



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Implicaciones socioambientales de la presencia de
transgenes en colmenas de *Apis mellifera* y
Scaptotrigona mexicana en Zihuateutla, Sierra
Norte de Puebla

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Arana González Amanda Sofía

TUTORA

Dra. Ana Laura Wegier Briuolo



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



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.

1. Datos de la alumna
Arana
González
Amanda Sofía
Universidad Autónoma de México
Facultad de Ciencias
313002401
2. Datos del tutor
Dra.
Ana Laura
Wegier
Briuolo
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Fernando
Córdova
Tapia
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Mariana
Benítez
Keinrad
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Eric
Vides
Borrell
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Francisco Javier
Pérez
López
7. Datos del trabajo escrito
Implicaciones socioambientales de la presencia de transgenes en colmenas de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* en Zihuateutla, Sierra Norte de Puebla
90 pp.
Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



“Es posible que el tiempo, ese elemento esencial, matriz y parámetro de todo arte animal conocido, no participe necesariamente del arte vegetal. Las plantas pueden muy bien usar un compás cuyo modelo sea la eternidad. Es algo que desconocemos.”

Úrsula K. Leguín

Para todos los apicultores y meliponicultores que dedican su vida a cuidar de las abejas, y a quienes han aprendido de estos seres tan pequeños que la reciprocidad y empatía consiste en una red de afectos interespecíficos que nos mantienen a todos conectados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos institucionales

Agradezco profundamente a la UNAM por abrirme sus puertas y ventanas para mi formación académica y personal, desde los conciertos, la danza, los museos, la facultad de ciencias y los institutos.

Agradezco a Ana Wegier, Mariana Benítez, Fernanda Figueroa, Fernando Córdova, Omar Arellano y Luis Zambrano, mis profesores y profesoras del taller Análisis Integral de Sistemas Socioambientales, por enseñarme a pensar desde la complejidad y a plantear soluciones desde la sensibilidad y empatía.

Gracias a Ella Vázquez y Kyle Shaney por darme la oportunidad de aprender sobre genética de la conservación y genética del paisaje, perspectivas que han transformado por completo mi manera de percibir el mundo y que me hacen maravillarme de la biología cada día más.

Agradezco al Instituto de Biología y al Jardín Botánico por permitirme usar sus instalaciones y equipos, particularmente el Laboratorio de Biología Molecular del LANABIO. Especialmente agradezco el apoyo de Lidia Cabrera, Andrea Jiménez y Ulises Rosas, por sus observaciones, consejos y por resolver todas mis dudas técnicas dentro del laboratorio.

Agradezco al Instituto de Ecología, al laboratorio de Genética y Ecología, así como a Daniel Piñero y Nancy Gálvez, por toda su paciencia, entusiasmo y amor por enseñar a los estudiantes el arte de trabajar en un laboratorio de biología molecular.

Gracias a todos los miembros del laboratorio de Genética de la Conservación del Jardín Botánico, especialmente a Javier Pérez, Tania Sosa, Daniel Morales y Melania Vega por transmitirme todos sus conocimientos que hicieron posible esta tesis.

Gracias a Andrés Castro, Eric Vides, Lázaro Arroyo, Jorge Mérida e Isabel May del Equipo Abeja de EcoSur San Cristóbal por ser mis valiosos amigos y por compartirme información, datos, anécdotas y experiencias. Les agradezco cada conversación sobre abejas, miel y polen. Su trabajo con las abejas y sus guardianes son una enorme fuente de inspiración para mí.

Por otro lado, agradezco al proyecto “Análisis de la evolución adaptativa en hexápodos con plantas con transgenes del complejo silvestre-domesticado de algodón” (IN214719) que mediante UNAM-DGAPA-PAPIIT me apoyó con una valiosa beca.

Finalmente agradezco a mi comité sinodal: Ana Wegier, Mariana Benítez, Fernando Córdova, Eric Vides y Javier Pérez por el tiempo que se tomaron para enriquecer mi tesis con observaciones y aportaciones.

Agradecimientos personales

En primer lugar agradezco mucho a Ana, por recibirme como alumna de tesis y apoyarme para materializar todas las ideas de mi cabeza en este proyecto de tesis. Gracias por guiarme durante todo este proceso personal y académico. Gracias también a mi comité Sinodal, grandes profesores a los que admiro profundamente.

Agradezco enormemente al ADVC Koliijke, una reserva maravillosa que acoge a innumerables animales y plantas que me recuerdan cada día que luchar por la biodiversidad vale siempre la pena. Gracias infinitas a Arcadio y Ana Paula Ojeda por abrirme sus puertas al proyecto socioambiental por tantos años, las experiencias y aprendizajes los llevaré siempre en mi corazón. Gracias a Santiago, Ayamel, Mashelli, Andrés, Manolo, Julia, Katia y Jorge y a toda una larga lista de los grandes amigos que hice en Koliijke.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el gran apoyo de la familia Cano Flores, a Patricio, Salomé, Sofía y Patricio por transmitirme todos sus conocimientos, experiencias y amor por las abejas, las cuales han resguardado por varias generaciones. Gracias por abrirme las puertas de su hogar y sus colmenas, por la comida tan deliciosa y por las largas conversaciones sobre la selva. No hay palabras para agradecer todo lo que me enseñaron ustedes y sus abejas.

Gracias también a los pobladores de Ocomantla, particularmente a los jóvenes que forman parte y participan en el proyecto agroecológico del CCPO. Agradezco a la primera y segunda generación de Jóvenes Construyendo el Futuro que han tenido particular interés en la conservación de insectos polinizadores, gracias por dejarme transmitirles lo que sé sobre el tema y gracias a ustedes por su gran trabajo y cariño por Ocomantla.

Gracias a todas las comunidades científicas que me han apoyado y se han interesado por mi trabajo, particularmente al laboratorio de Genética de la Conservación y todos sus miembros, quienes han sido excelentes compañeros de trabajo pero también muy buenos

amigos. Gracias a Alonso, Julia y Lev por enseñarme la complejidad y belleza de la agroecología.

Agradezco enormemente a mis grandes amigos que son un refugio cálido para mi corazón, entre ellos mis amigos biólogos Zubi, Carmina, Zam, Erick, Yahir, Andrés, Marina, Cami, Vicho, Mich y muchísimos otros. Y también agradezco compartir mi camino de vida con amigos a los que admiro cada día más, entre ellos Sofía, Humberto, Arturo, Fer, Bri, Froy, Ruval, Greta, Sandra, Sofi, Ale, Camilo, Julián, Manu, Lucía, Horacio, Óscar, Lety, Gyalden, Sangden y una larga lista que se hace más grande cada día.

Finalmente agradezco de todo corazón a mi familia quienes me han apoyado en cada detalle de mi vida cotidiana con muchísimo amor. Gracias a Emilio, mi compañero de playa, viajes y sueños por su comprensión, amor y paciencia. Gracias a Vale, Edy, Iaz y Nay, Guille, Marce y Jovis por quererme tanto. Y especialmente a Marcos y Gabriela, mi mamá y papá que me han dado todo su amor, cuidado y sensibilidad, ser su hija es el mejor regalo que me ha dado el universo.

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
I. Consecuencias de la Agricultura intensiva para las abejas melíferas	11
II. Interacción entre organismos genéticamente modificados y organismos no blanco	12
III. Análisis de miel y polen para biomonitorio	13
IV. Ventajas y retos del análisis molecular de miel y polen	14
V. Análisis genético de polen: una herramienta para la agroecología	15
VI. Contexto agrario de la Sierra Norte de Puebla	16
VII. Proyecto Socioambiental “ADVC Kolijke”	17
VIII. Vinculación entre “Amigos de Kolijke” y “Jóvenes construyendo el futuro”	18
IX. Manejo de abejas melíferas: una alternativa para los jóvenes de Ocomantla	19
X. Consecuencias socioambientales de la presencia de transgenes en miel producida en México	20
Objetivo general	23
Objetivos particulares	23
Hipótesis	23
Sitio de estudio	24
Organismos de estudio	26
MÉTODO	29
I. Muestreo de polen en colmenas de Apis mellifera	29
II. Muestreo de polen en colmenas Scaptotrigona Mexicana	33
III. Detección de transgenes en muestra de miel de Apis mellifera	37
IV. Detección de transgenes en polen muestreado en apiarios y polen recolectado por Scaptotrigona mexicana	38
RESULTADOS	40
I. Extracción de ADN	40
II. PCR punto final para miel de Apis mellifera cosechada en 2019	41
III. PCR punto final para la detección de cry1Ac, cry2Ab y cp4-eps en polen colectado por Apis mellifera y Scaptotrigona mexicana	43
DISCUSIÓN	50
I. Extracción de ADN de origen botánico extraído y amplificación con PCR punto final	50
II. Presencia de cp4-epsps en productos PCR punto final	51
III. Limitaciones para determinar el origen y dinámica de flujo de polen con presencia de cp4-epsps	52
IV. Presencia de transgenes e interacción con herbicidas: una explicación al decremento en la producción de miel y altas tasas de mortalidad de colonias	54

V. Implicaciones socioambientales de la presencia de transgenes en miel producida en la Sierra Norte de Puebla	57
CONCLUSIONES	60
Anexo 1: Protocolo de obtención de polen de miel	61
Anexo 2: Disrupción de polen para extracción de ADN	62
Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN con CTAB, modificado de Doyle y Doyle (1987)	63
Anexo 4: Protocolo de realización de PCR punto final	64
Anexo 5: Protocolo para preparación de geles de agarosa, visualización de la integridad de ADN y productos PCR por medio de electroforesis	69
Anexo 6: Controles positivos utilizados en PCRs punto final	70
Anexo 7: Características de los primers empleados para PCR punto final	71
Anexo 8: Especificaciones de reactivos utilizados	72
Anexo 9: Maíz sembrado cerca de los apiarios muestreados	74
Anexo 10: Tabla de eventos de liberación de Organismos Genéticamente Modificados en México (proteínas Cry y EPSPS)	75
REFERENCIAS	82

RESUMEN

Actualmente los insectos polinizadores enfrentan múltiples problemáticas causadas por el deterioro de la calidad de su hábitat. En particular, las abejas melíferas sufren de intoxicación por agroquímicos y son vulnerables a enfermedades causadas por hongos y parásitos, así como a deficiencias nutricionales ocasionadas por la pérdida de diversidad floral. Por otra parte, el manejo de *Apis mellifera* y meliponinos nativos como *Scaptotrigona mexicana* representa una oportunidad para los jóvenes que desean impulsar el desarrollo económico y social en comunidades rurales, ya que su manejo requiere poca inversión económica y puede desarrollarse sin la necesidad de poseer grandes extensiones territoriales.

A pesar de esto, en el sureste del país se han identificado múltiples problemáticas socioambientales relacionadas con el rechazo de productos apícolas en mercados especializados y la disminución de la confianza en la apicultura como un ingreso regular. Además, está demostrado que la presencia de transgenes en las plantas visitadas por abejas puede afectar directamente su supervivencia y longevidad. Dadas las razones anteriores y que hace 25 años se siembran organismos genéticamente modificados en México, resulta indispensable analizar los posibles efectos derivados de su presencia en la producción de miel. En México se sabe de la presencia de transgenes en maíz, soya, algodón, canola, papa, alfalfa, betabel y tomate, ya sea por liberación experimental, comercial o derivada de flujo transgénico no previsto. Estos poseen genes que les confieren principalmente tolerancia al herbicida glifosato (*cp4-epsps*) y efectos insecticidas (*cry 1AB* y *cry 2AB*), entre otros. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de transgenes dentro de las colmenas y analizar sus posibles implicaciones socioambientales.

El presente estudio se desarrolló en el municipio de Zihuateutla, en la Sierra Norte de Puebla, dentro del proyecto Agroecológico facilitado por el Área Destinada Voluntariamente a la Conservación “Kolijke”. En este proyecto un equipo transdisciplinario y miembros de las comunidades vecinas realizan esfuerzos por la conservación ambiental de la región, la cual se conforma de bosques tropicales perennifolios y bosques mesófilos de montaña, intercalados con milpas y cultivos cafetaleros.

Se diseñó un método de muestreo y análisis genético de polen y miel de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* para detectar los transgenes *cp4-epsps*, *cry 1AB* y *cry 2AB*, el cual consistió en la extracción de ADN con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. Como resultado, se detectó la presencia de *cp4-epsps* en 32 de 33 muestras de miel y polen colectadas entre 2019 y 2020.

Dado que *cp4-epsps* confiere resistencia al glifosato, su presencia es un indicador del posible uso de dicho herbicida, el cual tiene un efecto subletal en diversos artrópodos. Por lo tanto, es pertinente considerarlo como una posible causa de la alta mortalidad de colonias de abejas y de la disminución en la producción de miel en Zihuateutla, además de los efectos que pudiera ocasionar el polen modificado genéticamente en el ambiente.

Con lo anterior se propone una metodología para evaluar los daños socioambientales de la interacción entre organismos genéticamente modificados y abejas melíferas. Este conocimiento, permite analizar los retos y limitaciones de las certificaciones orgánicas, así como reconsiderar los procesos de producción, la heterogeneidad territorial y el cuidado de la biodiversidad, además de las cualidades de mayor relevancia en la comercialización de miel.

INTRODUCCIÓN

I. Consecuencias de la Agricultura intensiva para las abejas melíferas

La agricultura intensiva implica grandes retos para las comunidades de polinizadores que enfrentan múltiples problemáticas relacionadas con el deterioro ambiental y cambio climático, entre ellas malnutrición, intoxicación por agroquímicos y vulnerabilidad a enfermedades (Vaudo, *et al.*, 2015). Las abejas melíferas son generalistas, es decir, forrajean en diversas flores y recorren grandes distancias para satisfacer necesidades nutricionales. Dado que la calidad y cantidad de polen y néctar varía de un angiosperma a otro (Hawkins *et al.*, 2015). El polen provee proteínas, ácidos linoléicos y esteroides, que son indispensables para procesos fisiológicos como la producción de cera, puesta de huevos y el desarrollo larvario (Vaudo *et al.*, 2015). El néctar, por su parte, constituye la fuente principal de carbohidratos y azúcares en la dieta de larvas y abejas adultas, ya que se conforma por monosacáridos y disacáridos (Brodschneider *et al.*, 2010).

La escasez de recursos florales para forrajeo puede causar hambruna en las colonias y dificultad para mantener una dieta balanceada. En consecuencia, la esperanza de vida de abejas de diferentes castas se ve reducida e incrementa su vulnerabilidad a hongos y parásitos (Brodschneider *et al.*, 2010). La salud de las colonias se relaciona con la cantidad de individuos bien nutridos que son capaces de producir prole, resistir factores de estrés como periodos de escasez de recursos florales, debidos a cambios estacionales y cambio climático, parásitos, infecciones, exposición a insecticidas y agroquímicos (Vaudo *et al.*, 2015). Aunque las tasas altas de mortalidad en colonias se relacionan con el estrés y deficiencias nutrimentales, la causa principal del decremento de diversidad y abundancia de abejas se atribuye al uso de plaguicidas y herbicidas.

Las abejas sociales y solitarias llevan inevitablemente sustancias químicas a las colmenas y nidos por medio de la colecta de néctar y polen. Se ha demostrado que los agroquímicos con efecto insecticida (Ramírez-Romero *et al.*, 2008) y herbicida (Motta *et al.*, 2022 y Crall, 2022) representan un potencial riesgo para su salud, comportamiento y reproducción. Sin embargo, consecuencias poco advertidas, como la presencia de transgenes en el ADN del polen transportado a las colmenas, han sido escasamente estudiadas.

II. Interacción entre organismos genéticamente modificados y organismos no blanco

En la actualidad, la siembra de cultivos genéticamente modificados (GM) se ha incrementado mundialmente mediante innovaciones e investigaciones agrobiotecnológicas, publicidad y programas gubernamentales (Sharma *et al.* 2022). La resistencia a insectos plaga y la tolerancia a herbicidas son características que se busca incluir en el desarrollo de paquetes biotecnológicos, los cuales se conforman por un conjunto de insumos y técnicas de siembra.

Las secuencias de ADN más utilizadas en el desarrollo de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) provienen principalmente de bacterias. Los genes más utilizados para el control de insectos plagas son los *cry*, los cuales derivan de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Las proteínas recombinantes Cry producen endotoxinas con forma de cristales en el revestimiento del intestino medio de lepidópteros en estado larvario, causando la parálisis y la muerte del insecto (Székács *et al.*, 2010). Existen diferentes genes que confieren las proteínas recombinantes Cry, entre ellos, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Ab* y *cry1F*.

Por otro lado, el compuesto herbicida más utilizado a nivel mundial es el glifosato (N-fosfonometil glicina o C₃H₈NO₅P), cuyos principios activos interfieren en el funcionamiento de la enzima 3-enolpiruvylshikimate-5-fosfato sintasa (EPSPS) presente en la ruta metabólica del shikimato, realizada únicamente por bacterias y plantas (Motta *et al.*, 2018). Esta enzima es indispensable para la formación de aminoácidos como la triosina, fenilalanina y triptófano, usados en la síntesis de proteínas (Battisti *et al.*, 2020). Para conferir resistencia al glifosato, se utiliza el gen *cp4-epsps*, proveniente de la bacteria *Agrobacterium sp.* (Cepa 4), el cual codifica la enzima (EPSPS), de modo que, cuando las plantas poseen enzimas EPSPS adicionales a las que produce la planta de manera endógena, se genera tolerancia al glifosato (Motta *et al.*, 2018).

Dado que los transgenes mencionados influyen directamente en mecanismos de defensa y rutas metabólicas involucradas en el desarrollo, crecimiento y reproducción de las plantas, se modifica la cantidad y calidad de los metabolitos secundarios, lo cual interfiere en su desarrollo, así como en su interacción con bacterias y hongos en los suelos (Hernández-Terán *et al.*, 2018) y con comunidades de insectos (Vázquez-Barrios *et al.* 2021).

A pesar de que los transgenes confieren características específicas, es posible que otros rasgos sean afectados debido a los complejos procesos regulatorios del desarrollo y metabolismo de las plantas (Hernández-Terán *et al.*, 2017). Los transgenes tienen efectos

impredecibles en el genotipo de plantas silvestres y nativas domesticadas (Hernández Terán *et al.* 2017), así como en los ecosistemas, pues modifican las interacciones ecológicas entre las plantas transgénicas silvestres y sus artrópodos asociados (Vázquez-Barrios *et al.* 2021). Por lo tanto, a los organismos que interactúan con plantas GM y son perjudicados de forma directa o indirecta se les denomina organismos no blanco (ONB).

Dado que las proteínas Cry y las enzimas EPSPS se expresan en todos los tejidos de las plantas afectadas, incluyendo el polen (Székács *et al.*, 2010), el flujo entre cultivos y parientes silvestres facilita la propagación de transgenes (Yook *et al.*, 2021). En consecuencia, la polinización mediada por insectos, particularmente por las abejas melíferas, resulta un parteaguas para entender los múltiples efectos en los ONB (Coutinho *et al.*, 2021).

III. Análisis de miel y polen para biomonitoreo

La diversidad de abejas melíferas y su distribución en el mundo, así como su facilidad de manejo las convierte en un organismo ideal para el biomonitoreo (Cunningham *et al.*, 2022). La miel que producen se considera una sustancia compleja que se conforma de polen y secreciones dulces provenientes de plantas que rodean las colmenas, como néctares y recompensas florales, las cuales son recolectadas, modificadas y almacenadas (Baroni *et al.*, 2009).

Dado que las abejas melíferas interactúan con una gran diversidad floral, las trampas de polen en la entrada de las colmenas proveen información directa e inmediata sobre las preferencias y distancias de forrajeo. Por su parte el polen presente en la miel o en el alimento almacenado por largos periodos de tiempo en las celdas y potes provee una visión e información a largo plazo sobre las mismas (Hawkins *et al.*, 2015). Por lo tanto, la miel y el polen recolectado por abejas melíferas son objeto de investigación morfológica, química y molecular (Cunningham *et al.*, 2022).

Por otro lado, la miel se encuentra generalmente bien posicionada en el mercado global. Su alta demanda se debe al aprecio de sus propiedades curativas y biológicas (Soares *et al.*, 2015). Su diversidad, rareza, sabores únicos, propiedades medicinales y la especie que la produce, proporcionan un valor agregado a las mieles, que pueden alcanzar precios muy elevados. Debido a esto y a la escasez y alta demanda, la miel se diluye, se sustituyen elementos y se cambia su composición, lo cual vulnera su calidad (Prosser y Hebert, 2017; Soares *et al.*, 2015). Como respuesta a esto, se han desarrollado numerosas técnicas para el

análisis de muestras de polen y miel, entre ellas para la detección OGMs, confirmación del origen botánico de la miel, detección de microorganismos, determinación de alérgenos y monitoreo de sustancias tóxicas (Guertler *et al.*, 2014).

Desde la perspectiva del análisis genético, la miel se conforma por dos elementos: el polen y el líquido, los cuales contienen ácido desoxirribonucleico (ADN) de los recursos botánicos predominantes y secundarios a los que acceden las abejas (Prosser y Hebert, 2017). Dado que la miel se produce a partir de azúcares florales, que se modifican por medio de la saliva y sustancias gástricas, y que posteriormente atraviesan procesos de fermentación, deshidratación y maduración dentro de las celdas de almacenamiento en las colmenas (Jain *et al.*, 2013), los análisis genéticos de mieles también proporcionan información de las mismas abejas y su microbiota intestinal.

Las abejas melíferas poseen una microbiota especializada para su desarrollo, nutrición y protección contra patógenos (Motta y Moran, 2020). Aunque la diversidad, riqueza y abundancia de la microbiota dentro de las colmenas ha sido escasamente estudiada, los microorganismos juegan un papel importante en la maduración y modificaciones bioquímicas del polen y la miel almacenada (Motta *et al.*, 2022). De este modo, en protocolos de extracción de ADN de polen recolectado por abejas melíferas, generalmente se espera extraer material genético fragmentado, desnaturalizado, y en pequeñas cantidades (Jain *et al.*, 2013). Por ende, es necesario el desarrollo de protocolos estandarizados eficientes para la extracción de ADN.

IV. Ventajas y retos del análisis molecular de miel y polen

A comparación de los métodos físicoquímicos y morfológicos, los análisis moleculares y genéticos de polen presentan numerosas ventajas para determinar su origen botánico y geográfico, pues tienen mayor sensibilidad, estabilidad, especificidad, menor margen de subjetividad humana y son métodos reproducibles (Laube *et al.*, 2010 y Soares *et al.*, 2015). Por su parte, los métodos automatizados como el reportado por Guertler *et al.* (2014) y métodos con kits comerciales, como DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Alemania), reportado por Laube *et al.* (2010) y Valentini *et al.* (2010), aunque son rápidos y sencillos, resultan sumamente costosos y requieren equipos e insumos de alta especialidad.

Sin embargo, el uso de reactivos comunes de laboratorio, como el Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB), permite que las extracciones sean mucho más económicas (Jain *et al.*, 2013), sin embargo, requieren más tiempo y trabajo que los kits comerciales. La extracción de ADN de material botánico posee numerosos retos asociados con la disrupción y lisado de las paredes celulares (Jain *et al.*, 2013). Por ende, el lisado de células vegetales por medio de la actividad detergente del CTAB, seguido de la purificación y precipitación de ácidos nucleicos es uno de los métodos más utilizados (Moyo *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2013).

La forma más eficiente para obtener información sobre el origen botánico de la miel y detectar polen GM recolectado por abejas melíferas es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual genera múltiples copias de un fragmento de ADN molde para amplificarlo y hacerlo detectable. Por ello, es indispensable utilizar un método eficiente que garantice la extracción de ADN de calidad (Soares *et al.*, 2015).

V. Análisis genético de polen: una herramienta para la agroecología

En los últimos años las innovaciones en la biología molecular y la genética han incrementado la capacidad de identificar y monitorear tanto las problemáticas que enfrentan las comunidades de polinizadores como la diversidad de redes ecológicas que se ven afectadas (Manel *et al.*, 2013). Por ejemplo, el *metabarcoding*, una técnica que consiste en la identificación y secuenciación de ADN para determinar las especies presentes en una muestra, permite analizar eficientemente en muestras de polen la diversidad botánica asociada a las comunidades de abejas (Grozinger *et al.*, 2020). Los datos genéticos obtenidos con este método pueden reflejar las tendencias y preferencias de abejas melíferas y, de este modo, contribuir a la toma de decisiones en proyectos agroecológicos¹ comunitarios.

El análisis de polen de plantas nativas en su centro de origen es una herramienta para la genética de la conservación, la cual consiste en el estudio de poblaciones y sus cambios evolutivos para desarrollar estrategias de conservación. La detección de transgenes en el polen de maíz (*Zea mays* ssp.) o algodón (*Gossypium hirsutum*) y su interacción con otros artrópodos, puede generar nuevas preguntas sobre las consecuencias ecológicas y evolutivas de la liberación de organismos genéticamente modificados al ambiente (Vázquez-Barrios *et al.*, 2021).

¹ En el presente trabajo el término “agroecología” será definido como una práctica, movimiento y ciencia transdisciplinaria que aplica conceptos y principios ecológicos para el diseño y manejo de sistemas agroalimentarios sostenibles, tomando en consideración los conocimientos y necesidades locales, así como las condiciones sociales y económicas (Wezel, et al. 2009).

De este modo, el estudio de las complejas dinámicas de flujo del polen abre paso a la genética del paisaje, una interdisciplina que combina la genética de poblaciones, ecología del paisaje y análisis geoespacial. Esta disciplina ofrece una valoración importante de los ecosistemas y un marco flexible para vincular los patrones de variación genética adaptativa con la heterogeneidad ambiental (Manel *et al.*, 2013), ya que se enriquece con enfoques diversos de la biología y se complementa con datos obtenidos a través de técnicas como mapeos geográficos de alta resolución, diferentes prácticas de manejo agrícolas, datos sobre productividad, registros de biodiversidad, entre otros (Manel *et al.*, 2013).

Dado que la mayoría de los ecosistemas tendrán cambios drásticos de manera rápida y dinámica como parte del cambio global (Barnosky *et al.*, 2012), es necesario desarrollar herramientas prácticas que vinculen diferentes disciplinas y enfoques dentro del marco de la genética de la conservación. De este modo, se generará un impacto positivo e innovador para la conservación de la biodiversidad, en la cual es necesaria la participación activa de las comunidades para el diagnóstico de sus problemas y la gestión de sus recursos.

Los planes de conservación necesitan urgentemente considerar los agroecosistemas para desarrollar propuestas funcionales que permitan el diseño y desarrollo de alternativas de adaptación al cambio climático que tomen en cuenta las condiciones sociales y las necesidades de las comunidades.

VI. Contexto agrario de la Sierra Norte de Puebla

Actualmente la mayoría de los ecosistemas terrestres se encuentran sumamente fragmentados. Las zonas cafetaleras en América Latina no son la excepción, ya que generalmente las plantaciones de café se intercalan con remanentes de bosques (Perfecto *et al.*, 2009). Desde su llegada al continente, el café ha sido tradicionalmente cultivado en la parte norte de América Latina bajo la sombra del dosel, coexistiendo con una gran cantidad de biodiversidad asociada (Jedlicka *et al.*, 2021). Las plantaciones de café de sombra han caracterizado a países desde México hasta Perú como los principales productores en el mundo (McCook, 2017).

En la década de 1980 la mayoría de países del norte de América Latina acumularon grandes deudas externas, en consecuencia, organismos internacionales crediticios, entre ellos el Banco Mundial, generaron diversas presiones para que estos logran incrementar sus ingresos y, de este modo, pagar sus deudas (McCook, 2017). Particularmente en México surgieron numerosos programas gubernamentales que buscaban intensificar la producción de

café mediante la introducción de nuevas variedades, así como paquetes tecnológicos con fertilizantes y herbicidas (Perfecto *et al.*, 2009).

Actualmente en México, la mayoría de las áreas designadas como prioritarias para la conservación de la biodiversidad están implicadas en una matriz de plantaciones de café (Perfecto *et al.*, 2009). Asimismo, las condiciones históricas han propiciado que el cultivo de café se desarrolle en condiciones desventajosas para los pequeños productores, tal es el caso de la Sierra Norte de Puebla (Villegas, 2019).

Desde mediados del siglo XIX, la economía en esta región se desarrolló a partir de cultivos comerciales de tabaco, vainilla, caña de azúcar y café. Antes de la década de 1970, la economía campesina en esta región se sustentaba en el autoconsumo y el comercio a pequeña escala. A causa de la alta demanda y los precios elevados en el mercado internacional, en 1958 se instauró el Instituto Mexicano del Café (INMECAFE), con la finalidad de intensificar la producción de café en el país (Villegas, 2019).

Sin embargo, en 1989 el Acuerdo Internacional del Café no fue renovado, lo cual produjo la caída del precio del café a nivel internacional. En consecuencia, muchas de las instituciones públicas que sostenían la industria del café en América Latina, entre ellas el INMECAFE, fueron cerradas (McCook, 2017). La fuerte intervención del INMECAFE en la Sierra Norte de Puebla condujo a la adopción del cultivo de café como principal actividad económica, así como a un evidente proceso de pauperización del campesinado en la zona (Villegas, 2019).

En la comunidad de Ocomantla, estas transformaciones agrícolas y socioeconómicas se han visto reflejadas hasta la fecha en procesos de descampesinización, caracterizados por el desuso de prácticas agrícolas tradicionales y, en consecuencia, por la pérdida de seguridad económica y autosuficiencia alimentaria (Ojeda-Valverde, 2018).

VII. Proyecto Socioambiental “ADVC Kolijke”

Desde hace más de 30 años, se consolidó el proyecto ambiental “Kolijke”, el cual se desarrolla en el predio particular “Vega del Río” en el municipio de Zihuateutla, Sierra Norte de Puebla. Las condiciones geográficas y espaciales de dicho predio la convierten en un gran acervo de diversidad biológica, por lo cual, en 2005 se decretó oficialmente como Área Destinada Voluntariamente a la Conservación (ADVC) bajo registro 17/2005 de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), con la finalidad de frenar la caza furtiva, tala y actividades agropecuarias que mermaban su biodiversidad (De la Maza, 2015).

En virtud de los esfuerzos por la conservación ambiental de la región mediante el vínculo con las comunidades rurales e indígenas vecinas al ADVC Kolijke, a partir del 2015, se comenzó un proyecto social y ambiental con la comunidad de Ocomantla. De esta iniciativa han surgido las bases para un proyecto agroecológico. Desde sus inicios, este proyecto socioambiental se ha construido a partir de los deseos, preocupaciones e intereses de la comunidad de Ocomantla. De este modo, los proyectos se han basado en destacar la importancia de la identidad, el territorio y las relaciones de los habitantes con su comunidad y ambiente (Ojeda-Valverde, 2018).

En 2019 se construyó el Centro Comunitario Productivo de Ocomantla (CCPO) con el objetivo de establecer un espacio para el desarrollo de diferentes proyectos que buscan soluciones y alternativas para abordar problemáticas locales actuales mediante el aprendizaje colectivo de la agroecología y la biología de la conservación (figura 1A y 1B). Las actividades que se realizan en el CCPO son una oportunidad para los habitantes de todas las edades de interactuar con su comunidad de manera participativa.

Para el proyecto ha resultado indispensable considerar la equidad intergeneracional, ya que el 25.9% de la población en el estado de Puebla tenía menos de 30 años (INEGI, 2020). Las acciones por la conservación de la biodiversidad que pretenden incluir a la juventud generalmente no consideran las historias, ambiciones, recursos y redes de los y las jóvenes que son únicos y particulares de los lugares y comunidades donde viven (Barraclough *et al.*, 2021; Ballard *et al.*, 2017). Por ende, replantear la educación ambiental desde y para la juventud es parte de la construcción de nuevas estrategias para la resiliencia (Krasny *et al.*, 2014).

VIII. Vinculación entre “Amigos de Kolijke” y “Jóvenes construyendo el futuro”

En el 2018, el proyecto socioambiental de ADVC Kolijke se consolidó como asociación civil bajo el nombre “Amigos de Kolijke A.C”. Posteriormente, en 2019, se vinculó con el programa gubernamental “Jóvenes Construyendo el Futuro”, con el objetivo de generar oportunidades para que mujeres y hombres de entre dieciocho y treinta años pertenecientes a esta comunidad pudieran capacitarse como monitores ambientales, apicultores y meliponicultores dentro del marco de la agroecología (Figura 1C y 1D).

Más allá de los aprendizajes técnicos, el trabajo que este grupo ha realizado, ha resultado una experiencia significativa en la que la capacidad de asombro y la empatía han sido clave para detonar procesos participativos en su comunidad. Además de esto, los saberes, las prácticas, y las formas de concebir y valorar el entorno natural por los habitantes de esta comunidad se han consolidado como elementos importantes que deben considerarse como parte del territorio que se busca proteger y conservar.

El diálogo y aprendizaje colectivo entre apicultores y jóvenes interesados en el manejo de abejas melíferas en Ocomantla ha resultado una excelente herramienta para la comprender y abordar problemáticas locales, y ha promovido la gestión de nuevas técnicas para mejorar la producción agroecológica. Además de esto, como ya se comentó, el polen que las abejas trasladan a las colmenas constituye una fuente accesible, constante y diversa de información que contribuye a la consolidación de diagnósticos precisos para el proyecto agroecológico de la comunidad.

IX. Manejo de abejas melíferas: una alternativa para los jóvenes de Ocomantla

En los procesos de capacitación de los jóvenes de Ocomantla, se ha trabajado con *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* para el aprendizaje de técnicas de producción de miel, rescate de colmenas silvestres en riesgo y la división de colonias para la producción de miel (figura 2). Conforme la agroecología se abre paso como una alternativa global de transformación, las abejas melíferas cobran importancia en el mantenimiento de la salud y función de los ecosistemas, así como en la vinculación de valores culturales y sistemas de gobernanza de comunidades locales (Hill *et al.*, 2019).

Actualmente, el manejo de abejas melíferas en México es una oportunidad económica para los jóvenes que desean permanecer en sus comunidades, ya que, al ofrecer oportunidades laborales, puede amortiguar fenómenos de migración dentro y fuera del país. En las comunidades rurales donde el acceso a los ingresos es limitado, la apicultura puede contribuir significativamente a la seguridad de los medios de vida y soberanía alimentaria (FAO, 2015).

El manejo de abejas melíferas puede realizarse con una inversión económica mínima, ya que no requiere la posesión de grandes extensiones de tierra (Phil *et al.*, 2015). Los equipos y herramientas son de bajo costo y pueden ser obtenidos o fabricados fácilmente (Oliveira *et al.*, 2020). Además de esto, las habilidades, técnicas y conocimientos que requiere esta

actividad suelen estar directamente relacionados con las tradiciones y cultura local (FAO, 2015).

Por otra parte, las abejas melíferas son un elemento importante para aumentar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Vides *et. al*, 2019). En los parches preservados alrededor de las tierras de cultivo las plantas silvestres son abundantes. Las milpas, los huertos de hortalizas o de traspatio, los jardines y los espacios comunitarios, además de que proporcionan recursos diversos y constantes a lo largo de todo el año, cumplen la función de refugios y corredores de dispersión para mantener la diversidad de polinizadores nativos (Vides *et. al*, 2019).

Dado que los bienes obtenidos de la colmena, como la miel, la cera, el propóleo, la jalea real, el polen y el veneno, son fáciles de transportar, envasar y almacenar (FAO, 2015), representan un ingreso regular y atemporal. Además de esto, ya que son fácilmente negociables, pueden convertirse en productos con valor agregado, como artículos para uso cosmético o medicinal, productos valorados en el mercado local, nacional e internacional (Oliveira *et al.*, 2020).

Por otro lado, el manejo de abejas nativas tiene gran valor cultural y simbólico para los productores, ya que hasta la fecha se conservan técnicas ancestrales de producción que suponen usos medicinales, religiosos y culinarios. Actualmente en México, la meliponicultura abarca alrededor de 19 de las 46 especies de abejas sin aguijón que existen en el país (Ayala *et al.*, 2013), por lo cual debe ser considerada como una forma de identidad cultural única en el mundo (Pat-Fernández *et al.*, 2012). La Península de Yucatán, la región Totonaca de Veracruz y la Sierra Nororiental de Puebla son las pocas regiones donde aún se desarrollan diversas técnicas de meliponicultura (Ayala *et al.*, 2013).

X. Consecuencias socioambientales de la presencia de transgenes en miel producida en México

Los efectos de los OGMs sobre la fauna no-blanco, además de ser diversos, han sido escasamente estudiados. Sin embargo, uno de los efectos más tangibles es la presencia de polen GM en la miel producida por abejas melíferas, lo cual tiene implicaciones sociales, económicas y políticas. El caso particular de la Península de Yucatán ha sido un parteaguas para cuestionar la coexistencia de prácticas apícolas con la siembra de cultivos GM.

La península de Yucatán (Yucatán, Campeche y Quintana Roo) es la principal región productora de miel del país, pues cuenta con 40,000 apicultoras y apicultores organizados en 162 cooperativas (CONABIO, 2009), así como con 250,073 colmenas registradas (SAGARPA, 2017). La producción apícola en esta región se caracteriza por desarrollarse en bosques tropicales y vincularse con sistemas de milpa y huertos familiares (Toledo y Barrera, 2017). Actualmente más de 85% de la miel cosechada en esta región se exporta a la Unión Europea y Estados Unidos (SAGARPA, 2017), donde la demanda por los productos orgánicos va en aumento. No obstante, durante 2011 y 2012, la Unión Europea estableció limitaciones para la comercialización de miel con polen GM, lo cual tomó especial relevancia en la península de Yucatán, al ser una región del país en donde se han sembrado grandes extensiones de soya GM (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2013).

Diversos estudios, entre ellos el de Gálvez-Mariscal *et al.* (2013) y Villanueva-Gutiérrez *et al.* (2014), comprobaron la interacción entre abejas melíferas y soya GM, así como la presencia de polen GM en muestras de mieles comerciales provenientes de esta región. Esto ha comprometido las relaciones comerciales internacionales hasta la fecha. En consecuencia, diversos colectivos, cooperativas y productores apícolas promovieron una campaña para revocar la autorización de siembra de soya GM, la cual reunió más de 74,000 firmas mediante www.change.org y ganó dos demandas legales ante la Suprema Corte de Justicia (Hudlet, 2017). En 2016 se estableció el decreto 418/2016 que determina al estado de Yucatán como zona libre de cultivos agrícolas con OGMs. Sin embargo, hasta la fecha, la deforestación, los cultivos extensivos tecnificados, y la siembra ilegal de soya y otros cultivos GM siguen poniendo en riesgo las prácticas apícolas y la riqueza biocultural que conlleva.

Dado que el presente trabajo busca evidenciar la presencia de transgenes en muestras de polen y miel provenientes de la Sierra Norte de Puebla, una región del país en la cual la siembra de cultivos GM no ha sido oficialmente autorizada y donde las prácticas apícolas resultan de gran valor biocultural, es pertinente señalar y cuestionar las consecuencias sociales, culturales y económicas para el manejo de abejas melíferas.



Figura 1: A) Centro Comunitario Productivo de Ocomantla (CCPO). B) Instalación de meliponario dentro del CCPO. C y D) Capacitación de meliponicultura y pláticas sobre educación ambiental con participantes del programa “Jóvenes Construyendo el Futuro”.



Figura 2: A y B) Participante del programa “Jóvenes Construyendo el Futuro”, recibe su primer núcleo de *Apis mellifera* después de completar su capacitación como apicultor. C) Colmena de *Scaptotrigona mexicana* a cargo de una participante del programa.

Objetivo general

Determinar la presencia de transgenes en *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* y analizar las posibles implicaciones socioambientales para el proyecto agroecológico desarrollado en la comunidad de Ocomantla, en el municipio de Zihuateutla, Puebla.

Objetivos particulares

1. Diseñar un método de muestreo y análisis genético de polen y miel de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*.
2. Determinar la presencia o ausencia de transgenes que confieren tolerancia al glifosato (*CP4 EPSPS*) y propiedades insecticidas (*cry1Ac* y *cry2Ab*) en muestras de miel y polen recolectado por *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* en el municipio de Zihuateutla, Puebla.
3. Analizar las implicaciones socioambientales de la presencia de transgenes dentro de colmenas de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* en el marco del proyecto agroecológico la comunidad de Ocomantla.

Hipótesis

H0: El municipio de Zihuateutla y sus alrededores están libres de plantas genéticamente modificadas, por lo que las colmenas de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* recolectan polen sin presencia de transgenes, por lo cual se reflejarán resultados negativos en el análisis de presencia/ausencia de transgenes. Por lo tanto, el manejo de abejas melíferas generará beneficios sociales, ambientales y económicos para el proyecto agroecológico en la comunidad de Ocomantla .

H1: Las colmenas de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* obtienen alimento de plantas genéticamente modificadas en el municipio de Zihuateutla y trasladan transgenes a las colmenas. Por lo tanto, se reflejarán resultados positivos en el análisis de presencia/ausencia

de transgenes, lo cual tiene implicaciones sociales, ambientales y económicas para el manejo de abejas melíferas dentro del proyecto agroecológico en la comunidad de Ocomantla.

Sitio de estudio

Zihuateutla es uno de los 217 municipios que conforman el estado de Puebla. Se localiza en la región noroeste de la Sierra Norte de Puebla y colinda con los estados de Tlaxcala, Hidalgo y Veracruz (figura 3). La comunidad de Ocomantla se localiza en el norte del municipio de Zihuateutla (DD: -97.894167, 20.244444) (figura 4).

Zihuateutla colinda con cinco de diez municipios poblanos (Xicotepec de Juárez, Juan Galindo, Huauchinango, Jopala y Tlaola) que se encuentran dentro del Área de Protección de Recursos Naturales (APRN) “Cuenca Hidrográfica del Río Necaxa”: (CONANP, 2002).

La “Cuenca Hidrográfica del Río Necaxa” se conforma por la región norte de Puebla y la región este de Hidalgo (20° 3' y 20° 14' de latitud norte y 97° 51' y 98° 13' de longitud oeste), y abarca una superficie de 42,129.25 hectáreas (CONANP, 2002). Esta APRN se conforma por 10 municipios dentro del estado de Puebla: Ahuazotepec, Chiconcuautla, Huauchinango, Jopala, Juan Galindo, Naupan, Tlaola, Xicotepec de Juárez, Zacatlán y Zihuateutla, mientras que comprende únicamente dos municipios dentro del estado de Hidalgo: Acaxochitlán y Cuauhtepic de Hinojosa (CONANP, 2002) (figura 5).

Dentro del APRN se encuentran cinco presas que conforman el sistema hidrológico del área: Nexapa, La Laguna (El Tejocotal), Tenango, Omiltemetl (Los Reyes) y Necaxa. Todas ellas se consideran sitios Ramsar² (sitio 1796) (CONANP, 2008). Los tipos de vegetación predominantes en el APRN son bosque tropical perennifolio, bosque de pino-encino y bosque mesófilo de montaña (CONANP, 2002).

² La Convención sobre los Humedales (Ramsar) es un tratado intergubernamental en pro de la conservación y uso racional de los humedales, manteniendo sus características ecológicas. Se considera un sitio Ramsar a aquellos que contienen humedales representativos, raros o únicos de importancia para la conservación biológica.



Figura 3: Ubicación geográfica del municipio de Zihuateutla.

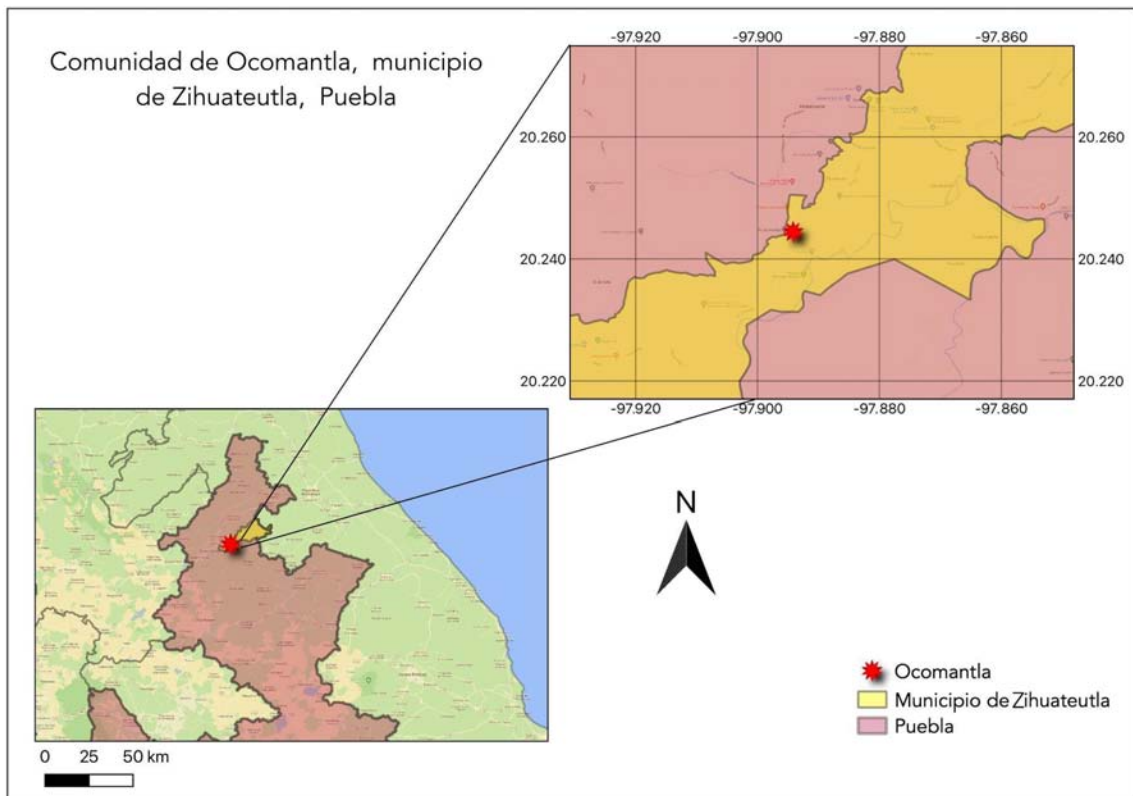


Figura 4: Ubicación geográfica de la comunidad de Ocomantla, municipio de Zihuateutla

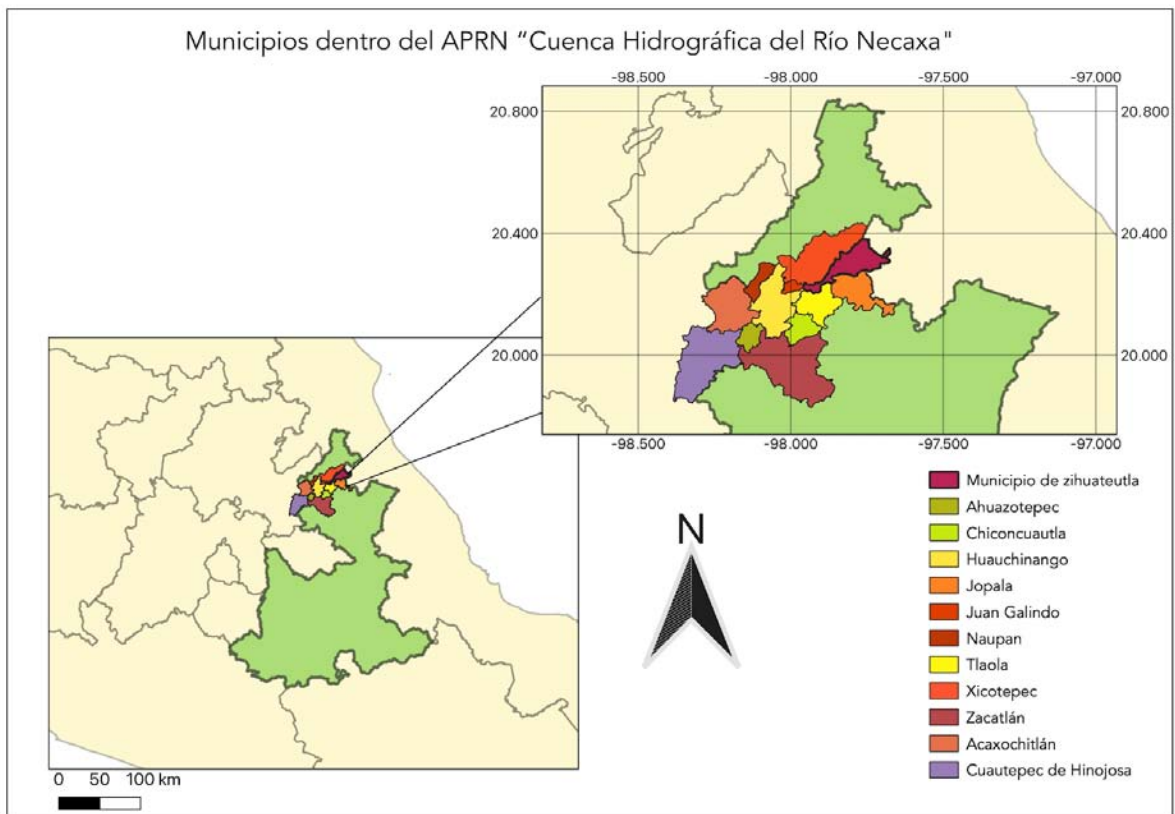


Figura 5: Municipios ubicados dentro del APRN “Cuenca Hidrográfica del Río Necaxa”.

Organismos de estudio

Las abejas son un grupo monofilético conformado por alrededor de 20 mil especies (Arnold *et al.*, 2018). La familia Apidae contiene a la subfamilia Apinae que engloba diferentes tribus, entre ellas las abejas sin aguijón (Meliponini), las abejas melíferas con aguijón (Apini), los abejorros (Bombini) y las abejas solitarias de las orquídeas (Euglossini) (Romiguier *et al.*, 2016) (figura 6A y 6B).

Las abejas eusociales se dividen en las primitivamente sociales (Bombini) y las altamente sociales (Meliponini y Apini) (Arnold *et al.*, 2018), llamadas así porque se conforman por tres grupos de individuos (reinas, obreras y machos) diferenciados tanto morfológicamente como en cuanto a comportamiento y tareas (Grüter, 2020). *Scaptotrigona mexicana* (Meliponini) y *Apis mellifera* (Apini) pertenecen al grupo de las abejas corbiculadas, ya que poseen una concavidad especializada para la colecta de polen en las patas posteriores (Arnold *et al.*, 2018) (Figura 6C).

La división natural de las colonias de abejas sin aguijón es mucho más lenta. Aunque poseen varias reinas vírgenes, hay una reina fecundada de gran tamaño con alas atrofiadas, por lo cual, las colonias se establecen de forma permanente en un solo sitio. Debido a esto, la selección de un buen sitio de anidación y la construcción del nido con una arquitectura adecuada es clave para su supervivencia (Grüter, 2020). Los nidos de los meliponinos se construyen de cerumen, una mezcla de cera, saliva, elementos del suelo, resinas y otras sustancias botánicas que proveen propiedades antipatógenas. Estos nidos se componen de la entrada (piquera), batumen, involucro, celdas de cría y potes de almacenamiento (Grüter, 2020) (tabla 1, figura 7).

Las especies de la tribu Meliponini forman colonias permanentes, donde almacenan miel y polen en grandes cantidades por largos periodos de tiempo para satisfacer sus necesidades en periodos de escasez de recursos (De Paula *et al.*, 2021). Los recursos almacenados en los potes atraviesan procesos de fermentación por bacterias simbiotes. En contraste, la tribu Apini forma colonias temporales, y almacena recursos en celdas hexagonales utilizando estrategias de deshidratación para preservar el alimento (Menezes *et al.*, 2013)

Estructura	Función
Piquera	Elemento visual importante para que las abejas puedan regresar al interior del nido, así como una estructura para regular el tránsito de individuos dentro y fuera de la colmena.
Batumen	Serie de capas compuestas de cerumen, barro, tierra y fibras, que rodean y delimitan las diferentes secciones del nido, además de que sellan grietas o cavidades del exterior.
Involucro	Estructura de cerumen en forma de láminas que protege la cámara de crías de cambios en la temperatura, humedad y de parásitos o depredadores.

Cámaras de cría	Cámaras compuestas de cerumen dispuestas una sobre otra. Están separadas por conductos para que las abejas se desplacen entre ellas. Dependiendo de la especie, las cámaras de cría pueden organizarse en forma de discos horizontales, espirales o verticalmente en forma de racimos.
Potes de almacenamiento	Estructuras esféricas construidas con cerumen y cera para el almacenamiento y maduración de polen y miel. Se sitúan alrededor del involucro y la cámara de cría.

Tabla 1: Estructuras principales que conforman los nidos de meliponinos (Grüter, 2020 y Arnold *et al.*, 2018).

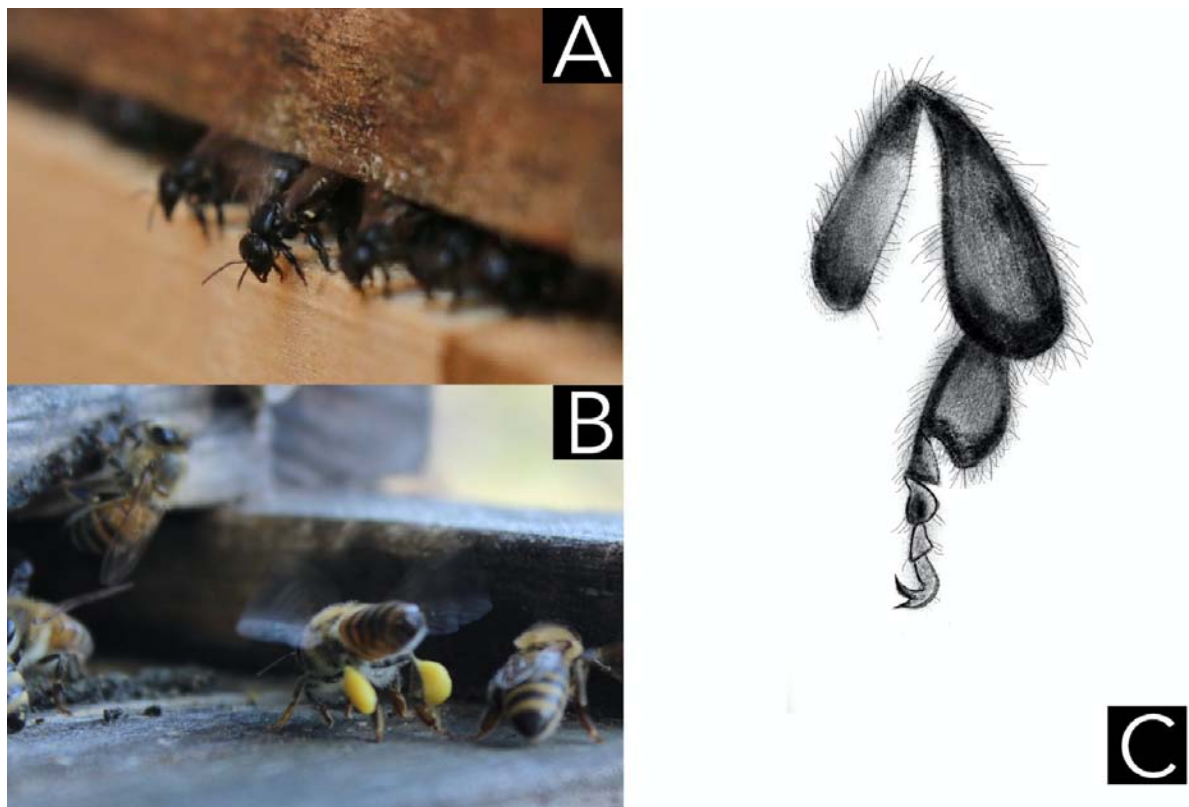


Figura 6: A) *Scaptotrigona mexicana* B) *Apis mellifera* C) Pata posterior de una abeja corbiculada, modificado de Arnold *et al.*, (2018)

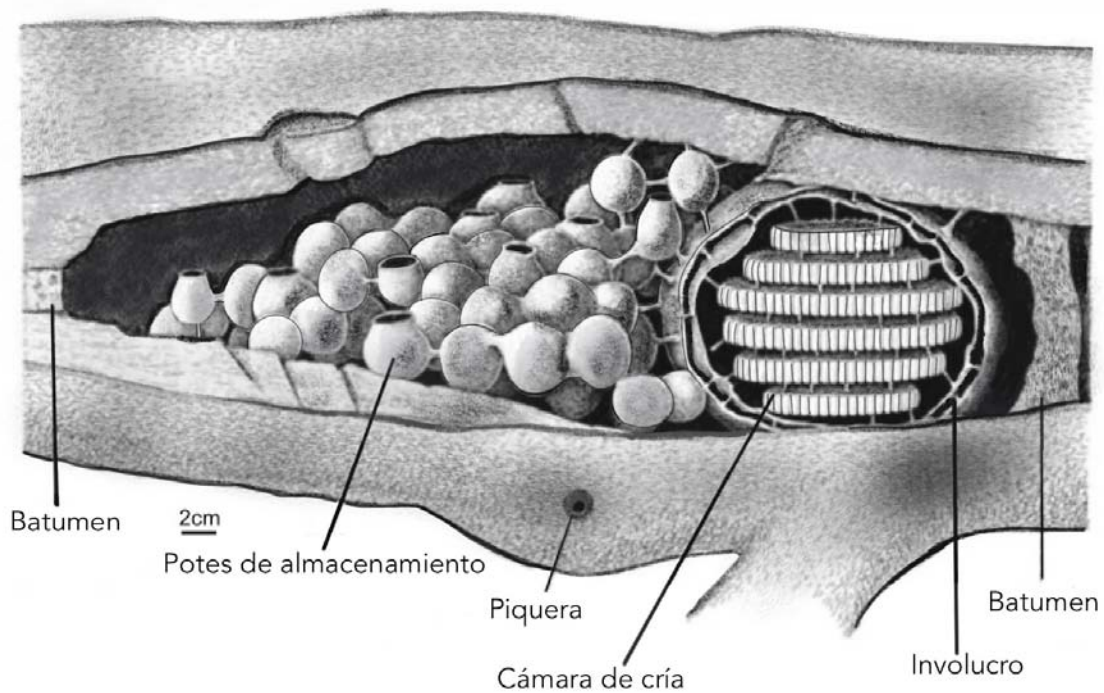


Figura 7: Arquitectura del nido de meliponinos, modificado de Grüter (2020).

MÉTODO

I. Muestreo de polen en colmenas de *Apis mellifera*

Las muestras analizadas en el presente estudio provienen de un conjunto de apiarios que forman parte del proyecto agroecológico de la comunidad de Ocomantla. Todas las muestras fueron obtenidas con el permiso, apoyo y supervisión de los apicultores³. Se analizó una muestra de miel proveniente de dichos apiarios cuya floración corresponde al periodo de agosto a octubre del 2019. Posteriormente, el 25 de febrero del 2020, se realizó un muestreo en cuatro apiarios localizados en diferentes zonas cercanas al municipio de Zihuateutla (tabla 2 y figura 8).

Los muestreos se realizaron en temporada invernal, ya que en este periodo abundan reservas de recursos alimenticios dentro de las colmenas (figura 9). En cada apiario se muestrearon de dos a tres cajas, según el estado óptimo de las colmenas. Se tomaron

³ Las muestras analizadas en el presente estudio provienen de una empresa familiar de varias generaciones que forma parte del proyecto agroecológico de la comunidad de Ocomantla. Todas las muestras fueron obtenidas con permiso, apoyo y supervisión de los apicultores.

muestras al azar de dos bastidores de cada caja, los cuales fueron raspados con una espátula metálica para romper las celdas selladas con cera y obtener miel madura y polen (figura 10 y 11)⁴. Finalmente, se seleccionaron 3 muestras de cada uno de los apiarios, obteniendo un total de 12 muestras para su posterior análisis en laboratorio. Las muestras recolectadas se guardaron en tubos falcon de 50 mL y se etiquetaron. Posteriormente, se almacenaron en congelador para evitar la fermentación de los azúcares en las muestras.

Apiario	Nombre	Latitud	Longitud
A	ADVC Kolijke	20°14'06.6"N	97°53'24.4"W
B	Finca Cafetalera Cre Leg	20°16'09.6"N	97°49'45.0"W
C	Ojo de Agua/tranca de fierro	20°16'31.3"N	97°52'33.4"W
D	El infierno	20°16'49.5"N	97°52'54".4W

Tabla 2: Coordenadas de los apiarios muestreados el 25 de febrero de 2020. Las coordenadas se muestran en grados, minutos y segundos.

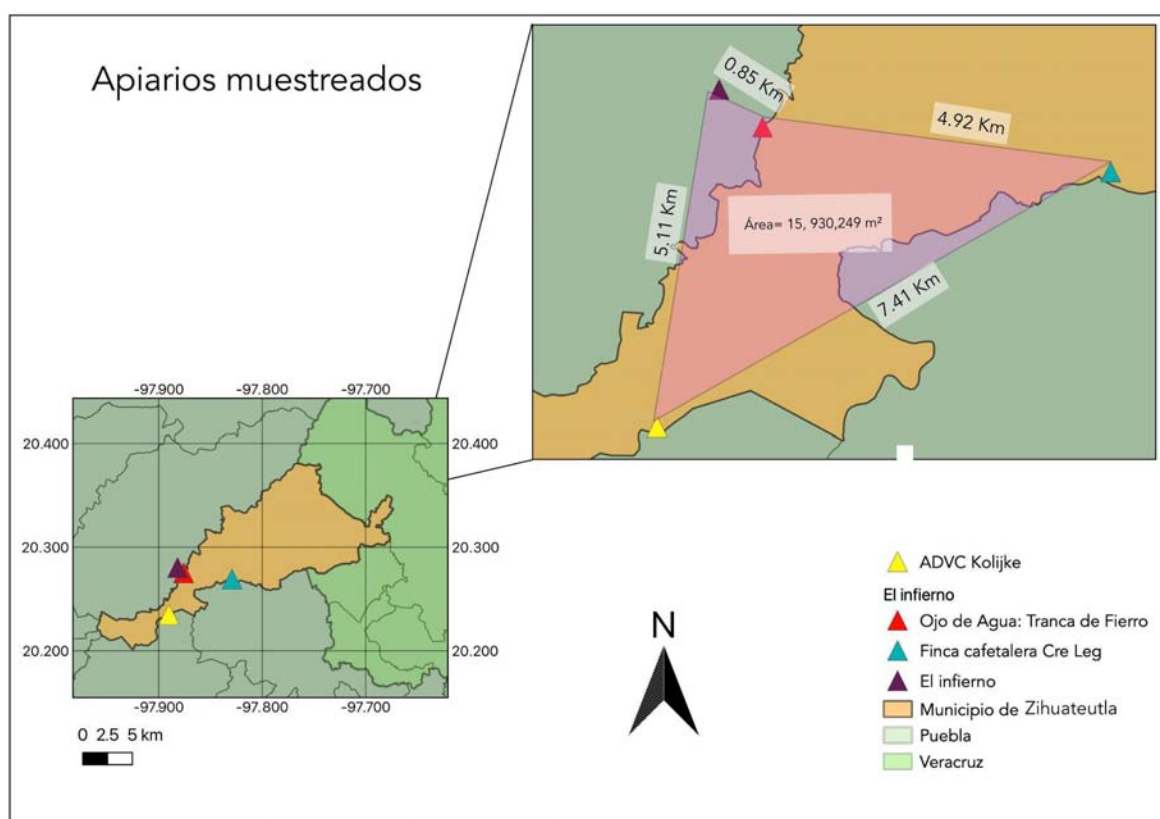


Figura 8: Ubicación geográfica de los apiarios muestreados en febrero de 2020.

⁴ Los apicultores determinaron las cajas candidatas a ser abiertas para obtener polen de las celdas. Las cajas muestreadas se encontraban en estado óptimo, aquellas que tenían colonias pequeñas o recién trasladadas a los apiarios fueron descartadas.

Muestreo de polen colectado por *Apis mellifera*

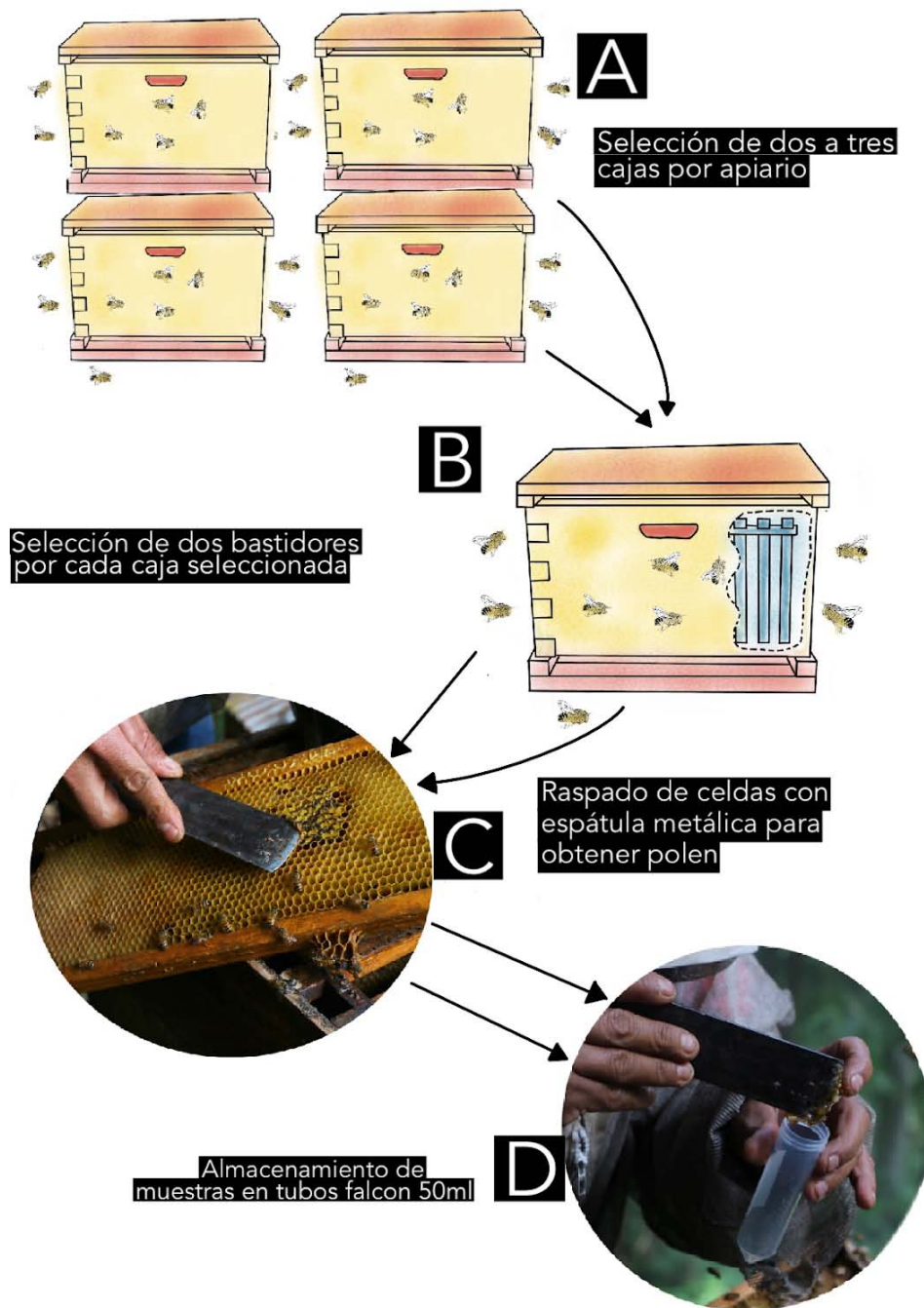


Figura 9: Metodología para la colecta de muestras de polen colectado por *Apis mellifera*.



Figura 10: *A)* Toma de muestra de polen por medio de raspado de celdas en el apiario “ADVC Kolijke”.
B) Selección de cajas en estado óptimo para el muestreo, apiario “El infierno”.



Figura 11: *A)* Raspado de celdas para obtener polen. *B)* Espátula metálica utilizada para el raspado de celdas.
C) Colecta de miel en tubo falcon de 50ml.

II. Muestreo de polen en colmenas *Scaptotrigona Mexicana*

El 12 de diciembre de 2019, se reubicó una colmena de *Scaptotrigona mexicana*, encontrada en un tronco en estado de putrefacción en el apiario C “Ojo de Agua/tranca de fierro”. La cámara de cría fue trasladada a una nueva caja y reubicada en el apiario A “ADVC Kolijke” (figura 12).

Durante este proceso se conservaron los potses de polen para su posterior análisis (figura 13). Los 20 potses de polen fueron etiquetados y numerados por medio de un corte longitudinal (figura 14). Se extrajo un aproximado de 0.5 g de polen de cada pote, evitando la contaminación entre ellos. Las muestras se colocaron en tubos para microcentrifuga de 2 mL de tapa con seguro (figura 15).



Figura 12: A) Proceso de reubicación de colonia de *Scaptotrigona mexicana*, encontrada en estado silvestre en un tronco putrefacto en el apiario “Ojo de agua/tranca de fierro”. B y C) Potses de almacenamiento de polen. D) Capacitación práctica de meliponicultura para los participantes del programa “Jóvenes Construyendo el futuro”. Fotografías de Ayamel Fernández García, diciembre de 2019.



Figura 13: Conjunto de pots de almacenamiento de polen, colectados a partir de la reubicación de la colonia de *Scaptotrigona mexicana* encontrada en estado silvestre. Corte longitudinal.

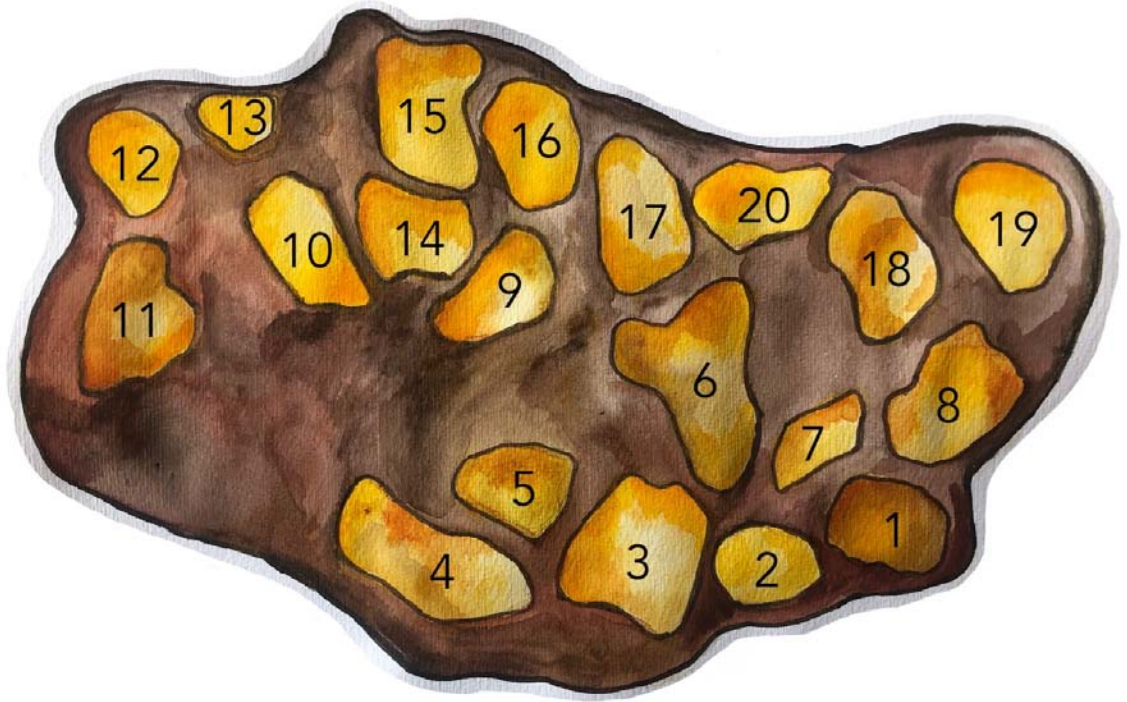


Figura 14: Esquema de la enumeración de potes de almacenamiento de polen cortados de forma longitudinal.

Muestreo de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana*

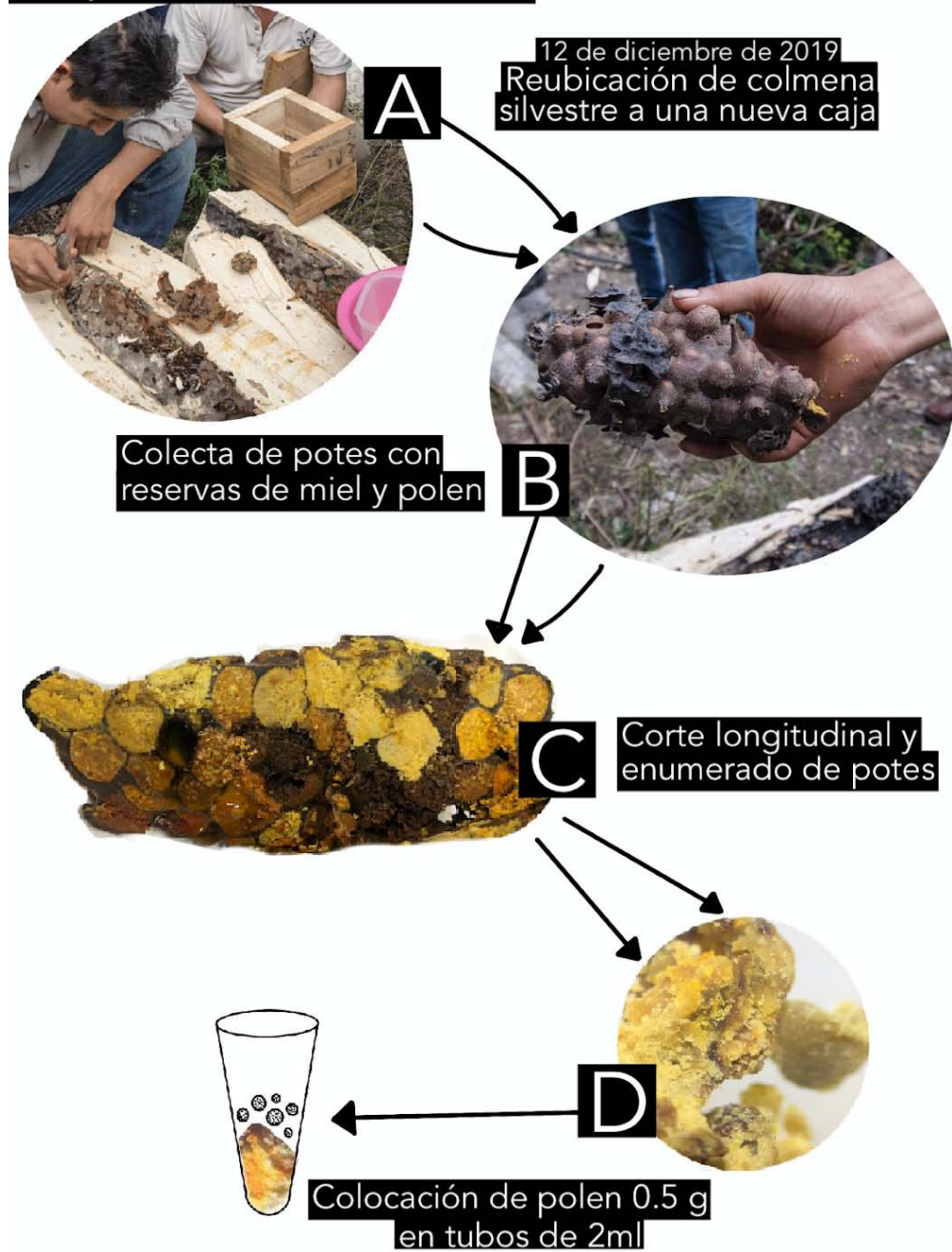


Figura 15: Metodología de muestreo de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana*.

III. Detección de transgenes en muestra de miel de *Apis mellifera*

La extracción de ADN y la detección de transgenes por PCR punto final se realizó en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio) de los departamentos de Botánica y Zoología del Instituto de Biología, UNAM.

Dado que la miel se compone casi en su totalidad de monosacáridos y disacáridos, se obtuvo el polen de las muestras por medio del lavado de azúcares (anexo 1). Se obtuvieron 6 pellets de polen de la muestra proporcionada de la cosecha 2019. Las muestras fueron sometidas a disrupción mecánica con balines para lisis utilizando el equipo Tissue Lysser II (QIAGEN, Alemania) (anexo 2).

La extracción de ADN genómico de las muestras se realizó siguiendo el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987), originalmente utilizado para tejidos vegetales (hojas frescas). Sin embargo, en el presente trabajo se realizaron modificaciones y adaptaciones al protocolo (anexo 3). La primera modificación realizada al protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987) fue la disrupción de tejido. En el protocolo original, el tejido foliar se muele en un mortero empleando nitrógeno líquido, no obstante, en el presente trabajo se optó por la disrupción mecánica con balines para lisis, utilizando el equipo Tissue Lysser II (QIAGEN, Alemania) (anexo 2). La segunda modificación al protocolo consistió en reducir la temperatura de incubación durante la lisis celular de 70° C a 65° C. Asimismo, se estableció un periodo de incubación en isopropanol de 17 horas a 4° C.

Posteriormente, se corroboró la calidad del ADN por medio de geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, teñidos con Gel Red® (Biotum, Fremont, California) en una cámara de electroforesis (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos). La visualización del ADN se realizó en un Fotodocumentador MultiDoc-IT TM (UVP, California, Estados Unidos).

Se realizaron PCRs punto final para las 6 muestras. Para amplificar los genes *cry1Ac*, *cry2Ab* y *CP4-EPSPS* se utilizaron los cebadores *cry1Ac* (F: 5' - GAC CGC TTA CAA GGA GGG ATA CG -3', R:5' - ACG GAG GCA TAG TCA GCA CC -3') con amplicón de 228 pb (Randhawa y Chhabra, 2013), *cry2Ab* (F: 5' - CAG CGG CGC CAA CCT CTA CG -3', R: 5' - TGA ACG GCG ATG CAC CAAT TGT -3') con amplicón de 260 pb (Randhawa et al., 2010) y *CP4-EPSPS* (F: 5' - GCA TGC TTCACG GTG CAA -3', R: 5' - TGA AGG ACC

GGT GGG AGA T -3') con amplicón de 108 pb (Barbau Piednoir et al., 2012) (IDT, Iowa, Estados Unidos) (anexo 7).

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Massachusetts, Estados Unidos). Cada reacción fue realizada con 20 µL de mezcla de PCR con 5 µL de ADN por muestra. El volumen final de cada reacción fue de 25 µL (anexo 4). Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN de *Gossypium hirsutum* con transgenes (anexo 6)

Las condiciones de reacción para los tres transgenes fueron las siguientes: 95 °C por 8 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95 °C de 20 segundos (desnaturalización), 61 °C por un minuto (alineamiento), 72 °C por un minuto (extensión) y una extensión final de 72 °C por 8 minutos.

Los productos PCR amplificados se observaron en geles de agarosa al 2% con buffer TBE 1X, teñidos con Gel Red® (Biotum, Fremont, California), en una cámara de electroforesis (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos). Los amplicones fueron visualizados y capturados en un fotodocumentador MultiDoc-IT (UVP, California, Estados Unidos).

IV. Detección de transgenes en polen muestreado en apiarios y polen recolectado por *Scaptotrigona mexicana*

La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LaNaBio) de los departamentos de Botánica y Zoología del Instituto de Biología, UNAM. Por su parte, la detección de transgenes por PCR punto final se realizó en el Laboratorio de Genética y Ecología, en el Instituto de Ecología, UNAM.

Se extrajo ADN de 32 muestras en total. De éstas, 12 muestras corresponden al polen recolectado en cada uno de los cuatro apiarios de *Apis mellifera*, mientras que 20 muestras corresponden al polen almacenado en potes de la colmena de *Scaptotrigona mexicana*.

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones y adaptaciones (anexo 3). Posteriormente, se corroboró la calidad del ADN por medio de la visualización en geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, teñidos con Gel Red® (Biotum, Fremont, California) en una cámara de electroforesis (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos). La visualización del ADN se realizó en un fotodocumentador MultiDoc-IT TM (UVP, California, Estados Unidos).

Se realizaron PCRs punto final para 12 muestras de polen colectado por *Apis mellifera* y para los 20 potes de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana*, obteniendo como resultado 32 muestras en total. Para amplificar los genes *cry1Ac*, *cry2Ab* y *cp4-epsps*, se utilizaron los cebadores *cry1Ac* (F: 5'- GAC CGC TTA CAA GGA GGG ATA CG -3', R:5'- ACG GAG GCA TAG TCA GCA CC -3') con amplicón de 228 pb (Randhawa y Chhabra, 2013), *cry2Ab* (F: 5'- CAG CGG CGC CAA CCT CTA CG -3', R: 5'- TGA ACG GCG ATG CAC CAAT TGT -3') con amplicón de 260 pb (Randhawa et al., 2010) y *CP4-EPSPS* (F: 5'- GCA TGC TTCACG GTG CAA -3', R: 5'- TGA AGG ACC GGT GGG AGA T -3') con amplicón de 108 pb (Barbau Piednoir et al., 2012) (IDT, Iowa, Estados Unidos) (anexo 7).

Las amplificaciones por PCR punto final se llevaron a cabo en el termociclador *Mastercycler Nexus Gradient* (Eppendorf, Alemania). Cada reacción fue realizada con 23 µL de mezcla de PCR con 2 µL de ADN por muestra. El volumen final de cada reacción fue de 25 µL (anexo 4). Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN de *Gossypium hirsutum* (anexo 6).

Las condiciones de reacción para los tres transgenes fueron las siguientes: 95 °C por 8 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95 °C de 20 segundos (desnaturalización), 61 °C por un minuto (alineamiento), 72 °C por un minuto (extensión) y una extensión final de 72 °C por 8 minutos.

Los productos PCR amplificados se observaron en geles de agarosa al 2% con buffer TBE 1X, teñidos con Gel RedGel Red® (Biotum, Fremont, California) en una cámara de electroforesis (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos). Los amplicones fueron visualizados y capturados en un fotodocumentador MultiDoc-IT (UVP, California, Estados Unidos).

RESULTADOS

I. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones y adaptaciones (anexo 3) resultó exitosa. Se obtuvieron bandas de ADN gruesas y definidas de la muestra de miel cosechada en 2019. Se seleccionaron 6 muestras para realizar análisis con PCR punto final (figura 16).

Se obtuvieron bandas definidas del polen colectado por *Apis mellifera* muestreado en los cuatro apiarios por separado para realizar análisis con PCR punto final: A3, A5, A10, B2, B3, B5, C4, C8, C9, D2, D6, D7 (figura 17).

En cuanto a las muestras de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana*, se obtuvieron diez bandas de ADN bien definidas: S1, S2, S4, S12, S15, S16, S17, S18, S19 y S20 y diez bandas degradadas S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S13 y S14 (figura 17). No se encontró correlación alguna que determinara algún gradiente temporal de almacenamiento en los pots con base en la calidad del ADN extraído.

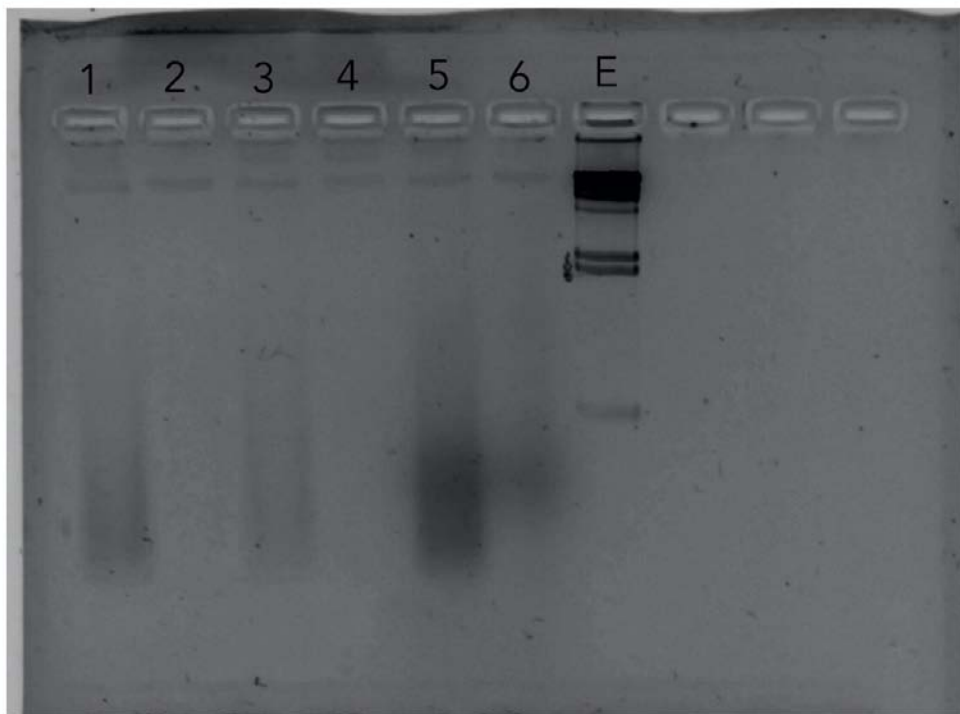


Figura 16: Extracción de muestra de miel cosechada en 2019. Gel de agarosa al 2%.

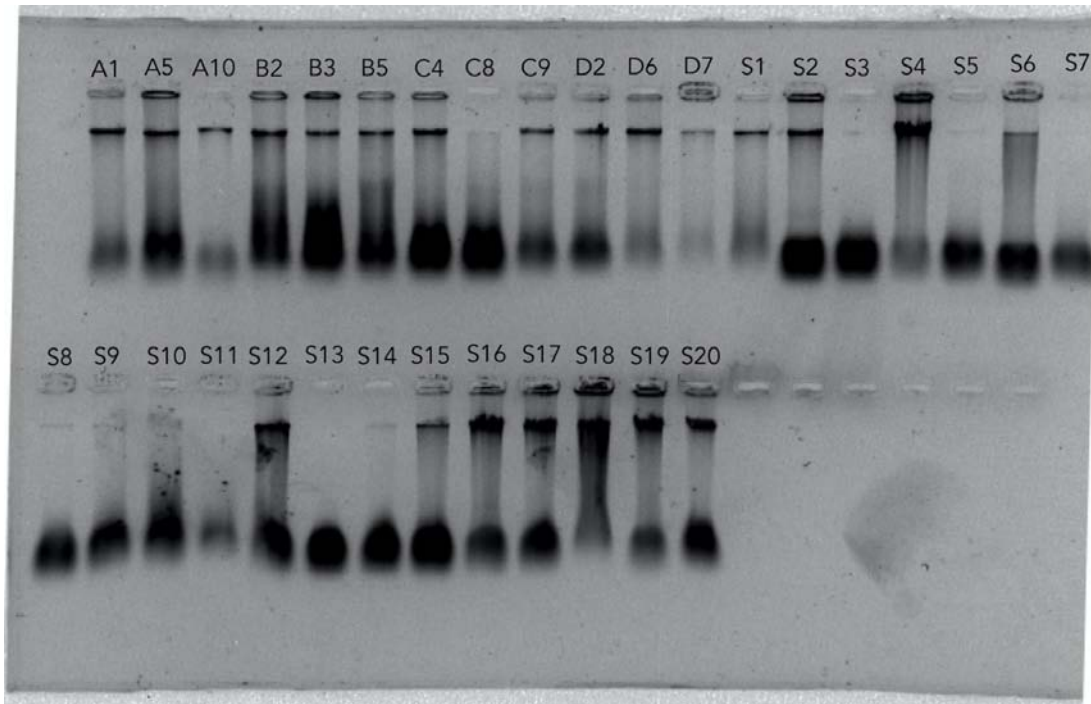


Figura 17: Extracción de ADN de polen colectado por *Apis mellifera* (A1, A5, A10, B2, B3, B5, C4, C8, C9, D2, D6, D7) y de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana* (S1-S20) en gel de agarosa al 2%.

II. PCR punto final para miel de *Apis mellifera* cosechada en 2019

No se registró la presencia de genes *cry1Ac* con amplicón de 228 pb (figura 18), ni tampoco la presencia de genes *cry2Ab* con amplicón de 260 pb en ninguna de las 6 muestras de miel de *Apis mellifera* cosechada en 2019 (figura 19). Sin embargo, se registró la presencia de *cp4-epsps* con amplicón 108 pb en 3 de 6 muestras (figura 20).

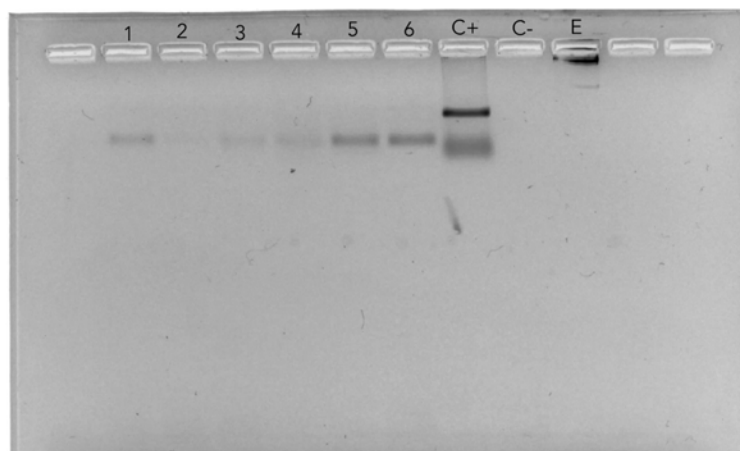


Figura 18: Productos PCR punto final en gel de agarosa al 2% para detectar la presencia del transgen *cry1Ac* con amplicón de 228 pb, en las muestras de miel de *Apis mellifera* cosechada en 2019. No se detectó la presencia de dicho transgen.

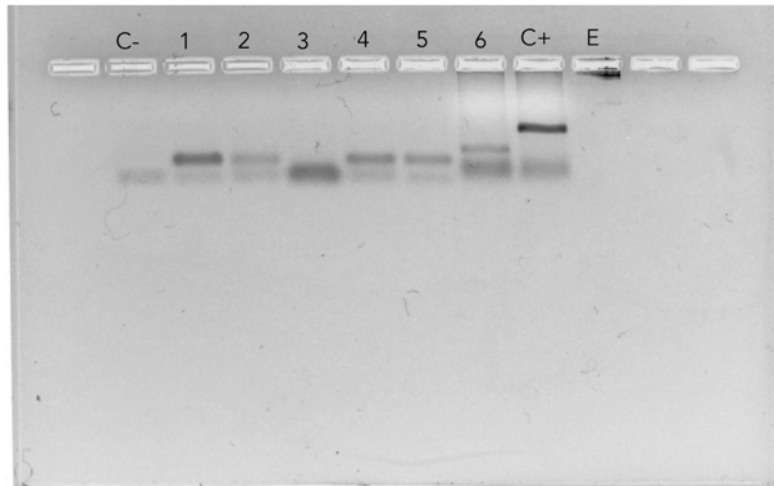


Figura 19: Productos PCR punto final en gel de agarosa al 2% para detectar la presencia del transgen *cry2Ab* con amplicón de 260 pb, en las muestras de miel de *Apis mellifera* cosechada en 2019. No se detectó la presencia de dicho transgen.

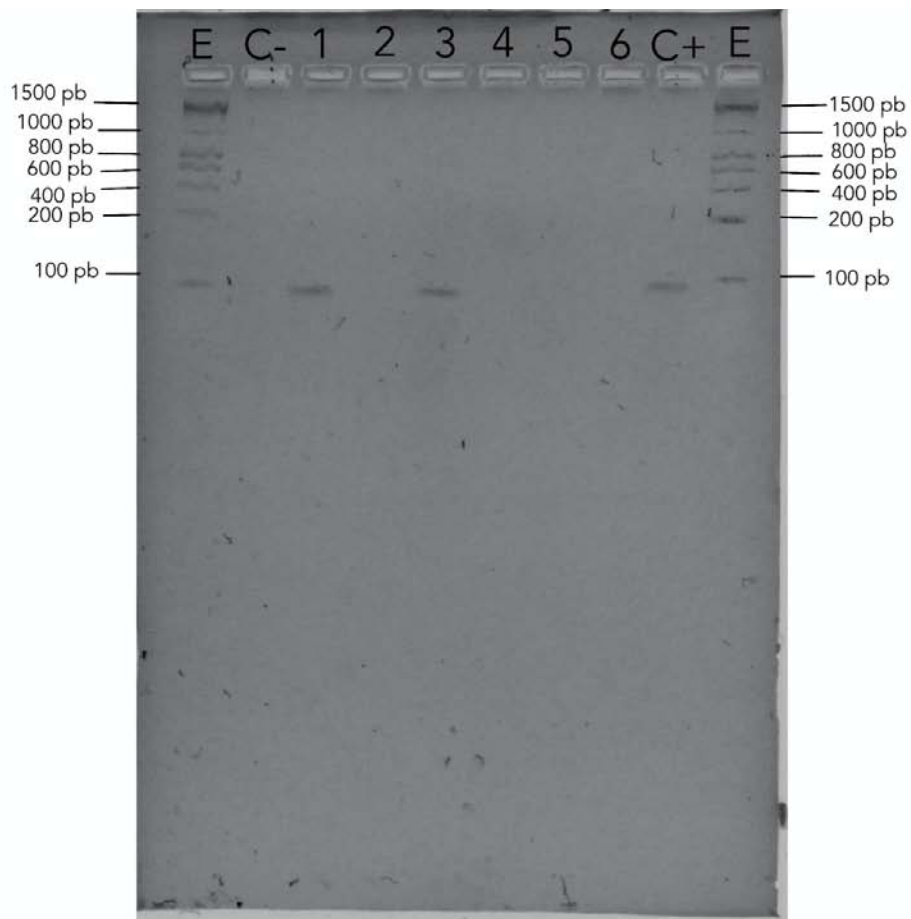


Figura 20: Productos PCR punto final en gel de agarosa al 2% para detectar la presencia del transgen *cp4-epsps* con amplicón de 108 pb, en las muestras de miel de *Apis mellifera* cosechada en 2019. Se detectó la presencia de dicho transgen en el pozo 1 y 3. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “Hyperladder 100bp” de la marca Bioline.

III. PCR punto final para la detección de *cry1Ac*, *cry2Ab* y *cp4-eps* en polen colectado por *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*

Se registró la presencia *cp4-epsps* con amplicón 108 pb en las 31 de las 32 muestras analizadas (tabla 3 y 4, figuras 28, 29 y 30). Sin embargo, no se registró la presencia de genes *cry1Ac* con amplicón de 228 pb, ni tampoco la presencia de genes *cry2Ab* con amplicón de 260 pb en ninguna de las 12 muestras de *Apis mellifera* (tabla 3, figuras 21, 22 y 25), ni en ninguna de las 20 muestras de *Scaptotrigona mexicana* (tabla 4, figuras 22, 23, 24, 25, 26 y 27).

En el caso de las muestras de *Scaptotrigona mexicana*, no se encontró ninguna correlación que determinara algún posible gradiente temporal entre el almacenamiento de los potes y la presencia del gen *cp4-epsps* en los productos de PCR.

No. de muestra	Clave	<i>Cry 2AB</i>	<i>Cry 1AB</i>	<i>CP4-EPSPS</i>
1	A3	0	0	1
2	A5	0	0	1
3	A10	0	0	1
4	B2	0	0	1
5	B3	0	0	1
6	B5	0	0	1
7	C4	0	0	1
8	C8	0	0	1
9	C9	0	0	1
10	D2	0	0	1
11	D6	0	0	1
12	D7	0	0	1

Tabla 3: Resultados de PCRs punto final para la determinar la ausencia/ presencia de transgenes en las muestras de polen recolectadas en diferentes apiarios de *Apis mellifera*.

No. de muestra	Clave	CP4-EPSPS	Cry 2AB	Cry 1AB
13	S1	1	0	0
14	S2	1	0	0
15	S3	1	0	0
16	S4	1	0	0
17	S5	1	0	0
18	S6	1	0	0
19	S7	1	0	0
20	S8	1	0	0
21	S9	1	0	0
22	S10	1	0	0
23	S11	1	0	0
24	S12	1	0	0
25	S13	1	0	0
26	S14	1	0	0
27	S15	0	0	0
28	S16	1	0	0
29	S17	1	0	0
30	S18	1	0	0
31	S19	1	0	0
32	S20	1	0	0

Tabla 4: Resultados de PCRs punto final para la determinar la ausencia/ presencia de transgenes en las muestras de polen recolectadas en diferentes apiarios de *Scaptotrigona mexicana*.

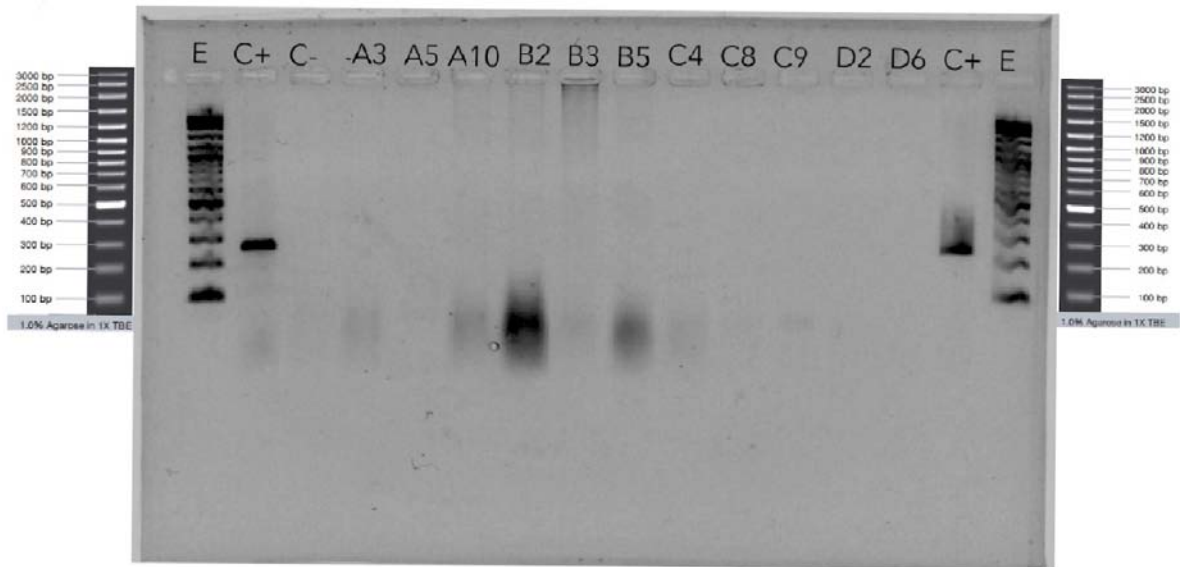


Figura 21: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cryIAc* con amplicón de 280 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

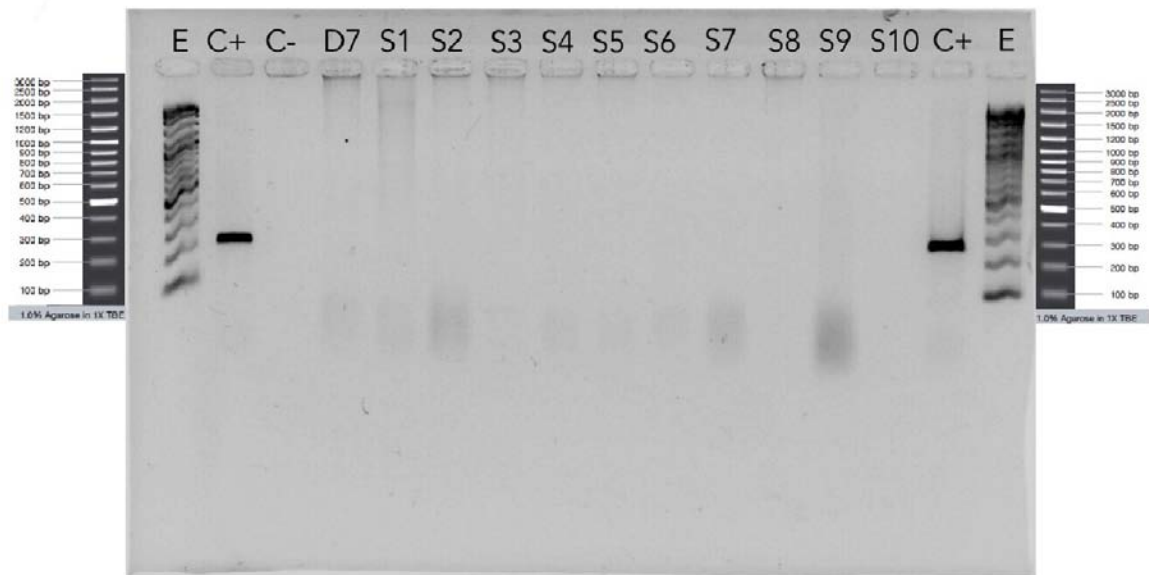


Figura 22: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cryIAc* con amplicón de 280 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

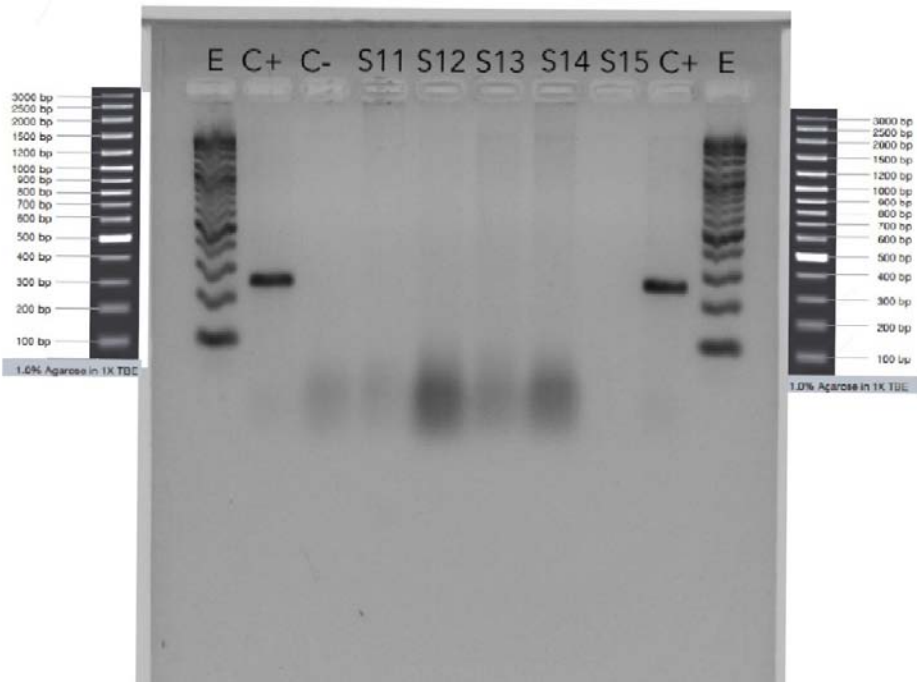


Figura 23: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cryIAc* con amplicón de 280 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

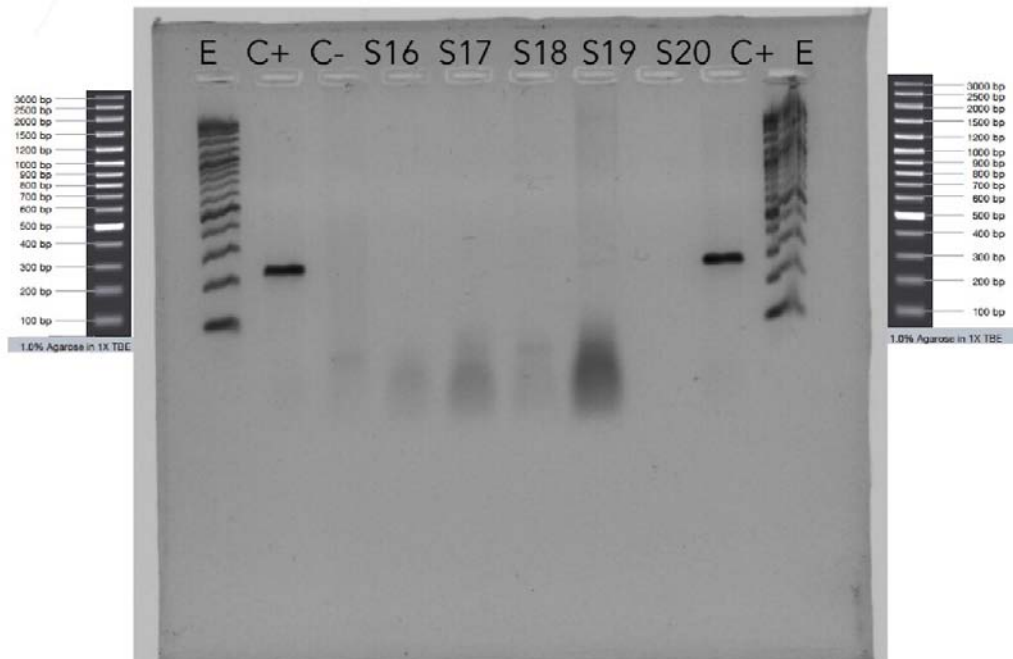


Figura 24: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cryIAc* con amplicón de 280 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

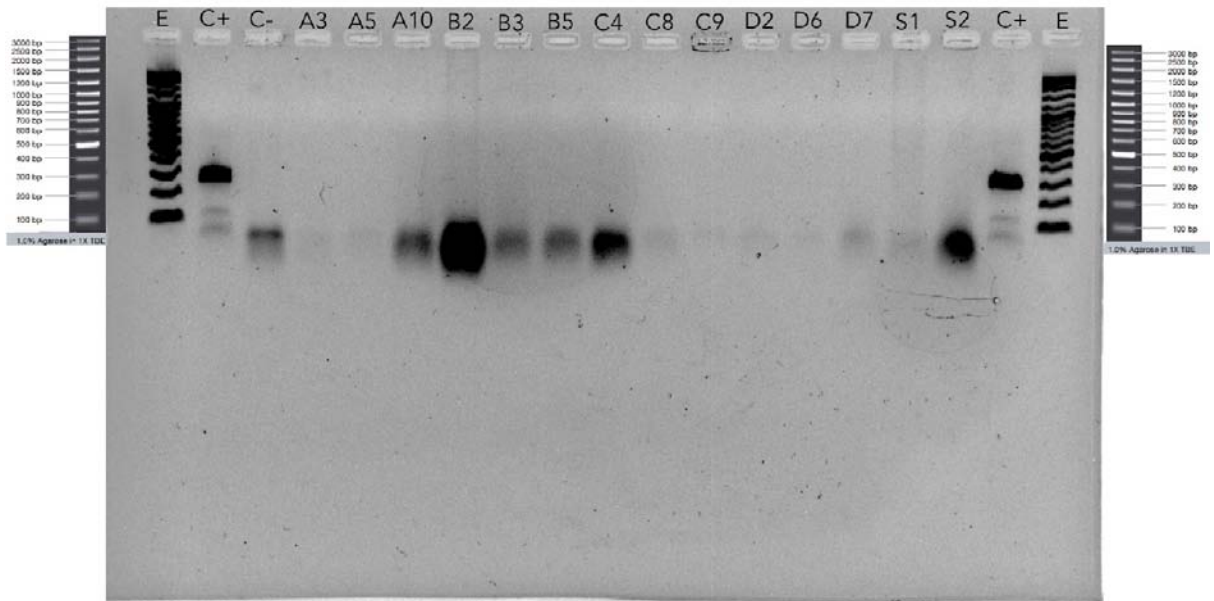


Figura 25: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cry2Ab* con amplicón de 260 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

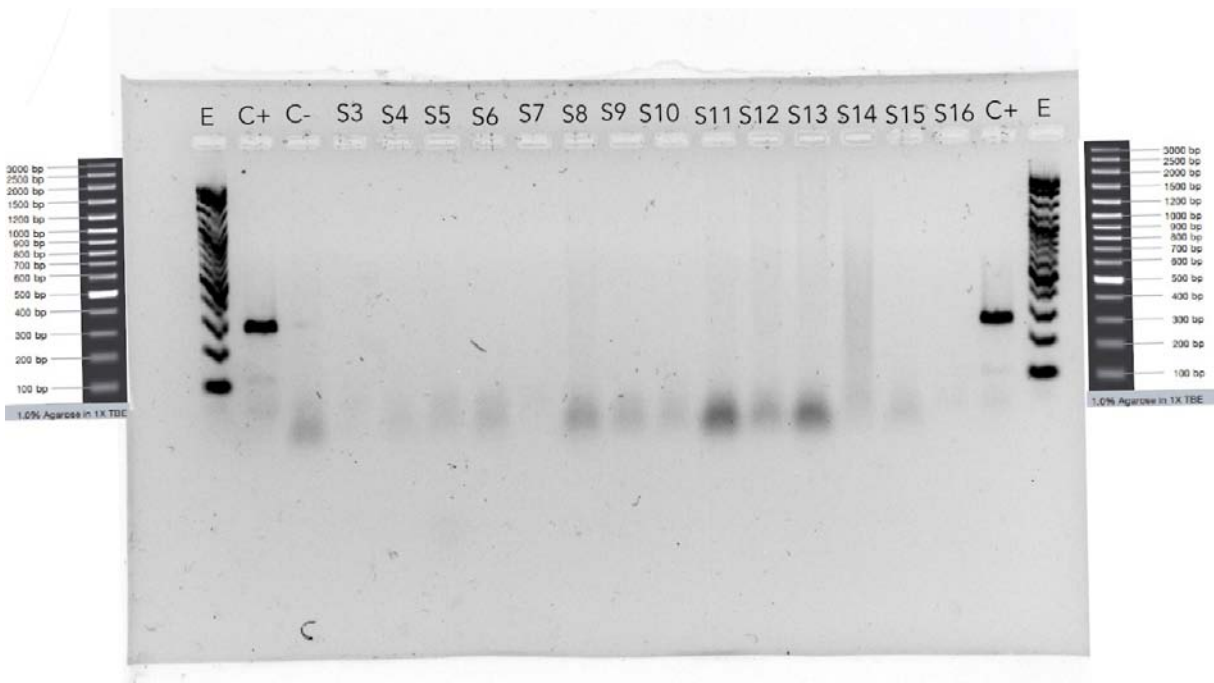


Figura 26: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cry2Ab* con amplicón de 260 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

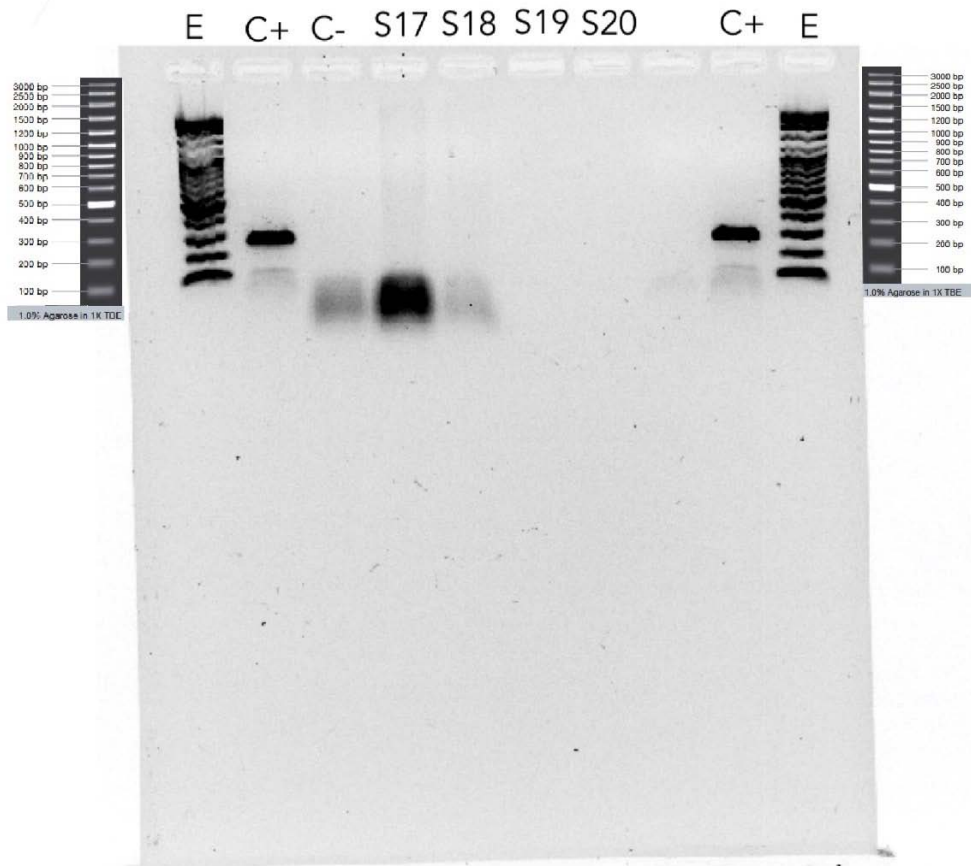


Figura 27: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cry2Ab* con amplicón de 260 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

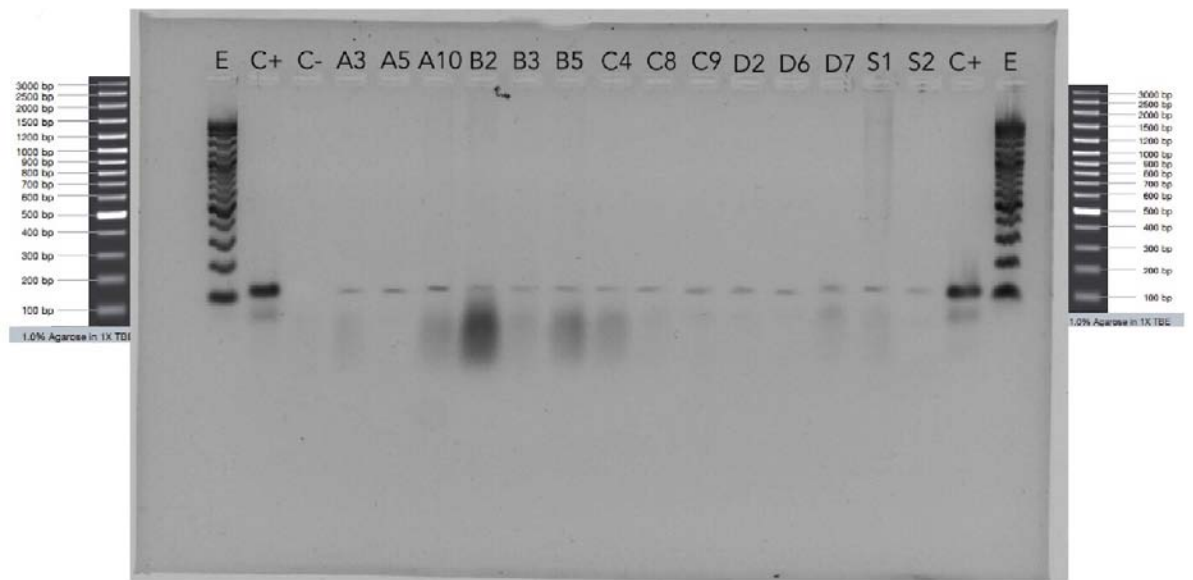


Figura 28: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cp4-epsps* con amplicón de 108 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

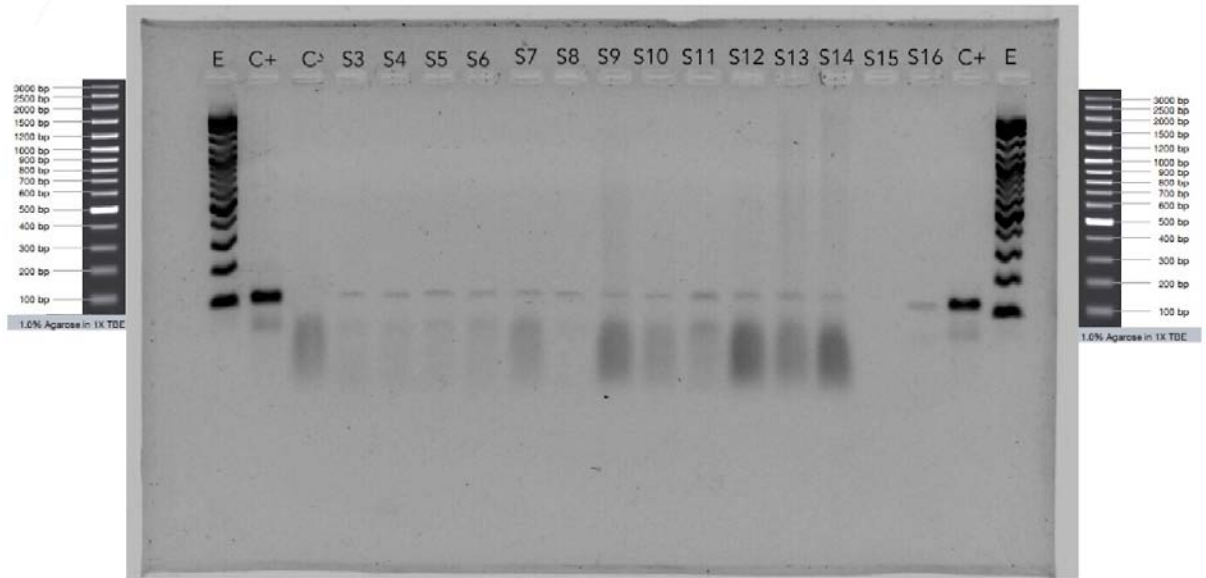


Figura 29: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cp4-epsps* con amplicón de 108 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

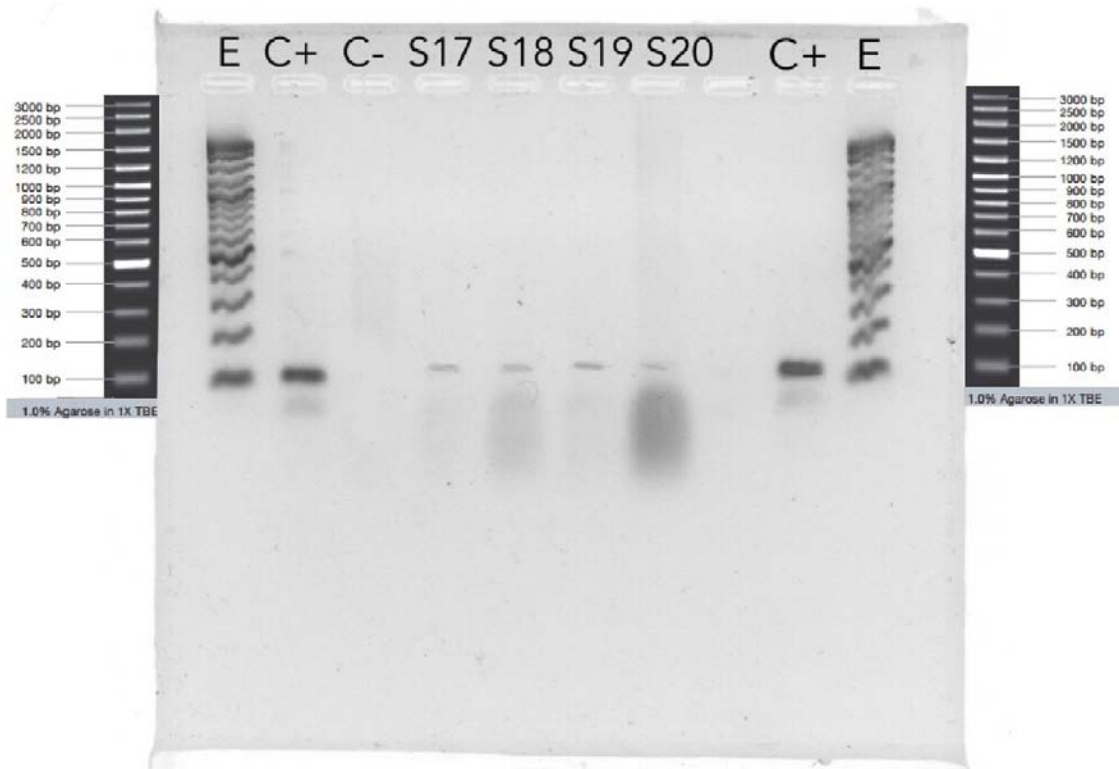


Figura 30: Productos PCR punto final para detectar la presencia del transgen *cp4-epsps* con amplicón de 108 pb, en las muestras de polen de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. Se utilizó la escalera de referencia de peso molecular “VC 100bp Plus DNA Ladder” de la marca Vivantis.

DISCUSIÓN

I. Extracción de ADN de origen botánico extraído y amplificación con PCR punto final

La extracción de ADN de polen utilizando el protocolo Doyle y Doyle (1987) con modificaciones resultó exitosa, pues proporcionó ADN de buena calidad para realizar los análisis genéticos. El protocolo original fue diseñado para tejidos foliares, los cuales se muelen en un mortero empleando nitrógeno líquido. Sin embargo, los granos de polen necesitan romperse por medios enzimáticos, físicos y mecánicos para liberar el material genético que contienen (Dong *et al.*, 2015). La pared del polen se compone de dos capas: la intina y la exina (Dong *et al.*, 2015). La exina está fortificada por una cubierta de esporopolenina (Quilichini *et al.*, 2015), un biopolímero orgánico de gran estabilidad, que, al ser resistente a compuestos ácidos, alcalinos y corrosivos, protege el interior del gameto (Wu *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2015). Debido a las cualidades de la pared del polen, en el presente trabajo se optó por la disrupción mecánica con balines para lisis, utilizando el equipo Tissue Lysser II (QIAGEN, Alemania) (anexo 2).

Según Jain *et al.*, (2013) la actividad detergente del CTAB confiere una ventaja para extraer ADN de buena calidad del polen. Sin embargo, una de las modificaciones al protocolo consistió en reducir la temperatura de incubación durante la lisis celular de 70° C a 65° C, con el objetivo de reducir el impacto negativo de las altas temperaturas en el ADN ya degradado presente en la miel y el polen almacenados por largos periodos de tiempo. Asimismo, se estableció un periodo de incubación en isopropanol de 17 horas a 4° C, ya que estas condiciones facilitan que el ADN de bajo peso molecular pueda precipitarse lentamente y por completo (Jain *et al.*, 2013).

Cuando se extrajo ADN de los potes de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana*, se esperaba encontrar alguna correlación entre el tiempo de almacenamiento en la colmena y la calidad del ADN extraído (figura 17). Sin embargo, no se encontró correlación alguna ya que existe una variación entre los procesos bioquímicos que modifican la composición del polen en cada uno de los potes, entre ellos la fermentación alcohólica, acética y láctica (Guertler *et al.*, 2013 ; Maia-Silva *et al.* 2015).

Se han identificado diferentes géneros de bacterias lácticas en el polen almacenado por abejas melíferas, entre ellos *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Vollet-Neto *et al.*, 2017; Vásquez y Olofsson, 2009). Dichos microorganismos participan en la conversión metabólica y fermentación por medio de enzimas que modifican el olor, sabor, color y

textura del polen almacenado (Menezes *et al.* 2013), así como otras transformaciones bioquímicas que causan el ablandamiento de la exina del polen, y actúan como mecanismo para facilitar la digestión de las abejas (Nicolson, 2017). A causa de la presencia de diversos microorganismos dentro de las colmenas, en la extracción de ADN para miel y polen almacenado, el material genético obtenido también puede corresponder a bacterias, hongos, abejas y otros artrópodos (Jain *et al.*, 2013).

Dado que se suele obtener ADN fragmentado de la miel y polen recolectado por abejas melíferas, los *primers* que amplifican fragmentos cortos durante el análisis PCR resultan mucho más adecuados (Jain *et al.*, 2013; Galimbert *et al.*, 2013). Por esta razón, en el presente trabajo se utilizaron cebadores para identificar transgenes de origen botánico: *cry1Ac* con amplicón de 228 pb (Randhawa y Chhabra, 2013), *cry2Ab* con amplicón de 260 pb (Randhawa *et al.*, 2010) y *cp4-epsps* con amplicón de 108 pb (Barbau Piednoir *et al.*, 2012) (IDT, Iowa, Estados Unidos) (anexo 7).

Los análisis PCR arrojaron resultados positivos a la presencia de *cp4-epsps* en muestras de polen colectado por *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*. En consecuencia se puede inferir que el ADN extraído y amplificado con PCR punto final refleja una modificación genética presente en un grupo determinado de angiospermas que las abejas visitan para obtener alimento.

II. Presencia de *cp4-epsps* en productos PCR punto final

En los productos del PCR punto final para la miel de *Apis mellifera* cosechada en 2019 (mezcla de los cuatro apiarios), no se registró la presencia de *cry 1Ac* ni *cry 2Ab* en ninguna muestra, únicamente se registró la presencia de *cp4-epsps*. De este modo, se dedujo que al menos uno de los cuatro apiarios se relaciona con algún evento autorizado o no autorizado de *cp4-epsps* (anexo 10). Asimismo, los productos PCR punto final del polen obtenido por el raspado de celdas en cada uno de los cuatro apiarios de forma independiente también indicaron la presencia del gen *cp4-epsps*.

Es importante recalcar que las colmenas muestreadas de *Apis mellifera* no son alimentadas en ningún momento del año con polen de maíz o soya. En periodos invernales o de escasez de recursos únicamente se les administra agua con azúcar de caña. Por lo tanto, la presencia de transgenes en la miel y el polen recolectado de las celdas no se relaciona con la técnica del apicultor⁵.

⁵ Información proporcionada por los apicultores en entrevista no estructurada, realizada en marzo del 2021.

Dado que se registró la presencia del gen *cp4-epsps* en el apiario “Ojo de Agua/tranca de fierro”, se esperaba la presencia de dicho transgen en al menos una muestra de los potes de polen de la colmena de *Scaptotrigona mexicana*. Ya que se registró el gen *cp4-epsps* en 19 de los 20 potes analizados, no se encontró ninguna relación temporal para estimar el momento de aparición del transgen. Igualmente, se deduce que *Scaptotrigona mexicana* interactuó con el transgen desde que la colonia instaló su nido en estado silvestre dentro de un tronco en el apiario “Ojo de Agua/tranca de fierro”.

Todas las especies de la tribu Apini son eusociales y forman colonias perennes (Vollet-Neto *et al.*, 2017). Estas colonias tienen un crecimiento mucho más lento, comparado con el de *Apis mellifera*. Existen diversas variables para determinar la edad de una colmena, entre ellas el tamaño poblacional, la salud de los individuos, las etapas de floración y la cantidad de recursos disponibles, entre otras. Además de esto, la edad de los potes de almacenamiento difícilmente puede determinarse por el color del polen, ya que este varía dependiendo de la diversidad de angiospermas visitados, así como la maduración y la acidez resultante de los procesos de fermentación⁶. En consecuencia, la única manera de determinar la edad de una colmena es bajo monitoreo y control de múltiples variables.

III. Limitaciones para determinar el origen y dinámica de flujo de polen con presencia de *cp4-epsps*

El flujo de polen es un proceso a multiescala en el que influyen diversas variables ambientales y ecológicas, como la temperatura, la humedad, las corrientes de viento, la diversidad y riqueza de recursos florales disponibles, la competencia entre individuos, y sus diferentes patrones de comportamiento.

Ya que el traslado de polen es uno de los principales mecanismos de flujo génico, diversos autores, tal como Beekman y Ratnieks (2000), y Danner *et al.* (2016) han diseñado estrategias para estimar las distancias de forrajeo de *Apis mellifera* basándose en las danzas comunicativas. Sin embargo, hasta ahora las técnicas que buscan medir con precisión los rangos de forrajeo tienen fuertes limitaciones.

⁶ Información y asesoría proporcionada por Andrés Castro y Lázaro Arroyo (El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas) con base en experiencia empírica, conocimiento, observación y opinión.

Determinar los rangos de forrajeo de forma precisa ha tomado gran relevancia debido a la dispersión de transgenes por medio del flujo génico, a través del intercambio de polen entre cultivos GM y cultivos convencionales, así como entre parientes silvestres (Pasquet *et al.*, 2008). Sin embargo, el flujo de polen a largas distancias es sumamente difícil de medir, ya que la distancia de forrajeo de los individuos de una colonia se ve influenciada por diversas variables como la temperatura, la humedad, las corrientes de viento e incluso la edad de cada individuo.

Los datos genéticos obtenidos del polen recolectado por abejas, junto con datos sobre la ecología del paisaje, observaciones y documentación del traslado de polen en condiciones controladas, pueden proveer información relevante en torno a la heterogeneidad espacial, la calidad y cantidad de los recursos obtenidos, así como los impactos negativos en hábitats fragmentados (Pasquet *et al.*, 2008). Aunque el presente estudio se enfocó en determinar la presencia o ausencia de transgenes, el material genético obtenido también puede revelar información importante sobre las preferencias y patrones de recolección de recursos de las abejas eusociales en Zihuateutla.

A causa de que se registró la presencia del transgen *cp4-epsps* en los cuatro apiarios muestreados, se puede afirmar que en una o varias áreas hay presencia de transgenes. Conforme a las observaciones cualitativas de cada apiario, la mayoría de los cultivos comestibles cercanos corresponden a la siembra estacional de maíz a pequeña escala y para autoconsumo (anexo 9). Dado que en la región no se cultivan soya, algodón, canola, papa, ni betabel, los cuales pueden corresponder a eventos de liberación de OGM en México, es probable que los transgenes *cp4-epsps* detectados en las muestras correspondan a *Zea mays*.

Dado que el maíz es una planta de polinización abierta, las plantas con transgenes pueden polinizar a plantas sin transgenes aunque no estén en parcelas contiguas. El riesgo de polinización cruzada entre ambos tipos de plantas depende de factores imposibles de controlar, entre ellos, la distancia entre parcelas, la sincronía de tiempo de floración, las corrientes de vientos, la humedad relativa, la temperatura y la orografía (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013). Aunque *Zea mays* no requiere de la polinización por insectos y sus recursos florales pueden resultar menos atractivos que otras flores nativas, existe evidencia de que representa una fuente de néctar y polen para diversos grupos de insectos polinizadores, entre ellos, las abejas melíferas (Wheelock *et al.*, 2016).

En el presente trabajo únicamente se determinó la presencia/ausencia de transgenes. Por ende se requerirían análisis genéticos específicos para determinar el origen del transgen. El barcoding de ADN es un método exitoso para identificar y clasificar organismos de acuerdo

a una secuencia corta de nucleótidos (Keller *et al.* 2015), dado que este método contempla un amplio rango de variación interespecífica (Mohamadzade *et al.* 2018), resulta ideal para determinar el origen del transgen en las muestras.

A pesar de que no se determinó el origen botánico de los transgenes, los resultados evidencian que los OGM están interactuando en el ambiente con organismos *no blanco* en el estado de Puebla. Dado que casi todas las muestras analizadas en el presente trabajo mostraron únicamente la presencia del transgen *cp4-epsps*, el cual confiere la tolerancia al glifosato, es prudente señalar los efectos de dicho herbicida en las abejas melíferas.

IV. Presencia de transgenes e interacción con herbicidas: una explicación al decremento en la producción de miel y altas tasas de mortalidad de colonias

El glifosato es el principal ingrediente activo de varios herbicidas de amplio espectro utilizados para eliminar la vegetación “no deseada” (Motta, *et al.* 2018). Sin embargo, cuando se elimina la vegetación silvestre que provee refugio y recursos a la artropofauna, ésta se reduce en términos de riqueza y abundancia, lo cual afecta directamente a pequeños mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Schütte *et al.*, 2017).

La efectividad del glifosato se basa en su acción específica para inhibir la ruta metabólica del shikimato, realizada exclusivamente por plantas y microorganismos (Motta *et al.* 2020). Dado que los animales carecen de la ruta de shikimato, no resultan directamente afectados por el glifosato (Mir *et al.*, 2013). No obstante, este herbicida afecta de diversas formas a organismos no blanco presentes en el suelo y el agua. Tal es el caso del decremento en la reproducción de lombrices en los suelos (Gaupp-Berghausen *et al.*, 2015) y de anfibios en cuerpos de agua (Brühl *et al.*, 2013), así como el crecimiento desequilibrado de microalgas y bacterias acuáticas (Tsui y Chu, 2003). El uso del glifosato también se asocia con alteraciones en los microbiomas de las plantas, tanto endófitos, como de la rizósfera (Van Bruggen *et al.*, 2018), así como con cambios importantes en las microbiotas de diversos animales, entre ellos, las abejas eusociales.

La salud de las abejas eusociales está directamente relacionada con la composición, diversidad y abundancia de la microbiota intestinal (Motta *et al.*, 2018). Dado que el glifosato afecta el crecimiento de microorganismos, la exposición directa o indirecta a este herbicida puede causar disbiosis (Motta *et al.*, 2022). Las enzimas EPSPS se dividen en dos clases. La clase I se encuentra en todas las plantas y algunas bacterias y es altamente sensible al glifosato; la clase II se encuentra únicamente en bacterias y puede tolerar altas

concentraciones de glifosato (Motta *et al.*, 2018; Mir *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la mayoría de bacterias presentes en la microbiota intestinal de las abejas melíferas tienen una ruta funcional de shikimato con enzimas EPSPS de clase I y II (Motta *et al.*, 2020). Por ende se puede deducir que el glifosato inhibe selectivamente algunas bacterias de la microbiota intestinal de las abejas eusociales (Motta *et al.*, 2018; Motta *et al.*, 2020).

La microbiota intestinal de *Apis mellifera*, *Bombus* spp. y otras especies del género *Apis*, se componen principalmente por nueve *clusters* de especies bacterias: *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium*, *Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5 (Kwong y Moran, 2016), las cuales son indispensables para su desarrollo, nutrición, comportamiento e inmunidad (Motta y Moran, 2020). Conforme a Motta y Moran (2020), *Snodgrassella alvi* es la especie más sensible al glifosato. Dicha bacteria facilita la colonización de otros microorganismos benéficos en el tracto intestinal, además de que lo protege de patógenos mediante la formación de una biopelícula. Por lo tanto, la ausencia o reducción de esta bacteria afecta significativamente la composición de la microbiota (Motta y Moran, 2020).

Las abejas melíferas desarrollan su microbiota durante los primeros días de vida después de emerger de la pupa (Kwong y Moran, 2016). Los estados larvarios son alimentados con el polen y néctar llevado a las colmenas, por lo que están directamente expuestos a residuos de glifosato, y, por lo tanto, resultan más susceptibles a perturbaciones en la microbiota intestinal (Motta y Moran, 2020).

Por otro lado, las abejas reinas poseen una fisiología y dieta particular, lo cual supone que tienen una microbiota intestinal distinta a la de las abejas obreras hembras y a los drones machos. La jalea real con la que se alimentan las reinas y larvas provee elementos importantes para la respuesta inmune de la colmena. Según Faight *et al.* (2022), si bien la exposición de las abejas a herbicidas derivados del glifosato provoca cambios en las glándulas hipofaríngeas, lo cual reduce la producción de jalea real, los cambios en la composición proteica de la jalea real aún son desconocidos (Faight *et al.*, 2022).

Por otro lado, las abejas obreras adultas son más propensas a estar en contacto directo con el glifosato al forrajear polen y néctar, lo cual incrementa la probabilidad de que mueran en esta etapa de su ciclo de vida. Estudios como el de Balbuena *et al.* (2015) y Gonalons y Farina (2018) han demostrado que el glifosato afecta las capacidades cognitivas y olfativas de las abejas sociales, necesarias para el vuelo y el regreso a sus colmenas. Además, corren el riesgo de ser expulsadas de la colonia por otras abejas obreras al estar contaminadas por dicho producto. Dentro de los impactos negativos, Vázquez *et al.* (2020) también han

identificado alteraciones negativas en el sueño de las abejas melíferas, lo cual repercute en la salud de las colonias enteras.

Dado que las abejas se auto asean como mecanismo de higiene dentro de las colmenas (Zhukovskaya *et al.* 2013), el contacto tópico directo o indirecto de los pesticidas con el cuerpo se vuelve una ingestión. La exposición por vía oral causa la muerte u otros efectos subletales como daños en la expresión génica (Gregorc *et al.* 2012), alteraciones enzimáticas y daño oxidativo (Boily *et al.* 2017; Helmer *et al.* 2015). Este tipo de estudios toxicológicos con parámetros moleculares y bioquímicos busca entender y explicar los efectos negativos del glifosato en la salud de las abejas, la cual, en último término, se refleja en la supervivencia y mortalidad de las colmenas (Battisti *et al.* 2021).

Si bien las abejas obreras adultas que forrajean son vulnerables a altas concentraciones de glifosato de forma oral y tópica, y esto supone una serie de consecuencias negativas ya señaladas, los efectos de este herbicida dentro de la colmena y sus efectos en el proceso de desarrollo de las primeras etapas de vida en las abejas melíferas merecen particular atención (Vázquez *et al.*, 2018; Vázquez *et al.*, 2020).

En contraste al uso del glifosato, los efectos directos de OGMs en abejas han sido escasamente discutidos. Se ha demostrado que las proteínas Cry presentes en las fuentes de alimento producen efectos subletales en abejas melíferas. De acuerdo con Ramirez-Romero *et al.* (2008), los cultivos transgénicos de *Zea mays* que expresan proteínas Cry afectan el aprendizaje y la plasticidad del comportamiento de forrajeo, lo cual perjudica la eficiencia *Apis mellifera* para alimentarse.

La exposición de las abejas melíferas jóvenes a las toxinas *Bt* modificadas puede causar efectos nocivos en su desarrollo y aprendizaje (Ramirez-Romero *et al.*, 2008). Durante sus primeras etapas de vida, las abejas melíferas desarrollan las estructuras fisiológicas involucradas en el olfato y aprendizaje, como las glándulas hipofaríngeas (Babendreier *et al.*, 2005; Ramirez-Romero *et al.*, 2008). Dado que las larvas y adultos jóvenes son alimentados con el polen almacenado en la colmena, la presencia de toxinas *Bt* en el alimento puede ocasionar la acumulación de éstas en los tejidos (Babendreier *et al.*, 2005).

Aunque *Apis mellifera*, al ser una especie introducida en todos los continentes, se considera un modelo de estudio para analizar los efectos de los OGM en organismos *no blanco*, las repercusiones de la interacción con OGM son diferentes en las especies nativas. Los principios precautorios y procesos regulatorios para plantas GM deben considerar los estudios que evidencian los múltiples efectos de los OGMs en la gran diversidad de abejas

nativas, sin dejar de lado las diferencias relevantes en su biología, ciclos de vida y comportamiento (Konrad *et al.*, 2009).

Estudios como el de Seide *et al.* (2018), Ruiz-Toledo *et al.* (2014) y Abraham *et al.* (2018), han demostrado cómo el glifosato y las proteínas Cry tienen efectos letales y alteran el proceso de desarrollo de abejas nativas sociales como *Melipona quadrifasciata*, *Hypotrigona ruspollii* y *Tetragonisca angustula*. Aunado a esto, los estudios que demuestran los efectos del uso de agroquímicos y que la interacción con OGM afecta particularmente a las abejas solitarias son de suma importancia, ya que sus larvas se alimentan exclusivamente de polen durante todo su desarrollo. Por ejemplo, Konrad *et al.*, (2009) han reportado que el consumo de polen genéticamente modificado afecta negativamente la longevidad de la abeja solitaria *Osmia bicornis*.

V. Implicaciones socioambientales de la presencia de transgenes en miel producida en la Sierra Norte de Puebla

El presente trabajo evidenció la presencia de transgenes en muestras de polen y miel de la Sierra Norte de Puebla. Debido a que la presencia de polen GM en la miel es cada vez más frecuente, es pertinente analizar los aspectos sociales y ambientales que enfrenta la producción apícola a pequeña escala, especialmente en el marco del comercio de productos orgánicos.

El desarrollo de estándares y certificaciones orgánicas se promueve como herramientas para incentivar a los individuos a cambiar sus prácticas de consumo para transformar el sistema agroalimentario (Flora *et al.*, 2012). Dado que la adquisición de dichos etiquetados está mediada por instituciones privadas y gubernamentales, se han generado nichos en el mercado para diversas empresas que buscan declararse ambientalmente responsables (Bain y Selfa, 2017).

Actualmente se ha cuestionado la creciente demanda de productos completamente libres de OGMs en un sistema agroalimentario tecnificado donde se favorecen y predominan los avances biotecnológicos (Bain y Selfa, 2017). La descripción de nuevas consecuencias de los cultivos GM en el ambiente ha evidenciado que las certificaciones orgánicas pueden dejar en desventaja a los productores de miel, quienes se vuelven dependientes de las formas en las se utiliza el territorio.

En los sistemas agrícolas intensivos, el manejo apícola tecnificado tiene como objetivo producir miel y cera, además de promover la polinización de determinados cultivos extensivos. No obstante, desde el enfoque agroecológico, las técnicas de manejo de *Apis mellifera* y otras especies de abejas melíferas nativas se diversifican al permitir la planeación y el diseño del paisaje, por ejemplo, al considerar los periodos de floración, preservar la vegetación silvestre, favorecer la siembra de determinadas especies y obtener semillas, al mismo tiempo que mejoran la producción de miel y otros productos (Liere y Philpott, 2017).

Asimismo, la apicultura y meliponicultura desarrollada en proyectos agroecológicos, como el de la comunidad de Ocomantla, articulan las dimensiones ecológicas con las socioeconómicas y sociopolíticas de los sistemas agrícolas alternativos. La agroecología que contempla el manejo apícola orientado a la producción familiar, local y cooperativa brinda numerosos beneficios al ser compatible con las actividades agrícolas, costumbres y medios de vida.

El interés de los jóvenes por el manejo de abejas melíferas en Ocomantla es reciente, pero se ha enriquecido a través del aprendizaje colectivo de técnicas agroecológicas, como la planeación de huertos comestibles y medicinales, compostas, cultivos de hongos, fabricación de biofertilizantes, entre otras. Este tipo de actividades, además de ser complementario al manejo apícola, añade valor económico y simbólico a las dinámicas de producción y trabajo, creando así un nicho en el mercado de productos agroecológicos.

El proyecto agroecológico de Ocomantla ha construido redes para comercializar sus productos entre consumidores que valoran sus técnicas de producción y organización colectiva. Por ejemplo, se ha vinculado con la organización urbana de la Ciudad de México “Mercado Alternativo”, la cual promueve espacios en donde los productores pueden comercializar sus productos sin la necesidad de intermediarios, al mismo tiempo que favorecen la solidaridad entre los productores y consumidores.

La organización colectiva de los productores apícolas es una forma de aumentar sus ingresos, generar oportunidades económicas en áreas rurales, proteger la biodiversidad y promover el consumo de alimentos agroecológicos. Dado que en la actualidad las preocupaciones hacia la salud de los polinizadores van en aumento, los colectivos de apicultores y meliponicultores son reconocidos no solo por la producción de miel, sino también por sus estrategias de organización, participación y empoderamiento social (Wolff *et al.*, 2015).

Debido a que el manejo apícola es una actividad que depende de cómo se utilizan los territorios, y que además es vulnerable a daños ambientales y al cambio climático, los colectivos de apicultores y meliponicultores suelen formar parte de movimientos sociales que promueven la solidaridad y acción social respecto a problemáticas ambientales (Suryanarayanan *et al.*, 2014). Existen numerosos ejemplos de movimientos que han ganado influencia global y han logrado impactos macroinstitucionales. Un buen ejemplo de esto es la organización de cooperativas de apicultores en la Península de Yucatán que logró revocar la autorización de siembra de soya GM.

El presente trabajo recalca la importancia de fortalecer la comercialización de productos agroecológicos, particularmente la miel. En lugar de limitar la aceptación de los productos apícolas en el mercado en dependencia de la presencia o ausencia de OGM, se propone considerar las técnicas empleadas, el manejo de las abejas y el cuidado de la biodiversidad como un parámetro de calidad. Asimismo, la metodología empleada en el presente trabajo es una propuesta para monitorear la presencia de transgenes en proyectos apícolas agroecológicos, con el fin de evidenciar la interacción de OGM con flora y fauna nativa.

Si bien el presente trabajo evidenció la presencia del transgen *cp4-epsps*, es necesario, como trabajo subsecuente, determinar la especie de origen del transgen mediante técnicas de secuenciación genómica. Si dicho transgen proviene de *Zea mays* o *Gossypium hirsutum*, las colmenas muestreadas en el proyecto agroecológico de Ocomantla representan una oportunidad para monitorear los efectos en artrópodos polinizadores a corto, largo y mediano plazo. Dado que los transgenes *cp4-epsps* interactuaron con una especie de abeja nativa, es importante recalcar la relevancia y urgencia de estudios que exploren los efectos moleculares, bioquímicos, etológicos, ecológicos y evolutivos de la interacción de abejas nativas con plantas GM.

Ya que el transgen *cp4-epsps* confiere la tolerancia a diversos herbicidas derivados del glifosato, es pertinente considerar a este último como una de las posibles causas de las bajas en la producción de miel y las altas tasas de mortalidad en colmenas del Municipio de Zihuateutla, sin embargo, es necesario determinar si la presencia de dicho transgen se vincula con el uso de herbicidas a base de glifosato, para lo cual se deben realizar pruebas fisicoquímicas a las muestras de polen y miel.

CONCLUSIONES

El manejo apícola y la interacción con OGM es un fenómeno cada vez más frecuente de tal forma que la presencia de polen GM en la miel resulta inevitable. Sin embargo, las técnicas de producción agroecológicas y la organización colectiva de apicultores y meliponicultores pueden compensar los efectos negativos del rechazo en el mercado orgánico, al promover la apicultura agroecológica y el manejo de abejas melíferas nativas como una forma de cuidar la biodiversidad en un sistema agroalimentario en crisis.

El conocimiento generado mediante el estudio particular de las colmenas del proyecto agroecológico en la comunidad de Ocomantla, es una propuesta para cuestionar los retos y limitaciones de las certificaciones orgánicas. Así como considerar los procesos de producción, cuidado de la heterogeneidad territorial y biodiversidad como cualidades de mayor relevancia en la comercialización de miel.

El muestreo de polen recolectado directamente de las colmenas de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* mediante el raspado de celdas o potes de polen, junto con la toma de coordenadas geográficas, así como el etiquetado y almacenamiento adecuado, resultan un método accesible y eficiente para todo aquel que desee recabar información sobre las preferencias y patrones de forrajeo de abejas melíferas.

Por otro lado, la extracción de ADN de polen utilizando el protocolo Doyle y Doyle (1987) con las modificaciones mencionadas resultó exitosa, ya que se obtuvo ADN botánico de buena calidad que permitió llevar a cabo análisis PCR punto final. A pesar de esto la concentración y calidad del ADN se ven afectadas por la variación en los procesos de fermentación durante el almacenamiento en las celdas y potes.

En los análisis PCR punto final, se detectó la presencia del gen *cp4-epsps* en la muestra de miel de cosechada *Apis mellifera* en 2019, al igual que se detectó la presencia de dicho gen en 31 de las 32 muestras de polen analizadas. En las muestras de polen colectado por *Scaptotrigona mexicana*, se detectó la presencia del gen *cp4-epsps* en 19 de los 20 potes analizados. Sin embargo, no se detectó la presencia de transgenes *cry1Ac* ni *cry2AB* en ninguna muestra.

En el presente trabajo únicamente se determinó la presencia/ausencia de transgenes *cp4-epsps*, *cry1Ac* y *cry2AB*. Se requieren análisis genéticos específicos para determinar el origen de dichos transgenes. No obstante, los resultados evidencian que los gametos GM están interactuando en el ambiente con organismos *no blanco* en el estado de Puebla.

Anexo 1: Protocolo de obtención de polen de miel

Objetivo: extraer polen de muestras de miel para posteriormente obtener ADN.

1. En caso de que la miel se encuentre cristalizada, es necesario calentarla en baño María. La miel debe estar completamente líquida para facilitar su manejo.
2. Pesar 12.5 gramos de miel en tubos falcon de 50ml.

Primer lavado.

3. Calentar agua destilada a 50 ° C y aforar cada tubo falcon a 20 ml.
4. Disolver los cristales de azúcar en la miel agitando el tubo manualmente. Procurar que los azúcares estén disueltos por completo antes de centrifugar.
5. Centrifugar las muestras a 2700 rpm por 10 minutos.

Segundo lavado.

6. Desechar el sobrenadante y aforar cada tubo falcon a 20 ml con agua destilada a 50 ° C
7. Centrifugar las muestras a 2700 rpm durante 5 minutos.
8. Desechar sobrenadante.

Tercer lavado.

9. Con ayuda de una micropipeta de 1000 µL, resuspender los pellets y transferirlos a tubos de 1.5ml con seguro para Tissue Lyser II.
10. Aforar las muestras a 1.5 ml.
11. Centrifugar a 2700 rpm durante 5 minutos.
12. Desechar el sobrenadante y añadir 50 µL de agua destilada a cada muestra.
13. Guardar las muestras a 4 ° C para su almacenamiento prolongado.

Anexo 2: Disrupción de polen para extracción de ADN

1. Descongelar muestras de polen y resuspender los pellets con 100 μ L de agua destilada.
2. Transferir las muestras a tubos para microcentrífuga de 2 mL con tapa de seguro.
3. Colocar en cada tubo balines para lisis⁷.
4. Colocar las muestras en el equipo TissueLyser II de Quiagen por 1 minuto a 30 Hz.

⁷ En este protocolo se utilizaron los balines contenidos en los *tubos de lisis Bashing Beads* del Kit de Bioline *ISOLATE II Fecal DNA* y los balines contenidos en los tubos para lisis *ZR BashingBead Lysis Tubes (0.5 mm)* de Zymo Research.

**Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN con CTAB, modificado de Doyle y Doyle
(1987)**

1. Agregar a cada muestra 751 μL de CTAB y 1.5 μL de β mercapto. Calcular las cantidades de reactivo necesario para el total de muestras y preparar dentro de la campana.
2. Incubar las muestras con movimiento a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, añadir 4 μL de proteinasa K e incubar nuevamente por 30 minutos a la misma temperatura. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Agregar 750 μL de una mezcla fría de 24:1 de cloroformo. Agitar en el vortex hasta formar dos fases.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 600 rpm a temperatura ambiente.
5. Recuperar la fase acuosa, procurando no contaminarla y desechar el resto. Trasladar la acuosa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.
6. Agregar 2 volúmenes de isopropanol frío, aforando todos los tubos a 1.5 ml.
7. Agitar ligeramente para homogeneizar. Dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de dejar precipitar los ácidos nucleicos. Una vez transcurrido el tiempo, verificar que el tubo se vea completamente translúcido.
8. Dejar reposar las muestras en isopropanol durante 17 horas a 4°C .
9. Centrifugar 10 minutos a 6,000 rpm a temperatura ambiente.
10. Desechar el sobrenadante y dejar los pellets en el tubo.
11. Agregar 1 ml de etanol al 70% a cada tubo.
12. Centrifugar 5 minutos a 7000 rpm a 4°C .
13. Dejar que se evapore por completo el etanol de cada muestra.
14. Resuspender la muestra con 50 μL de agua libre de nucleasas.
15. Almacenar las muestras a -20°C .

Anexo 4: Protocolo de realización de PCR punto final

Se utilizó siguiente fórmula para calcular los volúmenes y concentraciones:

$$C1 V1=C2 V2$$

Donde:

- C1= concentración inicial
- C2= concentración final
- V1= volumen para una muestra
- V2= volumen para total de muestras

Realización de PCR Punto Final para muestras provenientes de mezcla de mieles de los cuatro apiarios CanFlor, colectada en 2019

Reactivo	Concentración inicial (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una muestra (V1)	Volumen para el total de muestras (V2)
H2O	-	-	10.8 µL	97.2 µL
PCR Buffer	5X	1x	5.0 µL	45.0 µL
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3.0 µL	27.0 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL	4.5 µL
Forward Primer Cry1AC	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Reverse Primer Cry1AC	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Taq	5 u/µL	1 u	0.1µL	0.9 µL

* Se utilizaron 5 µL de ADN por muestra

Tabla 5: reactivos utilizados para PCR realizado el 5 de noviembre de 2019 para corroborar presencia/ausencia del transgen *cry1Ac*. Para un total de 9 muestras (6 muestras, control positivo, control negativo y tributo).

Reactivo	Concentración inicial (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una muestra (V1)	Volumen para el total de muestras (V2)
H2O	-	-	10.1 µL	90.9 µL
PCR Buffer	5X	1x	5.0 µL	45.0 µL
MgCl ₁₂	25 mM	3 mM	3.0 µL	27.0 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL	4.5 µL
Forward Primer Cry2AB	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Reverse Primer Cry2AB	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Forward primer CP4 EPSPS	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Reverse Primer CP4 EPSPS	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Taq	5 u/µL	2 u	0.2 µL	1.8 µL

* Se utilizaron 5 µL de ADN por muestra.

Tabla 6: Reactivos utilizados para PCR realizado el 5 de noviembre de 2019 para corroborar presencia/ausencia de los transgenes *cry2Ab* y *cp4-epsps*. Para un total de 9 muestras (6 muestras, control positivo, control negativo y tributo).

Reactivo	Concentración inicial (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una muestra (V1)	Volumen para el total de muestras (V2)
H2O	-	-	10.8 µL	97.2 µL
PCR Buffer	5X	1x	5.0 µL	45.0 µL
MgCl ₁₂	25 mM	3 mM	3.0 µL	27.0 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL	45.0 µL
Forward Primer	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL

CP4 EPSPS				
Reverse Primer CP4 EPSPS	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	2.7 µL
Taq	5 u/µL	1 u	0.1 µL	0.9 µL

* Se utilizaron 5 µL de ADN por muestra.

Tabla 7: Reactivos utilizados para PCR realizado el 20 de noviembre de 2019 para corroborar presencia/ausencia del transgen *cp4-epsps*. Para un total de 9 muestras (6 muestras, control positivo, control negativo y tributo).

**Realización de PCR Punto Final para muestras provenientes de apiarios CanFlor
muestreados por separado (*Apis mellifera*) y potes de polen de *Scaptotrigona mexicana*,
muestras colectadas en 2020**

Reactivo	Concentración inicial (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una muestra (V1)	Volumen para el total de muestras (V2)
H2O	-	-	13.2 µL	462 µL
PCR Buffer	5X	1x	5.0 µL	175 µL
MgSO4	25 mM	3 mM	3.0 µL	105 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL	17.5 µL
Forward Primer Cry2AB	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	10.5 µL
Reverse Primer Cry2AB	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	10.5 µL
BSA	10 mM	-	0.5 µL	17.5 µL
Taq	5 u/µL	1 u	0.2 µL	7 µL

* Se utilizaron 2 µL de ADN por muestra.

Tabla 8: Reactivos utilizados para PCR realizado el 7 de diciembre de 2021 para corroborar presencia/ausencia del transgen *cry2Ab*. Para un total de 35 muestras (32 muestras, control positivo, control negativo y tributo).

Reactivo	Concentraci3n inicial (C1)	Concentraci3n final (C2)	Volumen para una muestra (V1)	Volumen para el total de muestras (V2)
H2O	-	-	13.2 µL	462 µL
PCR Buffer	5X	1x	5.0 µL	175 µL
MgSO4	25 mM	3 mM	3.0 µL	105 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL	17.5 µL
Forward Primer CP4 EPSPS	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	10.5 µL
Reverse Primer CP4 EPSPS	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	10.5 µL
BSA	10 mM	-	0.5 µL	17.5 µL
Taq	5 u/µL	1 u	0.2 µL	7 µL

* Se utilizaron 2 µL de ADN por muestra.

Tabla 9: Reactivos utilizados para PCR realizado el 7 de diciembre de 2021 para corroborar presencia/ausencia del transgen *cp4-epsps*. Para un total de 35 muestras (32 muestras, control positivo, control negativo y tributo).

Reactivo	Concentraci3n inicial (C1)	Concentraci3n final (C2)	Volumen para una muestra (V1)	Volumen para el total de muestras (V2)
H2O	-	-	17.3 µL	605.5 µL
PCR Buffer	10X	1x	2.5 µL	87.5 µL
MgSO4	50 mM	3 mM	1.5 µL	52.5 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL	17.5 µL
Forward Primer Cry1AC	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	10.5 µL
Reverse Primer Cry1AC	10 mM	0.12 mM	0.3 µL	10.5 µL
BSA	10 mM	-	0.5 µL	17.5 µL
Taq	10 u/µL	1 u	0.1 µL	3.5 µL

* Se utilizaron 2 µL de ADN por muestra

Tabla 10: Reactivos utilizados para PCR realizado el 8 de diciembre de 2021 para corroborar presencia/ausencia del transgen *cry1Ac*. Para un total de 35 muestras (32 muestras, control positivo, control negativo y tributo). En esta reacci3n se realiz3 un cambio de reactivos y Taq polimerasa (anexo 6).

Notas:

Para las reacciones de PCR realizadas 5 y 20 de noviembre de 2019 se utilizó la termocicladora *GeneAmp PCR System 9700* de *Applied Biosystems*. Para las reacciones realizadas el 7 y 8 de diciembre de 2021 se utilizó la termocicladora *Mastercycler, Nexus Gradient de Eppendorf*. Las condiciones de reacción para los tres transgenes fueron las siguientes: 95 °C por 8 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95 °C de 20 segundos (desnaturalización), 61 °C por un minuto (alineamiento), 72 °C por un minuto (extensión) y una extensión final de 72 °C por 8 minutos.

Anexo 5: Protocolo para preparación de geles de agarosa, visualización de la integridad de ADN y productos PCR por medio de electroforesis

Proporciones para geles de 20 de peines:

- Para geles al 1% pesar 1.0 g de agarosa.
- Para geles al 1.5% pesar 1.5 de agarosa.
- Para geles al 2% pesar 2.0 g de agarosa.

Cantidades de productos para visualización:

- Para visualizar integridad de ADN: Colocar sobre parafilm 2 μ L de ADN, con 3 μ L de buffer de carga.
- Para visualizar productos PCR: Colocar sobre parafilm 3 μ L del producto PCR con 3 μ L de buffer de carga.

Procedimiento:

- 1) En un matraz colocar 100 ml de TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) al 0.5X con un pH de 8.0
- 2) Calentar la mezcla dentro del matraz por aproximadamente 1 minuto. Mezclar por agitación hasta que la mezcla esté completamente traslúcida.
- 3) Verter la mezcla en el molde con peines. Dejar enfriar hasta solidificar por completo. Retirar cuidadosamente los peines.
- 4) Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis previamente calibrada y llenar con TBE 0.5X.
- 5) Cargar cada muestra en un pozo dentro de la cámara de electroforesis.
- 6) Conectar la cámara de electroforesis a una fuente de poder, asegurándose que el ADN corra del polo negativo al positivo.
- 7) Dejar correr el gel a 85 Volts por 40 minutos.
- 8) Visualizar los resultados en una cámara con exposición a rayos UV (480 nm).

Anexo 6: Controles positivos utilizados en PCRs punto final

Transgen	Especie de procedencia	Origen de la muestra	Clave
<i>cry1Ac</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Pinotepa de Don Luis, Oaxaca	S3-13
<i>cry2Ab</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Pinotepa de Don Luis, Oaxaca	S1-10
<i>cp4eps</i> <i>ps</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Pinotepa de Don Luis, Oaxaca	S2-7

Tabla 11: Controles positivos proporcionados por Daniel Morales Villegas, como parte de su trabajo de licenciatura “Monitoreo de transgenes en variedades de algodón nativo en cultivos de la Costa Chica de Oaxaca”

Anexo 7: Características de los *primers* empleados para PCR punto final

Nombre del oligo	Secuencia del oligo (5'-3')	Peso Molecular (MW)	Punto de Fusión (TM)	Concentración	Peso del amplicón
CP4_Barbau12_F	5'- GCA TGC TTCACG GTG CAA -3'	5,499.6 g/mol	56.9 °C	10 mM	108 pb (Barbau Piednoir et al., 2012)
CP4_Barbau12_R	5'- TGA AGG ACC GGT GGG AGAT -3'	5,957.9 g/mol	58.1 °C	10 mM	108 pb (Barbau Piednoir et al., 2012)
Cry2Ab_Randhawa10_F	5'- CAG CGG CGC CAA CCT CTA CG -3'	6,048.0 g/mol	63.5 °C	10 mM	260 pb (Randhawaet al., 2010)
Cry2Ab_Randhawa10_R	5'- TGA ACG GCG ATG CAC CAAT TGT -3'	6,744.4 g/mol	60.6 °C	10 mM	260 pb (Randhawaet al., 2010)
Cry1Ac_Randhawa13_F	5'- GAC CGC TTA CAA GGA GGG ATA CG -3'	7,122.7 g/mol	59.1 °C	10 mM	228 pb (Randhawa y Chhabra, 2013)
Cry1Ac_Randhawa13_R	5'- ACG GAG GCA TAG TCA GCA CC -3'	7,107.7 g/mol	62.8 °C	10 mM	228 pb (Randhawa y Chhabra, 2013)

Tabla 12: Información de los *primers* utilizados marca Integrated DNA Technologies (IDT)

Anexo 8: Especificaciones de reactivos utilizados

Reactivo	Marca	Nombre comercial	Concentración
Proteinasa K	Thermo Scientific	Proteinase K (recombinant) PCR grade	20 mg/mL
β mercapto	Sigma Aldrich	2- Mercaptoethanol	78.13 g/mol

Tabla 13: Reactivos utilizados para el protocolo de extracción de ADN con CTAB, modificado de Doyle y Doyle (1987)

Reactivo	Marca	Nombre comercial	Concentración
H2O libre de nucleasas	Sigma Aldrich	Nuclease-Free Water, for Molecular Biology	-
PCR Buffer	Promega	Colorless, GoTaq Flexi Buffer	5X
MgCl12	Promega	MgCl12	25mM
dNTPs	Thermo Scientific	dNTP Set, molecular biology grade	4X 100 μ mol
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	New England BioLabs	BSA (Molecular Biology Grade)	20 mg/ml
Forward Primer Cry2AB	IDT	Cry2Ab_Randhawa10_F	10 mM
Reverse Primer Cry2AB	IDT	Cry2Ab_Randhawa10_R	10 mM
Forward Primer CP4 EPSPS	IDT	CP4_Barbau12_F	10 mM
Reverse Primer CP4 EPSPS	IDT	CP4_Barbau12_R	10 mM
Taq polimerasa	Promega	GoTaq Flexi DNA Polymerase	5 u/ μ L

Tabla 14: Reactivos utilizados en la realización de PCR punto final, el 5, 20 de noviembre de 2019 y 7 de diciembre de 2021

Reactivo	Marca	Nombre comercial	Concentración
H2O libre de nucleasas	Sigma Aldrich	Nuclease-Free Water, for Molecular Biology	-
PCR Buffer	Invitrogen	10X High Fidelity PCR Buffer	10X
MgSO4	Invitrogen	MgSO4	50 mM
dNTPs	Thermo Scientific	dNTP Set, molecular biology grade	4X 100µmol
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	New England BioLabs	BSA (Molecular Biology Grade)	20 mg/ml
Forward Primer Cry1AC	IDT	Cry1Ac_Randhawa13_F	10 mM
Reverse Primer Cry1AC	IDT	Cry1Ac_Randhawa13_R	10 mM
Taq polimerasa	Invitrogen	Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	10 u/µL

Tabla 15: Reactivos utilizados en la realización de PCRs punto final, el 8 de diciembre de 2021

Reactivo	Marca	Nombre comercial	Concentración
Agarosa	Roche	Agarose MP (Grado para biología molecular)	-
Agarosa	Vivantis	Agarose LP (Grado para biología molecular)	-
Buffer de carga	Promega	Green Go taq Flexi Buffer	5X
Escalera molecular	Vivantis.	VC 100bp Plus DNA Ladder	5x
Escalera molecular	Bioline	Hyperladder 100bp	5x

Tabla 16: Reactivos utilizados para la visualización de la integridad de ADN y productos PCR por medio de electroforesis

Anexo 9: Maíz sembrado cerca de los apiarios muestreados

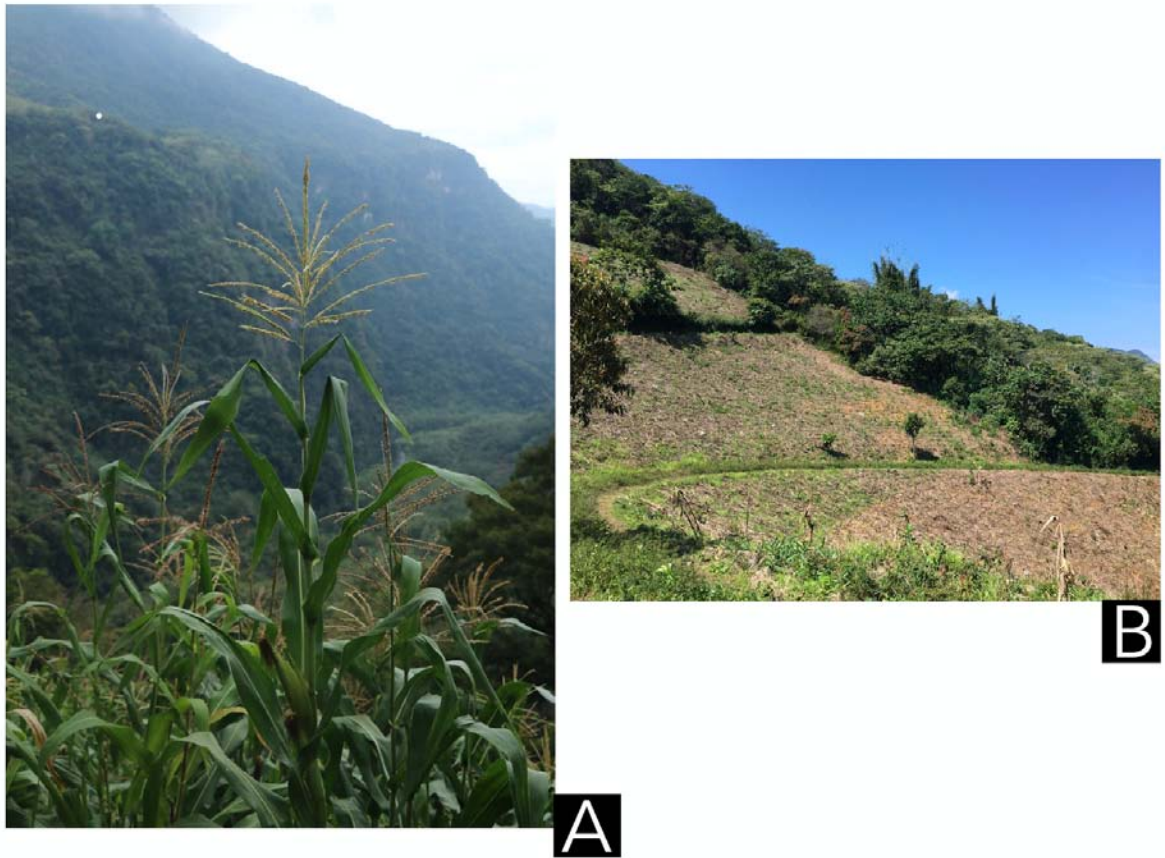


Figura 31: A) Cultivo de maíz cercano al apiario “ADVC Koliijke”, enero 2021 B) Terreno de cultivo anual de maíz, cerca del apiario “Ojo de agua/Tranca de Fierro”, enero 2020.

Anexo 10: Tabla de eventos de liberación de Organismos Genéticamente Modificados en México (proteínas Cry y EPSPS)⁸

Nombre comercial	Evento	Compañía	Genes insertos	Año de liberación	Característica conferida
Alfalfa Roundup Ready™	J101	Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4)	2005 Y 2010	Tolerancia a herbicidas con glifosato

Tabla 17: eventos de liberación de *Medicago sativa* (alfalfa) GM en México (proteínas Cry y EPSPS).

Nombre comercial	Evento	Compañía	Genes insertos	Año de liberación	Característica conferida
Canola Roundup Ready™, Canola TruFlex™ Roundup Ready™	GT73 (RT73), MON88302	Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4) y goxv247	1996 y 2013	Tolerancia a herbicidas con glifosato
InVigor™ x TruFlex™ Roundup Ready™ Canola	MON88302 XMS8 XRF3	Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4), bar, barnasa y estrella de bar.	2015	Tolerancia a herbicidas con glifosato y alteraciones en la fertilidad de la planta

Tabla 18: eventos de liberación de *Brassica napus* (Canola Argentina) GM en México (proteínas Cry y EPSPS).

Nombre comercial	Evento	Compañía	Genes insertos	Año de liberación	Característica conferida
Algodón WideStrike™	281-24-236 X 3006-210-23 (MXB-13)	Dow AgroSciences LLC	Endotoxina delta Cry1Ac, Endotoxina delta	2004	Resistencia a los insectos lepidópteros

⁸ Información disponible en <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=Any&TraitTypeID=Any&DeveloperID=Any&CountryID=MX&ApprovalTypeID=Any>

			Cry1F y enzima PAT		
Algodón WideStrike™ Roundup Ready™, Algodón Widestrike™ Roundup Ready Flex™ y Widestrike™ x Roundup Ready Flex™ x VIPCOT™ Cotton	3006-21 0-23 X 281-24-236	Dow AgroSciences LLC y Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4), Endotoxina delta Cry1Ac, Endotoxina delta Cry1F y enzima PAT	2005 y 2008	Tolerancia a herbicidas con glifosato, resistencia a los insectos lepidópteros, resistencia a antibióticos
Bollgard® III y Bollgard® II	COT102 X MON15985	Monsanto Company	Endotoxina delta Cry1Ac, Endotoxina delta Cr21Ab, marcadores de selección (mida, nptII, aph4)	2003 y 2014	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a los insectos lepidópteros
GlyTol™, Glyto™ x Twinlink™ y Algodón Glyto™ x Twinlink™ x VIPCOT™	GHB614	Bayer CropScience	Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (versión doble mutante, proveniente de Zea mays), Endotoxina delta Cr21Ab, Endotoxina delta Cry1Ac, enzima PAT	2008, 2012	Tolerancia a herbicidas con glifosato
Algodón Roundup Ready™	MON1445	Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4), marcador de selección nptII.	2000	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a antibióticos

Algodón Roundup Ready™ Bollgard II™	MON15985	Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4), endotoxina delta Cry1Ac, Endotoxina delta Cr21Ab, marcadores de selección (mida, nptll, aph4)	2006	Tolerancia a herbicidas con glifosato, confiere resistencia a los insectos lepidópteros y resistencia a antibióticos
Bollgard™ Cotton, Ingard™	MON231	Monsanto Company	Endotoxina delta Cry1Ac, marcador de selección nptll.	1996	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a antibióticos
Algodón Roundup Ready™ Flex™	MON88913	Monsanto Company	cp4 epsps (aroA:CP4)	2006	Tolerancia a herbicidas con glifosato
Algodón Roundup Ready™ Flex™ Bollgard II™	MON88913 X MON15985	Monsanto Company	epsps cp4 (aroA:CP4), endotoxina delta Cry1Ac, Endotoxina delta Cr21Ab, marcadores de selección (mida, nptll, aph4)	2006	Tolerancia a herbicidas con glifosato, confiere resistencia a los insectos lepidópteros y resistencia a antibióticos

Tabla 19: eventos de liberación de *Gossypium hirsutum* (Algodón)GM en México (proteínas Cry y EPSPS).

Nombre comercial	Evento	Compañía	Genes insertos	Año de liberación	Característica conferida
No disponible	3272 X Bt11 X MIR604 X GA21	Syngenta	Endotoxina delta Cry1Ac, Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfa to sintasa (versión doble mutante,	2010	Tolerancia a herbicidas con glifosato, resistencia a insectos coleópteros y lepidópteros

			proveniente de Zea mays), marcadores de selección (mida, nptII, aph4), y enzima PAT		
Agrisure® Duracade™ 5122 y Agrisure® Duracade™ 5222, Agrisure® Duracade™	5307 X MIR604 X Bt11 X TC1507 X GA21	Syngenta	Endotoxina delta Cry1Ac, proteína delta endotoxina quimérica (Cry3A-Cry1Ab), enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (versión doble mutante, proveniente de Zea mays), marcadores de selección (mida, nptII, aph4), y enzima PAT	2013	Tolerancia a herbicidas con glifosato, resistencia a insectos coleópteros y lepidópteros
Herculex™ RW Roundup Ready™ 2	59122 X NK603	DuPont	enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (versión doble mutante, proveniente de Zea mays), Endotoxina delta Cry34Ab1 y Cry35Ab1	2006	Tolerancia a herbicidas con glifosato, resistencia a insectos coleópteros y lepidópteros
Agrisure™ CB/LL y Agrisure® 3122	Bt11 (X4334CBR, X4734CBR),	Syngenta	enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfa	2007 y 2010	Tolerancia a herbicidas con glifosato y

	Bt11 X 59122 X MIR604 X TC1507 X GA21, Bt11x GA21		to sintasa (versión doble mutante, proveniente de Zea mays), Endotoxina delta Cry1Ac y enzima PAT		resistencia a insectos lepidópteros
Agrisure® Viptera™ 3110	Bt11 X MIR162	Syngenta	Endotoxina delta Cry1Ac.	2017	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a insectos lepidópteros
Maíz Roundup Ready™, Agrisure™GT	GA21	Monsanto Company	enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfa to sintasa (versión doble mutante, proveniente de Zea mays)	2002	Tolerancia a herbicidas con glifosato
Mavera™ YieldGard™ Maize	LY033 X MON810	Renesen LLC and Monsanto Company	cordapA, cry1Ab	2008	Incrementa la producción de lisina y confiere resistencia a insectos lepidópteros
No disponible	SYN-IR162-4 x MON-89Ø34-3	Syngenta	vip3a20, pmi, cry2Ab2, cry1A	2017	Resistencia a los insectos lepidópteros
YieldGard™, MaizeGard™	MON-ØØ81Ø-6	Monsanto Company	cry1Ab, grox247, cp4-epsps, nptII	2002	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a insectos lepidópteros

YieldGard™ VT Triple	MON-00810-6 x MON-88017-3	Monsanto Company	cry1Ab, cry3Bb1, cp4-epsps, nptII	2006	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a insectos lepidópteros
-------------------------	------------------------------	---------------------	---	------	--

Tabla 20: eventos de liberación de *Zea mays* (Maíz) GM en México (proteínas Cry y EPSPS).

Nombre comercial	Evento	Compañía	Genes insertos	Año de liberación	Característica conferida
No disponible	DAS81419	Dow AgroSciences LLC	cry1Ac, pat, cry1F	2015	Resistencia a los insectos lepidópteros
Conkesta Enlist E3 Soybean	DAS81419 X DAS44406	Dow AgroSciences LLC	cry1Ac, pat, cry1F, 2mepsps	2016	Resistencia a los insectos lepidópteros
Roundup ready Soybean	GTS 40-3-2 (40-3-2)	Monsanto Company	cp4 epsps (aroA:CP4)	1996	Tolerancia a herbicidas con glifosato
No disponible	MON87701	Monsanto Company	cry1Ac	2010	Resistencia a los insectos lepidópteros
Intacta™ Roundup Ready™ 2 Pro	MON87701 X MON89788	Monsanto Company	cry1Ac, cp4 epsps (aroA:CP4)	2011	Tolerancia a herbicidas con glifosato y resistencia a insectos lepidópteros
Vistive Gold™	MON87705	Monsanto Company	cp4 epsps (aroA:CP4), fatb1-A, fad2-1A	2011	Tolerancia a herbicidas con glifosato
Genuity® Roundup Ready™ 2 Xtend™	MON87708	Monsanto Company	cp4 epsps (aroA:CP4), dmo	2012	Tolerancia a herbicidas con glifosato

No disponible	MON87769X MON89788	Monsanto Company	cp4 epsps (aroA:CP4),Pj.D 6D, Nc.Fad3	2012	Tolerancia a herbidas con glifosato
Genuity® Roundup Ready 2 Yield™	MON89788	Monsanto Company	cp4 epsps (aroA:CP4)	2008	Tolerancia a herbidas con glifosato

Tabla 21: eventos de liberación de *Glycine max L.* (soya) GM en México (proteínas Cry y EPSPS).

REFERENCIAS

- Abraham, J., Benhotons, G. S., Krampah, I., Tagba, J., Amissah, C., & Abraham, J. D. (2018). Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(8), 695–702. <https://doi.org/10.1111/eea.12694>
- Alvarez-Buylla, E., Nelson, A. P., & Trueba, C. C. (Eds.). (2013). *El maíz en peligro ante los transgénicos: un análisis integral sobre el caso de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades.
- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez-Dávila, M. & Maya, E. M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México; con catálogo de especies* (0 ed.). El Colegio de la Frontera Sur : Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. e-ISBN: 978-607-8429-53-0
- Ayala, R., Gonzalez, V. H., & Engel, M. S. (2013). Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge. En P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (Eds.), *Pot-Honey* (pp. 135–152). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_9
- Babendreier, D., Kalberer, N. M., Romeis, J., Fluri, P., Mulligan, E., & Bigler, F. (2005). Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie*, 36(4), 585–594. <https://doi.org/10.1051/apido:2005049>
- Bain, C., & Selfa, T. (2017). Non-GMO vs organic labels: Purity or process guarantees in a GMO contaminated landscape. *Agriculture and Human Values*, 34(4), 805–818. <https://doi.org/10.1007/s10460-017-9776-x>
- Balbuena, M.S., Tison, L., Hahn, M.L., Greggers, U., Menzel, R., Farina, W.M., 2015. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J. Exp. Biol.* 218, 2799–2805. <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>.
- Ballard, H. L., Dixon, C. G. H., & Harris, E. M. (2017). Youth-focused citizen science: Examining the role of environmental science learning and agency for conservation. *Biological Conservation*, 208, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.024>
- Barnosky, A. D., Hadly, E. A., Bascompte, J., Berlow, E. L., Brown, J. H., Fortelius, M., Getz, W. M., Harte, J., Hastings, A., Marquet, P. A., Martinez, N. D., Mooers, A., Roopnarine, P., Vermeij, G., Williams, J. W., Gillespie, R., Kitzes, J., Marshall, C., Matzke, N., ... Smith, A. B. (2012). Approaching a state shift in Earth's biosphere. *Nature*, 486(7401), 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature11018>
- Barraclough, A. D., Sakiyama, M., Schultz, L., & Måren, I. E. (2021). “Stewards of the future: Accompanying the rising tide of young voices by setting youth-inclusive research agendas in sustainability research”. *Sustainable Earth*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42055-021-00041-w>
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Vandermassen, E., Mbongolo-Mbella, E.-G., Leunda-Casi, A., Roosens, N., Sneyers, M., & Van den Bulcke, M. (2012). Four new SYBR®Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready®, LibertyLink®, and CryIAb traits in genetically modified products. *European Food Research and Technology*, 234(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1605-7>

- Baroni, M., Arrua, C., Nores, M., Faye, P., Diaz, M., Chiabrando, G., & Wunderlin, D. (2009). Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*, *114*(2), 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.018>
- Beekman, M., & Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L.: *Honey-bee foraging. Functional Ecology*, *14*(4), 490–496. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00443.x>
- Boily, M., Aras, P., Jumarie, C., 2017. Foraging in maize field areas: a risky business? *Sci. Total Environ.* 601–602, 1522–1532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.014>.
- Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, *41*(3), 278–294. <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Brühl, C. A., Schmidt, T., Pieper, S., & Alscher, A. (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports*, *3*(1), 1135. <https://doi.org/10.1038/srep01135>
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2002. Programa de Manejo Área de Protección de Recursos Naturales Zona Protectora Forestal Vedada Cuenca Hidrográfica del Río Necaxa. México.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2008. Programa de Conservación y Manejo Sitio RAMSAR “Sistema de Represas y Corredores Biológicos de la Cuenca Hidrográfica del Río Necaxa, del APRN “Cuenca Hidrográfica del Río Necaxa”. México.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). *Mieles Peninsulares y Diversidad*; Corredor biológico Mesoamericano México: Sureste de México, México, 2009.
- Coutinho, J. G. E., Hipólito, J., Santos, R. L. S., Moreira, E. F., Boscolo, D., & Viana, B. F. (2021). Landscape Structure Is a Major Driver of Bee Functional Diversity in Crops. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *9*, 624835. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.624835>
- Crall, J. (2022). Glyphosate impairs bee thermoregulation. *Science*, *376*(6597), 1051–1052. <https://doi.org/10.1126/science.abq5554>
- Cunningham, M. M., Tran, L., McKee, C. G., Ortega Polo, R., Newman, T., Lansing, L., Griffiths, J. S., Bilodeau, G. J., Rott, M., & Marta Guarna, M. (2022). Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. *Ecological Indicators*, *134*, 108457. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108457>
- Danner, N., Molitor, A. M., Schiele, S., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2016). Season and landscape composition affect pollen foraging distances and habitat use of honey bees. *Ecological Applications*, *26*(6), 1920–1929. <https://doi.org/10.1890/15-1840.1>
- De la Maza, Roberto. (2015). RESTAURACIÓN DEL ÁREA SINIESTRADA POR LA DEPRESIÓN TROPICAL 11 (4 DE OCTUBRE DE 1999) Y SEGUIMIENTO, A LARGO PLAZO, DE LA SUCESIÓN VEGETAL EN EL ÁREA DEDICADA VOLUNTARIAMENTE A LA CONSERVACIÓN “KOLIJKE”, MUNICIPIO DE ZIHUATÉUTLA, PUEBLA, MÉXICO. Área Destinada Voluntariamente a la Conservación Kolijke, publicación especial No.1. ADVC Kolijke, informes y publicaciones. 1-55.
- De Paula, G. T., Menezes, C., Pupo, M. T., & Rosa, C. A. (2021). Stingless bees and microbial interactions. *Current Opinion in Insect Science*, *44*, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006>

- DOF - *Diario Oficial de la Federación*. (s/f). Recuperado el 27 de abril de 2022, de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5612434&fecha=01/03/2021&print=true
- Dong, J., Gao, K., Wang, K., Xu, X., & Zhang, H. (2015). Cell Wall Disruption of Rape Bee Pollen Treated with Combination of Protamex Hydrolysis and Ultrasonication. *Food Research International*, 75, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.039>
- Doyle JJ., Doyle JL. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11–15.
- Faita, M. R., Chaves, A., Corrêa, C. C. G., Silveira, V., & Nodari, R. O. (2022). Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate. *Chemosphere*, 292, 133334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133334>
- FAO. (2015). Crops, weeds and pollinators. Understanding ecological interaction for better management. Biodiversity and ecosystem services in agricultural production systems. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 96 pp.
- Flora, C. B., Bain, C., & Call, C. (2012). Sustainability Standards and Their Implications for Agroecology. En W. B. Campbell & S. López Ortiz (Eds.), *Integrating Agriculture, Conservation and Ecotourism: Societal Influences* (Vol. 2, pp. 163–225). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4485-1_3
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>
- Gálvez Mariscal, A., Peña Montes, C., Quirasco Baruch, M., Estrada Hernández, C.A. 2013. Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto KE007. México, D. F. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfKE007.pdf>
- Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., & Zaller, J. G. (2015). Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Scientific Reports*, 5(1), 12886. <https://doi.org/10.1038/srep12886>
- Guertler, P., Eicheldinger, A., Muschler, P., Goerlich, O., & Busch, U. (2014). Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food Chemistry*, 149, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.129>
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.* 58, 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.015>.
- Grozinger, C. M., & Zayed, A. (2020). Improving bee health through genomics. *Nature Reviews Genetics*, 21(5), 277–291. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0216-1>
- Grüter, C. (2020). Colony Organisation and Division of Labour. En C. Grüter, *Stingless Bees* (pp. 203–232). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60090-7_6
- Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., Baillie, L., & Adams-Groom, B. (2015). Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLOS ONE*, 10(8), e0134735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
- Hernández-Terán, A., Navarro-Díaz, M., Benítez, M., Lira, R., Wegier, A., & Escalante, A. E. (2020). Host genotype explains rhizospheric microbial community composition: The case of wild cotton

- metapopulations (*Gossypium hirsutum* L.) in Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(8), f1aa109. <https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa109>
- Hernández-Terán, A., Wegier, A., Benítez, M., Lira, R., & Escalante, A. E. (2017). Domesticated, Genetically Engineered, and Wild Plant Relatives Exhibit Unintended Phenotypic Differences: A Comparative Meta-Analysis Profiling Rice, Canola, Maize, Sunflower, and Pumpkin. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2030. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02030>
- Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2015. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8010–8021. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>.
- Hill, R., Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J. J. G., Buchori, D., LeBuhn, G., Maués, M. M., Pert, P. L., Kwapong, P. K., Saeed, S., Breslow, S. J., Carneiro da Cunha, M., Dicks, L. V., Galetto, L., Gikungu, M., Howlett, B. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., O'B. Lyver, P., Martín-López, B., Oteros-Rozas, E., ... Roué, M. (2019). Biocultural approaches to pollinator conservation. *Nature Sustainability*, 2(3), 214–222. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0244-z>
- Hudlet, K. (2017). Maya Beekeepers Stand Up to Monsanto's Genetically Modified Soy. *Fighting the Tide*.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2020). Censo nacional de Población y Vivienda. <https://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/pue/poblacion/>
- Jain, S. A., Jesus, F. T. de, Marchioro, G. M., & Araújo, E. D. de. (2013). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(4), 753–756. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400022>
- Jedlicka, J. A., Philpott, S. M., Baena, M. L., Bichier, P., Dietsch, T. V., Nute, L. H., Langridge, S. M., Perfecto, I., & Greenberg, R. (2021). Differences in insectivore bird diets in coffee agroecosystems driven by obligate or generalist guild, shade management, season, and year. *PeerJ*, 9, e12296. <https://doi.org/10.7717/peerj.12296>
- Keller, A., Danner, N., Grimmer, G., Ankenbrand, M., von der Ohe, K., von der Ohe, W., Rost, S., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2015). Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology*, 17(2), 558–566. <https://doi.org/10.1111/plb.1225>
- Konrad, R., Connor, M., Ferry, N., Gatehouse, A. M. R., & Babendreier, D. (2009). Impact of transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin-1 (OC-1) and of insecticidal proteins on longevity and digestive enzymes of the solitary bee *Osmia bicornis*. *Journal of Insect Physiology*, 55(4), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.007>
- Krasny, M. E., Russ, A., Tidball, K. G., & Elmqvist, T. (2014). Civic ecology practices: Participatory approaches to generating and measuring ecosystem services in cities. *Ecosystem Services*, 7, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2013.11.002>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.063>

- Liere, H., Jha, S., & Philpott, S. M. (2017). Intersection between biodiversity conservation, agroecology, and ecosystem services. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 41(7), 723–760. <https://doi.org/10.1080/21683565.2017.1330796>
- Maia-Silva, C., Hrnčir, M., da Silva, C. I., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. *Apidologie*, 46(5), 631–643. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0354-1>
- Manel, S., & Holderegger, R. (2013). Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(10), 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.012>
- McCook, S. (2017). Environmental History of Coffee in Latin America. En S. McCook, *Oxford Research Encyclopedia of Latin American History*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199366439.013.440>
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F. A. F. L., Venturieri, G. C., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2013). The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. En P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (Eds.), *Pot-Honey* (pp. 153–171). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10
- Mir, R., Jallu, S., & Singh, T. P. (2015). The shikimate pathway: Review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 172–189. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813901>
- Mohamadzade Namin, S., Kim, M.-J., Son, M., & Jung, C. (2022). Honey DNA metabarcoding revealed foraging resource partitioning between Korean native and introduced honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Scientific Reports*, 12(1), 14394. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18465-5>
- Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2020). Impact of Glyphosate on the Honey Bee Gut Microbiota: Effects of Intensity, Duration, and Timing of Exposure. *MSystems*, 5(4), e00268-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00268-20>
- Motta, E. V. S., Powell, J. E., & Moran, N. A. (2022). Glyphosate induces immune dysregulation in honey bees. *Animal Microbiome*, 4(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00165-0>
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
- Moyo, M., Amoo, S. O., Bairu, M. W., Finnie, J. F., & van Staden, J. (2008). Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 74(4), 771–775. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.07.001>
- Nicolson, S. W., Da Silva Das Neves, S., Human, H., & Pirk, C. W. W. (2018). Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology*, 107, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.12.008>
- Ojeda Valverde, A. P. (2018) *Propuesta de un proyecto educativo dialógico en la comunidad de Ocomantla, Municipio de Zihuateutla, Puebla, México*. [Tesis para obtener grado de licenciatura, Facultad de Filosofía y Letras, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/I7I19YATIJ53UAMGJ6XCDGF72249P2JRPAMJS7748XI6M2K5NR-20469?func=full-set-set&set_number=884388&set_entry=000001&format=999
- Oliveira, E. R. de, Muniz, E. B., Soares, J. P. G., de Fátima Lomba Farias, M., Gandra, J. R., de Araújo Gabriel, A. M., Malaquias, J. V., & Pereira, T. L. (2020). Environmental impacts of the conversion

- to organic honey production in family units of small farmers in Brazil. *Organic Agriculture*, 10(2), 187–197. <https://doi.org/10.1007/s13165-019-00256-4>
- Pat Fernández, J. M., López López, R., van der Wal, H., & Villanueva Gutiérrez, R. (2012). Organización social productiva: situación y perspectiva apícola de la sociedad UNAPINCARE en la Reserva de la Biosfera Los Petenes, Campeche, México. *Región y sociedad*, 24(54), 201-230.
- Pasquet, R. S., Peltier, A., Hufford, M. B., Oudin, E., Saulnier, J., Paul, L., Knudsen, J. T., Herren, H. R., & Gepts, P. (2008). Long-distance pollen flow assessment through evaluation of pollinator foraging range suggests transgene escape distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13456–13461. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806040105>
- Perfecto, I., Vandermeer, J., & Wright, A. (2009). *Nature's Matrix* (0 ed.). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781849770132>
- Phil L., Carneiro da Cunha, M. & Roué, M. (2015). *Indigenous and local knowledge about pollination and pollinators associated with food production: outcomes from the global dialogue workshop* [Material de conferencia]. Global Dialogue Workshop on Indigenous and Local Knowledge of Pollination and Pollinators with Food Production, Ciudad de Panamá. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000233811.locale=es>
- Prosser, S. W. J., & Hebert, P. D. N. (2017). Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chemistry*, 214, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.077>
- Quilichini, T. D., Grienberger, E., & Douglas, C. J. (2015). The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry*, 113, 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.002>
- Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A., & Pham-Delègue, M. H. (2008). Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(2), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.002>
- Randhawa, G. J., & Chhabra, R. (2013). Genetically Modified Cotton in India and Detection Strategies. En B. Zhang (Ed.), *Transgenic Cotton* (Vol. 958, pp. 17–28). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-212-4_2
- Randhawa, G. J., Singh, M., Chhabra, R., & Sharma, R. (2010). Qualitative and Quantitative Molecular Testing Methodologies and Traceability Systems for Commercialised Bt Cotton Events and Other Bt Crops Under Field Trials in India. *Food Analytical Methods*, 3(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9126-8>
- Ruiz-Toledo, J. & Sánchez-Guillén, D., 2014. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Acta zoológica Mex.* 30, 408–413.
- SAGARPA (2017) Producción de miel 2017 . *Producción de miel 2017—Datos.gob.mx/busca*. (s/f). Recuperado el 27 de abril de 2022, de <https://datos.gob.mx/busca/dataset/produccion-de-miel-2017>
- Schütte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruohonen-Lehto, M., Saucy, A.-G. W., & Mertens, M. (2017). Herbicide resistance and biodiversity: Agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe*, 29(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0100-y>

- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—Occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Seide, V. E., Bernardes, R. C., Pereira, E. J. G., & Lima, M. A. P. (2018). Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution*, *243*, 1854–1860. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>
- Sharma, P., Singh, S. P., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldivar, R., Varjani, S., & Tong, Y. W. (2022). Genetic modifications associated with sustainability aspects for sustainable developments. *Bioengineered*, *13*(4), 9509–9521. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061146>
- Suryanarayanan, S., & Lee Kleinman, D. (2014). Beekeepers' Collective Resistance and the Politics of Pesticide Regulation in France and the United States. En S. Frickel & D. J. Hess (Eds.), *Political Power and Social Theory* (Vol. 27, pp. 89–122). Emerald Group Publishing Limited. <https://doi.org/10.1108/S0198-871920140000027011>
- Székács, A., Lauber, É., Juracsek, J., & Darvas, B. (2010). Cry1Ab toxin production of *MON 810* transgenic maize. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(1), 182–190. <https://doi.org/10.1002/etc.5>
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2015). Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control*, *48*, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.035>
- Toledo, V., & Barrera-Bassols, N. (2017). Political Agroecology in Mexico: A Path toward Sustainability. *Sustainability*, *9*(2), 268. <https://doi.org/10.3390/su9020268>
- Tsui, M. T. K., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, *52*(7), 1189–1197. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.008>
- Valentini, A., Miquel, C., & Taberlet, P. (2010). DNA Barcoding for Honey Biodiversity. *Diversity*, *2*(4), 610–617. <https://doi.org/10.3390/d2040610>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, *616–617*, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, *48*(3), 189–195. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>
- Vázquez-Barrios, V., Boege, K., Sosa-Fuentes, T. G., Rojas, P., & Wegier, A. (2021). Ongoing ecological and evolutionary consequences by the presence of transgenes in a wild cotton population. *Scientific Reports*, *11*(1), 1959. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81567-z>
- Vázquez, D.E., Balbuena, M.S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., Farina, W.M., 2020a. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Sci. Rep.* *10*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67477-6>.
- Vázquez, D.E., Ilina, N., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M., 2018. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One* *13*, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205074>.

- Vázquez, D.E., Latorre-Estivalis, J.M., Ons, S., Farina, W.M., 2020b. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: a toxicogenomic study. *Environ. Pollut.* 261, 114148. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114148>.
- Vides-Borrell, E., Porter-Bolland, L., Ferguson, B. G., Gasselin, P., Vaca, R., Valle-Mora, J., & Vandame, R. (2019). Polycultures, pastures and monocultures: Effects of land use intensity on wild bee diversity in tropical landscapes of southeastern Mexico. *Biological Conservation*, 236, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.025>
- Villanueva-Gutiérrez, R., Echazarreta-González, C., Roubik, D. W., & Moguel-Ordóñez, Y. B. (2015). Transgenic soybean pollen (*Glycine max* L.) in honey from the Yucatán peninsula, Mexico. *Scientific Reports*, 4(1), 4022. <https://doi.org/10.1038/srep04022>
- Villegas Loeza, D. (2019) Efectos de la liberalización de la economía en la caficultura Estudio de caso en la Sierra Norte de Puebla. *Política y Cultura* (52), 39-60
- Villegas-Plazas, M., Figueroa-Ramírez, J., Portillo, C., Monserrate, P., Tibatá, V., Sánchez, O. A., & Junca, H. (2018). Yeast and Bacterial Composition in Pot-Pollen Recovered from Meliponini in Colombia: Prospects for a Promising Biological Resource. En P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. W. Roubik (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology* (pp. 263–279). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5_19
- Vollet-Neto, A., Maia-Silva, C., Menezes, C., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2017). Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona* aff. *Depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. *Apidologie*, 48(2), 204–210. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0464-4>
- Wezel, A., Bellon, S., Doré, T., Francis, C., Vallod, D., & David, C. (2009). Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(4), 503–515. <https://doi.org/10.1051/agro/2009004>
- Wheelock, M. J., Rey, K. P., & O’Neal, M. E. (2016). Defining the Insect Pollinator Community Found in Iowa Corn and Soybean Fields: Implications for Pollinator Conservation. *Environmental Entomology*, 45(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw087>
- Wolff, L. F., & Gomes, J. C. C. (2015). Beekeeping and Agroecological Systems for Endogenous Sustainable Development. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 39(4), 416–435. <https://doi.org/10.1080/21683565.2014.991056>
- Wu, W., Qiao, J., Xiao, X., Kong, L., Dong, J., & Zhang, H. (2021). *In vitro* and *In vivo* digestion comparison of bee pollen with or without wall-disruption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2744-2755. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10902>
- Yook, M.-J., Park, H.-R., Zhang, C.-J., Lim, S.-H., Jeong, S.-C., Chung, Y. S., & Kim, D.-S. (2021). Environmental risk assessment of glufosinate-resistant soybean by pollen-mediated gene flow under field conditions in the region of the genetic origin. *Science of The Total Environment*, 762, 143073. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143073>