slaa, E.J., Sánchez-Chaves, L.A., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. Apidologie 37 (2), 293-315
- Soberón, J., Peterson, A.T. (2005) Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. Biodivers. Inform. 2, 1-10
- Tessarolo, G., Rangel, T.F., Araújo, M.B., Hortal, J. (2014) Uncertainty associated with survey design in Species Distribution Models. Divers. Distrib. 20 (11), 1258-1269
- Tylianakis, J. M. (2013). The global plight of pollinators. Science, 339(6127), 1532-1533.
- Wheeler, Q. D. (2004). Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 359(1444), 571-583.
- Whittaker, R. J., Araújo, M. B., Jepson, P., Ladle, R. J., Watson, J. E., & Willis, K. J. (2005). Conservation biogeography: assessment and prospect. Diversity and distributions, 11(1), 3-23.
- Wielstra, B., Beukema, W., Arntzen, J. W., Skidmore, A. K., Toxopeus, A. G., & Raes, N. (2012). Corresponding mitochondrial DNA and niche divergence for crested newt candidate species. PLoS One, 7(9), e46671.
- Wille, A. (1979). Phylogeny and relationships among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world. Rev. Biol. Trop. 27(2): 241-277
- Williams, P. H., & Osborne, J. L. (2009). Bumblebee vulnerability and conservation worldwide. Apidologie, 40 (3): 367-387.
- Yurrita-Obiols, C.L. Vásquez, M. (2013) Stingless Bees of Guatemala, in: Vit, P., Pedro, S. R. M. and Roubik, D. W. (Eds.), Pot-Honey a legacy of stingless bee. Springer, New York, pp. 99-111