



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ABEJAS DE LA TRIBU MELIPONINI
DE LAS PRINCIPALES PROVINCIAS MELIPONICULTORAS DE ECUADOR

Autora

Pamela Leticia Loján Cueva

Año

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ABEJAS DE LA TRIBU MELIPONINI
DE LAS PRINCIPALES PROVINCIAS MELIPONICULTORAS DE ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía

PhD María Isabel Ballesteros Redondo

Autora

Pamela Leticia Loján Cueva

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Caracterización molecular de abejas de la tribu Meliponini de las principales provincias meliponicultoras de Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Pamela Leticia Loján Cueva, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

María Isabel Ballesteros Redondo
Doctora en Biología con mención en Genética
CI: 1757168610

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Caracterización molecular de abejas de la tribu Meliponini de las principales provincias meliponicultoras de Ecuador, de la estudiante Pamela Leticia Loján Cueva, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo
Doctor en Agrotecnología
CI: 1716829666

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

Pamela Leticia Loján Cueva

CI: 1724400369

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Isabel Ballesteros, por guiarme durante este proyecto, por brindarme el apoyo necesario y por toda la confianza y paciencia impartida.

Al Dr. José Miguel Álvarez, por permitirme participar y desarrollar este proyecto.

A la Dirección General de Investigación por permitirme utilizar sus instalaciones y a la Msc. Irina Villacrés, por ayudarme en todo momento, por estar pendiente y por brindarme su apoyo y confianza.

Finalmente, al Dr. Vinicio Armijos por orientarme para culminar este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios, por nunca dejarme caer y por iluminar mi camino cada día, a mis padres Bolívar y Cecilia, quienes me forjaron para ser la persona que soy ahora, por siempre brindarme su amor su apoyo, a mi hermano Bolívar por estar conmigo siempre y por ayudarme cuando más lo he necesitado.

A mi novio Gabriel por ser mi pilar en los momentos más difíciles, por siempre confiar en mí y por motivarme cada día a seguir.

A mis amigos Dani, Gis, Adrián, Andre, Jenny, Diego y Pato quienes formaron parte importante durante toda la carrera y a quienes siempre los llevaré en mi corazón.

RESUMEN

En los países donde existe una gran diversidad biológica, los procesos de identificación y caracterización de especies son necesarios. Los códigos de barras de ADN constituyen una técnica de identificación sencilla y que permite el descubrimiento de taxones crípticos, a través del uso de bibliotecas de referencia. Las abejas de la tribu Meliponini son abejas melíferas sin aguijón que presentan una gran diversidad de especies. En el Ecuador estas abejas cumplen un papel importante debido a los usos medicinales que le han otorgado los habitantes a la miel proveniente de estas especies. Sin embargo, los estudios de identificación en el país son escasos, por lo que se desconocen las principales especies productoras. Por ello, en este estudio se planteó caracterizar mediante métodos moleculares las especies de la tribu Meliponini de las principales provincias meliponicultoras de Ecuador. Para esto se analizaron individuos de 64 colmenas de abejas sin aguijón provenientes de las provincias de El Oro, Loja, Zamora Chinchipe, Pastaza, Los Ríos y Orellana, mediante la secuenciación del gen COI (citocromo c oxidasa I) y comparación con las bases de datos de *GenBank* y *BOLD*. También se realizó la colaboración con el taxónomo experto David W. Roubik para la identificación taxonómica de estas especies. Los resultados de la identificación mostraron que la mayor cantidad de especies pertenecen al género *Melipona*. En las provincias de Loja y El Oro el género que predominó fue *Melipona* y *Scaptotrigona*, y en las demás provincias del país se identificaron especies pertenecientes a los géneros *Cephalotrigona*, *Trigona*, *Tetragonisca*, *Partamona*, *Paratrigona* y *Oxytrigona*. Sin embargo, en algunos casos no fue posible dilucidar a nivel de especie a los individuos, principalmente del género *Melipona*, a pesar de contar con la secuencia completa del gen COI, debido a que tuvieron un valor de variabilidad intraespecífica e interespecífica cercano. Además, los resultados mostraron que la provincia de Loja presentó la menor variabilidad intraespecífica. En conclusión, se identificaron 18 especies de abejas sin aguijón pertenecientes a 9 géneros, de las cuales el mayor número

de individuos corresponde al género *Melipona* y *Scaptotrigona* en las principales provincias meliponicultoras de Ecuador.

Palabras clave: Tribu Meliponini, Ecuador, códigos de barra de ADN, COI, variabilidad genética.

ABSTRACT

In megadiverse countries, identification and characterization processes are of great importance. DNA barcodes are a simple identification technique that allows the discovery of cryptic taxa, through the use of reference libraries. The bees of the tribe Meliponini are honey bees that lack of sting and present a great diversity of species. In Ecuador these bees play an important role due to medicinal purposes that the inhabitants have granted to the honey from these species. However, in the country, the characterization of the Meliponini species is scarce, and the main honey producer species are unknown. Therefore, in this study the purpose was to characterize the tribe Meliponini species by means of molecular methods from the main meliponicultures provinces of Ecuador. For which, 64 stingless bees were analyzed from the provinces of El Oro, Loja, Zamora Chinchipe, Pastaza, Los Ríos and Orellana, through the sequencing of the COI (cytochrome c oxidase I) gene and identification with the GenBank and BOLD databases. A collaboration was also carried out with the expert taxonomist David W. Roubik to carry out the taxonomic identification of these species. The results of the identification determined that the most part of species belong to the genus *Melipona*. In the provinces of Loja and El Oro, the predominant genus was *Melipona* and *Scaptotrigona*. In the other provinces of the country species belonging to the genera *Cephalotrigona*, *Trigona*, *Tetragonisca*, *Partamona*, *Paratrigona* and *Oxytrigona* were identified. However, in some cases it was not possible to identify the name of species, principally of *Melipona* genus, perhaps the using of the complete COI gene, due they had an intraspecific variability very close to interspecific variability. Further, the province of Loja had the least intraspecific variability. In conclusion, 18 stingless bees belonging to 9 genera were identified, of which the largest number of individuals corresponds to the genus *Melipona* and *Scaptotrigona* in the main meliponicultures provinces of Ecuador.

Keywords: Tribe Meliponini, Ecuador, DNA barcode, COI, genetic variability

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	5
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo General:	6
1.3.2. Objetivos Específicos:.....	7
1.4. Justificación de la investigación.....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Características Generales de las abejas.....	9
2.1.1. Descripción de las abejas	9
2.1.2. Morfología externa	10
2.1.3. Taxonomía.....	11
2.2. Descripción de la tribu Meliponini.....	18
2.2.1. Colmena y conformación de la sociedad	20
2.2.2. Nidificación	21
2.3. Meliponicultura.....	22
2.3.1. Historia.....	22
2.3.2. Meliponicultura en el Ecuador.....	23
2.4. Técnicas de identificación molecular	25
2.5. Variabilidad genética	26
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	27
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	29
4.1. Población y muestra	29
4.2. Lugar de muestreo.....	30

4.3. Materiales y métodos	33
4.3.1. Extracción del ADN genómico	33
4.3.2. Amplificación del ADN	35
4.3.3. Visualización de los productos de amplificación	39
4.3.4. Secuenciación, alineamiento y comparación con las bases de datos...	40
4.3.5. Identificación taxonómica.....	40
4.3.6. Análisis de la diversidad genética	40
4.3.7. Análisis filogenético	41
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. Identificación taxonómica	42
5.2. Extracción y optimización de la PCR de la región 5´ del gen COI.....	43
5.3. Amplificación de la región 5´del gen COI	44
5.4. Identificación molecular de especies a través de COI.....	45
5.5. Optimización de la PCR para la región 3´ del gen COI.....	53
5.6. Amplificación de la región 3´ del gen COI	54
5.7. Identificación usando el gen COI como código de barras	54
5.8. Análisis de la variabilidad del gen COI.....	55
5.8.1. Análisis de la composición nucleotídica.....	55
5.9. Análisis de la diversidad del gen COI en abejas sin aguijón utilizadas como productoras	58
5.9.2. Análisis de la variabilidad genética del género y de la especie	60
5.10. Análisis filogenético	65
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
6.1. Conclusiones.....	67
6.2. Recomendaciones	67

REFERENCIAS	69
ANEXOS	83

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las abejas de la tribu Meliponini son abejas melíferas que no poseen aguijón. Este tipo de abejas son nativas de América, viven en colonias perennes y forman parte del grupo de insectos sociales de la subfamilia Apinae, con alrededor de 500 especies y 42 géneros descritos en las zonas tropicales (Hurtado, 2015). Sin embargo, se estima que la mayor diversidad de especies se encuentra en el Neotrópico con un valor aproximado de 400 especies y 33 géneros desde México hasta Argentina (Nates & Rosso, 2013). El conocimiento de la biología de las especies de esta tribu es bastante moderado en comparación con las abejas de otros géneros. Los primeros escritos que mencionan a las abejas sin aguijón se atribuyen a exploradores españoles y alemanes en Centro y Sur América durante el siglo XVI (Hrncir et al., 2016, pp.597-601).

Las abejas sin aguijón tienen la capacidad de producir miel al igual que las abejas del género *Apis*, por lo que son de especial interés para los apicultores debido a las propiedades que posee la miel de estos insectos (Vit, 2009). En el siglo XVII *Apis mellifera*, también conocida como la abeja de la miel, fue introducida a América del Norte por colonos de Europa, y posteriormente se llevó a América del Sur en el año de 1838 a 1857. Sin embargo, para ese entonces los indígenas de la región Neotropical ya practicaban la meliponicultura (proceso de obtención de miel y otros derivados a partir de abejas sin aguijón), y utilizaban la miel de estos insectos en la alimentación y medicina de manera empírica (Rasmussen & Castillo, 2003). Hoy en día, la miel de estas abejas está siendo objeto de estudio por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Sousa et al., 2016, pp.61-68).

Las abejas de la tribu Meliponini cuentan con una gran diversidad de especies en los trópicos de Centro y Sur América (Freitas et al., 2009, pp.332-346). Debido a que el Ecuador es un país megadiverso, se estima que puede existir una alta diversidad de especies de abejas sin aguijón. Sin embargo, se han realizado pocos estudios al respecto (Vit et al., 2018, pp.207-227). En Ecuador se han elaborado trabajos de identificación de abejas sin aguijón basados principalmente en análisis taxonómicos y morfométricos, pero hasta el momento no se han reportado estudios de identificación molecular. Uno de los primeros trabajos de identificación fue el realizado por Coloma (1986), en el cual se reportaron 73 especies recolectadas de la región Sur del Ecuador, donde sobresalían las especies de *Melipona mimetica*, *M. indecisa*, *M. eburnea* y también la especie del género *Trigona*, *T. fulviventris* provenientes de distintas regiones del país como Olmedo, Machala, Chaguarpamba y Palanda. Por otro lado, Rasmussen (2004) caracterizó 16 especies de abejas sin aguijón y Ramírez, et al (2013) identificaron un total de 89 especies de abejas de diferentes géneros en las provincias de Zamora Chinchipe, El Oro y Loja en donde predominó el género *Trigona* (Ramírez et al., 2013, pp.81-92). Por otra parte, la Universidad San Francisco de Quito realizó un estudio de identificación en donde se analizaron un total de 118 especies de abejas sin aguijón mediante morfometría geométrica de la venación alar anterior, constituyendo una técnica económica y rápida que permite la caracterización preliminar de este tipo de abejas de forma efectiva (García et al., 2015, pp.32-38). Finalmente, Vit (2018), gracias al apoyo del Ministerio de Agricultura y del Instituto de Normalización en Ecuador han realizado avances en la meliponicultura del país, gracias a su estudio para determinar la diversidad de especies. En este caso se hizo una revisión de la literatura y se determinó que existe un total de 132 especies pertenecientes a 23 géneros en las 24 provincias del país, además reportaron 54 especies colectadas durante el período 2014-2015 (Vit et al., 2018, pp.207-227).

Respecto a la miel de las abejas de la tribu Meliponini se han realizado pocos estudios de los cuales destacan los siguientes. Patricia Vit y colaboradores (2017) realizaron un estudio para determinar los tipos de miel provenientes de

la provincia de Pastaza en la comunidad de Kichwa de Río Chico, utilizando perfiles de libre elección. Este método constituye un nuevo enfoque debido a que en este caso cada sujeto involucrado en el estudio produce, a través de sus sentidos, perfiles individuales del producto a analizar, por lo que utiliza sus propios términos para describirlo. En esta investigación se analizaron las características sensoriales de diversos tipos de mieles con diferentes orígenes entomológicos provenientes de *Melipona grandis*, *Scaptotrigona sp*, *Geotrigona leucogastra* y de *Apis mellifera*. Para esta investigación participaron cuatro hombres y cuatro mujeres, los cuales tenían que identificar diferentes características como sabor, olor y apariencia de los diferentes tipos de mieles. Los habitantes Kichwas supieron describir y diferenciar las mieles, dando como resultado que los nativos provenientes de esta comunidad preservan un legado sensorial que les permite conocer sobre productos como la miel, gracias a su conocimiento ancestral (Vit et al., 2017, pp.384-387).

En otro estudio realizado en Ecuador, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de miel a partir de *Tetragonisca angustula* producida en la provincia de Esmeraldas. Para este estudio se implementaron 10 indicadores de calidad en cuatro mieles provenientes de este tipo de abeja. Este estudio se ejecutó debido a que en el NET INEN (Normas técnicas de calidad del Instituto Ecuatoriano de Normalización) únicamente incluye la miel producida a partir de *Apis mellifera* por lo que esta investigación podría aportar información a las autoridades de normalización del Ecuador para la elaboración de normas de calidad de este tipo de miel. Además, podría incentivar a la investigación de mieles de otro tipo de especies de abejas sin aguijón (Vit et al., 2016, p.77).

El Oro también ha formado parte de un estudio respecto a la miel y diversidad de estas abejas. En este caso Patricia Vit y colaboradores (2015) investigaron la biodiversidad de abejas de la tribu Meliponini y el uso medicinal que se le ha otorgado a la miel por parte de los pobladores en la provincia de El Oro. Según

el estudio, la miel se utiliza sola o mezclada con otras sustancias para curar afecciones como cataratas, inflamaciones, enfermedades renales, tumores, várices, cicatrización de heridas, entre otras. Estos datos fueron proporcionados por los apicultores de esta región. En esta investigación detectaron que *Scaptotrigona ederi*, también conocida como “catiana” es la abeja más frecuente encontrada en Balsas, Las Lajas, Zaruma y Piñas. Además, determinaron otras abejas sin aguijón que también son importantes como *Melipona mimética*, *M. indecisa*, *Paratrigona aff.* y *Nannotrigona cf* (Vit et al., 2015, p.502).

Finalmente, Schievano y colaboradores (2015) realizaron un estudio donde determinaron la autenticidad de las mieles comerciales ecuatorianas. Esta investigación se realizó con el objetivo de discriminar las mieles genuinas de las mieles falsas mediante un método que utiliza una emulsión de vórtice con agua y éter dietílico. Para discriminar las mieles genuinas de las falsas se visualizaron las fases, las mieles genuinas formaban tres fases mientras que las mieles falsas dos, además esto fue confirmado con espectros de RMN 1H. De 42 mieles analizadas, 34 fueron auténticas. Para este estudio también se probaron otros indicadores de calidad como el método de azúcares, conocido como HMF, indicadores de fermentación y residuos de ácido cítrico. Este estudio constituye una valiosa contribución para proteger a los consumidores de miel y fomentar el desarrollo de la industria apícola en el Ecuador (Schievano et al., 2015, pp.327-330).

La identificación de especies constituye una parte importante para la descripción y reconocimiento de la biodiversidad. Tradicionalmente, la identificación morfológica se basa en reportes de estudios taxonómicos, para lo cual se requieren personas especializadas en el tema. Sin embargo, el número de taxónomos expertos en identificación ha disminuido drásticamente por lo que se requiere la implementación de otras tecnologías que se complementen

con esta técnica (Rasool, et al., 2018, pp.229-239). Hoy en día la biología molecular se ha convertido en una herramienta que permite la identificación de diferentes especies de organismos, mediante el uso del código de barras de ADN. Este método tiene la ventaja de que la identificación puede realizarse a partir de una pequeña sección del espécimen que se quiere estudiar (Paz et al., 2011, pp.161-176). El código de barras biológico utiliza una secuencia de ADN estandarizada, cuya función principal es etiquetar las diferentes especies para su eficaz identificación. Además, permite el descubrimiento de taxones crípticos (Hebert et al., 2003, pp.313–321). Para este fin, una de las metodologías se basa en utilizar una secuencia corta de ADN, que luego va a ser amplificada y secuenciada para finalmente comparar la secuencia obtenida con bases de datos preexistentes y de esta manera identificar las especies (Paz et al., 2011, pp.161-176). Los genomas mitocondriales de distintos filos animales, a excepción de los cnidarios, muestran suficiente diversidad de secuencias para permitir su discriminación, por lo que las divergencias del gen COI, pueden servir como una herramienta efectiva en el reconocimiento de especies (Hebert et al., 2003, pp.96-99). Además, el gen COI presenta una buena resolución para varias especies de insectos, debido a que presenta una baja variabilidad intraespecífica, respecto a una mayor variabilidad interespecífica (Botero et al., 2016, pp.695-706).

1.2. Planteamiento del problema

Ante los constantes cambios a nivel global, es necesaria la implementación de nuevas estrategias que aceleren el proceso de identificación de la biodiversidad. Los estudios a nivel morfológico pueden conllevar complicaciones debido a la carencia de personas expertas en el tema por lo que son necesarias nuevas estrategias que permitan la caracterización de las distintas especies y que aceleren el trabajo taxonómico, como la implementación del código de barras genético (García et al., 2015, pp.32-38). Además, los procesos de caracterización basados en caracteres morfométricos

no son adecuados para estudios filogeográficos debido a que tanto la variabilidad genética como la plasticidad fenotípica en los caracteres empleados en el reconocimiento pueden conducir a una incorrecta identificación (Rasool et al., 2018, pp.229-239).

En Ecuador se han realizado pocos estudios respecto a la identificación de abejas sin aguijón, por lo que existe un alto nivel de desconocimiento sobre la biodiversidad de especies y de las tecnologías para su manipulación (Ramírez et al., 2013, pp.81-92). A la falta de información de la biodiversidad de estas abejas, se le añade la existencia de barreras geográficas en las diferentes zonas en las que habitan y a la alta convergencia morfológica, lo cual sugiere la existencia de especies crípticas (especies que no son distinguibles morfológicamente) lo que hace que la identificación de estas especies en base a diferencias morfológicas sea difícil de aplicar (García et al., 2015, pp.32-38). Además, hay que tomar en cuenta que la biodiversidad de estas abejas se puede ver amenazada por actividades humanas como la deforestación (Samejima et al., 2004, pp.577-587), la introducción de especies exóticas, la expansión de la agricultura y su intensificación y otros factores como el cambio climático (Freitas et al., 2009, pp.332-346), por lo que es necesario acelerar los procesos de identificación y catalogación de especies.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General:

Caracterizar mediante métodos de biología molecular las especies de abejas de la tribu Meliponini provenientes de las principales provincias meliponicultoras de Ecuador.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Identificar a nivel de género y especie las abejas de la tribu Meliponini mediante secuenciación y análisis del gen COI (Citocromo c oxidasa I).
- Determinar la diversidad de abejas sin aguijón recolectadas de las principales provincias meliponicultoras.

1.4. Justificación de la investigación

Los procesos de identificación y caracterización de especies son necesarios, principalmente en grupos altamente diversos, como es el caso de las abejas (Souza & Carvalho, 2014). Las abejas del género *Apis* son insectos sociales que pertenecen a la familia Apidae, de las cuales *Apis mellifera* es la más importante debido a que es la mayor productora de miel en el mundo (Crane, 2009). A pesar de que esta especie de abeja es una de las más importantes para la apicultura, estudios actuales han descubierto que la miel de las abejas sin aguijón tiene un gran potencial en la medicina moderna, debido a que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y citotóxicas (Yaacob et al., 2017, pp.124-133). En los últimos años, ha surgido el interés de ampliar el conocimiento de estas especies debido a la reducción en el número de polinizadores y a la utilización de productos derivados de este tipo de abejas (Nates & Rosso, 2013).

Las zonas tropicales cuentan con una gran biodiversidad y endemismo, por lo que han sido objeto de estudio de varias investigaciones (Loyola & Pezo, 2018). El Ecuador es un país megadiverso, que cuenta con una gran variedad de organismos y ecosistemas (Padron et al., 2018). Se estima que en el Ecuador existe un gran potencial para el estudio de abejas propias de la región debido al gran número de especies, principalmente de la tribu Meliponini, las cuales son de especial interés debido a que producen miel con grandes

estándares de calidad, aunque en pequeñas cantidades (Rasmussen, 2004). La miel de este tipo de abejas es utilizada por la población principalmente con fines nutricionales y de salud (Guerrini et al., 2009, pp.1413-1420), y se ha reportado que la miel de abejas sin aguijón es utilizada para procesos curativos propios de la región. En el Oro los apicultores informan que pueden ser aplicadas en trastornos como tumores, cataratas, infecciones, várices, contusiones, entre otras (Vit et al., 2015, p.502).

A pesar de que en Ecuador se han realizado escasos estudios de identificación de abejas sin aguijón, se estima que debe existir un gran número de especies, debido a la variedad de ecosistemas en las diferentes regiones (García et al., 2015; Rasmussen, 2004). Existen diversas técnicas que permiten identificar este tipo de abejas, como el método de código de barras de ADN, el cual permite comparar e identificar especies de una manera sencilla (Hebert et al., 2004, pp.14812–14817). Estudios previos enfocados a la identificación de abejas sin aguijón mediante métodos moleculares, indican que el uso de distintos marcadores moleculares permite identificar especies crípticas (Hurtado et al., 2016, pp.171-181). El gen COI (citocromo c oxidadaasa I) en insectos es utilizado para la identificación taxonómica, dado que la velocidad de mutación que posee es rápida, característica que es idónea debido a que hay especímenes que están estrechamente relacionados, lo que permite discriminar entre especies y estudiar la diversidad intraespecífica. (Lanteri, 2007). Estudios realizados en otros países han utilizado este gen para identificar especies de abejas sin aguijón, lo que permite determinar la abundancia de estas especies, y aportar a otros estudios (Souza & Carvalho, 2014).

Debido a estas razones, se realizó esta investigación con la finalidad de determinar las especies de abejas sin aguijón mediante métodos moleculares, de las principales provincias meliponicultras de Ecuador que permitan aportar

a los estudios de biodiversidad en el país y determinar las principales especies productoras de miel.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Características Generales de las abejas

2.1.1. Descripción de las abejas

Las abejas son un grupo de insectos que pertenecen al orden Hymenoptera y que forman parte de la Superfamilia Apoidea, a la cual también pertenecen las avispa y hormigas. Las abejas se caracterizan debido a que el aparato reproductor de las hembras está modificado en un aguijón, aunque existen especies que carecen de este órgano (Farouk et al., 2014, pp.1-10). Además, difieren de otros insectos del mismo orden debido a que requieren de polen como fuente de alimentación para sus larvas y para el desarrollo de las hembras encargadas de la reproducción (Michener, 2007). El origen de las abejas data desde el periodo Cretáceo, hace alrededor de 100 millones de años, y se ha descrito que el ancestro común de estos especímenes se denomina *Milittosphex burmensis*, que contiene caracteres tanto del grupo Spheciforme como de Apiforme (Poinar & Danforth, 2006).

Las abejas cumplen un papel de gran importancia debido a que son los principales insectos encargados de la polinización de una gran variedad de plantas con flores. Además, existe una gran variabilidad entre los individuos de este grupo por lo que generalmente son utilizadas como modelo de estudio en temas ecológicos y de comportamiento (Smith & Vélez, 2008).

2.1.2. Morfología externa

Las abejas poseen diferentes regiones denominadas tagmas, las cuales se conforman de la cabeza, tórax y abdomen. Los dos primeros constituyen el mesosoma y el último el metasoma (Figura 1). Una característica que comparten con otros insectos como avispas y hormigas es que poseen el primer segmento abdominal fusionado con el último segmento del tórax, formando de esta manera el propodeo (Farouk et al., 2014, pp.1-10).

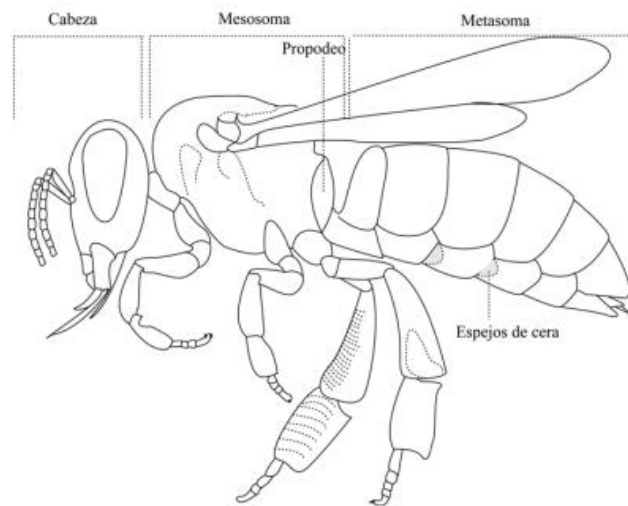


Figura 1. Morfología externa de una abeja y división de las partes de su cuerpo.

Tomado de (Farouk et al., 2014, pp.1-10).

Las abejas poseen características que les permiten diferenciarse de otros insectos pero que a su vez les posibilita relacionarse con el medio externo. Poseen ojos compuestos que les permiten detectar la mayoría de colores, ojos simples que les permiten detectar la intensidad de la luz, antenas que hacen posible la detección de sonidos y olores y mandíbulas con las que construyen sus nidos y con las que abren cortezas y flores (Figura 2). Otra característica

que las distingue es que poseen dos pares de alas, a diferencia de otros insectos que generalmente poseen un único par (Baquero, & Stamatti, 2007).

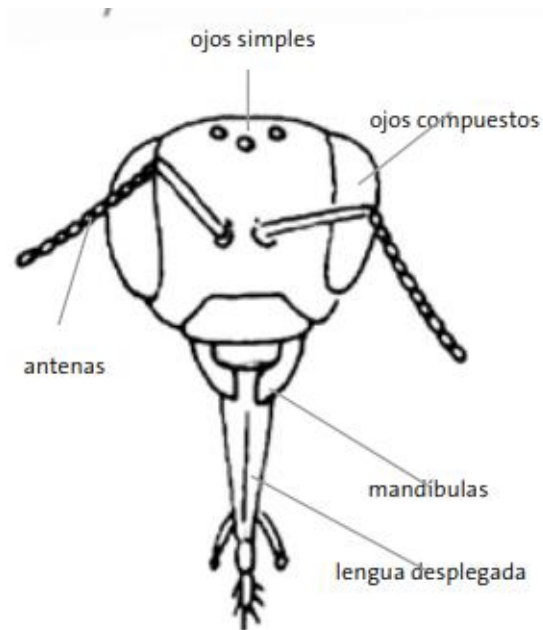


Figura 2. Anatomía de la cabeza de una abeja.

Tomado de (Baquero & Stamatti, 2007).

2.1.3. Taxonomía

La clasificación taxonómica consiste en la identificación de organismos vivos mediante un nombre y a la agrupación de especies semejantes entre sí. Los grupos en los que se clasifican los seres vivos se denominan taxones o categorías taxonómicas. La clasificación taxonómica de las abejas de la tribu Meliponini por ejemplo, comprende los grupos taxonómicos que se visualizan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de las abejas de la tribu Meliponini

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Suborden	Apócrita
Superfamilia	Apoidea
Familia	Apidae
Subfamilia	Meliponinae
Tribu	Meliponini

Las abejas pertenecen al reino animal y se encuentran dentro del filo de los artrópodos debido a que poseen patas articuladas. Estos insectos forman parte del orden Hymenoptera, el cual comprende a uno de los cuatro órdenes de insectos megadiversos y está conformado principalmente por hormigas, abejas, moscas de sierra y avispa (Figura 3), donde cada individuo desempeña diferentes funciones como polinizadores, depredadores y parasitoides (Peters et al., 2017, pp.1013-1018).

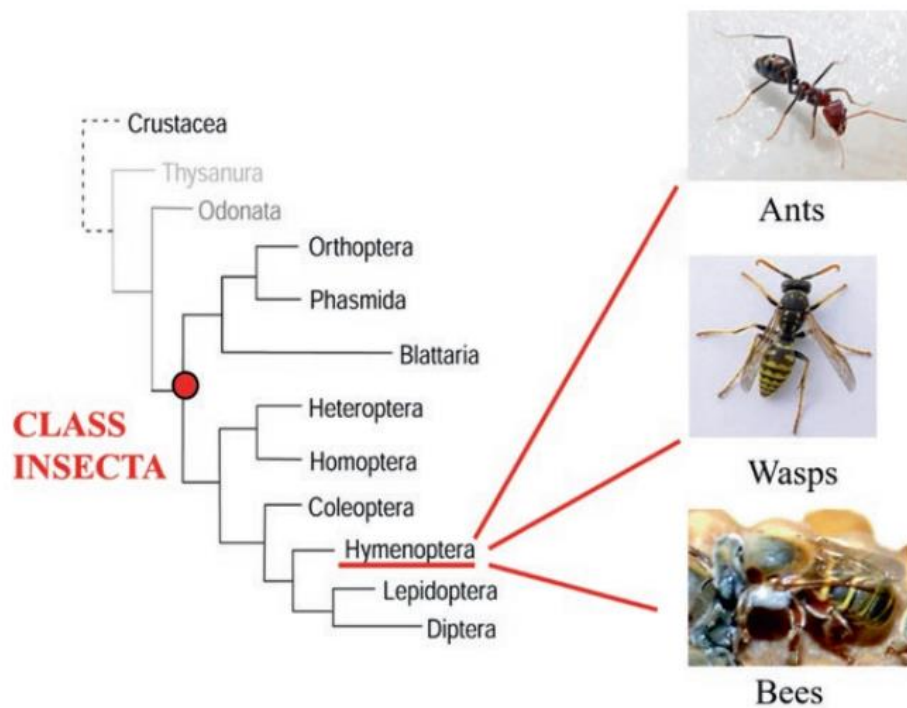


Figura 3. Filogenia de las órdenes pertenecientes a la clase Insecta y en la parte subrayada los individuos que conforman el orden Hymenoptera. Tomado de (Quezada, 2018).

Dentro del orden Hymenoptera se encuentran alrededor de 120 000 especies descritas, aunque se estima que el número real de especies es mayor (Reed & Landolt, 2019). Los himenópteros poseen dos pares de alas membranosas cubiertas de escamas, las alas posteriores son de menor tamaño que las alas anteriores y durante el vuelo ambos pares se entrelazan por una hilera de ganchos conocidos como hamuli (Figura 4). Esta característica hace que esta orden sea díptica, debido a la funcionalidad de sus alas durante el vuelo (Quicke, 2009).

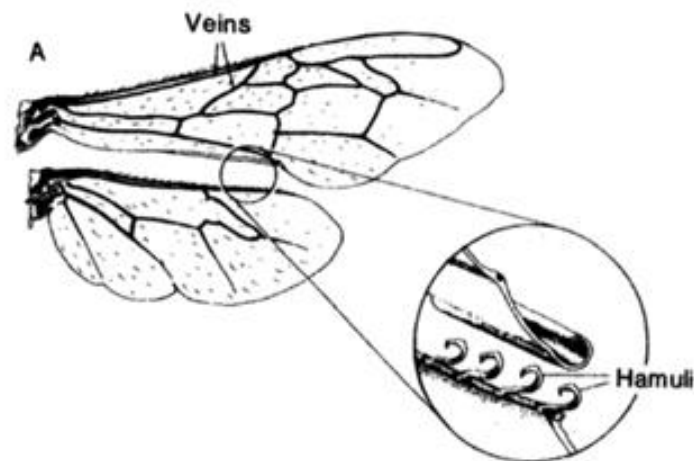


Figura 4. Alas posterior y anterior de una abeja como ejemplo del tipo de alas que poseen los miembros del orden Hymenoptera.

Tomado de (Quicke, 2009).

Los himenópteros se dividen en los subórdenes Symphyta y Apocrita, cuya diferencia radica en que en el caso de Symphyta el abdomen y el tórax se encuentran unidos, sin constricción abdominal y en el caso de Apocrita el abdomen se encuentra unido al tórax con un estrechamiento entre el primer y segundo segmento abdominal. (Reed & Landolt, 2019). A su vez, esta última se divide en los grupos, Parasitica y Aculeata (Hagen et al., 1999, pp.383-503). El grupo Aculeata está conformado por hormigas, abejas y avispas, es decir, consta de hembras del grupo Hymenoptera que poseen un órgano con el cual pueden inyectar veneno. Las abejas y avispas constituyen a la superfamilia Apoidea, la cual posee características que permiten su reconocimiento, y las más comunes son: 1) Lóbulo pronatal posterior pequeño, generalmente separado de la tégula, 2) Pronoto acortado, que tiene la apariencia de un collar y que no llega hacia la tégula, pero se extiende ventralmente a cada lado, rodeando el tórax como se observa en la Figura 5 (Michener, 2007).

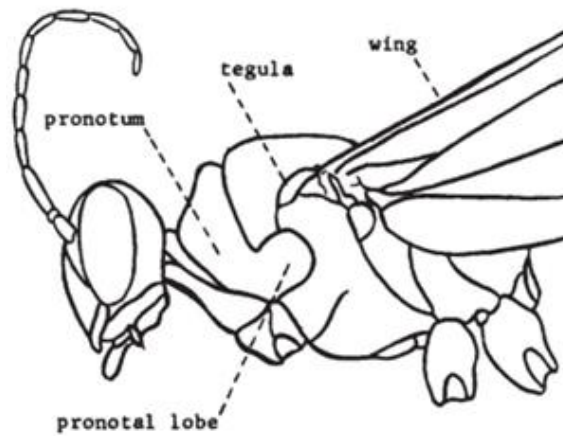


Figura 5. Características de la tégula, lóbulo pronotal y pronoto de la superfamilia Apoidea.

Tomado de (Scott & Stojanovich, 2017).

Otra característica que les permite diferenciarse de otras superfamilias es que tienen pelos ramificados en el tórax (Figura 6), el primer segmento del tarso posterior se encuentra ensanchado y a menudo son peludas (Scott & Stojanovich, 2017).



Figura 6. Pelos ramificados en el tórax, característica de los individuos de la superfamilia Apoidea.

Tomado de (Scott & Stojanovich, 2017).

Apoidea se divide en los grupos Spheciformes, que conforman las avispas esferoides y Apiformes que constituyen a las abejas, y a su vez cada grupo se clasifica en una amplia variedad de familias (Tabla 2). Existen características que permiten diferenciar a las abejas de otros insectos del mismo orden como: 1) la existencia de pelos ramificados en su cuerpo (Figura 6) y 2) basitarso posterior más ancho que los basitarsos subsiguientes (Figura 7) (Farouk et al., 2014, pp.1-10).

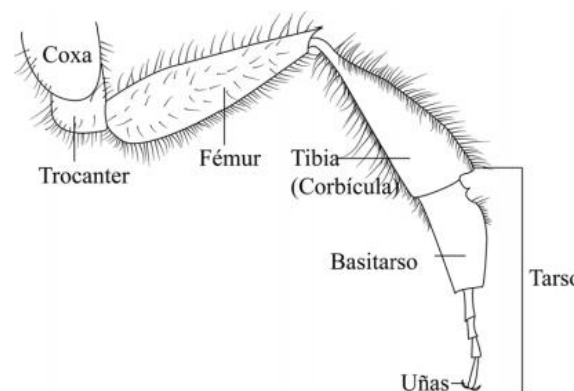


Figura 7. Anatomía de la pata posterior de una abeja.

Tomado de (Farouk et al., 2014, pp.1-10).

Los Apiformes se clasifican en 7 familias (Tabla 2), de entre las cuales la familia Apidae despierta gran interés debido a su diversidad. Además, presenta el mayor número de tribus en comparación con otras familias. La etología de los miembros de esta familia tiene una alta variabilidad. Algunas especies se comportan de manera solitaria y otros son altamente sociales, algunos pueden ser proveedores masivos y otros proveedores progresivos, nidifican en madera, suelo, en campo abierto o en otro tipo de cavidades. A pesar de las diferencias que puede haber entre los individuos de Apidae, existe un carácter que es único en todos los miembros de esta familia. El número de ovarios en las hembras y el número de túbulos por testículo en los machos es mayor a 3, número que caracteriza a otras familias dentro de Apoidea

(Michener, 2007). Además, se sabe que las abejas de la familia Apidae tienen ciertas características en común entre ellas, especialmente en que la mayoría de individuos forman nidos perennes, los cuales poseen una reina y varias abejas obreras (Roubik, 2006).

Tabla 2.

Clasificación de la Superfamilia Apoidea.

Grupos	Familias
Spheciformes	Familia Ampulicidae
	Familia Sphecidae
	Familia Crabronidae
Apiformes	Familia Stenotritidae
	Familia Colletidae
	Familia Andrenidae
	Familia Halictidae
	Familia Melittidae
	Familia Megachilidae
	Familia Apidae

Tomado de (Michener, 2007)

Existen diversas formas de clasificar a las abejas de la familia Apidae. Según la recopilación realizada por (Michener, 2007), pueden ser clasificadas en las Subfamilias Fideliinae, Anthophorinae, Xylocopinae y Apinae las cuales a su vez se dividen en una variedad de Tribus, o en las Subfamilias Apinae y Meliponinae de las cuales los miembros pertenecientes a las tribus Bombini, Meliponini y Apini son altamente sociales. Es decir, son especies que viven en conjunto y que poseen comportamiento social, lo que les permite relacionarse con individuos de su misma especie. Este comportamiento les permite realizar actividades como buscar de una manera más eficiente los alimentos, la defensa del nido frente a amenazas y la protección de las crías (Michener,

2007). Además, los individuos pertenecientes a estas tribus se consideran corbiculados (Figura 8) debido a que tienen una corbícula, la cual es una estructura que se encuentra en la tibia de las patas traseras que les permite transportar polen (Quezada, 2018).

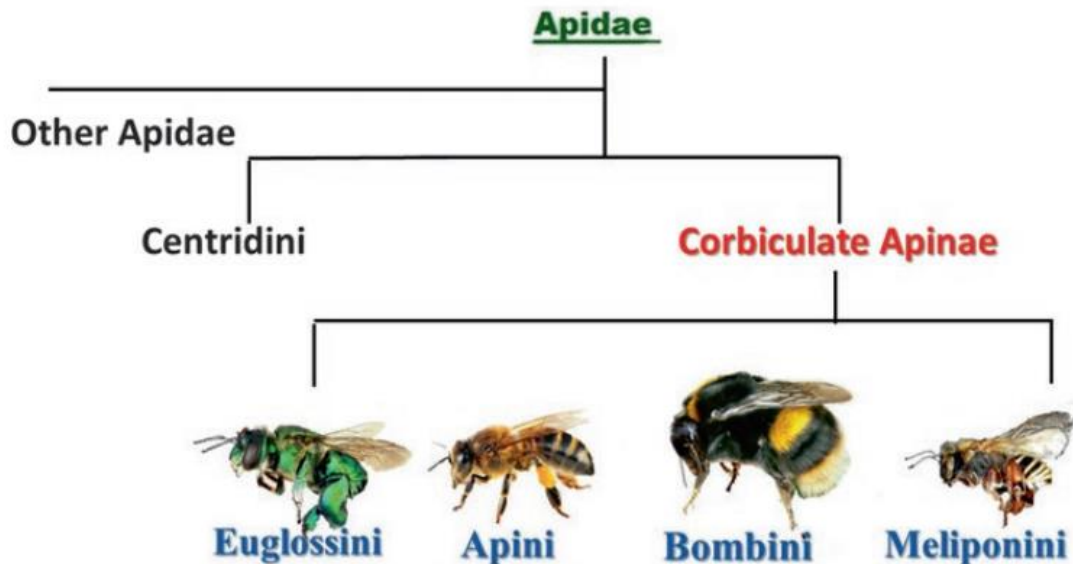


Figura 8. Clasificación de las cuatro tribus de abejas corbiculadas de la familia Apidae.

Tomado de (Quezada, 2018).

La subfamilia Meliponinae comprende a todas las abejas sin aguijón, las cuales cuentan con un gran número de especies, aunque es difícil establecer el número real debido a la existencia de especies crípticas y la gran cantidad de razas geográficas, que tienen diferencias muy superficiales entre sí (Nates, 1990).

2.2. Descripción de la tribu Meliponini

Las abejas sin aguijón habitan las áreas tropicales y subtropicales del planeta, y se estima que han estado en la tierra desde hace más de 65 millones de años

(Roubik, 2006). Este tipo de abejas pertenecen a una de las tres subfamilias de la familia Apidae, denominada Meliponinae y cuentan con tres características que hacen posible diferenciarlas de otros tipos de abejas: 1) Debilidad y reducción de la venación alar, 2) Presencia de penicillum, una especie de cepillo con estructuras similares a cerdas largas y rígidas ubicadas en el margen apical externo de la tibia posterior y 3) Carencia de aguijón funcional, por lo que son incapaces de picar (Wille, 1983). A pesar de que este tipo de abejas carecen de picadura, poseen otro tipo de defensa debido a que tienen mandíbulas conectadas a músculos que son significativamente más grandes que los de las abejas del género *Apis* (Chidi & Odo, 2017).

La subfamilia Meliponinae se divide en las tribus Meliponini y Trigonini, debido al descubrimiento de una variedad de caracteres taxonómicos principalmente de carácter morfológico y reforzado por caracteres basados en la biología general, como la arquitectura del nido, canal alimentario, vaso dorsal y cordón nervioso ventral. Los caracteres anatómicos más importantes se detallarán a continuación, dado que permiten la diferenciación entre estas tribus. En el caso de la tribu Meliponini, la porción torácica del vaso dorsal forma una especie de arco entre los músculos longitudinales del tórax, mientras que en los géneros de la tribu Trigonini la porción torácica del vaso dorsal es recto y sigue a lo largo y de forma dorsal al intestino, pero nunca entre los músculos torácicos longitudinales. Por otro lado, el tracto digestivo de las especies de abejas de la tribu Meliponini es más largo que el de Trigonini (Wille, 1983). Finalmente, las abejas de la tribu Meliponini son de cuerpo, forma y tamaño más robusto, tienen una mayor pubescencia y poseen alas más cortas que las de la tribu Trigonini (Chidi & Odo, 2017).

Dentro de Meliponinae existen varios tamaños de especímenes. Las abejas pueden tener desde 13 mm como en el caso de *Melipona fuliginosa*, la cual es considerada como la abeja sin aguijón más grande, hasta 2 mm en el caso de

las especies enanas como *Trigonisca duckei*. En el caso de las colonias también existen diferencias, en algunos casos las colonias pueden tener pocos individuos como en ciertas especies de *Melipona*, hasta cientos de miles de abejas como en el caso del género *Trigona*. (Sommeijer, 2015). También es importante recalcar que debido a la gran diversidad de especies y a su presencia principalmente en bosques tropicales, este tipo de abejas son consideradas muy importantes para la polinización de los ecosistemas tropicales. Además, algunas de estas especies producen miel de alta calidad, por lo que los habitantes de países de América la utilizan como medicina o como un complemento en su dieta (Baquero & Stamatti, 2007).

2.2.1. Colmena y conformación de la sociedad

Las abejas sin aguijón se caracterizan por vivir en conjunto con varios individuos en un nido donde almacenan miel y polen (Sommeijer, 2015). En las colonias cada individuo cumple una función especializada y se encuentra conformada por la reina, las obreras (hembras trabajadoras) y los zánganos (machos encargados de la reproducción) (Arnold et al., 2018).

La reina, las obreras y los zánganos tienen diferente anatomía y llevan a cabo distintas funciones dentro del nido. La reina es la responsable de la reproducción por medio de huevos y de intervenir en el comportamiento de los demás integrantes del nido para que se mantengan unidos a través de mensajes de olor. Las obreras tienen una serie de actividades a su cargo como la construcción y defensa del nido, obtención de néctar, agua, polen y otro tipo de materiales, así como la eliminación de desechos. Finalmente, los zánganos tienen como principal función la reproducción, la cual la realizan con la reina durante un vuelo nupcial y una vez completado este proceso, mueren (Baquero, & Stamatti, 2007).

2.2.2. Nidificación

El nido está conformado por la cámara de cría y el área de almacenamiento de alimentos, los cuales se encuentran separados en celdas de cría y macetas de almacenamiento. Estas últimas suelen ser más grandes que las celdas de cría en la mayoría de especies (Sommeijer, 2015). La cámara de cría de las abejas sin aguijón se compone de una serie de células compactas que se encuentra rodeada de una multicapa de cera y resina denominada involucro, cuya finalidad es otorgar protección al nido. En la parte externa del involucro se encuentra el área de almacenamiento de cera en grandes macetas donde las abejas almacenan polen y miel. El nido suele estar sellado del resto de la cavidad por varias láminas de resina llamadas placas de batumen (Figura 9). Además, el nido normalmente se conecta con el exterior mediante un tubo de varios centímetros de cera (Oldroyd & Pratt, 2015).

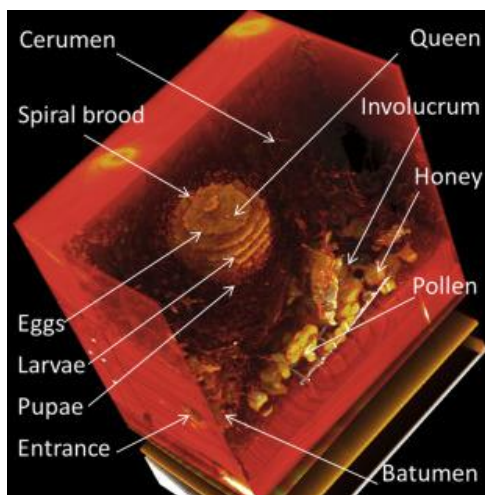


Figura 9. Nidificación de abejas sin aguijón. Se puede observar la cámara de cría y las celdas de almacenamiento protegidas por el involucro y sellado por batumen.

Tomado de (Oldroyd & Pratt, 2015).

Las abejas sin aguijón se caracterizan por ser capaces de nidificar en cavidades de troncos de árboles y paredes, en nidos abandonados o de forma subterránea, hasta cuatro metros bajo tierra. Esto lo logran mediante el acondicionamiento del lugar de acuerdo a sus necesidades (Nates, 2001).

2.3. Meliponicultura

2.3.1. Historia

La meliponicultura es el proceso de crianza de abejas sin aguijón, llevado a cabo por los apicultores, los cuales se encargan del mantenimiento, propagación y utilización de colonias de diferentes especies de abejas de este tipo. La finalidad es obtener miel, polen, resina y otros productos derivados a partir de estos individuos y poder lucrar de esta actividad. Las colonias son manejadas en colmenas artificiales para producir productos de interés, además de que pueden ser utilizadas como polinizadores de cultivos comerciales (Chidi & Odo, 2017).

Antes de los viajes de Cristóbal Colón, en los trópicos de Europa, Asia y África se practicaba la apicultura a partir de abejas (*Apini*) para obtener una mayor producción de miel, pero las abejas sin aguijón rara vez eran utilizadas para esta actividad. Por otro lado, en América, la apicultura se desarrolló a partir de las abejas sin aguijón debido a que no existían abejas comunes. Para este fin, la abeja más utilizada en esos tiempos era *Melipona beecheii* debido a que su tamaño favorece la producción de miel. En México, los mayas en la península de Yucatán todavía realizan la apicultura con esta especie de abeja (Crane, 2009).

2.3.2. Meliponicultura en el Ecuador

La meliponicultura es una actividad ancestral que se practica en Ecuador debido a que los habitantes utilizan la miel de estas abejas para emplearla en el sector alimentario y en el área de la medicina tradicional (Martínez, 2015). Las abejas sin aguijón se encuentran distribuidas principalmente en las zonas tropicales del planeta y habitan en mayor cantidad en zonas de alta biodiversidad. La región del Sur del Ecuador está conformada por las provincias de Loja, ubicada en la región Andina, El Oro, perteneciente a la región Costera y Zamora Chinchipe, ubicada en la Amazonía, y se estima que en esta zona existe una gran diversidad de especies de abejas sin aguijón (Ramírez et al., 2012, pp.81-92). La meliponicultura no se ha desarrollado únicamente en estas provincias, sino también se ha implementado en ciudades como Guayaquil y Manabí en donde se produce miel de abeja sin aguijón en grandes cantidades principalmente para el consumo (Ocampo, 2018).

La crianza de abejas de la tribu Meliponini en el Ecuador se da por métodos artesanales, los cuales son llevados a cabo por apicultores que producen la miel en su propia casa o en asociación con las comunidades (Figura 10). Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, en el Oro hay alrededor 700 meliponicultores que practican esta actividad, la cual puede ser realizada a partir de un cajón, hasta cientos de cajones. Actualmente el MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca), junto con la Dirección Agropecuaria de El Oro, han potenciado la meliponicultura gracias a la realización de talleres a los productores. El objetivo es dar a conocer nuevas técnicas para el manejo y cuidado de las abejas sin aguijón, realización de cajas, mantenimiento y traspaso de colmenas, y además de despejar dudas que puedan surgir por parte de los productores.



Figura 10. Método de crianza de abejas sin aguijón en el Ecuador

En Loja para fomentar la crianza de abejas sin aguijón se implementó el proyecto “Fomento de la Producción Apícola y melipónica en la provincia de Loja” en el año 2017 gracias al apoyo de la Prefectura de Loja junto con la Dirección de Gestión Agropecuaria y Productiva y con la Dirección General de Desarrollo Productivo, el cual se llevó a cabo en 12 cantones. La finalidad de este proyecto fue enseñar a los productores nuevas técnicas para impulsar y mejorar la meliponicultura y de esta manera obtener una miel de mejor calidad y con una mayor cantidad que la que se obtenía de manera tradicional. En la provincia de Loja varias son las familias que producen miel y sus derivados a partir de abejas con y sin aguijón, teniendo un incremento del 30% en la productividad.

La UTPL también ha tomado un papel importante en el mejoramiento del manejo de abejas sin aguijón, a través de capacitaciones a los productores de

la provincia de Loja. Hasta el momento se estima que existen alrededor de 300 productores en esta provincia (Ocampo, 2018). El Laboratorio de la UTPL de Ecología Tropical y Servicios Ecosistémicos, junto con el MAGAP, el Consejo Provincial de Loja y el NCI (Naturaleza y Cultura Internacional), desarrollaron un proyecto con la finalidad de promover y mejorar la meliponicultura. La importancia del conocimiento de esta actividad se da debido a que las abejas sin aguijón se encuentran en peligro debido a la escasa información que existe sobre esta especie. Además, la miel que es extraída de este tipo de abejas tiene una alta demanda en el país por lo que representa un gran campo para personas interesadas en generar productos a partir de estos insectos (Ocampo, 2018).

2.4. Técnicas de identificación molecular

La biología molecular constituye una valiosa herramienta para la identificación de diferentes especies de individuos y para el estudio de la filogenia entre organismos. Los códigos de barras de ADN, consisten en sistemas de identificación basados en el análisis de la diversidad de secuencias cortas de ADN (Hebert et al., 2003, pp.313-321). Para realizar este proceso se debe tomar en cuenta que no cualquier región del genoma puede ser utilizado para este propósito, sino que es necesario que dicha región permita distinguir entre la variación interespecífica (variación entre especies relacionadas) e intraespecífica (variación dentro de la misma especie). Con esta idea se desarrolló el concepto de *barcoding gap*, el cual hace referencia a las diferencias que existen entre la variación inter e intraespecífica, es decir, mientras mayor sea la diferencia entre estos factores, la discriminación será más acertada (Paz et al., 2011, pp.161-176). Además, los códigos de barras de ADN requieren de una biblioteca de referencia que cuente con secuencias que hayan sido previamente descritas, que permitan identificar una secuencia de una muestra no identificada (Kress & Erickson, 2008).

El método de código de barras de ADN fue propuesto por Hebert et al., (2003) con la finalidad de poder comparar e identificar especies de una manera sencilla, además de que permite el descubrimiento de taxones crípticos. Este método utiliza el gen mitocondrial de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (cox1 o COI) que actúa como un marcador molecular estandarizado que permite la clasificación de diversas especies de animales vertebrados e invertebrados. Cox1 ha sido elegido para este proceso debido a que aparenta tener una mejor señal filogenética que otros genes mitocondriales. Este gen es ideal debido a que evoluciona lo suficientemente rápido lo que permite discriminar entre especies que se encuentran estrechamente relacionadas y de esta manera es posible estudiar la diversidad intraespecífica (Rodrigues et al., 2017, p.488).

2.5. Variabilidad genética

La diversidad genética son aquellas variaciones que pueden existir en las características hereditarias encontradas en una población de una misma especie, producto de la adaptación ante los constantes cambios en el entorno. Estos cambios pueden producirse tanto en especies silvestres como en domésticas, aunque en estas últimas el nivel de diversidad es bajo (Xu et al., 2016, pp.247-274). La diversidad genética también se puede definir como la variabilidad de genes dentro de una especie, y contribuye al potencial que tiene una especie de sobrevivir ante nuevas amenazas (Songer, 2019).

La diversidad genética es necesaria para la evolución de las poblaciones ante cambios ambientales. El motivo principal por el cual la diversidad se va reduciendo es debido a que el tamaño de una población es muy pequeño, dando como resultado la disminución del potencial evolutivo y la pérdida de alelos (Frankham, 2001). Por tanto, las poblaciones que cuentan con individuos parecidos entre sí, y por ende con una menor diversidad genética, tienen

menor probabilidad de que cuenten con características necesarias para su supervivencia, conllevando a la reducción o incluso eliminación de la población en un área determinada cuando las condiciones cambian (Songer, 2019). Por otro lado, las especies con grandes poblaciones, cuentan con un mayor nivel de diversidad genética (Frankham, 2001), por tanto, cuando existen cambios en el entorno, tienen mayor probabilidad de sobrevivir (Songer, 2019).

La variabilidad genética hace referencia a las variaciones que existen dentro de las poblaciones. Existen varios factores por los que la variabilidad genética aumenta en una población, como son la poliploidía (variación en el número cromosómico), flujo de genes debido al movimiento de una determinada población de un lugar a otro y mutaciones. Entre estos factores, el principal motivo de que exista una mayor tasa de variación genética son las mutaciones, como las que se manifiestan producto de una modificación en un solo nucleótido creando nuevos alelos (mutación puntual) o mediante el movimiento de alelos a diferentes loci en el mismo o en diferentes cromosomas (mutaciones cromosómicas) (Beedanagari et al., 2014, pp.729-742).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El diseño del plan experimental que se ejecutó durante el proyecto se puede visualizar en el diagrama de flujo de la Figura 11.

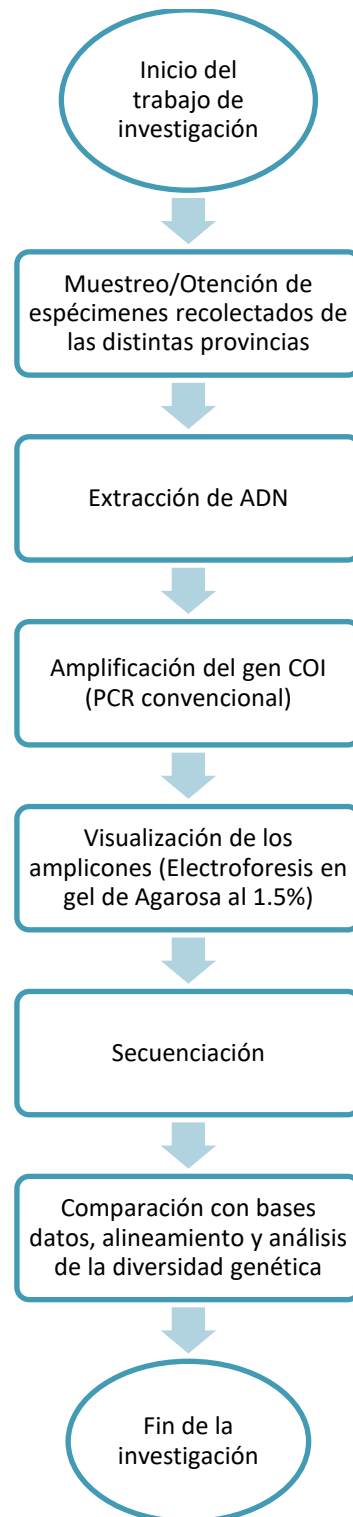


Figura 11. Diagrama de flujo que muestra el diseño del plan experimental para la caracterización y análisis de la diversidad genética de abejas de la tribu Meliponini

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Población y muestra

Se analizaron muestras de abejas sin aguijón colectadas de 64 colmenas de meliponicultores que cuentan con registros en el Ministerio de Agricultura y Ganadería. Los especímenes se nombraron con un código dependiendo de la provincia y un número de identificación de la colmena (Tabla 3).

Tabla 3.

Código de identificación otorgado para cada provincia y el número de colmenas analizadas. De cada colmena se colectaron de 20 a 30 individuos.

Provincia	Código	N.º de colmenas
El Oro	OR	20
Pastaza	PS	11
Pastaza - Río Negro	RN	6
Loja	LO	17
Zamora Chinchipe	ZC	3
Los Ríos	LR	6
Orellana	OA	1
Total		64

Las abejas fueron obtenidas usando trampas de colecta con cloroformo o “*killing jar*” en la entrada de cada colmena como se puede observar en la Figura 12 y posteriormente se guardaron en botes estériles con etanol al 96% para la conservación del material genético.



Figura 12. Ilustración de la entrada de una colmena a partir de la cual se obtuvieron abejas y la trampa de colecta con cloroformo.

4.2. Lugar de muestreo

Las muestras fueron recolectadas de las provincias de El Oro, Pastaza, Los Ríos, Loja, Zamora Chinchipe y Orellana (Figura 13). En la Tabla 4 se muestra el lugar de colecta de cada provincia y el número de productores visitados. En algunos casos no fue posible obtener la elevación a la que fueron tomadas las muestras debido a la falta de señal en ese sector.



Figura 13. Mapa del Ecuador donde se muestra las provincias a partir de las cuales se obtuvieron las abejas que fueron objeto de estudio.

Adaptado de (Gifex, 2019).

Tabla 4.

Provincia y lugar donde se recolectaron las muestras, número de productores y elevación de cada región de donde se obtuvieron las muestras.

Provincia	Nombre del lugar	Productores	Elev. (m)	Dec. Lat.	Dec. Long.
El Oro	Tinajas-Balsas	1	427m	-3.658	-79.819
El Oro	Huacas-Balsas	1	1009m	-3.658	-79.754
El Oro	Sector Naranjo	1	434 m	-3.659	-79.819
Pastaza	Puyo	1	935 m	-1.474	-78.005
Pastaza	Tarqui	1	938 m	-1.551	-78.022
Pastaza	Madre Tierra	1	968 m	-1.530	-78.049
Pastaza	Santa Clara	1	523 m	-1.216	-77.877
Pastaza	Puyo	1	932 m	-1.513	-77.979
Pastaza	Veracruz	1	646 m	-1.498	77.879
Pastaza	Puyo, Río Negro	2	1469m	-1.404	-78.247
Pastaza	Puyo, Río Negro	1	1481m	-1.403	-78.244
Pastaza	Puyo, Río Negro	1	1325m	-1.410	78.248
Pastaza	Puyo, Río Negro	1	1250m	-1.408	-78.199
Los Ríos		6			
Loja	Zapotillo , Alto de La Cruz	1	650	-4.171	-80.239
Loja	Zapotillo, San Felipe	1			
Loja	Zapotillo , Chaquino	1			
Loja	Zapotillo, Cochas	2			
Loja	Garza Real, Balsa Real	5	400	-4.247	-80.245
Loja	Bolaspamba, El Guabo	4	454	-4.398	-80.337

Zamora	Pío Jaramillo	1	908 m	-4.055	-78.934
Chinchipe	Alvarado				
Orellana	La Joya de los Sachas	1	273m	-0.324	-76.858

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Extracción del ADN genómico

La metodología aplicada para el proceso de extracción de ADN se basó en el protocolo de Chelex (Suenaga & Nakamura, 2005), el cual fue estandarizado por la Msc. Irina Villacrés en los laboratorios de Investigación de la Universidad de Las Américas. Adicionalmente se realizó otra extracción mediante el Kit de ADN de QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (250) y se siguió el protocolo de purificación de ADN total a partir de tejidos animales mediante un sistema de columnas con membranas de sílice indicado por la casa comercial, con el objetivo de conservar ADN de calidad para futuros trabajos.

4.3.1.1. Extracción de ADN con Chelex

Para este proceso se tomaron las patas y parte del tórax de las abejas como material inicial. El tejido fue colocado con pinzas en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales contenían 200 µL de Chelex 100 de Sigma al 10%. Para iniciar con el proceso de extracción, las muestras se trituraron con pistilos esterilizados para homogeneizar el tejido, se agitaron con vórtex durante dos minutos y se centrifugaron a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante un minuto. Posteriormente, se agregaron 5 µL de Proteinasa K (Promega) y se llevó a cabo una segunda centrifugación a 10000 rpm durante un minuto. Luego, se incubaron a 56°C por una hora, se mezclaron con vórtex durante un minuto y

terminado este proceso se centrifugaron las muestras nuevamente a 10000 rpm por un minuto. A partir de este paso, el contenido de cada tubo se incubó a 96°C en un termobloque durante 20 minutos y se efectuó una última centrifugación a 10000 rpm durante dos minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante con una pipeta y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

4.3.1.2. Extracción de ADN con Kit

Al igual que con el método anterior, para iniciar con la extracción se tomaron las patas y parte del tórax de las abejas como material inicial y se colocaron en un tubo de 1.5 mL, el cual contenía 180 µL de *Buffer* ATL (tampón de lisis tisular) y luego se trituraron con pistilos esterilizados para homogeneizar el tejido. Posteriormente, se agregaron 20 µL de Proteinasa K al contenido, se mezcló con vórtex y se incubaron las muestras a 56°C durante una hora o hasta que el tejido se haya lisado completamente (en este paso las muestras se agitaron con vórtex cada 15 minutos). Al terminar este proceso, se volvieron a mezclar con vórtex durante 15 segundos, se agregaron 200 µL de *Buffer* AL (tampón de lisis durante el aislamiento de ADN) a cada tubo y se efectuó otra agitación con vórtex para mezclar el contenido. Luego se agregaron 200 µL de etanol absoluto (para precipitar el ADN) y se mezcló nuevamente. Enseguida, se pipeteó el contenido total de cada tubo del paso anterior en la columna en un tubo de 2 mL, se centrifugaron las muestras a 8000 rpm durante un minuto y se desechó el tubo de paso y recogida. Cada columna se traspasó a un nuevo tubo de recolección de 2 mL, se agregaron 500 µL de *Buffer* AW1 (tampón de lavado) y se centrifugaron a 8000 revoluciones por minuto por un minuto. Luego se desechó el tubo de paso y recogida. Cada columna se traspasó nuevamente a un nuevo tubo de recolección de 2 mL, se agregaron 500 µL de *Buffer* AW2 (tampón de lavado) y se centrifugaron las columnas durante 3 minutos a 14000 revoluciones por minuto para secar la membrana. Al terminar este proceso, el tubo de paso y recogida fue desechado. Finalmente, se colocó

la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se pipetearon 30 μ L de *Buffer* AE (tampón de elución) directamente sobre la membrana. Se incubó el contenido durante un periodo de un minuto y se centrifugaron los tubos a 8000 revoluciones por minuto durante un minuto para eluir el ADN. Para mejorar el rendimiento del ADN se repitió la elución con 20 μ L de *Buffer* AE como se describe en el paso anterior.

4.3.2. Amplificación del ADN

4.3.2.1. Cebadores utilizados en el proceso de amplificación

Se utilizaron cebadores universales para amplificar un fragmento del gen COI (citocromo c oxidasa I) de invertebrados. Para este proceso se emplearon la combinación de cebadores LCO1490 y HCO2198 de Folmer et al. (1994) que amplifican la región 5' del gen COI y para amplificar la región 3' del gen se probaron 2 combinaciones con los cebadores MT6 de Simon et al. (1994) y Jerry y S20 de Pauls et al. (2006). En la Tabla 5 se muestra la secuencia de cada cebador y su sentido de amplificación, y en la Figura 14 se representa la posición de cada cebador en el gen COI.

Tabla 5.

Cebadores utilizados para la amplificación de la región 3' y 5' del gen COI.

Cebadores	Tipo	Secuencia (5' - 3')
LCO1490	Forward	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198	Reverse	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Jerry	Forward	5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3'
S20	Reverse	5'-GGGAAAAAGGTTAAATTTACTCC-3'
MT6	Forward	5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3'
S20	Reverse	5'-GGGAAAAAGGTTAAATTTACTCC-3'

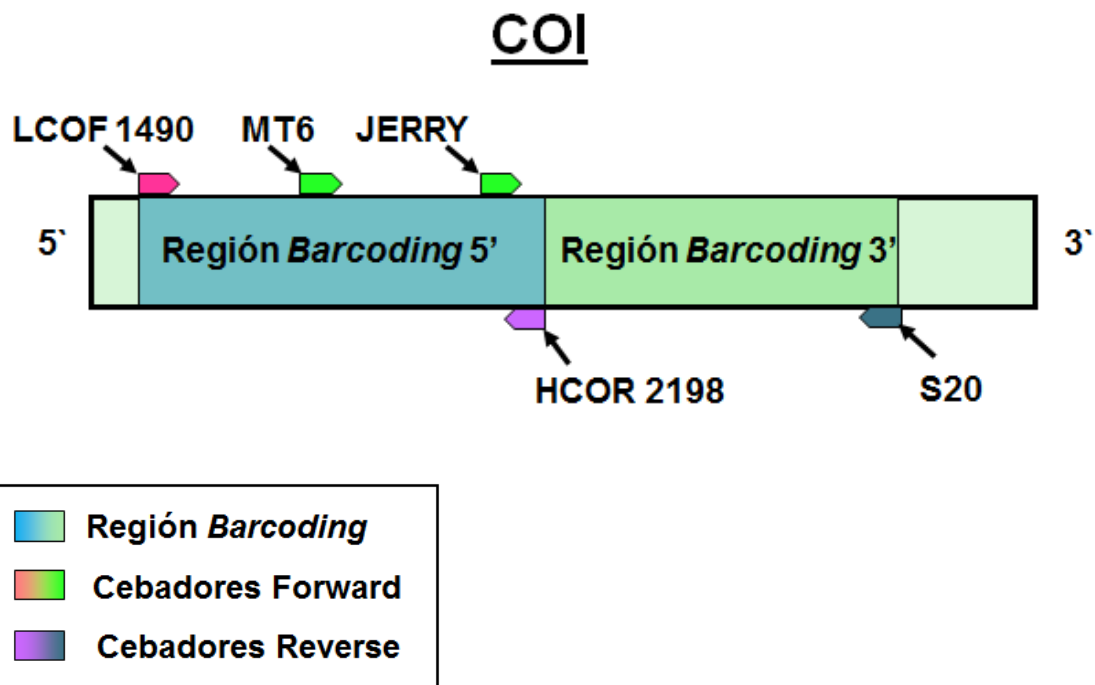


Figura 14. Orden de los cebadores en el genoma mitocondrial. La región azul y verde muestra la posición de la región de código de barras dentro del gen COI y las posiciones de los cebadores Forward y Reverse.

4.3.2.2. Condiciones de PCR

En el caso de la pareja de cebadores LCO1490 y HCO2198, se utilizó la polimerasa GoTaq® Flexi de Promega y en el caso de los cebadores Jerry y

S20 y MT6 y S20 se empleó la enzima GoTaq Green Master Mix de Promega por cuestión de disponibilidad.

Para la amplificación con los cebadores LCO y HCO y la enzima GoTaq® Flexi se realizó la optimización de la PCR utilizando un volumen final de 10 μ L. El primer factor que se determinó fue la concentración necesaria de cebadores, y luego se evaluó la temperatura óptima de hibridación mediante un gradiente a diferentes temperaturas, partiendo de la temperatura calculada *in silico* mediante el programa *Biomath Calculator* de Promega (<http://www.promega.com/biomath/default.htm>) y utilizando temperaturas de 2°C por debajo de esta y temperaturas con un aumento de 2°C. Las concentraciones de los reactivos y las condiciones para el termociclador que se utilizaron se encuentran descritas en las Tablas 6 y 8 respectivamente.

Tabla 6.

Concentración de los reactivos para amplificar la región 5' del gen Citocromo oxidasa I.

Master mix para la PCR		
Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final
GoTaq Buffer	5x	1x
Polimerasa GoTaq® Flexi	5 U/ μ L	1.25 U
DNTPs	10 mM	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM

Cebador LCO1490 (Forward)	5 μ M	0.2 μ M – 0,4 μ M
Cebador HCO2198 (Reverse)	5 μ M	0.2 μ M – 0,4 μ M
H ₂ O	-	-
ADN	-	>10 ng/ μ L

En el caso de la amplificación con los cebadores Jerry/S20 y MT6/S20 con el uso de la enzima GoTaq Green Master Mix de Promega, se realizó otra optimización de la PCR. De igual manera, se determinó la concentración necesaria de cebadores, y luego se evaluó la temperatura óptima de hibridación mediante un gradiente a diferentes temperaturas. Las concentraciones finales de los reactivos y las condiciones para el termociclador se visualizan en las Tablas 7 y 8 respectivamente. Para la amplificación con ambos métodos de extracción se utilizó como control negativo agua Mili-Q.

Tabla 7.

Concentración de los reactivos para amplificar la región 3' del gen Citocromo oxidasa I.

Master mix para la PCR		
Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final
GoTaq Green Master Mix	2x	1x
Cebador Jerry/MT6 (Forward)	20 μ M	0.2 μ M – 0,4 μ M

Cebador S20 (Reverse)	20 μ M	0.2 μ M – 0,4 μ M
H ₂ O	-	-
ADN	-	-

Las condiciones del termociclador con el gradiente de temperatura utilizado para la amplificación se indican en la Tabla 8.

Tabla 8.

Programa de PCR para amplificar la región 3' y 5' del gen Citocromo oxidasa I.

		Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial		94° C	2 min
Ciclos repetitivos (40 ciclos)	Denaturación	94° C	1 min
	Hibridación	(40°C - 50°C)	1 min
	Extensión	72° C	1 min
Extensión final		72° C	5 min

4.3.3. Visualización de los productos de amplificación

Una vez obtenidos los amplicones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con *Syber Safe*, el cual se corrió a 100 voltios durante 30 minutos para revelar el producto de la PCR. Se utilizó como marcador

molecular un *Ladder* de 100 pares de bases de ADN de Invitrogen y se empleó el fotodocumentador ChemiDoc™ Imaging Systems para visualizar los geles.

4.3.4. Secuenciación, alineamiento y comparación con las bases de datos

Los fragmentos amplificados se secuenciaron mediante el método de Sanger en un *Genetic Analyzer 3130* de *Applied Biosystems*, en el servicio de secuenciación de los laboratorios de investigación de la UDLA. Una vez obtenidos los resultados, se editaron las secuencias mediante el software *ChromasPro*, y se analizaron los fragmentos del gen COI mediante el uso del programa bioinformático MEGA7 (Kumar et al., 2016), en el cual se realizó el alineamiento de las secuencias con ClustalW (Thompson et al., 1994). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de *GenBank* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y con BOLDSYSTEMS (www.boldsystems.org), para la identificación de las especies.

4.3.5. Identificación taxonómica

Para este estudio se colaboró con el experto David W. Roubik para el proceso de identificación taxonómica. La cual se realizó a partir de la comparación de los especímenes recolectados con las colecciones del *Smithsonian Tropical Research Institute*.

4.3.6. Análisis de la diversidad genética

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple para cada provincia con todas las secuencias obtenidas utilizando ClustalW dentro de MEGA7. Una vez obtenidas las secuencias, se comprobó que el marco de lectura de los genes

no tuviera codones *stop* con el programa *DNA Expasy* (<http://web.expasy.org/translate/>) debido a que el fragmento secuenciado constituye una región codificadora.

Se realizó el análisis de polimorfismos de las secuencias de ADN mediante el programa DnaSP 6 (Rozas et al., 2017). Luego se estimó el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para los datos empleados mediante el programa MEGA7 (Anexo 1) y se determinó la composición nucleotídica. Posteriormente se realizó una matriz de distancias para el análisis de la variabilidad genética. Se analizó la variabilidad interespecífica e intraespecífica de las poblaciones mediante una matriz de distancias. En este caso se utilizó el modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) mediante el programa bioinformático MEGA7. Este último análisis se realizó con la región 5' del gen COI, para determinar las secuencias que tenían una similitud del 100% y el análisis de polimorfismos y de la variabilidad genética se realizó con la unión de los fragmentos 3' y 5' del gen mencionado.

4.3.7. Análisis filogenético

Se realizó un alineamiento en el programa MEGA7 de las secuencias que presentaron cambios en la secuencia nucleotídica, al unir los fragmentos 3' y 5' del gen COI y se efectuó un árbol de máxima verosimilitud con el modelo GTR (General Time Reverse), utilizando un bootstrap no paramétrico (100 repeticiones) como medida de soporte. Para este proceso, a cada secuencia se la nombró con el código de la provincia junto con el número de colmena para cada taxa, adicional a esto el nombre de la especie según morfología y a continuación el nombre de la especie identificada mediante el gen COI.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó por parte del experto David W. Roubik, mediante su clave taxonómica personal, a partir de la comparación de los especímenes recolectados con las colecciones del *Smithsonian Tropical Research Institute*. Para esta investigación, se realizó la identificación taxonómica de 64 muestras de abejas sin aguijón, a partir de un individuo de cada colmena y se determinó la existencia de 18 especies productoras utilizadas por los meliponicultores de Ecuador. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Tabla 9 en donde se muestra la especie identificada, el código de la provincia junto con el número de colmena y el número de muestras identificadas para una misma especie por provincia. El término cf., hace referencia a que la especie descrita es incierta, es decir, que la mayoría de caracteres de diagnóstico corresponden a la especie dada, pero algunos caracteres no están claros. Por otro lado, el término n. sp, hace referencia a las especies que todavía no tienen un nombre científico, es decir son calificadores como una forma de referirse a nuevos taxones, aún sin nombre antes de la publicación formal de la descripción.

Tabla 9.

Identificación taxonómica de las especies de abejas sin aguijón productoras de Ecuador.

Identificación taxonómica	Código	N.º muestras
<i>Cephalotrigona sp.</i>	OR15	1
<i>Melipona mimetica</i>	OR16	1
<i>Melipona indecisa</i>	OR22,23,24, 25	4
	LR32, 34, 37	3

<i>Melipona nitidifrons</i>	LR33, 35, 36	3
<i>Melipona cf. fuscopilosa</i>	PS4, 9	2
<i>Melipona nigrifacies</i>	PS5	1
<i>Melipona grandis</i>	PS6, 7, 8, 14	4
<i>Melipona eburnea</i>	RN1	1
<i>Melipona 'pseudoeburnea' n. sp.</i>	RN6	1
	OA38	1
<i>Tetragonisca angustula</i>	OR17	1
	PS10,12	2
	RN2, 3,4 5	4
	ZC2	1
<i>Trigona silvestriana</i>	OR18	1
	PS13	1
<i>Oxytrigona mellaria</i>	OR19	1
<i>Nannotrigona chapadana</i>	OR20, 21	2
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	ZC3	1
<i>Scaptotrigona 'problanca' n.sp.</i>	OR26-29, 58-60	7
	LO39-57	17
<i>Partamona 1</i>	OR31	1
<i>Paratrigona euteneata</i>	PS11	1
<i>Paratrigona 1</i>	ZC1	1
<i>Paratrigona 2</i>	OR30	1

5.2. Extracción y optimización de la PCR de la región 5' del gen COI

Se realizó la extracción de ADN de un total de 64 abejas sin aguijón, un espécimen por cada colmena muestreada. Para la optimización de la PCR, el primer factor que se evaluó fue la concentración de cebadores, para lo cual se hicieron pruebas a 0.2 μ M y 0.4 μ M. Se determinó que la concentración óptima para la combinación LCO1490 y HCO2198 fue de 0,2 μ M. Adicionalmente, se

realizó un gradiente de temperaturas en donde se estableció que la temperatura óptima de hibridación fue de 50°C (Figura 15).

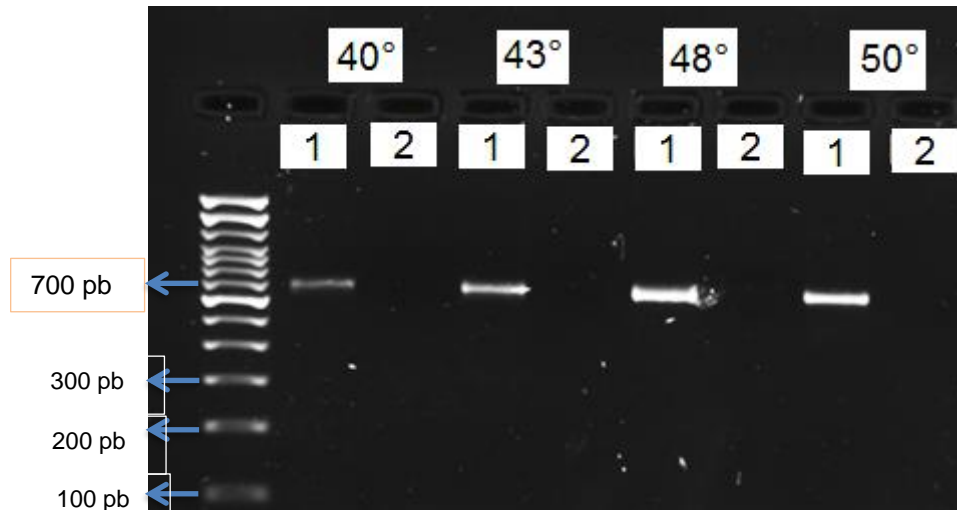


Figura 15. Resultados de la amplificación con los cebadores LCO1490 y HCO2198 en un gradiente de temperatura a 40°C, 43°C, 48°C y 50°C.

1: PCR con ADN (control positivo).

2: PCR sin ADN (control negativo).

5.3. Amplificación de la región 5' del gen COI

A partir del ADN total, se realizó la amplificación del fragmento 5' del gen citocromo c oxidasa I de las 64 abejas sin aguijón extraídas mediante el método de Chelex. En la Figura 16 se puede observar el tamaño de banda de los fragmentos amplificados y se estima que tienen alrededor de 700 pb. La amplificación fue exitosa a pesar de que algunos autores no recomiendan utilizar Chelex para la extracción de ADN debido a que el Chelex se comporta como una resina quelante de iones metálicos, que en algunos casos puede inhibir la PCR (García et al., 2004, pp.139-144). Sin embargo, el emplear un protocolo estandarizado mediante este método, constituye una manera, rápida, sencilla y económica en comparación con otras técnicas basadas en solventes orgánicos. Además, a pesar de que el ADN pueda quedar fragmentado, al

generar secuencias cortas, la posibilidad de que se produzca la amplificación aumenta (López et al., 2014, pp.222-227).

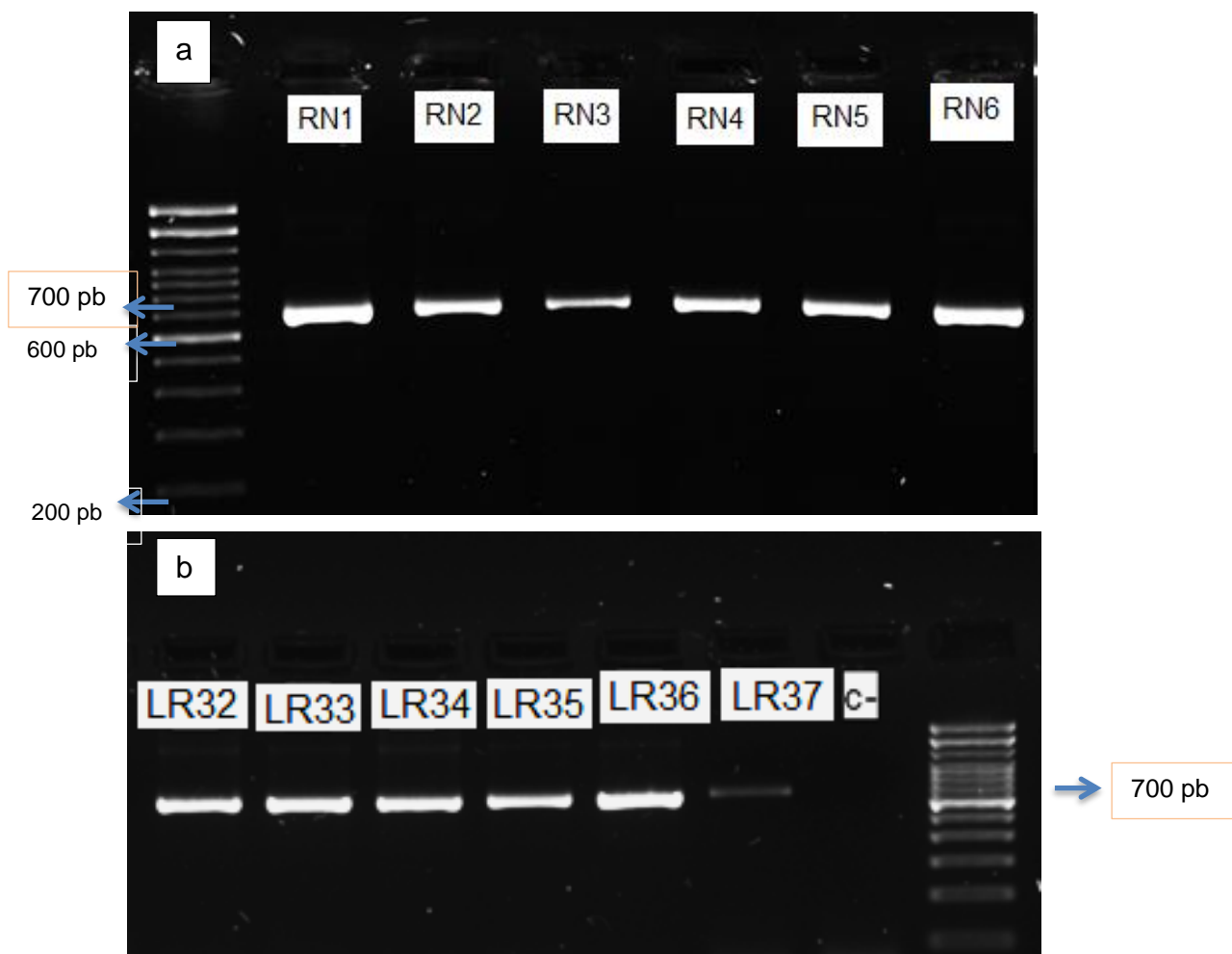


Figura 16. Electroforesis de la amplificación de la región 5' de las muestras

a) Río Negro

b) Los Ríos

5.4. Identificación molecular de especies a través de COI

A partir de las secuenciaciones se obtuvieron secuencias de una longitud de 636 pares de bases pertenecientes a la región 5' del gen COI. En total se analizaron 63 secuencias y mediante una matriz de distancias, se determinó los individuos que tuvieron secuencias idénticas y los que no. Estos resultados

mostraron que 30 secuencias tuvieron valores de divergencia mayores a 0%. A cada secuencia se la identificó como Sec. De las 30 secuencias, 14 secuencias pertenecían a la provincia de El Oro, 6 a la provincia de Pastaza, 3 a Río Negro (Pastaza), 2 de Los Ríos, 3 de Zamora Chinchipe, 1 de Loja y 1 de Orellana. Posteriormente, cada secuencia se comparó con la base de datos de *GenBank* del NCBI y con la base de datos BOLD (*Barcode of Life Data Systems*), mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Los resultados obtenidos al comparar con las bases de datos se pueden observar en la Tabla 10. En la tabla se puede visualizar el código de la provincia junto con el número de colmena, las especies identificadas morfológicamente, las especies que tuvieron el mayor porcentaje de identidad en las bases de datos de *GenBank* y BOLD, el número de individuos que tuvieron secuencias idénticas y el número de secuencias que tuvieron variación en cada provincia. Los datos que coincidieron con la identificación taxonómica se encuentran con negrita. Los resultados de *GenBank* mostraron el menor porcentaje de identidad en comparación con los datos de *BOLD*. Los resultados obtenidos al comparar las secuencias con la base de datos de *GenBank*, mostraron un 80.95% de identificación exitosa a nivel de género, es decir de las 63 secuencias analizadas al utilizar el gen COI, 51 coincidieron en el género con la identificación taxonómica, de las cuales la mayoría presenta un porcentaje de identidad superior al 98% a excepción del género *Trigona*, que presenta un 93.55% de identidad. La mayoría de secuencias que no coincidieron en el género mostraron un porcentaje de identidad inferior al 95% a excepción de los géneros *Partamona*, que presenta un 98.50% de identidad y *Frieseomelitta*, con un 96.87%, ambos de la provincia de Pastaza. Por otro lado, los resultados mostraron un 12.70% de identificación exitosa a nivel de especie, es decir, de las 63 secuencias, únicamente 8 tuvieron coincidencias con la identificación taxonómica, las cuales pertenecieron a la especie *Tetragonisca angustula* y presentaron un porcentaje de identidad superior al 99%. Estos mismos valores de identificación a nivel de género y especie se dieron al comparar entre los resultados obtenidos con la base de datos de

GenBank y de *BOLD*. La identificación de especies mediante códigos de barras de ADN, requieren de bases de datos de referencia que hagan posible clarificar la especie a la que pertenece una secuencia desconocida, a través de la asignación a secuencias de otros especímenes previamente descritos (Paz et al., 2011, pp.161-176). Las diferencias que existieron en la identificación de especies al utilizar ambas bases de datos, pueden ocurrir debido a que los algoritmos de búsqueda detrás de *BOLD* y *GenBank* difieren, *BOLD* realiza la búsqueda en la secuencia global de proteínas traducidas, mientras que *GenBank* compara la secuencia de consulta con secuencias de bases de datos. Además, la cobertura de las bases de datos de *GenBank* y *BOLD* no es exhaustiva. Sin embargo, la cobertura no siempre tiene que estar completa para permitir la identificación correcta de las especies, aunque una base de datos más completa, puede contener más haplotipos y esto se traduce en una mejor evaluación para la identificación de especies (Meier et al., 2006, pp.715-728). Idealmente, todas las secuencias de códigos de barras contenidas en cualquiera de estas bases de datos, deben provenir de especies “voucher”, que hayan sido verificadas por taxónomos expertos (Hebert et al., 2003, pp.313-321). Sin embargo, es inevitable que en cualquier base de datos pública puedan existir algunos errores en los datos presentes, debido a una identificación errónea del material original, registros duplicados debido a casos de sinonimia o errores en el proceso de PCR. (Meiklejohn et al., 2019).

Los resultados obtenidos al comparar las secuencias con la base de datos de *BOLD*, mostraron un 96.83% de identificación exitosa a nivel de género, es decir de las 63 secuencias analizadas al utilizar el gen COI, 61 coincidieron en el género con la identificación taxonómica, de las cuales la mayoría presenta un porcentaje de identidad superior al 99%, a excepción de los géneros *Paratrigona* y *Nannotrigona*, de la provincia de Pastaza, los cuales presentan un 96% y 97% de identidad respectivamente y también de los géneros *Trigona* y *Partamona* de la provincia de El Oro, que presentan valores de identidad del 98%. Las dos secuencias que no coincidieron en el género mostraron un

porcentaje de identidad superior al 99% y pertenecen a los géneros *Plebeia* y *Tetragona*. Finalmente, los resultados mostraron un 26.98% de identificación exitosa a nivel de especie, es decir, de las 63 secuencias, 17 tuvieron coincidencias con la identificación taxonómica, las cuales pertenecen a las especies *Melipona mimetica*, *Tetragonisca angustula*, *Melipona indecisa* y *Melipona grandis* y presentan un porcentaje de identidad superior al 99%. Además, en algunos casos esta base de datos proporcionó resultados de identificación únicamente del género. Esto puede ser debido al número limitado de especies en la biblioteca de referencia actual, por lo que el motor de identificación a menudo no puede entregar una identificación a nivel de especie (Ratnasingham & Hebert, 2007). La base de datos de *BOLD* proporciona información variada lo que le permite actuar como código de barras de ADN de grandes proporciones. Sin embargo, las alianzas con taxónomos expertos representan una estrategia más efectiva para identificar especímenes (Hajibabaei et al., 2005, pp.1959-1967). La integración de la morfología con el código de barras del ADN, ha ayudado anteriormente a resolver grupos taxonómicamente difíciles de abejas y otros organismos. Este método se ha aplicado recientemente en grupos de abejas y se ha demostrado que distingue de manera confiable entre diferentes especies (Sheffield et al., 2009, pp.196-207). La base de datos de *BOLD*, proporciona la identificación de especies si la secuencia de consulta muestra una coincidencia estrecha, es decir, menos del 1% de divergencia, con la secuencia de referencia (Ratnasingham & Hebert, 2007). En estudios que utilizan el gen COI en insectos, las identificaciones suelen realizarse sobre la base de datos con las mejores coincidencias (>99% de similitud), de acuerdo con el método de “mejor coincidencia cercana” de Meier et al. (2006). Sin embargo, aún con este método, existen inconvenientes como que las bases de datos pueden incluir secuencias de especímenes mal identificados, no incluyen algunas especies o debido a que no siempre se pueden discriminar especies estrechamente relacionadas, lo que pudo haber ocurrido con las especies de los géneros *Plebeia* y *Tetragona*, que a pesar de tener un 99% de similitud con las bases de datos de *BOLD*, no coincidieron con la identificación morfológica. Adicionalmente, en esta base de datos esto puede

ocurrir debido a que es posible que las versiones anteriores no hayan pasado por procesos de control que los autores y revisores llevan a cabo al momento de realizar la publicación (Sonet et al., 2013, pp.307-328). Aunque los sistemas de identificación de *GenBank* y *BOLD*, tienen registros públicos iguales, cuentan con diferentes opciones para cumplir su función como bibliotecas de referencia. En el estudio realizado por Sonet et al. (2013) recomiendan utilizar la base de datos de *BOLD* y realizar la búsqueda a nivel de especie, debido a que esta opción permite verificar los datos y analizar el número de coincidencias. Además, esta biblioteca permite el acceso a otros trabajos de identificación realizados. Los datos de secuenciación de ADN, especialmente las secuencias del gen COI, se han acumulado para especies de abejas, revelando límites entre especies estrechamente relacionadas. La utilidad de código de barras de secuencias parciales del COI, se ha demostrado para himenópteros, sugiriendo que también podría ser una herramienta muy útil para la identificación de especies de abejas sin aguijón (Turčnavičienė et al., 2016, pp.476-482). Sin embargo, en este estudio existieron discrepancias entre la identificación mediante las bases de datos y entre la identificación taxonómica a pesar de que el COI ha demostrado ser particularmente útil para la discriminación taxonómica. Para los taxones que fueron mal identificados a nivel de especie en *BOLD* y *GenBank*, la clasificación correcta en niveles taxonómicos más altos como el género y familia se logró en la mayoría de los casos. Las identificaciones erróneas a nivel de especie podrían atribuirse a la inclusión de especímenes mal identificados en las bases de datos públicas, dado que las identificaciones morfológicas entre especies estrechamente relacionadas son un desafío en muchos órdenes. Para que la identificación sea válida, la biblioteca de referencia debe ser representativa, completa y sin errores de identificación o de secuenciación (Meiklejohn et al., 2019).

Los resultados de la identificación a partir de la comparación de las 63 secuencias obtenidas con las bases de datos mostraron que las abejas del género *Melipona* presentan la mayor cantidad de especies productoras según

la base de datos de BOLD y según los resultados de la identificación taxonómica, las cuales se encontraron en la mayoría de provincias a excepción de Loja y Zamora Chinchipe. Estos resultados difieren de la caracterización realizada por Ramírez et al. (2013), en donde identificaron 89 especies de abejas sin aguijón a partir de 17 géneros, provenientes de las provincias de Loja, El Oro y Zamora Chinchipe utilizando claves taxonómicas y la ayuda de taxónomos expertos, para aumentar el conocimiento de la diversidad de abejas sin aguijón, debido a que en este estudio el género *Trigona* presentó el mayor número de especies, seguido por *Nannotrigona*, *Partamona* y luego *Melipona*. Sin embargo, estos géneros también fueron identificados en este estudio. En Loja predominó la especie del género *Scaptotrigona* y en Zamora Chinchipe se encontraron 3 especies diferentes pertenecientes a los géneros *Nannotrigona*, *Tetragonisca* y *Paratrigona*. Además, las especies de *Tetragonisca angustula* estuvieron presente en las provincias de El Oro, Zamora Chinchipe y Pastaza. Adicionalmente, estos datos pueden ser comparados con los resultados de caracterización mediante morfometría geométrica a partir de 113 abejas sin aguijón realizado por García et al. (2015), en donde estudiaron la efectividad de la morfometría geométrica como método de caracterización rápida de abejas sin aguijón en el sur del Ecuador y se identificaron las especies del género *Scaptotrigona*, *Trigona*, *Melipona*, *Oxytrigona*, *Cephalotrigona* y *Nannotrigona* al igual que en este estudio, en las provincias de Loja, Zamora Chinchipe y El Oro. Además, en el estudio de (García et al., 2015, pp.32-38), también se identificó el género *Geotrigona* en estas provincias, pero este género no se encontró en las muestras identificadas en este estudio. Las discrepancias entre los resultados de identificación de este estudio, con los otros realizados en el país pueden ser debido a que, si bien se analizaron especies de abejas sin aguijón de las provincias de Loja, El Oro y Zamora Chinchipe en todos los casos, los sitios de muestreo no fueron los mismos.

Tabla 10.

Resultados de la identificación molecular obtenidos al comparar con las bases de datos.

Código	Identificación taxonómica	GenBank	Identidad	BOLD	Identidad	N.º de individuos	N.º de Sec
OR15	<i>Cephalotrigona</i> sp.	<i>Frieseomelitta</i> sp BdM1886	93.57%	<i>Cephalotrigona</i> sp. 1	99.37%	1	Sec 1
OR16	<i>Melipona mimetica</i>	<i>Melipona</i> scutellaris	97.96%	<i>Melipona mimetica</i>	100%	1	Sec 2
OR17	<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>Tetragonisca</i> angustula	99.67%	<i>Tetragonisca</i> angustula	99.69%	1	Sec 3
OR18	<i>Trigona silvestriana</i>	<i>Trigona</i> sp. BdM1884	93.55%	<i>Trigona</i> sp.	98.73%	1	Sec 4
OR19	<i>Oxytrigona mellaria</i>	<i>Frieseomelitta</i> sp BdM1886	93.10%	<i>Oxytrigona</i> sp. 1	99.69%	1	Sec 5
OR20, 21	<i>Nannotrigona chapadana</i>	<i>Scaptotrigona</i> pectoralis	94.41%	<i>Nannotrigona</i> sp.1	100%	2	Sec 6
OR22,23,24	<i>Melipona indecisa</i>	<i>Melipona</i> scutellaris	98.12%	<i>Melipona mimetica</i> / <i>indecisa</i>	99.84%	3	Sec 7
OR25	<i>Melipona indecisa</i>	<i>Melipona</i> scutellaris	98.28%	<i>Melipona mimetica</i> / <i>indecisa</i>	99.69%	1	Sec 8
OR26	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca' n.sp	<i>Scaptotrigona</i> pectoralis	99.51%	<i>Scaptotrigona</i> sp.	99.84%	6	Sec 9
OR27	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca' n.sp	<i>Scaptotrigona</i> pectoralis	99.18%	<i>Scaptotrigona</i> sp.	99.69%	1	Sec 10
OR28, 59	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca' n.sp	<i>Scaptotrigona</i> pectoralis	99.18%	<i>Scaptotrigona</i> sp.	99.84%	2	Sec 11
OR29, 60	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca' n.sp	<i>Scaptotrigona</i> pectoralis	99.34%	<i>Scaptotrigona</i> sp.	100%	2	Sec 12
OR31	<i>Partamona</i> 1	<i>Partamona</i> bilineata	97.65%	<i>Partamona</i> orizabaensis	98.58%	1	Sec 13
OR58	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca'	<i>Scaptotrigona</i> pectoralis	99.51%	<i>Scaptotrigona</i> sp.	99.83%	1	Sec 14

	<i>n.sp</i>						
PS4, 9	<i>Melipona cf. "fuscopilosa" n. sp</i>	Melipona scutellaris	98.59%	Melipona costaricensis	99.59%	2	Sec 15
PS5	<i>Melipona nigrifacies</i>	Melipona scutellaris	99.06%	Melipona cramptoni	99.49%	1	Sec 16
PS6, 7, 8, 14	<i>Melipona grandis</i>	<i>Partamona mulata</i>	98.50%	Melipona grandis	100%	4	Sec 17
PS10,12	<i>Tetragonisca angustula</i>	Tetragonisca angustula	99%	Tetragonisca angustula	99.37%	2	Sec 18
PS11	<i>Paratrigona euteneata</i>	<i>Frieseomelitta sp BdM1886</i>	96.87%	<i>Plebeia frontalis</i>	99.53%	1	Sec 19
PS13	<i>Trigona silvestriana</i>	<i>Frieseomelitta sp BdM1886</i>	94.36%	<i>Tetragona clavipes</i>	99.13%	1	Sec 20
RN1	<i>Melipona eburnea</i>	Melipona scutellaris	98.90%	Melipona costaricensis	99.80%	1	Sec 21
RN2, 3,4 5	<i>Tetragonisca angustula</i>	Tetragonisca angustula	99%	Tetragonisca angustula	98.99%	4	Sec 22
RN6	<i>Melipona 'pseudoeburnea' n. sp.</i>	Melipona scutellaris	99.06%	Melipona costaricensis	99.80%	1	Sec 23
LO39-57	<i>Scaptotrigona 'problanca' n.sp</i>	Scaptotrigona pectoralis	99.34%	Scaptotrigona sp.	100%	17	Sec 24
ZC1	<i>Paratrigona 1</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	92.30%	Paratrigona guatemalensis	96.08%	1	Sec 25
ZC2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Tetragonisca angustula	99.17%	Tetragonisca angustula	99.37%	1	Sec 26
ZC3	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	93.81%	Nannotrigona BOL01	97.80%	1	Sec 27
LR32, 34, 37	<i>Melipona cf. "indecisa" n. sp.</i>	Melipona scutellaris	98.59%	Melipona sp. MP96	99.80%	3	Sec 28
LR33, 35, 36	<i>Melipona nitidifrons</i>	Melipona scutellaris	98.90%	Melipona cramptoni	99.49%	3	Sec 29
OA38	<i>Melipona 'pseudoeburnea' n. sp.</i>	Melipona scutellaris	98.59%	Melipona rufiventris/MP91/fuscopilosa	100%	1	Sec 30

Nota: Todos los valores de Query cover fueron altos.

Debido a que existieron incongruencias entre los datos de la identificación se planteó realizar la amplificación de la región 3' del gen COI para obtener un fragmento de mayor tamaño y determinar si de esta manera mejora la identificación. El análisis se realizó a partir de las 30 secuencias que presentaron variabilidad.

5.5. Optimización de la PCR para la región 3' del gen COI

La extracción de ADN se realizó a partir de un representante de cada muestra que presentaba cambios en la secuencia nucleotídica de la región 5' del gen COI. En este caso se extrajeron 30 abejas sin aguijón mediante el Kit de extracción de QIAGEN con el objetivo de preservar las muestras para futuros estudios. Al igual que en el caso anterior, se realizó la optimización a partir de un espécimen y el primer factor que se evaluó fue la concentración de cebadores, para lo cual se hicieron pruebas a 0.2 μM y 0.4 μM y se determinó que la concentración óptima para la pareja de cebadores MT6/S20 y Jerry/S20 fue de 0,4 μM . Adicionalmente, se realizó un gradiente de temperaturas en donde se estableció que la temperatura óptima de hibridación fue de 50°C para todas las combinaciones de cebadores (Figura 17).

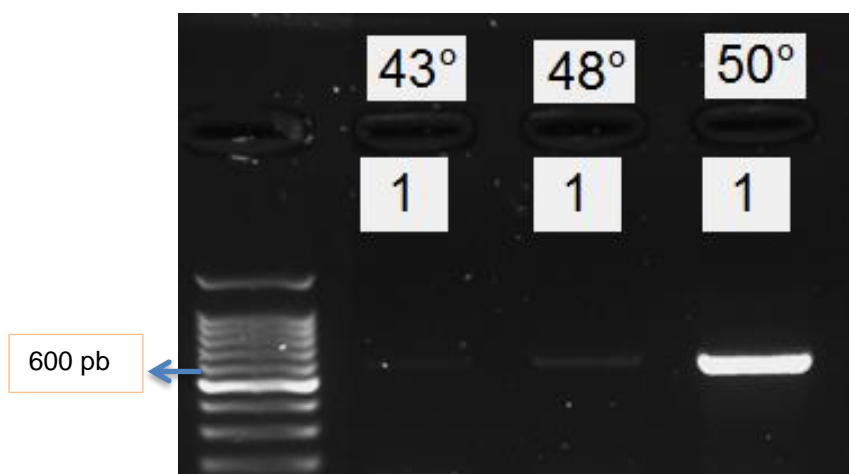


Figura 17. Resultados de la amplificación con los cebadores MT6/S20 en un gradiente de temperatura a 43°C, 48°C y 50°C.

5.6. Amplificación de la región 3' del gen COI

Se realizó la amplificación del fragmento 3' del gen citocromo c oxidasa I de las 30 abejas sin aguijón extraídas. En la Figura 18 se puede observar el tamaño de banda de los fragmentos amplificados y se estima que tienen alrededor de 600 pb. La amplificación fue positiva para todas las muestras.

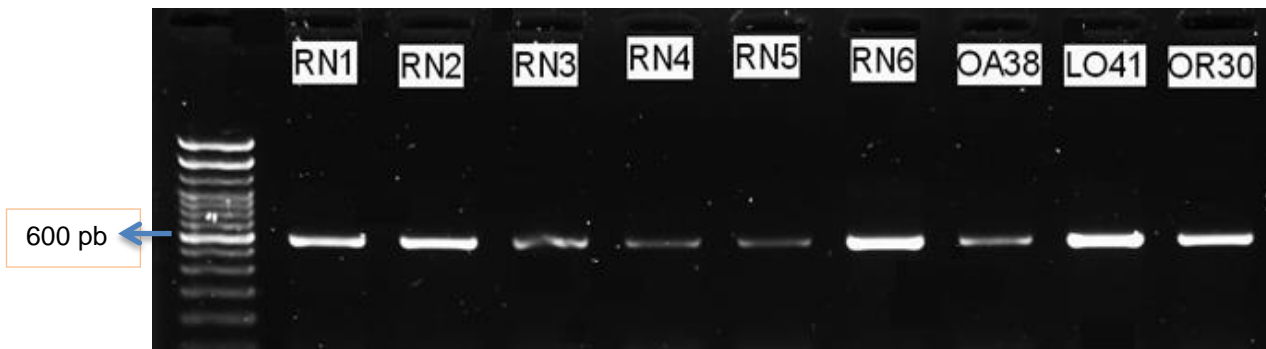


Figura 18. Electroforesis de la amplificación de la región 3' del gen COI de las muestras de las provincias que presentaron variabilidad con los cebadores MT6/S20.

5.7. Identificación usando el gen COI como código de barras

Se secuenció la región 3' del gen COI de los 30 individuos y se obtuvieron secuencias con un tamaño de 522 pares de bases. Cada secuencia obtenida se comparó con la base de datos de *GeneBank* del NCBI y con la base de BOLD (*Barcode of Life Data Systems*), mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). En este caso la identificación mejoró a nivel de género en *GenBank* pero no fue favorecida en la base de datos de BOLD, debido a que no se encontraron coincidencias en muchas de las especies. Al aumentar el tamaño del fragmento del gen COI, se obtuvieron secuencias de 1164 pares de bases, pero no existieron resultados significativos debido a que la mayoría coincidía con la identificación realizada con la región 5' y por ende se presentaron dificultades al identificar las abejas a nivel de especie. Las secuencias de los individuos que no tienen coincidencias con ninguna de las

especies de las bibliotecas de referencia empleadas, pueden sugerir una nueva especie o simplemente una especie que no ha sido incluida en dichas bases de datos. Independiente del marcador molecular que se utilice, un gran inconveniente que presentan los códigos de barras de ADN es que las bases de datos en algunos casos carecen de datos suficientes que permitan utilizarlas como referencia. A pesar de que mediante este tipo de identificación ha sido posible identificar varios taxones, hasta el momento no existe una región que permita la identificación de todas las especies de animales (Paz et al., 2011, pp.161-176). Utilizar un solo gen para identificar especies puede no ser representativo por lo que puede generar resultados engañosos. Sin embargo, utilizar marcadores genéticos nucleares y mitocondriales diferentes, puede favorecer a la delimitación de especies (Hurtado et al., 2016, pp.171-181).

5.8. Análisis de la variabilidad del gen COI

5.8.1. Análisis de la composición nucleotídica

El análisis de la variabilidad se realizó a partir de 1164 pares de bases, al juntar los fragmentos de la región 5' y 3' del gen COI. Se realizó el análisis para los individuos que mostraron diferencias en su secuencia nucleotídica, mediante el programa DnaSP.

Se determinó que de las 1164 pares de bases, 334 corresponden a sitios polimórficos y 830 fueron regiones conservadas (Tabla 11). Dentro de las regiones de muestreo, las secuencias de los especímenes de la provincia de El Oro, presentaron el mayor número de sitios polimórficos con un valor de 253 y las secuencias de los especímenes de la provincia de Los Ríos tuvieron el menor valor con 26 sitios segregantes. Los polimorfismos presentes en el ADN mitocondrial (mtDNA) son usados comúnmente como marcadores moleculares para la genética de poblaciones y para la sistemática de abejas sin aguijón,

debido a que sus secuencias mutan más rápido que las del ADN nuclear (Thummajitsakul et al., 2011, pp.499-510). De las 30 secuencias estudiadas, se encontraron 29 haplotipos, de los cuales 14 corresponden a la provincia de El Oro, 9 a la provincia de Pastaza, 3 a la provincia de Zamora Chinchipe, 2 a la provincia de los Ríos y 1 a Orellana. La mayoría de poblaciones son genéticamente diversas, por lo que existen diferentes haplotipos. Cuando una población presenta solo un haplotipo, contrasta con una alta diversidad (Souza, 2018). En el estudio realizado por Hurtado et al. (2016), en el cual emplearon marcadores nucleares y mitocondriales para delimitar especies de abejas sin aguijón, se determinó que la mayor diversidad de haplotipos se encontraron en los marcadores mitocondriales, particularmente en *cox1*. Estos resultados sugieren que los marcadores mitocondriales, muestran una mayor señal discriminante en contraste con los marcadores nucleares. Finalmente, la diversidad nucleotídica de las secuencias totales fue del 6,8% y en las provincias este valor varió desde el 2% en la provincia de Los Ríos al 9,6% en la provincia de Zamora Chinchipe. Este valor se produce de la estimación del número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias (Librado & Rozas, 2009). Finalmente, la diversidad de haplotipos fue de 0.998 y hace referencia a la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que estos análisis no son representativos de las poblaciones debido a que se emplearon pocas muestras. En poblaciones animales, la diversidad de haplotipos y nucleótidos son las estimaciones más comúnmente reportadas de la diversidad de secuencias de ADN para el gen COI. El tamaño de muestra influye en estos estudios dado que un valor no representativo puede generar estimaciones altamente variables que dificultan las variaciones precisas de diversidad de nucleótidos y haplotipos (Goodall et al., 2012, pp.50-56).

Tabla 11.

Diversidad nucleotídica del gen COI de las especies de abejas sin aguijón analizadas

	Gen COI (citocromo c oxidasa I)
Número de sitios polimórficos (S)	334
Número de haplotipos (h)	29
Diversidad de haplotipos (genes) (Hd)	0,998
Diversidad nucleotídica (Pi)	0,06811
Promedio del número de diferencias nucleotídicas (Kt)	79,280

Adicionalmente, se realizó el análisis de la composición nucleotídica de las diferentes provincias mediante el programa MEGA7. Las frecuencias de nucleótidos del gen COI de las abejas recolectadas revelaron una mayor cantidad de timina y adenina con un promedio de 44% y 33,4% respectivamente, que, de citosina y guanina, las cuales presentaron valores con un promedio de 10,9% y 11,7% respectivamente. En el estudio de (Hurtado et al., 2013, pp.1-10) en abejas del género *Scaptotrigona*, en el que utilizaron el gen COI para determinar la diversidad genética, se encontró un mayor porcentaje de Timinas y Adeninas que de Citosinas y Guaninas al igual que en este estudio. Según (Giraldo et al., 2011, pp.273-278) este patrón concuerda con los resultados observados en la mayoría de estudios de genomas mitocondriales de insectos

5.9. Análisis de la diversidad del gen COI en abejas sin aguijón utilizadas como productoras

El análisis de diversidad se realizó a partir del alineamiento de todas las secuencias, a excepción de las que tenían una similitud del 100%. Luego se generó una matriz de distancias mediante el modelo de Kimura de 2 parámetros con el objetivo de analizar el porcentaje de divergencia y similitud entre las muestras. Es importante destacar, que los análisis realizados en los siguientes apartados no constituyen un estudio de poblaciones de abejas sin aguijón debido a que las muestras no son representativas de los lugares en donde fueron colectadas.

El análisis se efectuó en las 30 secuencias que presentaron variabilidad, donde se determinó que el porcentaje de diversidad fue de 7,2%. Por otro lado, se realizó una matriz de distancias entre los 9 géneros identificados (Anexo 2) donde se pudo determinar que las muestras tuvieron una divergencia promedio de 8,5%. La menor divergencia se encontró entre las muestras de abejas sin aguijón pertenecientes al género *Tetragonisca* y *Scaptotrigona* con un valor de 7,1% y el mayor porcentaje de divergencia fue entre las muestras del género *Oxytrigona* y *Nannotrigona* con un valor de 11,2%. También se realizó una matriz de distancias entre las 18 especies identificadas (Anexo 3) y se pudo determinar que las muestras presentaron una divergencia de 7,5%. El mayor porcentaje de divergencia se dio entre las muestras de las especies *Oxytrigona mellaria* y *Nannotrigona testaceicornis* con un valor de 12%. Los altos valores de divergencia en las secuencias, constituyen un soporte para los procesos de separación taxonómica de especies. Sin embargo, estos valores pueden variar entre los distintos grupos de invertebrados (Sun et al., 2018). Las distancias promedio de los códigos de barras de ADN al utilizar el gen COI entre especies de Lepidópteros es de 7.70% (Hebert et al., 2010, pp.359-362), en Dípteros el promedio es de 9,3% y en Himenópteros de 11.5% (Hebert, et al., 2003, pp.96-99).

Finalmente se realizó una matriz de distancias entre las abejas sin aguijón del género *Melipona* (Anexo 4) debido a que presentaron la mayor cantidad de especies. Se determinó que las muestras tuvieron una divergencia de 2,6%. El menor porcentaje de divergencia se dio entre las especies de *Melipona fuscopilosa* y *M. eburnea*, seguido por las especies de *M. pseudoeburnea* y *M. eburnea* con un valor de 0,5%. La mayor divergencia se observó entre los individuos de *Melipona grandis* en relación con *M. nigrifacies*, *M. eburnea* y *M. fuscopilosa* con un valor de 5,2%. Los valores de divergencia fueron muy bajos. Esto puede ser debido a la presencia de una diversidad de especies crípticas o debido a identificaciones erróneas, lo que provoca que no exista un “barcode gap” claro mediante la matriz de distancias con el modelo K2P. Por otro lado, una baja divergencia genética entre especies que son morfológicamente distinguibles, puede ser provocada debido a procesos de especiación (Lin et al., 2015). Además según (Mallet & Willmott, 2003) existen limitaciones al utilizar el gen COI como código de barras genético, debido a que las diferencias en las secuencias de ADN entre especies estrechamente relacionadas a menudo son muy pequeños para permitir su discriminación. Según la identificación taxonómica y según la identificación mediante código de barras al utilizar el gen COI mediante la base de datos de BOLD, existieron 8 especies pertenecientes al género *Melipona*, pero existieron coincidencias entre ambos métodos únicamente con las especies *Melipona grandis*, *Melipona indecisa* y *Melipona mimetica*. Por otro lado, al realizar la identificación mediante la base de datos de *GenBank* todos los individuos pertenecieron a la especie *Melipona scutellaris*. Según (Cong et al., 2017) el código de barras de ADN es muy efectivo para discriminar especies estrechamente relacionadas y especies crípticas. Las diferencias de códigos de barras superiores al 2% generalmente hacen referencia a la existencia de diferentes especies biológicas, aunque se han reportado excepciones. En base a esto, la identificación mediante la base de datos de BOLD y mediante morfología es probable que sea más precisa debido a que según ambos datos existen varias especies de *Melipona* y debido a que los datos de divergencia fueron mayores al 2% en la mayoría de especies. Sin embargo en el estudio realizado por

(Silverio et al., 2014) la especie *Melipona cramptoni* tuvo un porcentaje de identidad muy alto con la secuencia COI de *Melipona scutellaris*, seguido por la especie *Melipona rufiventris* y *Melipona eburnea*, esto puede ser una razón del por qué en cada una de las bases de datos existieron identificaciones diferentes. Por estas razones no fue posible caracterizar las especies al 100%.

5.9.2. Análisis de la variabilidad genética del género y de la especie

Se realizó un análisis de variabilidad para determinar las diferencias intragénero. Para esto, se utilizaron únicamente las secuencias de los individuos identificados para más de una especie dentro de un mismo género. En este caso, se realizó el análisis entre los individuos identificados como el género *Melipona*, *Nannotrigona* y *Paratrigona*. Se determinó que el género con el menor porcentaje de diversidad lo constituye al género *Melipona* con un valor 2,2% al analizar las 8 especies identificadas para este género. El mayor porcentaje de diversidad se observó entre las abejas correspondientes a los géneros *Nannotrigona* y *Paratrigona* con un valor de 7,8% y 7,7% respectivamente, que hacen referencia a un porcentaje de similitud del 92,2% y 92,3% entre las dos especies identificadas para estos géneros (Tabla 12). La variación del porcentaje de diversidad entre los géneros puede ser debido al número de especies por género analizadas. Un alto valor de divergencia genética (>5%) proporciona un fuerte apoyo para la separación taxonómica de especies (Sun et al., 2018). Las divergencias de la secuencia COI entre especies de animales cogenericas generalmente son superiores al 2% (Hebert et al., 2003, pp.96-99), por lo que las divergencias interespecíficas inferiores a este valor suelen ser inusuales en diversos grupos de animales. Sin embargo, algunas especies que son evidentemente distintas en los géneros en grupos dentro de la orden Hymenoptera, exhibieron divergencias menores al 1% (Wang et al., 2011, pp.1–17), como en este caso en el género *Melipona*.

Tabla 12.

Variabilidad de los géneros identificados con más de un individuo muestreado.

Variabilidad por género	Diversidad (%)	Rango (%)
<i>Melipona</i>	2,6	(0,5 - 5,2)
<i>Nannotrigona</i>	7,8	-
<i>Paratrigona</i>	7,7	-

Por otro lado, se realizó el análisis de la variabilidad intraespecífica con los representantes de cada especie que presentaron más de un individuo con diferencias en la secuencia nucleotídica. En este caso se utilizaron muy pocos individuos para el análisis debido a que son escasas las especies con varios representantes. Se determinó que las especies que tenían el menor porcentaje de diversidad fueron las de *Scaptotrigona problanca* con un valor de 0,2% y las que presentaron el mayor porcentaje de diversidad fueron las abejas correspondientes a la especie *Tetragonisca angustula* con un valor de 0,7% (Tabla 13). Estos datos pueden ser comparados con los valores obtenidos en el estudio de (Hurtado et al., 2013, pp.1-10), donde se determinó que la divergencia intraespecífica de las especies del género *Scaptotrigona* provenientes de Mesoamérica fue del 0,7%. Por otro lado en el estudio realizado por (Sheffield et al., 2009, pp.196-207) con abejas, la divergencia intraespecífica media del gen COI fue menor al 0,5%. Debido a que las tasas de evolución mitocondrial en Hymenopteros son altas en comparación con otros grupos de insectos, se esperaba un valor divergencias intraespecíficas parecido. Según (Hebert et al., 2004, pp.14812-14817) el código de barras de ADN puede ser útil en la identificación de especies debido a que generalmente las divergencias de secuencia son mucho más bajas entre los individuos de una misma especie, que entre especies estrechamente relacionadas. Además, hay que tomar en cuenta que los valores de divergencia intraespecífica en genes mitocondriales rara vez son superiores al 2%, por lo que la mayoría se encuentran en valores inferiores al 1% (Avice, 2000). Sin embargo, a pesar de que las secuencias presentan valores de divergencia intraespecífica bajos, no

fue posible caracterizar las especies al 100% debido a que en algunos casos se llegaron a tener hasta tres identificaciones diferentes de acuerdo al método empleado. Según (Hebert et al., 2004, pp.14812-14817) la divergencia con la especie más cercana debe ser al menos 10 veces mayor que la distancia genética intraespecífica promedio. Este principio no se cumple en el caso de las especies identificadas como el género *Melipona*, debido a que los valores de divergencia intraespecífica e interespecífica son muy cercanos, lo que impide su correcta identificación mediante el uso de código de barras de ADN al utilizar el gen COI. Esto puede ser producto de que el gen COI dentro de esta tribu es poco variable.

Tabla 13.

Variabilidad de las especies identificadas en las principales provincias meliponicultoras de Ecuador.

Variabilidad por especie	Diversidad (%)	Rango (%)
<i>Tetragonisca angustula</i>	0,7	(0,3 – 1)
<i>Melipona cf "indecisa" n. sp.</i>	0,6	(0,2 – 1)
<i>Melipona eburnea y pseudoeburnea / Melipona costaricensis y Melipona rufiventris</i>	0,6	(0,2 – 0,9)
<i>Scaptotrigona 'problanca' / Scaptotrigona pectoralis y Scaptotrigona sp.</i>	0,2	(0,0 – 0,5)

El análisis de la variabilidad intraespecífica según las provincias reveló que la variabilidad de las especies de la provincia de Loja es muy baja debido a que las 17 secuencias, pertenecientes a la especie *Scaptotrigona 'problanca'* dada por la morfología, *Scaptotrigona pectoralis* dada por la base de datos de GenBan, y *Scaptotrigona sp.* Dada por la base de datos de BOLD, tuvieron una divergencia del 0%. Se realizó el análisis de la variabilidad entre las provincias

con aquellas especies que presentan varios individuos en cada sitio. El análisis se realizó primero entre los individuos que son del mismo sitio y luego entre los individuos que son de distintos sitios. Sin embargo, el número de muestra no es suficiente para hacer un análisis de la población de estas especies de abejas sin aguijón. El análisis de la variabilidad intraespecífica de las muestras identificadas como *Scaptotrigona 'problanca'*, mostraron que el menor porcentaje de divergencia fue de 0,2% entre las muestras recolectadas de la provincia de Loja con las de El Oro y el mayor porcentaje de divergencia fue de 0,3% entre las muestras de El Oro. El análisis de las muestras identificadas como *Melipona indecisa*, mostraron que el menor porcentaje de divergencia fue de 0,2% entre las muestras recolectadas de la provincia El Oro y el mayor porcentaje de divergencia fue de 0,9% entre las muestras de Los Ríos y El Oro. Los resultados de la variabilidad de las muestras identificadas como *Tetragonisca angustula*, mostraron que el menor porcentaje de divergencia fue de 0,3% entre las abejas sin aguijón recolectadas de la provincia de Pastaza y la mayor divergencia fue de 1% entre las abejas de la provincia de Zamora Chinchipe en relación con las de Pastaza. Finalmente, los resultados de la variabilidad intraespecífica de las muestras identificadas como *Melipona eburnea* y *pseudoeburnea*, mostraron que el menor porcentaje de divergencia fue de 0,2% entre las abejas sin aguijón recolectadas de la provincia de Pastaza y la mayor divergencia fue de 0,8% entre las abejas de la provincia de Orellana en relación con las de Pastaza. Estos resultados sugieren que existe una mayor diversidad entre los individuos identificados para una misma especie al comparar entre distintas provincias, que dentro de una misma provincia, a excepción de la especie *Scaptotrigona 'problanca'* de la provincia de El Oro ya que existió una mayor divergencia dentro de esta provincia que al comparar con los individuos de Loja. Esto puede estar asociado a la restricción o falta de flujo genético entre colonias provenientes de diferentes sitios. Además, la baja expansión de una población de abejas sin aguijón, podría ser ocasionada por enfermedades, falta de sitios de anidación o de recursos alimentarios o debido a la competencia con otras especies (Nascimento et al., 2010, pp.394-397). Por otro lado, las diferencias genéticas dentro de las poblaciones, puede ser el

resultado de un flujo genético interrumpido debido a la existencia de barreras geográficas entre individuos cercanos geográficamente (Bonatti et al., 2014, pp.17-24). Finalmente, en las abejas sin aguijón el flujo genético materno puede estar limitado, debido a la baja capacidad de dispersión de los enjambres (Tavares et al., 2013, pp.111-117). Sin embargo, estos datos no son suficientes para determinar la diversidad de especies de abejas sin aguijón en el Ecuador, debido a que el número de individuos por especie, no son representativas de cada provincia.

Tabla 14.

Variabilidad intraespecífica entre los géneros Melipona y Scaptotrigona dentro de las provincias.

Provincia	Género	No. de individuos	Media (%)	Rango (%)
Loja	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca'	17	0,0	-
El Oro y Loja	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca'	6	0,2	(0,0 - 0,5)
El Oro	<i>Scaptotrigona</i> 'problanca'	5	0,3	(0,1 - 0,5)
	<i>Melipona indecisa</i>	2	0,2	-
El Oro y Los Ríos	<i>Melipona indecisa</i>	3	0,9	-
Pastaza, Zamora y El Oro	<i>Tetragonisca angustula</i>	4	0,7	(0,6 – 1)
Pastaza	<i>Tetragonisca angustula</i>	2	0,3	-
	<i>Melipona eburnea</i> y <i>pseudoeburnea</i>	2	0,2	-
Pastaza y	<i>Melipona eburnea</i> y	3	0,8	-

Orellana	<i>pseudoeburnea</i>			
----------	----------------------	--	--	--

5.10. Análisis filogenético

Se reconstruyó un árbol filogenético mediante máxima verosimilitud, basado en el modelo GTR (General Time Reverse)+G+I luego de estimar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos (Anexo 1). Adicionalmente se utilizaron 100 repeticiones de bootstrap no paramétrico como medida de soporte. En la Figura 19 se puede observar el código de las provincias junto con el número de colmena para cada taxa, adicional a esto el nombre de la especie según morfología y a continuación el nombre de la especie identificada mediante el gen COI. Las especies que coincidieron con ambos métodos presentan el nombre de la única especie identificada.

El árbol proporciona información importante debido a que la mayoría de especies identificadas parecen tener coherencia filogenética (Figura 19), por lo que el gen COI constituye un buen marcador filogenético en abejas sin aguijón ya que ayudó a diferenciar las especies. Las especies que no coinciden entre los diferentes métodos, probablemente no estén bien identificadas. Por otro lado, los individuos se agrupan entre especies, independientemente del origen geográfico. A excepción de las especies identificadas como el género *Paratrigona*, debido a que se encuentran en clusters apartados. Sin embargo, no queda claro el problema de identificación respecto a las especies de *Melipona*, debido a que son muy parecidas entre sí, tal y como muestran los análisis de diversidad intraespecífica e interespecífica. Esto puede ser debido a que el gen COI es poco variable dentro de las especies de este género. Al igual que en este estudio, en la investigación realizada por Ramírez et al. (2010) en especies del género *Melipona*, al realizar la filogenia las ramas internas dentro de *Melipona* no se resolvieron. Una rápida diversificación del linaje puede explicar los valores de soporte bajos. Por otro lado, según (Cristiano et al., 2012, pp.527-538) el uso de una sola secuencia por especie, puede no ser suficiente para obtener buenas hipótesis filogenéticas. La estrategia para evitar este problema es utilizar al menos dos secuencias

diferentes por especies. Además, hay que tomar en cuenta que en estudios de identificación mediante códigos de barras con el uso de genes mitocondriales, pueden surgir mayores problemas por lo que se deben tomar precauciones adicionales, como el uso complementario con genes nucleares.

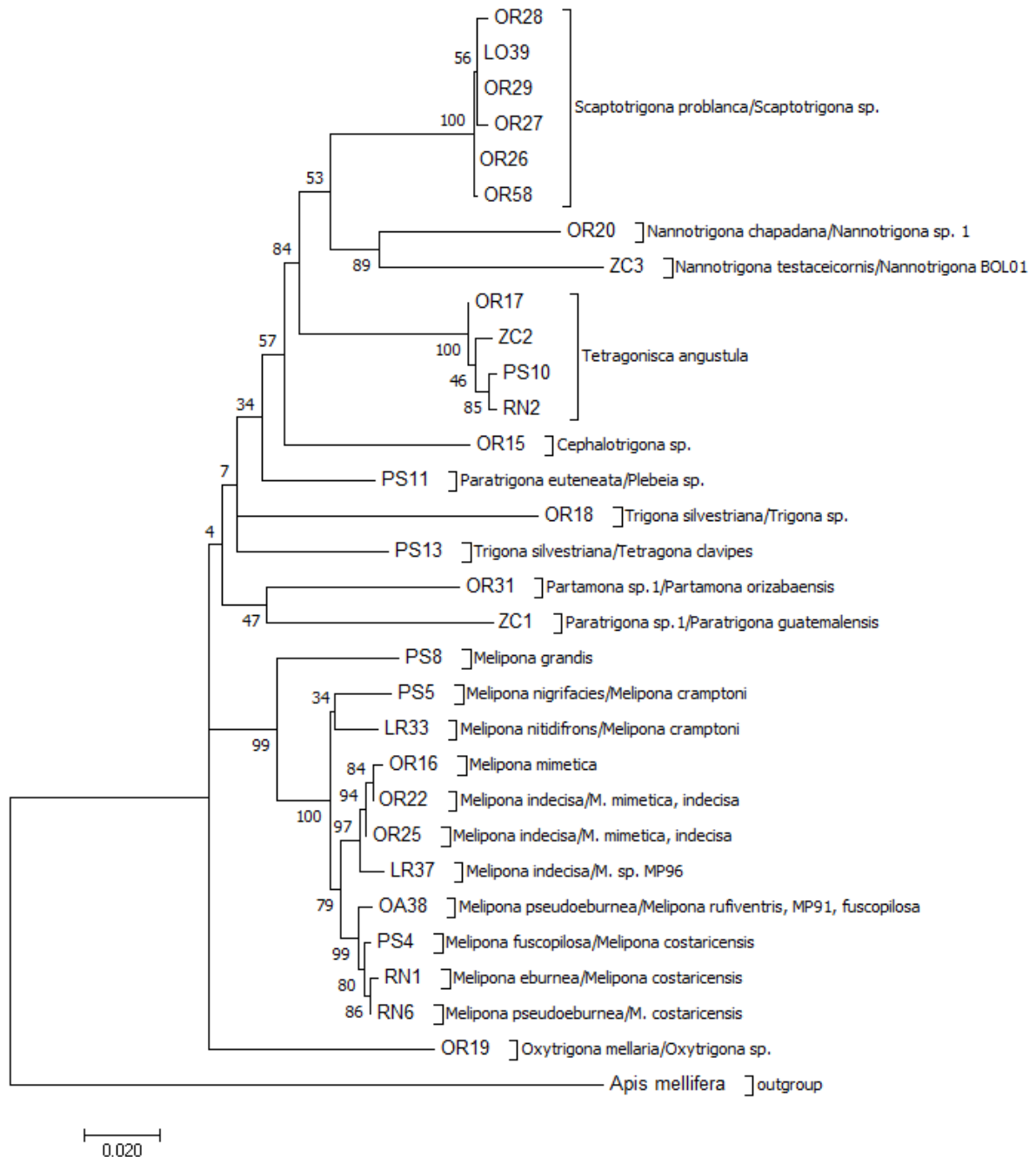


Figura 19. Árbol filogenético que representa las relaciones evolutivas y la distancia genética de las secuencias del fragmento completo del gen COI de las especies previamente identificadas.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

En conclusión, en las principales provincias meliponicultoras de Ecuador a partir de las cuales se realizó este estudio, existen 18 especies de abejas sin aguijón, pertenecientes a 9 géneros utilizadas por los meliponicultores. Las especies de abejas sin aguijón más utilizadas en Ecuador corresponden al género *Melipona*. En las provincias de El Oro y Loja las abejas más utilizadas constituyen a las especies del género *Melipona* y *Scaptotrigona*, además la especie *Tetragonisca angustula* está presente en la mayoría de provincias estudiadas. La región 5' del gen COI fue suficiente para realizar la identificación a nivel de género de las abejas de la tribu Meliponini de Ecuador mediante la base de datos de BOLD, debido a que presentó mejores coincidencias con los datos de la identificación taxonómica que la base de datos de *GenBank*. Sin embargo, la identificación de todas las especies fue difícil de llevar a cabo a pesar de realizarse un análisis de variabilidad de las especies que presentaron discrepancias entre los diferentes métodos de identificación empleados sobre todo en las especies del género *Melipona*, debido a que la variabilidad intraespecífica casi no difiere en relación a la variabilidad interespecífica. Por lo que, el gen COI no fue suficiente para determinar la variabilidad entre las especies de *Melipona* muestreadas en este estudio. Los resultados de diversidad mostraron que las muestras de Loja tienen la menor variabilidad intraespecífica y que en la mayoría de provincias este valor fue mayor entre, que dentro de las provincias. Sin embargo, estos análisis no constituyen un estudio de poblaciones debido a que las especies empleadas no fueron representativas de cada provincia.

6.2. Recomendaciones

Debido a que el gen COI no fue suficiente para identificar correctamente algunas especies por presentar poca variabilidad, se recomienda analizar otros

genes nucleares como EF-1 α (factor de elongación-1 α) y Arg-K (arginina quinasa), para solucionar este problema.

REFERENCIAS

- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, M. A., & Aldasoro, E. (2018). Biología de las abejas sin aguijón. *En Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies*. México: ECOSUR. Recuperado el 30 de Mayo de 2019 de <http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/14197.pdf>
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press. *The Genetical Society of Great Britain, Heredity*, 85, 199-201. Recuperado el 21 de Julio de 2019 de <https://www.nature.com/articles/6887654>
- Baquero, L., & Stamatti, G. (2007). Las abejas sin aguijón. *En Cría y manejo de abejas sin aguijón*. Argentina: Ediciones del Subtrópico. Recuperado el 3 de Mayo de 2019 de <http://proyungas.org.ar/wp-content/uploads/2014/12/criaymanejodeabejassinaguijon.pdf>
- Beedanagari, S., Vulimiri, S. V., Bhatia, S., & Mahadevan, B. (2014). *Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. Biomarkers in Toxicology*, 729–742. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00043-9>
- Bonatti, V., Simões, Z. L. P., Franco, F. F., & Franco, T. M. (2014). *Evidence of at least two evolutionary lineages in Melipona subnitida (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. Naturwissenschaften*, 101(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1123-5>
- Botero, A., Paredes, M., Groot, H., Camacho, G., & Realpe, E. (2016). Análisis de las secuencias citocromo oxidasa I y espaciadores ribosomales transcritos internos (ITS) I y II y 5.8S) para la identificación de especies de interés forense. *Entomología mexicana*, 3: 695-706. Recuperado el 21 de Julio del 2019 de <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2016/EMF/Em%20695->

706.pdf

- Chidi, O. H., & Odo, P. E. (2017). *Meliponiculture for sustainable economy*. En *Proceeding of the 4th Delta State University Faculty of Science International Conference, Abraka, Delta State, Nigeria* (pp. 131–137). Recuperado el 4 de Mayo del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/320922565_Meliponiculture_for_Sustainable_Economy
- Cong, Q., Shen, J., Borek, D., Robbins, R. K., Opler, P. A., Otwinowski, Z., & Grishin, N. V. (2017). *When COI barcodes deceive: complete genomes reveal introgression in hairstreaks*. *Proceedings. Biological Sciences*, 284(1848). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1735>
- Crane, E. (2009a). *Apis Species: (Honey Bees)*. *Encyclopedia of Insects*, 31–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00009-6>
- Crane, E. (2009b). *Beekeeping*. *Encyclopedia of Insects*, 66–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00019-9>
- Cristiano, M. P., Fernandes, T., & Yotoko, K. S. (2012). *Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees*. *Apidologie*, 43(5), 527–538. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0122-4>
- de Souza, F. S., Costa, M., de Oliveira, E., Ribeiro, M., Souza, B., Araújo, E. D., Imperatriz, V. L., de Carvalho, C. (2018). *Genetic Variability of Melipona subnitida (Hymenoptera: Apidae) in Introduced and Native Populations*. *Journal of Insect Science (Online)*, 18(5). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey089>
- Farouk, K., Palmera, K., & Sepúlveda, P. (2014). *Abejas*. *INFOZOA*, 6, 1-10. Recuperado el 30 de Mayo del 2019 de https://www.unimagdalena.edu.co/Content/Public/Docs/Entrada_Facultad3/adjunto_1029-20181004104847_528.pdf

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299. Recuperado el 12 de Junio del 2019 de <https://pdfs.semanticscholar.org/943d/38b9d96f8222e883604822bcafb7930ca6da.pdf>
- Frankham, R. (2001). *Conservation Genetics. Encyclopedia of Genetics*, 458–462. <https://doi.org/10.1006/RWGN.2001.0271>
- Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. de M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., & Quezada-Euán, J. (2009). *Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. Apidologie*, 40(3), 332–346. <https://doi.org/10.1051/apido/2009012>
- García-Olivares, V., Zaragoza, C., Ramirez, J., Guerrero, A., & Ruiz, C. (2015). Caracterización rápida de la biodiversidad usando morfometría geométrica: Caso de estudio con abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) del sur de Ecuador. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 7(1), B32-B38. <https://doi.org/10.18272/aci.v7i1.226>
- García, L. A., Rodrigo, J. P., Sánchez, P., Ramos, S., & Suárez, C. (2004). Extracción de adn con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 55(3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0001-6519\(04\)78497-6](https://doi.org/10.1016/S0001-6519(04)78497-6)
- Gifex. (2011). *Mapa político del Ecuador*. Recuperado de https://www.gifex.com/fullsize/2011-11-11-14894/Mapa_politico_del_Ecuador.html
- Giraldo, P., Uribe, S., & López, A. (2011). Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(2), 273–278. Recuperado el 20 de Julio del 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v37n2/v37n2a20.pdf>
- Goodall-Copestake, W. P., Tarling, G. A., & Murphy, E. J. (2012). *On the*

comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene cox1 in animals. Heredity, 109(1), 50–56. <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.12>

Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Sacchetti, G. (2009). *Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. Food Chemistry, 114(4), 1413–1420. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.023>*

Hagen, K. S., Mills, N. J., Gordh, G., & Mcmurtry, J. A. (1999). *Terrestrial Arthropod Predators of Insect and Mite Pests. Handbook of Biological Control, 383–503. <https://doi.org/10.1016/B978-012257305-7/50063-1>*

Hajibabaei, M., deWaard, J. R., Ivanova, N. V, Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., Hebert, P. (2005). *Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 360(1462), 1959–1967. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1727>*

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>*

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(41), 14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>*

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & Dewaard, J. R. (2003). *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. The Royal Society, S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>*

Hebert, P., Dewaard, J., & Landry, J.-F. (2010). *Evolutionary biology DNA*

- barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol .Lett.*, 6, 359–362. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0848>
- Hrncir, M., Jarau, S., & Barth, F. G. (2016). *Stingless bees (Meliponini): senses and behavior*. *Journal of Comparative Physiology A*, 202(9–10), 597–601. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1117-9>
- Hurtado-Burillo, M., May-Itzá, W., Quezada-Eúan, J., De la Rúa, P., & Ruiz, C. (2016). *Multilocus species delimitation in Mesoamerican Scaptotrigona stingless bees (Apidae: Meliponini) supports the existence of cryptic species*. *Systematic Entomology*, 42(1), 171–181. <https://doi.org/10.1111/syen.12201>
- Hurtado-Burillo, M., Ruiz, C., de Jesús May-Itzá, W., Quezada-Eúan, J. J. G., & De la Rúa, P. (2013). *Barcoding stingless bees: genetic diversity of the economically important genus Scaptotrigona in Mesoamerica*. *Apidologie*, 44(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0146-9>
- Hurtado, M. (2015). *Molecular and morphometric characterization of the genus Scaptotrigona (Apidae: meliponini) in Mesoamérica*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Recuperado el 21 de Enero del 2019 de <https://www.tdx.cat/handle/10803/349217>
- Kimura, M. (1980). *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). *DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- Lanteri, A. A. (2007). *Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología*. *Rev. Soc. Entomol. Argent*, 66(3-4), 15-25. Recuperado el 21 de Enero del 2019 de <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/viewFile/31470/27983>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lin, X., Stur, E., & Ekrem, T. (2015). *Exploring Genetic Divergence in a Species-Rich Insect Genus Using 2790 DNA Barcodes*. *PLOS ONE*, 10(9), e0138993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138993>
- López, M., Rivera, M. G., Viettri, M., Lares, M., Morocoima, A., Herrera, L., & Ferrer, E. (2014). *Comparing two protocols of DNA extraction of Trypanosoma cruzi cultured in axenic medium*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(2), 222–227. Recuperado el 11 de Junio del 2019 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000200005
- Loyola, N., & Pezo, K. (2018). *Diversidad de insectos polinizadores y su respuesta a recursos florales, temperatura, humedad, precipitación y viento en un matorral andino del Ecuador*. Universidad del Azuay . Recuperado el 7 de Julio del 2019 de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/8195/1/13917.pdf>
- Mallet, J., & Willmott, K. (2003). *Taxonomy: renaissance or Tower of Babel?* *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 57–59. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00061-7)
- Martínez, M. (2015). *Desarrollo sostenible y conservación etnoecológica a través de la meliponicultura, en el Sur de Ecuador*. Universidad Internacional de Andalucía. Recuperado el 4 de Mayo del 2019 de https://dspace.unia.es/bitstream/handle/10334/3519/0673_Martinez.pdf?se

quence=1

- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P. K. L. (2006). *DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success*. *Systematic Biology*, 55(5), 715–728. <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>
- Meiklejohn, K. A., Damaso, N., & Robertson, J. M. (2019). *Assessment of BOLD and GenBank – Their accuracy and reliability for the identification of biological materials*. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217084>
- Michener, C. (2007). *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press. Recuperado el 26 de Octubre del 2018 de <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Beekeeping/Thep-Bees-of-the-World.pdf>
- Nascimento, M. A., Batalha, H., Waldschmidt, A. M., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., & Salomão, T. M. F. (2010). *Variation and genetic structure of Melipona quadrifasciata Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern*. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2), 394–397. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000052>
- Nates-Parra, G. (2001). *Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia*. *Neotropical Braconidae Wasps. Biota Colombiana*, 2(3), 233-248. Recuperado el 30 de Abril del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/237794949_Las_Abejas_sin_Agujion_Hymenoptera_Apidae_Meliponini_de_Colombia
- Nates-Parra, G., & Rosso, J. M. (2013). *Diversity of Stingless Bees (Hymenoptera:Meliponini) Used in Meliponiculture in Colombia*. *Acta Biológica Colombiana*, 18(3), 415-426. Recuperado el 7 de Julio del 2019 de <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319029232001.pdf>
- Nates-Parra, G. (1990). *Abejas de Colombia. III. Clave para géneros y subgéneros de Meliponinae (Hymenoptera: Apidae)*. *Acta Biológica*

- Colombiana*, 2(6). Recuperado el 1 de Junio del 2019 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/25753/28521>
- Ocampo, S. (2018). UTPL fortalece la producción de abejas sin aguijón en la provincia de Loja. Sala de prensa. Recuperado el 5 de Mayo del 2019 de <https://noticias.utpl.edu.ec/sala-prensa/?q=node/162>
- Oldroyd, B. P., & Pratt, S. C. (2015). *Comb Architecture of the Eusocial Bees Arises from Simple Rules Used During Cell Building*. *Advances in Insect Physiology*, 49, 101–121. <https://doi.org/10.1016/BS.AIIP.2015.06.001>
- Padron, S., Padrón, P. S., Roubik, D. W., & Picón, R. P. (2018). *Researches of taxonomy of different groups of Insects View project A Preliminary Checklist of the Orchid Bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) of Ecuador. Article in Psyche A Journal of Entomology*. <https://doi.org/10.1155/2018/2678632>
- Pauls, S. U., Lumbsch, H. T., & Haase, P. (2006). *Phylogeography of the montane caddisfly *Drusus discolor*: evidence for multiple refugia and periglacial survival*. *Molecular Ecology*, 15(8), 2153–2169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02916.x>
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. (2011). *DNA Barcode of Life: An Introduction and Perspective*. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176. Recuperado el 15 de Junio del 2019 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/19782/27968>
- Peters, R. S., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., Meusemann, K., Niehuis, O. (2017). *Evolutionary History of the Hymenoptera*. *Current Biology*, 27(7), 1013–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.027>
- Poinar, G. O., & Danforth, B. N. (2006). *A Fossil Bee from Early Cretaceous Burmese Amber*. *Science*, 314(5799), 614–614. <https://doi.org/10.1126/science.1134103>
- Quezada-Euán, J. J. G. (2018). *Taxonomy and Diversity of the Stingless Bees*.

- In Stingless Bees of Mexico* (pp. 1–40). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77785-6_1
- Quicke, D. L. J. (2009). *Hymenoptera: Ants, Bees, Wasps. Encyclopedia of Insects*, 473–484. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00136-3>
- Ramírez, J. A., Ureña, J. V., & Valdivieso, E. (2013). Las abejas sin aguijón (Apidae : Meliponini) de la región sur del Ecuador. *CEDAMAZ*, 3(1), 81–92. Recuperado el 6 de Diciembre del 2018 de http://192.188.49.2/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-9-4/articulo_6_-_81_-_92.pdf
- Ramírez, J. A., Ureña, J. V., & Camacho, A. (2012). *Las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) de la región sur del Ecuador*. Revista Estudios Universitarios. Universidad Nacional de Loja. Recuperado el 4 de Diciembre del 2019 de http://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-9-4/articulo_6_-_81_-_92.pdf
- Ramírez, S. R., Nieh, J. C., Quental, T. B., Roubik, D. W., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Pierce, N. E. (2010). *A molecular phylogeny of the stingless bee genus Melipona (Hymenoptera: Apidae)*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(2), 519–525. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2010.04.026>
- Rasmussen, C. (2004). *Bees from Southern Ecuador*. *Lyonia*, 7(2), 29–35. Recuperado el 7 de Julio del 2019 de https://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article_245/pdf/articleBody.pdf
- Rasmussen, C., & Castillo, P. S. (2003). Estudio preliminar de la Meliponicultura o apicultura silvestre en el Perú (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), 43, 159–164. Recuperado el 6 de Diciembre del 2018 de https://museohn.unmsm.edu.pe/docs/pub_ento/Rasmussen2003_Perumelipocultura.pdf
- Rasool, A., Ahmad, T., Ganai, B. A., & Gull, S. (2018). *An overview of molecular identification of insect fauna with special emphasis on chalcid wasps*

- (Hymenoptera: Chalcidoidea) of India. *Acta agriculturae Slovenia*, 111(1), 229-239. <https://doi.org/10.14720/aas.2018.111.1.22>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). *bold: The Barcode of Life Data System* (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Reed, H. C., & Landolt, P. J. (2019). *Ants, Wasps, and Bees (Hymenoptera). Medical and Veterinary Entomology*, 459–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00022-4>
- Rodrigues, M. S., Morelli, K. A., & Jansen, A. M. (2017). *Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating Trypanosoma cruzi DTUs and closely related species. Parasites & Vectors*, 10(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2457-1>
- Roubik, D. W. (2006). *Stingless bee nesting biology. Apidologie*, 37(2), 124–143. <https://doi.org/10.1051/apido:2006026>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). *DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Samejima, H., Marzuki, M., Nagamitsu, T., & Nakasizuka, T. (2004). *The effects of human disturbance on a stingless bee community in a tropical rainforest. Biological Conservation*, 120(4), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.03.030>
- Schievano, E., Zuccato, V., Finotello, C., & Vit, P. (2015). *Authenticity of Ecuadorian Commercial Honeys. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 9(3), 327-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.099>
- Scott, H., & Stojanovich, C. (2017). *Stinging Hymenoptera: Pictorial Key to some common United States Familie*. Recuperado el 28 de Mayo del 2019

de https://www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial_keys/Hymenoptera.pdf

- Sheffield, C. ., Hebert, P. D., Kevan, P., & Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9, 196–207. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02645.x>
- Silverio, M. S., Rodovalho, V. de R., Bonetti, A. M., de Oliveira, G. C., Cuadros-Orellana, S., Ueira-Vieira, C., & Rodrigues dos Santos, A. (2014). Preliminary characterization of mitochondrial genome of *Melipona scutellaris*, a Brazilian stingless bee. *BioMed Research International*, 2014, 927546. <https://doi.org/10.1155/2014/927546>
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Sommeijer, M. J. (1999). Beekeeping with stingless bees: a new type of hive. *Bee World*, 80(2), 70–79. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099429>
- Sonet, G., Jordaens, K., Braet, Y., Bourguignon, L., Dupont, E., Backeljau, T., Desmyter, S. (2013). Utility of GenBank and the Barcode of Life Data Systems (BOLD) for the identification of forensically important Diptera from Belgium and France. *ZooKeys*, (365), 307–328. <https://doi.org/10.3897/zookeys.365.6027>
- Songer, M. (2019). Wildlife Ecology. *Encyclopedia of Ecology*, 509–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11177-7>
- Sousa, J. M., de Souza, E. L., Marques, G., Meireles, B., de Magalhães Cordeiro, Â. T., Gullón, B., ... Magnani, M. (2016). Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Food Research International*,

- 84, 61–68. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.03.012>
- Souza, M., & Carvalho-Zilse, G. (2014). Molecular identification of Amazonian stingless bees using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Genetics and Molecular Research*, *13*(3), 5507–5513.
- Suenaga, E., & Nakamura, H. (2005). Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of Chromatography B*, *820*(1), 137–141. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2004.11.028>
- Sun, X., Bedos, A., & Deharveng, L. (2018). Unusually low genetic divergence at COI barcode locus between two species of intertidal *Thalassaphorura* (Collembola: Onychiuridae). *PeerJ*, *6*, e5021. <https://doi.org/10.7717/peerj.5021>
- Tavares, M. G., Pietrani, N. T., Durvale, M. de C., Resende, H. C., & Campos, L. A. de O. (2013). Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations. *Genetics and Molecular Biology*, *36*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000100016>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Thummajitsakul, S., Klinbunga, S., & Sittipraneed, S. (2011). Genetic Differentiation of the Stingless Bee *Tetragonula pagdeni* in Thailand Using SSCP Analysis of a Large Subunit of Mitochondrial Ribosomal DNA. *Biochemical Genetics*, *49*(7–8), 499–510. <https://doi.org/10.1007/s10528-011-9425-9>
- Turčinavičienė, J., Radzevičiūtė, R., Budrienė, A., & Budrys, E. (2016). Species identification and genetic differentiation of European cavity-nesting wasps (Hymenoptera: Vespidae, Pompilidae, Crabronidae) inferred from DNA

- barcoding data. *Mitochondrial DNA*, 27(1), 476–482. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.905827>
- Vit, P., Gonzalez, I., Sorroza, L., Pedro, S. R., & Pedro, S. R. (2016). Physicochemical characterization of “angelita” *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) honey produced in Esmeraldas, Ecuador. *Ciencia Unemi*, 9(20), 77. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp77-84p>
- Vit, P., Pedro, S. R. M., Maza, F., Ramírez, V. M., & Frisone, V. (2018). Diversity of Stingless Bees in Ecuador, Pot-Pollen Standards, and Meliponiculture Fostering a Living Museum Meliponini of the World. In *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology* (pp. 207–227). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5_15
- Vit, P., Pedro, S. R. M., Vergara, C., Deliza, R., Vit, P., Pedro, S., Deliza, R. (2017). Ecuadorian honey types described by Kichwa community in Rio Chico, Pastaza province, Ecuador using Free-Choice Profiling. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3), 384–387. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.005>
- Vit, P., Vargas, O., Lopez, T., & Valle, F. (2015). Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6), 502. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015.04.079>
- Wang, J., Jiang, L.-Y., & Qiao, G.-X. (2011). Use of a mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe Aphidina (Hemiptera, Aphididae). *ZooKeys*, (122), 1–17. <https://doi.org/10.3897/zookeys.122.1256>
- Wille, A. (1983). Biology of the Stingless Bees. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 41–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.000353>
- Xu, P., Jiang, Y., Xu, J., Li, J., & Sun, X. (2016). Genomics in the common carp. *Genomics in Aquaculture*, 247–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801418-9.00010-X>

Yaacob, M., Rajab, N. F., Shahar, S., & Sharif, R. (2017). Stingless bee honey and its potential value: a systematic review. *Food Research*, 2(2), 124–133. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(2\).212](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(2).212)

ANEXOS

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+J)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GC)	
GTR+G+I	67	10615.354	10048.740	-4957.239	0.42	0.57	0.74	0.334	0.440	0.109	0.117	0.198	0.004	0.048	0.150	0.082	0.002	0.014	0.328	0.016	0.136	0.007	0.015
GTR+G	66	10698.671	10140.511	-5004.129	n/a	0.21	0.47	0.334	0.440	0.109	0.117	0.196	0.005	0.054	0.149	0.048	0.028	0.014	0.194	0.028	0.153	0.105	0.026
GTR+I	66	10754.288	10196.128	-5031.937	0.67	n/a	0.45	0.334	0.440	0.109	0.117	0.196	0.005	0.052	0.149	0.046	0.030	0.016	0.186	0.030	0.149	0.113	0.028
TN93+G	63	10756.366	10223.566	-5048.667	n/a	0.19	0.75	0.334	0.440	0.109	0.117	0.107	0.027	0.041	0.081	0.071	0.028	0.081	0.285	0.028	0.118	0.107	0.027
TN93+G+I	64	10757.875	10216.622	-5044.192	0.50	0.63	0.79	0.334	0.440	0.109	0.117	0.104	0.026	0.040	0.079	0.074	0.028	0.079	0.299	0.028	0.115	0.104	0.026
HKY+G	62	10758.997	10234.651	-5055.213	n/a	0.19	0.69	0.334	0.440	0.109	0.117	0.111	0.028	0.058	0.084	0.054	0.030	0.084	0.217	0.030	0.165	0.111	0.028
HKY+G+I	63	10762.640	10229.840	-5051.804	0.48	0.62	0.71	0.334	0.440	0.109	0.117	0.110	0.027	0.059	0.083	0.055	0.029	0.083	0.220	0.029	0.167	0.110	0.027
T92+G	60	10765.025	10257.586	-5068.688	n/a	0.19	0.69	0.387	0.387	0.113	0.113	0.098	0.029	0.056	0.098	0.056	0.029	0.098	0.191	0.029	0.191	0.098	0.029
T92+G+I	61	10769.346	10253.453	-5065.618	0.46	0.55	0.70	0.387	0.387	0.113	0.113	0.096	0.028	0.057	0.096	0.057	0.028	0.096	0.194	0.028	0.194	0.096	0.028
TN93+I	63	10803.078	10270.278	-5072.023	0.68	n/a	0.71	0.334	0.440	0.109	0.117	0.110	0.027	0.041	0.083	0.069	0.029	0.083	0.276	0.029	0.116	0.110	0.027
HKY+I	62	10807.533	10283.187	-5079.481	0.68	n/a	0.66	0.334	0.440	0.109	0.117	0.113	0.028	0.057	0.086	0.053	0.030	0.086	0.213	0.030	0.162	0.113	0.028
T92+I	60	10816.510	10309.071	-5094.430	0.68	n/a	0.65	0.387	0.387	0.113	0.113	0.100	0.029	0.055	0.100	0.055	0.029	0.100	0.186	0.029	0.186	0.100	0.029
GTR	65	11199.990	10650.283	-5260.018	n/a	n/a	0.48	0.334	0.440	0.109	0.117	0.255	0.007	0.054	0.194	0.057	0.003	0.020	0.230	0.008	0.154	0.011	0.008
HKY	61	11473.016	10957.123	-5417.453	n/a	n/a	0.47	0.334	0.440	0.109	0.117	0.131	0.033	0.047	0.100	0.044	0.035	0.100	0.177	0.035	0.134	0.131	0.033
TN93	62	11482.397	10958.051	-5416.913	n/a	n/a	0.47	0.334	0.440	0.109	0.117	0.131	0.033	0.044	0.100	0.047	0.035	0.100	0.188	0.035	0.124	0.131	0.033
T92	59	11493.442	10994.457	-5438.127	n/a	n/a	0.47	0.387	0.387	0.113	0.113	0.115	0.034	0.046	0.115	0.046	0.034	0.115	0.156	0.034	0.156	0.115	0.034
JC+G	58	11525.741	11035.210	-5459.507	n/a	0.22	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G+I	59	11534.638	11035.653	-5458.725	0.22	0.34	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+I	58	11561.564	11071.033	-5477.419	0.67	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G	59	11580.933	11081.948	-5481.872	n/a	0.22	0.82	0.250	0.250	0.250	0.250	0.069	0.069	0.113	0.069	0.113	0.069	0.113	0.069	0.113	0.069	0.113	0.069

Anexo 1. Resultado de la estimación del mejor modelo de sustitución de nucleótidos para la construcción del árbol filogenético mediante el programa MEGA7. Los modelos que presentan la puntuación BIC más baja, constituyen al mejor modelo de sustitución. El modelo seleccionado para los datos fue el de GTR (General Time-Reversible)+G+I

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>Cephalotrigona</i>								
2	<i>Melipona</i>	0,082							
3	<i>Tetragonisca</i>	0,079	0,090						
4	<i>Trigona</i>	0,080	0,077	0,087					
5	<i>Oxytrigona</i>	0,084	0,081	0,092	0,083				
6	<i>Nannotrigona</i>	0,092	0,103	0,084	0,096	0,112			
7	<i>Scaptotrigona</i>	0,075	0,083	0,071	0,085	0,083	0,077		
8	<i>Partamona</i>	0,087	0,077	0,092	0,086	0,088	0,101	0,088	
9	<i>Paratrigona</i>	0,078	0,075	0,080	0,083	0,080	0,097	0,083	0,082

Anexo 2. Matriz de distancias mediante el modelo K2P para el gen COI, entre los 9 géneros de abejas sin aguijón productoras de Ecuador identificados en este estudio.

1	<i>Cephalotrigona</i> sp.																			
2	<i>Melipona mimetica</i>	0,083																		
3	<i>Tetragonisca angustula</i>	0,079	0,092																	
4	<i>Trigona silvestriana</i>	0,080	0,078	0,087																
5	<i>Oxytrigona mellaria</i>	0,084	0,083	0,092	0,083															
6	<i>Nannotrigona chapadana</i>	0,096	0,103	0,077	0,089	0,105														
7	<i>Melipona indecisa</i>	0,079	0,006	0,089	0,075	0,080	0,100													
8	<i>Scaptotrigona problanca</i>	0,075	0,084	0,071	0,085	0,083	0,069	0,081												
9	<i>Partamona</i> 1	0,087	0,078	0,092	0,086	0,088	0,097	0,076	0,088											
10	<i>Melipona fuscopilosa</i>	0,084	0,017	0,091	0,076	0,081	0,102	0,016	0,085	0,079										
11	<i>Melipona nigrifacies</i>	0,085	0,028	0,094	0,078	0,084	0,103	0,025	0,085	0,080	0,022									
12	<i>Melipona grandis</i>	0,079	0,051	0,085	0,086	0,082	0,095	0,048	0,081	0,080	0,052	0,052								
13	<i>Paratrigona euteneata</i>	0,066	0,065	0,064	0,072	0,068	0,079	0,062	0,068	0,077	0,062	0,066	0,068							
14	<i>Paratrigona</i> 1	0,089	0,089	0,095	0,095	0,092	0,111	0,086	0,098	0,086	0,086	0,089	0,090	0,077						
15	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	0,088	0,108	0,091	0,102	0,120	0,078	0,105	0,084	0,105	0,105	0,106	0,109	0,083	0,117					
16	<i>Melipona cramptoni/nitidifrons</i>	0,079	0,023	0,086	0,073	0,078	0,095	0,022	0,078	0,073	0,022	0,023	0,051	0,064	0,085	0,098				
17	<i>Melipona eburnea</i>	0,084	0,018	0,091	0,077	0,083	0,102	0,017	0,086	0,080	0,005	0,023	0,052	0,064	0,088	0,108	0,022			
18	<i>Melipona pseudoeburnea</i>	0,083	0,017	0,090	0,077	0,081	0,102	0,016	0,084	0,077	0,005	0,022	0,051	0,062	0,086	0,106	0,021	0,005		

Anexo 3. Matriz de distancias para el gen COI, de las especies de abejas sin aguijón productoras de Ecuador

		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Melipona mimetica</i>							
2	<i>Melipona indecisa</i>	0,006						
3	<i>Melipona fuscopilosa</i>	0,017	0,016					
4	<i>Melipona nigrifacies</i>	0,028	0,025	0,022				
5	<i>Melipona grandis</i>	0,051	0,048	0,052	0,052			
6	<i>Melipona cramptoni/nitidifrons</i>	0,023	0,022	0,022	0,023	0,051		
7	<i>Melipona eburnea</i>	0,018	0,017	0,005	0,023	0,052	0,022	
8	<i>Melipona pseudoeburnea</i>	0,017	0,016	0,005	0,022	0,051	0,021	0,005

Anexo 4. Matriz de distancias para el gen COI entre las especies de abejas sin aguijón identificadas como el género *Melipona*.

