



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCIÓN DE POLEN CONVENCIONAL Y
GENÉTICAMENTE MODIFICADO DE SOYA, *GLYCINE MAX L.*,
EN LA MIEL DE ABEJA, *APIS MELLIFERA*, DE LOS ESTADOS
DE CAMPECHE Y YUCATÁN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAMELA ROSALÍA NARVÁEZ TORRES



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SOL ORTIZ GARCÍA
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno</p> <p>Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Facultad Carrera Número de Cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno</p> <p>Narváez Torres Pamela Rosalía 11-07-71-30 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 30626754-1</p>
<p>2. Datos del tutor</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor</p> <p>Dra. Sol Ortiz García</p>
<p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Dra. Silvia Castillo Argüello</p>
<p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>Dr. Luis Abdelmir Medina Medina</p>
<p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>Dra. Martha Graciela Rocha Munive</p>
<p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Maestra Rita Guadalupe Alfaro Bates</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito</p> <p>Título Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito</p> <p>Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soya, <i>Glycine max</i> L., en la miel de abeja, <i>Apis mellifera</i>, de los estados de Campeche y Yucatán 106p 2013</p>

Narváez-Torres, P. (2013). *Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soya, Glycine max L., en la miel de abeja, Apis mellifera, de los estados de Campeche y Yucatán*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

En el 2012 se aprobó la siembra comercial de soya (*Glycine max*) genéticamente modificada (GM) en la Península de Yucatán. Los polígonos solicitados para la liberación de esta soya se encuentran muy cercanos a las áreas de forrajeo de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) y corresponde a una región donde se produce aproximadamente el 40% de la miel nacional, de la cual el 90% se exporta a la Unión Europea. Las abejas pueden volar varios kilómetros para la colecta de polen y del néctar que se transforma posteriormente en miel, por lo que es posible que forrajeen en los cultivos de soya GM. En el 2011 el Tribunal de Justicia de la Unión Europea dictaminó que la miel que presentara polen de OGM de cualquier especie debería recibir aprobación regulatoria antes de ser comercializada en Europa. En esta tesis se analizaron los componentes biológicos y las prácticas de manejo que influyen en la presencia de polen de soya en la miel. El área de estudio para este proyecto fueron tres sitios en Campeche y tres en Yucatán, en los que se registraron cultivos de soya con apiarios cercanos. Se colectaron muestras de miel donde se observaron e identificaron los granos de polen de soya. Se extrajo DNA de las muestras para analizar y detectar por medio de PCR-PF y PCR-TR y detectar el gen endógeno de la soya y el evento transgénico, MON Ø4Ø32-6. A partir de los resultados obtenidos en este estudio se concluyó que la miel que se produce en los sitios muestreados en los estados de Campeche y Yucatán, contiene concentraciones relativamente bajas de polen de soya. Se plantearon recomendaciones relacionadas con el manejo de las colonias de abejas, con la finalidad de evitar la presencia de polen de soya GM en la miel que se produce en la Península de Yucatán.

ABSTRACT

In 2012 the commercial release of genetically modified (GM) soybean (*Glycine max*) was approved in the Yucatan Peninsula. The areas requested for the release of this crop are very close to the ones where honeybees (*Apis mellifera*) forage for food, and correspond to a region which produces about 40% of the national honey, of which 90% is exported to the European Union. Honeybees can fly several kilometers to collect pollen and nectar, later nectar is transformed into honey, it is possible that they might forage in GM soybean crops. In 2011, the European Court of Justice ruled that honey and food supplements containing pollen derived from GM crops constitute foodstuff which contain ingredients produced from GMO and should receive regulatory approval before being marketed in the European Union. In this thesis the biological components and management practices that influence the presence of soybean pollen in the honey were analyzed. The area of study for this project were three sites in Campeche and three in Yucatan, where soybean fields with nearby apiaries were registered. Honey samples were collected for soybean pollen identification, also DNA was extracted from the samples for PCR analysis to detect the endogenous gene of soybean and the transgenic soybean event MON Ø4Ø32 -6. From the results obtained in this study it was concluded that the honey produced in the sampled sites in the states of Campeche and Yucatan, contain relatively low concentrations of soybean pollen. Recommendations regarding the management of bee colonies in order to avoid the presence of GM pollen in honey produced in the Yucatan Peninsula were made.

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y SIGLAS

AMA	Abeja melífera africanizada
AME	Abeja melífera europea
CENICA	Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental
CE	Comisión Europea
CIBIOGEM	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados
Ct	<i>Cycle threshold</i> (ciclo umbral)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico o ADN)
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
GM	Genéticamente modificado
Ha	Hectárea
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
KOH	Hidróxido de potasio
LBOGM	Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PCR-PF	Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto final
PCR-TR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Tiempo real
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SF	Solución Faena
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TH	Tolerante a herbicidas
TJUE	Tribunal de Justicia de la Unión Europea
UE	Unión Europea

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	5
III. HIPÓTESIS	6
IV. OBJETIVOS	6
V. ANTECEDENTES	7
5.1 <i>Producción y exportación de miel en México</i>	7
5.2 <i>Contexto internacional y mercados de la miel mexicana</i>	9
5.3 <i>Producción de miel en la Península de Yucatán</i>	11
VI. MARCO TEÓRICO	13
6.1 Abeja melífera, <i>Apis mellifera</i>	13
6.1.1 <i>Generalidades de la especie</i>	13
6.1.2 <i>División del trabajo</i>	14
6.1.3 <i>Reproducción</i>	15
6.1.4 <i>Distribución original</i>	16
6.1.5 <i>Proceso de africanización de las abejas <u><i>Apis mellifera</i></u> en México</i>	16
6.1.6 <i>Alimentación</i>	17
6.1.7 <i>Constancia floral</i>	17
6.1.8 <i>Distancia de vuelo</i>	18
6.1.9 <i>Transformación de néctar a miel</i>	19
6.2 Miel	19
6.2.1 <i>Definición y composición</i>	19
6.2.2 <i>Ciclo apibotánico en la Península de Yucatán</i>	21
6.3 Soya, <i>Glycine max</i>	23
6.3.1 <i>Generalidades de la especie</i>	23
6.3.2 <i>Flor</i>	24
6.3.3 <i>Néctar y polen</i>	25
6.3.4 <i>Reproducción</i>	26
6.3.5 <i>Vaina y semilla</i>	27
6.3.6 <i>Origen y Distribución</i>	28

6.3.7	<i>Relación de la soya y las abejas melíferas</i>	28
6.3.8	<i>Variedades convencionales utilizadas en la Península de Yucatán</i>	29
6.3.9	<i>Variedad genéticamente modificada</i>	31
6.3.10	<i>Siembra de soya GM en la Península de Yucatán</i>	34
6.4	<i>Implicaciones de la siembra de soya GM en la Península de Yucatán</i>	35
VII. METODOLOGÍA		38
7.1	Sitio de estudio	38
7.1.1	<i>Estado de Campeche</i>	39
7.1.2	<i>Estado de Yucatán</i>	41
7.2	Métodos empleados en el campo	43
7.2.1	<i>Georreferenciación de apiarios y marcación de colmenas</i>	43
7.2.2	<i>Observación del comportamiento de forrajeo de las abejas dentro del cultivo de soya</i>	44
7.2.3	<i>Análisis del contenido de azúcar en el néctar del buche melífero</i>	44
7.2.4	<i>Colecta de miel</i>	45
7.3	Métodos empleados en el laboratorio	46
7.3.1	<i>Extracción de la miel del panal</i>	46
7.3.2	<i>Método cualitativo de análisis melisopalinológico</i>	46
7.3.3	<i>Acetólisis de Erdtman, 1969</i>	47
7.3.4	<i>Hidróxido de potasio al 10%</i>	47
7.3.5	<i>Análisis al microscopio</i>	48
7.3.6	<i>Extracción de polen contenido en la miel</i>	49
7.3.7	<i>Extracción de DNA a partir del polen</i>	50
7.3.8	<i>Cuantificación de DNA</i>	51
7.3.9	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	51
7.3.10	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	56
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN		58
8.1	Resultados de los métodos empleados en el campo	58
8.1.1	<i>Georreferenciación de apiarios, marcación de colmenas y extracción de las muestras de miel</i>	58
8.1.2	<i>Observación del comportamiento de forrajeo de las abejas dentro del cultivo de soya</i>	63
8.1.3	<i>Análisis del contenido de azúcar en el néctar contenido en el buche melífero</i>	67
8.4	Resultados de los métodos empleados en el laboratorio	72

8.2.1	<i>Montaje de muestras para observación al microscopio. Acetólisis, Hidróxido de potasio al 10% y lugol.</i>	72
8.2.2	<i>Cuantificación de DNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	78
8.2.3	<i>Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-PF</i>	82
IX.	CONCLUSIONES	86
V.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	89

I. INTRODUCCIÓN

Por muchos siglos el hombre ha seleccionado artificialmente plantas y animales a través de técnicas tradicionales de reproducción. La variabilidad que encontramos casi universalmente en los organismos domésticos no fue producida directamente por el hombre, ya que antes no podía originar variabilidad genética ni impedir que ocurriera; podía sí, seleccionar, preservar y acumular la que ocurría y producir un gran resultado. Esta selección artificial, en la que se eligen los organismos que presentan rasgos deseados para criar generaciones posteriores (Darwin, 1859), se limitó inicialmente a las variaciones que ocurren naturalmente. Sin embargo, en las últimas décadas los avances en el campo de la ingeniería genética han permitido intervenir en los cambios genéticos que se introducen en un organismo. Hoy en día, se pueden incorporar nuevos genes de una especie a otra totalmente diferente; y los cultivos agrícolas, animales de granja y bacterias del suelo son sólo algunos de los ejemplos más prominentes de organismos que han sido sujetos a la ingeniería genética (Phillips, 2008).

De acuerdo a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (2005), un organismo genéticamente modificado (OGM) se refiere a *“cualquier organismo vivo, con excepción de los humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de biotecnología moderna”*; y actualmente se pueden distinguir tres categorías de OGM: cultivos de 1ª Generación que incluyen mejoras en características agrícolas como resistencia a plagas y tolerancia a herbicidas. Los de 2ª generación que incluyen mejoras en la calidad, como mayor contenido nutricional; y los de 3ª generación que son diseñados para producir sustancias específicas con propósitos industriales y farmacéuticos. Desde el inicio de la década de los noventa, los cultivos se convirtieron en uno de los ejemplos más citados de OGM y actualmente, sólo se comercializan algunos de los de 1ª generación, siendo la soya tolerante a herbicidas (TH) la dominante en la producción mundial de cultivos GM (Qaim, 2009).

Con las nuevas tecnologías, los riesgos y beneficios potenciales deben ser identificados y cuantificados; con base en el principio precautorio, la Unión Europea (UE) ha desarrollado programas de investigación para evaluar los riesgos y beneficios que representan los OGM para el ambiente, la salud humana y la animal, y en el año 2010 la Comisión Europea (CE) presentó los resultados de este trabajo, los cuales se desprende del esfuerzo de más de 130 proyectos de investigación que abarcan un período de más de 25 años, y la participación de más de 500 grupos de investigación independientes. La conclusión principal es que: *“la*

biotecnología, y en particular los OMG, no son per se más riesgosos que, por ejemplo, las tecnologías de cultivo de plantas convencionales” (European Commission, 2010).

En México los primeros ensayos con OGM se remontan a finales de los ochentas y principios de los noventas con cultivos como el tomate, papa, calabaza, trigo y maíz. La soya tolerante al herbicida conocida como Solución Faena (SF) se introdujo por primera vez en Jalisco y Nayarit, y llegó a Campeche en el año 2000, incorporándose a Yucatán a partir de 2003, y a Quintana Roo en el 2005, estando presente desde entonces en algunas regiones de la Península de Yucatán. En 2010 y 2011 se otorgaron permisos de liberación piloto y en 2012 de liberación comercial de la soya GM (CIBIOGEM, 2005, 2011, 2012a), y esto es debido a que la agroindustria de la Península de Yucatán demanda 300 mil toneladas de soya al año que están dirigidas al mercado pecuario como alimento, así como aceite vegetal para el Sistema de Producto Oleaginosas. Generalmente esta demanda se ve cubierta por la importación, ya que en la región sólo se produce el 5% de lo demandado (Estrada-Vivas, 2010a).

Los polígonos solicitados para la liberación de soya SF coinciden espacialmente con las zonas en las que se produce miel en la Península de Yucatán, considerada, la región apícola más importante del país, aunado a que su miel posee gran prestigio a nivel nacional e internacional por su excelente calidad. Además, es la región que produce mayor volumen, del cual la mayoría se exporta al Mercado Europeo, en particular Alemania, que es el principal comprador. Las abejas que producen la miel son conocidas por volar varios kilómetros en busca de polen y néctar, por lo que existe la posibilidad de que algunas de las plantas forrajeadas por las abejas provengan de cultivos genéticamente modificados (GM).

El inconveniente de la presencia de polen GM en la miel se presentó en 2011, año que el gobierno mexicano autorizó la siembra piloto de 30 mil hectáreas de soya SF en la península y que coincidió con la resolución del TJUE que dictaminó que la miel que presentara trazas de polen GM debería recibir aprobación regulatoria antes de ser comercializada en Europa, ya que el polen constituye un ingrediente de la miel (y no un componente natural). El dictamen surgió a partir de que en Alemania en el Estado Libre de Baviera, un apicultor orgánico (Karl Heinz Bablok) encontrara trazas de polen de maíz GM (MON810) en su miel, afirmando bajo la normatividad de la UE que su miel no sería apta para la comercialización y el consumo (Woller, 2012; Bird *et al.*, 2013; Birkman *et al.*, 2013).

Debido a lo reciente de esta problemática, las investigaciones relacionadas con el tema son

aún limitadas, por lo que el objetivo principal de este proyecto de tesis fue: analizar los componentes biológicos y las prácticas de manejo que influyen en la presencia de polen de soya genéticamente modificada y convencional en la miel producida en la Península de Yucatán. Se propuso observar el comportamiento de forrajeo de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en los cultivos de soya, para determinar si éstas visitan las flores para la colecta de néctar y/o polen. Otro objetivo específico fue conocer el proceso de extracción de miel y obtener muestras de ésta para su análisis, así como muestras de polen para su observación al microscopio con la finalidad de identificar la posible presencia de los granos de polen de soya. Adicionalmente se contempló extraer el DNA de cada muestra para analizar por medio de PCR-PF y PCR-TR, con la finalidad de detectar el gen del cloroplasto (*rbcl*), el gen endógeno de la soya (*Lectina*), y del evento transgénico MON Ø4Ø32-6.

El área de estudio para este proyecto fueron los estados de Campeche y Yucatán. Se seleccionaron 6 sitios: Noh-Halal, San Pedro Tzula y Poccheil en Yucatán; y Los Laureles, San Miguel de Allende y Tixmucuy en Campeche. En estos sitios se ubicaron cultivos de soya con apiarios cercanos a estos. La presencia de polen de soya y la detección del transgén proporcionarán información sobre la frecuencia y distancia de forrajeo de las abejas a estos cultivos, a través de la presencia de los granos de polen de soya en las mieles extraídas, lo que permitirá determinar las consideraciones biológicas a considerar con relación a la siembra de soya GM en la Península de Yucatán, así como explorar la viabilidad de plantear mecanismos para evitar que el polen de soya GM llegue a la miel producida en estas regiones.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se concluyó que la miel de abeja que se produce en los estados de Campeche y Yucatán contiene concentraciones muy bajas de granos de polen de soya (*Glycine max*) y que éste no llegó a la miel por colecta directa de la abeja. Durante la revisión al microscopio se pudo determinar a través de los granos de polen las especies vegetales que las abejas estaban visitando con mayor frecuencia para la colecta de néctar y/o polen, y que el paisaje no limita las opciones de forrajeo a los cultivos de soya durante la temporada de lluvias.

Se realizaron recomendaciones sobre las medidas de manejo que podrían llevar a cabo los apicultores para evitar la presencia de polen de soya GM en la miel de los estados de Campeche y Yucatán. Resulta importante seguir estas recomendaciones para que al momento de analizar la miel, ésta pueda ser clasificada como “libre de OGM” o que cualquier presencia se tome como “adventicia o técnicamente inevitable”. Una alternativa final podría ser la

utilización de las diversas variedades de soya Huasteca desarrolladas por el INIFAP para la región.

Se considera importante realizar más análisis e investigaciones que ayuden a responder las dudas que restan con respecto al tema ya que la apicultura en la península enfrenta un panorama de retos y oportunidades, derivados principalmente de los requisitos del mercado internacional, y los apicultores deben cumplir con las medidas de inocuidad y calidad que los países importadores exigen.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a lo reciente de esta problemática, las investigaciones relacionadas con el tema son aún limitadas, y es necesario llevar a cabo estudios para poder determinar si es posible la coexistencia entre los cultivos de soya GM y la producción de miel, sin que el polen GM llegue a ésta.

Los apicultores de la Península de Yucatán necesitan saber si la miel que producen y que desean exportar al mercado europeo contiene polen de soya GM. Esto es importante ya que su miel se vende principalmente a ese mercado y este cuenta con la legislación más estricta en cuanto a los productos destinados a la alimentación humana o animal que contienen ingredientes provenientes de OGM.

Este trabajo de investigación se realizó con la finalidad de generar información que contribuya a dimensionar este problema, al observar el comportamiento de las abejas dentro del cultivo de soya, analizar muestras de miel de las colonias establecidas a diferentes distancias del cultivo, así como la detección del polen de soya convencional y/o GM, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular y melisopalinología, para determinar si las abejas están utilizando este recurso, y si sí lo hacen conocer con qué magnitud y en qué etapa con relación a la producción de miel de exportación.

III. HIPÓTESIS

Tomando en consideración que en el 2012 se otorgaron suspensiones de oficio para la siembra de soya Solución Faena® en los estados de Campeche y Yucatán, y que no se sembró ésta en Quintana Roo, pero sí se sembró soya convencional, se verificará que la miel producida en dichos estados se encuentra libre de polen de soya modificada genéticamente, evento MON-Ø4Ø32-6 y se detectará la posible presencia de polen de soya convencional.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es: Analizar los componentes biológicos y de prácticas de manejo que influyen en la presencia de polen de soya genéticamente modificada y convencional en la miel producida en la Península de Yucatán. En tanto que los particulares, derivados del anterior son los siguientes:

- Observar el comportamiento de forrajeo de las abejas melíferas (*Apis mellifera*), en los cultivos de soya; para determinar si visitan las flores y colectan polen y/o néctar.
- Conocer el proceso de cosecha de miel y obtener muestras de ésta en los apiarios seleccionados para su análisis.
- Realizar análisis melisopalinológicos para detectar la presencia de granos de polen de soya en estas mieles.
- Analizar las mieles colectadas a través de métodos de biología molecular como PCR Tiempo real y PCR Punto final para detectar la presencia de polen de soya convencional y GM en éstas.

V. ANTECEDENTES

5.1 Producción y exportación de miel en México

En México la apicultura posee un alto valor social y económico, contando con una amplia tradición en nuestro país, principalmente en los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo donde se ubican las principales zonas de producción. En nuestro país, se estima que alrededor de 40 mil productores de miel dependen de la apicultura (Secretaría de Economía, 2007), quienes en conjunto tienen aproximadamente 1.8 millones de colmenas, permitiendo que entre 2008 y 2012 México produjera (véase Cuadro 1) un promedio de 58 mil toneladas de miel al año (Financiera Rural, 2011; INEGI, 2012d; FAOSTAT, 2013).

La abeja melífera europea *Apis mellifera* fue introducida en nuestro país durante la época colonial, era una abeja que presentaba características como docilidad, resistencia a enfermedades y gran producción de miel (Financiera Rural, 2011), aún cuando en la Península de Yucatán mantuvieron por muchos años la producción de miel con abejas nativas sin aguijón de los géneros *Melipona* y *Trigona*, propios de las zonas tropicales y subtropicales de México (Quezada-Euán *et al.*, 2001).

A partir de 1950, la apicultura mexicana mostró un gran desarrollo comercial basado en la explotación de la abeja europea. En 1986 se registró la máxima producción de miel en México del período comprendido entre 1980 y 2010; en ese año se alcanzó una producción aproximada de 75 mil toneladas de miel. Hacia 1988 la producción cayó 22.5%, período que coincidió con la llegada de la abeja africanizada a México por la costa de Chiapas. En 1995 la producción volvió a caer por la africanización de las colmenas; mientras que hacia el año 2000 la producción se estabilizó e incrementó nuevamente (Financiera Rural, 2011).

De acuerdo con información de la FAO, en el año 2010 México se posicionó como el 7º productor de miel a nivel mundial, al contar con una producción de 55,684 toneladas (véase Cuadro 2). Situación que permitió que entre los años 2007 y 2011 se exportaran un promedio de 28 mil toneladas de miel anuales, mismas que representan entre el 45% y 55% de la producción anual total, manteniéndose como el tercer exportador del mundo y generando un ingreso anual aproximado de 78 millones de dólares (véase Cuadro 1).

Cuadro 1. Producción y exportación de miel en México

Año	Producción nacional (toneladas)	Volumen de exportación (toneladas)	Valor de exportación (millones de dólares)
2006	55 970	25 473	48.4
2007	55 459	30 912	56.5
2008	59 682	29 646	83.8
2009	56 071	26 984	81.2
2010	55 684	27 239	84.7
2011	57 783	26 888	90.4
2012	58 798	31 100*	98.2*

*Datos a octubre de 2012

Fuente: Elaboración propia con datos de Financiera Rural (2011), INEGI (2013), SIAP (2013) y FAOSTAT (2013).

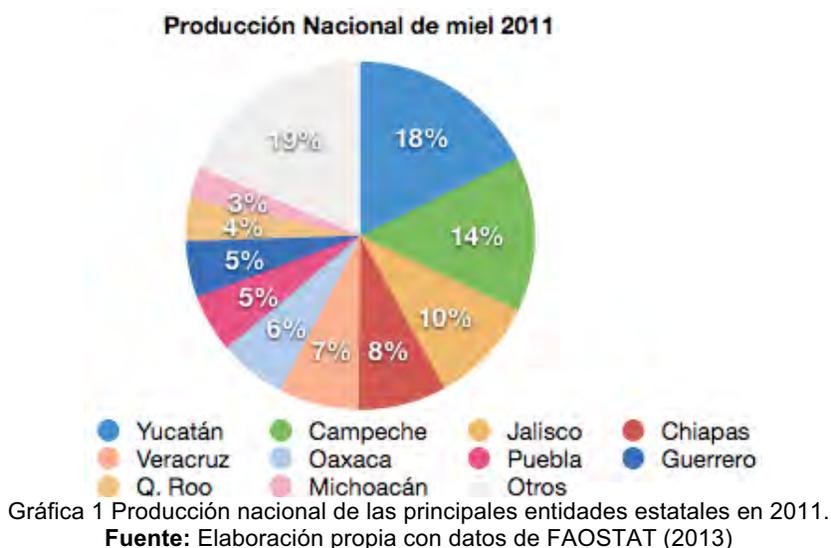
De acuerdo a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2010) nuestro país está dividido en cinco regiones apícolas por sus diferentes climas y flora, que influyen directamente en la composición del néctar y en el tipo de polen en la miel. Estas regiones se encuentran bien definidas por su grado de desarrollo y variedad de tipos de mieles en cuanto a sus características de humedad, color, aroma y sabor. Las cinco regiones son:

1. **Norte:** esta región está integrada por los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León y parte del norte de Tamaulipas y altiplano de San Luis Potosí. Produce excelente miel de mezquite que es de color ámbar extra clara; el precio de esta miel es uno de los mejores a nivel nacional. La mayoría de la producción se destina a Estados Unidos de América (E.U.A.)
2. **Costa del Pacífico:** Sinaloa, Nayarit, el poniente de Jalisco, Michoacán, Colima, parte de Guerrero, Oaxaca y Chiapas son los estados que conforman esta región. Produce mieles multiflorales y de mangle, y son principalmente oscuras.
3. **Golfo:** se compone por los estados de Veracruz, parte de Tabasco, Tamaulipas y la región Huasteca de San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro. Posee una gran producción de miel de cítricos, en particular, miel ámbar clara de flor de naranjo, siendo esta miel muy apreciada a nivel internacional, en especial en el mercado japonés.
4. **Altiplano:** la integran los estados de Tlaxcala, Puebla, México, Morelos, Distrito Federal, Guanajuato, Aguascalientes, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, el oriente de Jalisco,

Chiapas y parte de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí. Produce mieles ámbar y ámbar clara con consistencia tipo mantequilla que tiene mucha demanda en el mercado europeo.

5. **Sureste o Península de Yucatán:** formada por Campeche, Yucatán, Quintana Roo y parte de Chiapas y Tabasco. Es la más importante por su volumen de producción y por concentrar a más de 16,000 apicultores del país. Esta región aporta entre 35 y 45% del total de la producción nacional, de la cual alrededor del 95% se exporta, siendo el mercado europeo el principal comprador. Las mieles exportadas son multiflorales y el color va del ámbar claro a ámbar.

En 2011 más del 60% de la producción mexicana de miel se concentró en 6 estados (Gráfica 1): Yucatán (17.64%), Campeche (14.44%), Jalisco (9.93%), Chiapas (8.15%), Veracruz (7.43%) y Oaxaca (6.26%). Siendo Yucatán el principal productor nacional con más de 10 mil toneladas. Además, destacan Puebla (5.39%), Guerrero (5.24%), Quintana Roo (3.92%) y Michoacán (2.99%), y estas 10 entidades producen más del 80% de la miel nacional (INEGI, 2012d).



5.2 Contexto internacional y mercados de la miel mexicana

La miel mexicana es una de las más cotizadas a nivel internacional, especialmente en el mercado europeo y estadounidense. Su éxito se ha debido principalmente al sabor y calidad

que la caracterizan; logrando penetrar mercados con altas exigencias en materia de inocuidad y valor nutritivo (Secretaría de Economía, 2007).

De acuerdo a la FAO, en 2011 la producción mundial de miel estuvo a cargo de 135 países. El volumen alcanzó 1.6 millones de toneladas (véase Cuadro 2); el 44.7% se produjo en Asia, 22.8% en Europa, 19.3% en América, 11.3% en África y en el 1.8% restante en Oceanía. Más de la cuarta parte de la producción mundial de miel se obtuvo en China, e India produjo el 3.7%. De entre los principales productores se encuentran tres países europeos Turquía, Ucrania y Rusia, que en 2011 participaron con el 5.7%, 4.3% y 3.7% respectivamente.

En América los principales productores son E.U.A (4.1%), Argentina (3.6%) y México (3.5%). Los ocho países mencionados anteriormente aportan el 56% de la producción de miel a nivel mundial (Financiera Rural, 2011; FAOSTAT, 2013).

Cuadro 2. Producción de miel en toneladas por año de los países principales durante 2010 y 2011

	China	Turquía	EUA	Ucrania	India	Argentina	México	Rusia	Total
2010	409 149	81 115	79 789	70 900	60 000	59 000	55 684	51 535	1 555 980
2011	446 089	94 245	67 000	70 300	60 000	59 000	57 783	60 010	1 636 399

Fuente: Elaboración propia con datos de INEGI (2012) y FAOSTAT (2013).

La concentración de productores e importadores de este producto es importante, debido a que, solamente ocho naciones producen más del 55% de la miel mundial; diez países venden el 70% de la miel que se comercializa a nivel mundial, sobresaliendo cinco naciones que aportan el 50% de esas ventas, entre los que se encuentra México (véase Cuadro 3) con un volumen de 26,512 toneladas por año (INEGI, 2011; FAOSTAT, 2013).

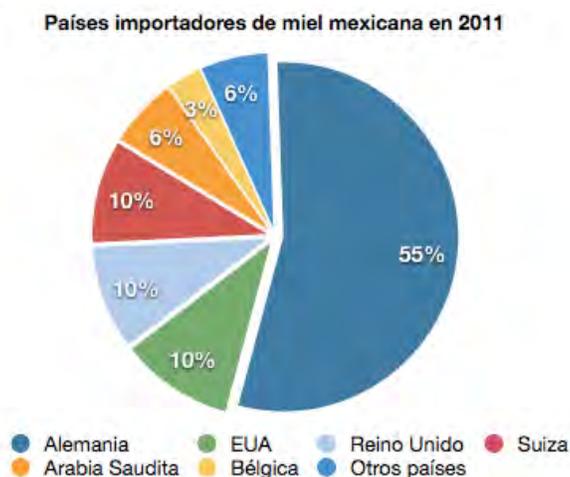
Cuadro 3. Principales países exportadores de miel en 2010

	China	Argentina	México	India	Vietnam	España	Alemania	Brasil	Total
2010	103 716	57 317	26 512	22 649	22 544	21 756	20 527	18 629	482 149

Cantidades en toneladas métricas. **Fuente:** Elaboración propia con datos de FAOSTAT (2013).

Las exportaciones mundiales en el 2010 alcanzaron 482 mil toneladas (véase Cuadro 3), cerca del 31% de la producción mundial de ese año. Poco más de la mitad de las exportaciones

proviene de seis países: China, Argentina, México, India, Vietnam y España (FAOSTAT, 2013). En 2011 las exportaciones mexicanas de miel (véase Gráfica 2) se destinaron en un 61.2% al segundo mayor importador mundial, Alemania. El 12.7% se destinó al Reino Unido, el 7.6% a Suiza, el 6.6% a Arabia Saudita, el 6.1% a Estados Unidos, el 3.1% a Bélgica y el restante 2.7% a países como Japón, China, España, Venezuela, entre otros (Secretaría de Economía, 2013).



Gráfica 2. Principales países importadores de miel mexicana en 2011
Fuente: Elaboración propia con datos de FAOSTAT (2013)

La red de tratados de libre comercio que México tiene con 44 países ha facilitado el acceso de la miel mexicana a los mercados de sus socios comerciales, en los cuales ésta ha cubierto las exigencias relacionadas con la calidad e inocuidad establecidas (Secretaría de Economía, 2007).

5.3 Producción de miel en la Península de Yucatán

Históricamente, el cuidado de las abejas ha tenido un papel importante en la historia, tradición y economía de la región peninsular, primero con la meliponicultura o cultivo de abejas nativas sin aguijón de los géneros *Melipona* y *Trigona* y, posteriormente, con la apicultura, utilizando la especie *Apis mellifera* (Echazarreta *et al.*, 1997; González-Acereto y De Araujo, 2005). La importancia de esta actividad se debe a la gran tradición en el manejo de las abejas desde tiempos prehispánicos y a la gran riqueza florística (Ayala-Arcipreste, 2001; Porter Bolland *et al.*, 2009).

La miel de esta zona goza de gran prestigio nacional y sobre todo internacional, ya que alrededor del 90% de la producción anual de miel proviene de dos principales flujos de néctar:

de la floración del chamiso o *tahonal* (*Viguiera dentata*, véase Figura 1) y la de *ts'iitsilche'* (*Gymnopodium floribundum*, véase Figura 2); las dos por su excelente calidad son destinadas en su mayoría a la venta en el Mercado Europeo (Alfaro *et al*, 2010; SAGARPA 2010), siendo una importante fuente de ingreso para los productores y sus familias (Ayala-Arcipreste, 2001).



Figura 1. Flor de *tahonal* (*V. dentata*)

Figura 2. Flor de *ts'iitsilche'* (*G. floribundum*).

Fuente: Pedro Tenorio Lezama (2000 en CONABIO, 2009).

Fuente: Germán Carnevali (en CICY, 2010a)

La Península de Yucatán se destaca como la región con la mayor producción de miel en México, ya que aporta entre el 30% y 40% del total de ésta, siendo Yucatán el principal productor, seguido por Campeche. Yucatán es reconocido como el principal punto de comercialización de miel en México; alrededor del 95% de la miel producida en la región se exporta siendo Alemania el principal comprador (SAGARPA, 2010; INEGI, 2012a). Durante el 2011 los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo produjeron 20,807 toneladas (véase Cuadro 4), que equivalen al 36.01% de la producción nacional y al 1.27% de la mundial (FAOSTAT, 2013).

Cuadro 4. Producción de miel en la Península de Yucatán

	2011	Lugar	Participación	2012	Lugar	Participación
Yucatán	10,195	1°	17.64%	10,405	1°	17.70%
Campeche	8,344	2°	14.44%	7,702	2°	13.10%
Quintana Roo	2,268	9°	3.93%	2,159	9°	3.67%
Total	20,807	-	036%	20,266	-	034%

Fuente: Elaboración propia con datos de INEGI (2012d) y SIAP (2013).

La apicultura en la Península enfrenta un panorama de oportunidades y retos, derivados principalmente de los requisitos del mercado internacional, y los apicultores deben cumplir con las medidas de inocuidad y calidad que los países importadores exigen (SAGARPA, 2010).

VI. MARCO TEÓRICO

En el sureste del país el cultivo de abejas se practica desde antes del arribo de los españoles a América. La producción de miel ha tenido transformaciones, ya que primero se criaban las abejas sin aguijón, principalmente *Melipona beecheii* (meliponicultura). A principios del siglo XX se empezó a explotar la subespecie alemana, *Apis mellifera mellifera*, a mediados de ese siglo la Italiana *A. m. ligustica* y a partir de 1988 la abeja africanizada, la cual es un híbrido entre la subespecie africana *A. m. scutellata* introducida en Brasil en 1956 y las subespecies europeas existentes en el Continente Americano. La miel que se produce en grandes cantidades y se exporta en la Península de Yucatán proviene de esta abeja melífera africanizada (AMA) (Güemes-Ricalde *et al.*, 2003).

6.1 Abeja melífera, *Apis mellifera*

Es un insecto del orden Hymenoptera, familia Apidae, subfamilia Apinae. Las AMA son un híbrido entre diferentes subespecies de abejas melíferas europeas (AME) como: *Apis mellifera mellifera*, *A. m. carnica* o *A. m. ligustica* y la abeja melífera africana *A. m. scutellata* (Ojar, 2002; Hutchins *et al*, 2003)

6.1.1 Generalidades de la especie

El cuerpo de estas abejas está cubierto con vellosidades color amarillo-marrón y con líneas negras (véase Figura 3). Poseen cuatro alas y seis extremidades, todas unidas al segmento medio del cuerpo (tórax). El abdomen es más largo que el tórax y termina con un aguijón en las hembras, que los zánganos no presentan (Woodward y Quinn, 2011). La cabeza es más pequeña que el tórax y el abdomen (Ojar, 2002). Las obreras miden de 9.5 a 15.8 mm de largo, los zánganos 15.8 mm mientras que la reina mide 19.5 mm. La cabeza, antenas y extremidades son negras, mientras que las alas son traslúcidas (Hutchins *et al*, 2003). Las obreras poseen corbículas, que son estructuras recolectoras de polen, formadas por pelos curvados especializados que se encuentran en la tibia de las patas traseras (Caccavari y Cilla, 2010).



Figura 3. Panal con abejas melíferas de la península de Yucatán. **Fuente:** Pamela Narváez Torres

6.1.2 División del trabajo

Las abejas melíferas son insectos sociales y viven en colonias perfectamente organizadas, donde cada individuo cumple con una función determinada (SAGARPA, 2001). Una colonia de éstas consiste en una reina, varios miles de obreras y algunos cientos de zánganos (véase Figura 4), y más de 80,000 abejas pueden vivir en una sola colonia (Hutchins *et al*, 2003).

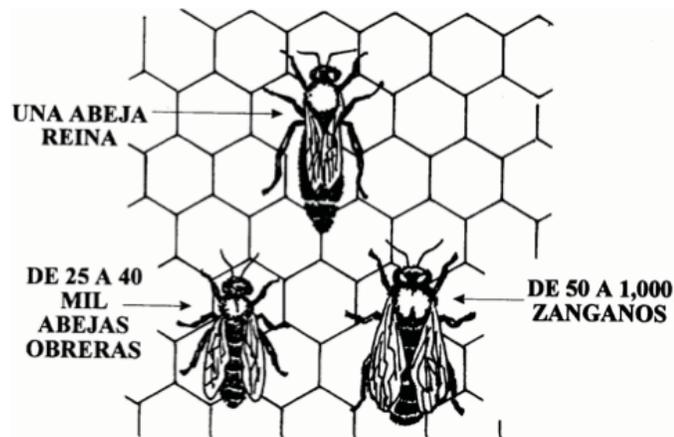


Figura 4. Abejas que habitan la colonia.
(Tomado de SAGARPA, 2001)

La función principal de la reina es la postura de huevos (Woodward y Quinn, 2011); la tarea de los zánganos es aparearse con la reina, los individuos que lo hacen mueren después de esto. Las obreras poseen órganos que no tienen la reina ni los zánganos, éstos les permiten realizar tareas relacionadas con la vida de la colonia, además están a cargo de realizar todos los trabajos dentro y fuera de la colmena, los cuales realizan de acuerdo a su edad y desarrollo glandular. Entre estas actividades se encuentran: limpiar los panales, dar calor a los huevos y

larvas, alimentar a las larvas, producir cera, construir panales, defender la colonia de la entrada de extraños, recolectar néctar, polen, agua y todo lo necesario para cubrir las necesidades de la colonia (SAGARPA, 2001).

6.1.3 Reproducción

Todas las abejas obreras son hembras estériles y las reinas son hembras fértiles, robustas, con el abdomen alargado, mientras que los zánganos son fértiles y los únicos machos en la colonia, poseen cuerpos angostos y un tanto largos. La reina se aparea con los zánganos, los huevos fertilizados se desarrollan en abejas obreras, a menos que, las larvas sean alimentadas con jalea real durante esta etapa, lo cual provoca que se desarrollen como abejas reinas. Las reinas también pueden producir huevos sin fertilizar, que van a desarrollarse como zánganos (Masterson, 2007; Woodward y Quinn, 2011).

En las abejas, el ciclo de desarrollo ontogénico consiste en: huevo, larva, pupa y adulto (véase Cuadro 5). La función principal de la reina es poner huevos, puede poner hasta 1,500 en un solo día, y la mayoría están destinados a desarrollarse en obreras, algunos en zánganos y unos pocos como reinas (Masterson, 2007). Los huevos se adhieren al fondo de las celdas del panal y eclosionan en aproximadamente 60 horas (Woodward y Quinn, 2011).

Cuadro 5. Ciclo de vida de las AMA

Fase del desarrollo	Obrera	Zángano	Reina
Huevo	3 días	3 días	3 días
Larva	5.5 días	5.5 días	6 días
Pupa	7.5 días	15.5 días	12 días
Días para emerger	16-18 días	24 días	21 días
Tiempo de vida	4-6 semanas	5- 10 semanas	1-3 años

Fuente: elaboración propia con datos de SAGARPA (2001) y Woodward y Quinn (2011)

La reina pone huevos de zánganos durante los ciclos de floración, ya que en las épocas de los flujos principales de néctar es cuando se requiere que las reinas vírgenes se apareen. Al llegar la época de escasez de néctar, la reina no necesita aparearse por lo que las obreras sacan a los zánganos de la colmena. Las obreras mantienen a los zánganos sólo durante los meses del año en que son de utilidad (SAGARPA, 2001).

6.1.4 *Distribución original*

La especie *Apis mellifera* es nativa de África, Europa y del Medio Oriente (Bradbear, 2009). Actualmente, la AMA se ha dispersado por todo Centro y Sudamérica hacia México y E.U.A. El ancestro africano proviene del sur y este de África, desde el sur de Kenia hasta la costa de Sudáfrica (Hutchins *et al*, 2003).

La mayoría de las colonias viven en colmenas comerciales hechas por el hombre y las celdas de la colmena están arregladas en panales verticales que las abejas usan para tener a sus larvas y almacenar sus provisiones (miel y polen). La miel es almacenada en la parte superior del panal, seguida de las celdas de polen, las celdas que contienen a las crías (huevos, larvas y pupas) y al final las de la cría de zánganos (Hutchins *et al*, 2003).

6.1.5 *Proceso de africanización de las abejas Apis mellifera en México*

Las AMA, son híbridos resultado de la cruce entre las abejas melíferas de origen europeo (AME) introducidas por los españoles hace unos 400 años y la subespecie africana *Apis mellifera scutellata*. Esta subespecie africana fue domesticada en el centro de Sudáfrica y se documentó como una abeja con alta producción de miel de calidad, resistente a enfermedades pero con un alto comportamiento defensivo (Ojar, 2002).

En 1956, el genetista Dr. Warwick Kerr llevó a Brasil abejas reinas provenientes de Tanzania para su cruce experimental con zánganos de origen europeo. La finalidad fue crear abejas mansas, que se adaptaran mejor al trópico y produjeran grandes cantidades de miel. Esta cruce dio como resultado la raza de AMA que conocemos hoy en día. En 1957, más de 24 reinas fueron liberadas accidentalmente al ambiente por el descuido de un apicultor (Masterson, 2007), lo que provocó que hibridaran con poblaciones de abejas europeas naturalizadas y se esparcieran por todo Centro y Sudamérica hasta México y E.U.A. (Medina *et al.*, 2002; Woodward y Quinn, 2011). Esta cruce dio como resultado las AMA que conocemos hoy en día.

Las AMA llegaron a México en 1986 al entrar por la costa de Chiapas y se dispersaron en pocos años por todo el país. Desde su llegada al país la SAGARPA implementó un programa de control que logró amortiguar su impacto en la apicultura (SAGARPA, 2001).

Las abejas europeas y las africanizadas pueden ser muy similares en apariencia, pero no en su comportamiento. Las AMA tienden a atacar fácilmente, responden con rapidez y con gran cantidad de individuos a los disturbios de sus colonias, mientras que las AME tienden a presentar de manera general un bajo comportamiento defensivo (Ojar, 2002). El comportamiento agresivo de las AMA hace que su manejo sea complicado en algunas regiones del país (SAGARPA, 2001).

6.1.6 Alimentación

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) colectan para su alimentación néctar y polen; el néctar es convertido en miel y representa su fuente principal de carbohidratos, mientras que el polen representa la parte proteica de su dieta (Woodward y Quinn, 2011). Las larvas que se convertirán en abejas reina son alimentadas exclusivamente con jalea real (Hutchins *et al*, 2003).

Los insectos sociales forrajeros deben obtener una serie de nutrientes, siendo la proteína uno de los más importantes. Las abejas melíferas proveen uno de los pocos sistemas en los que se puede examinar el forrajeo de proteína independientemente de la toma de energía, ya que los individuos forrajean proteína (polen) y energía (néctar) de forma independiente (Fewell y Winston, 1992).

6.1.7 Constancia floral

Las abejas obreras forrajeadoras presentan una alta constancia floral, esto quiere decir que normalmente visitan un solo tipo de flor durante sus vuelos de forrajeo (Free, 1963). La constancia floral es posible ya que las forrajeadoras rápidamente aprenden atributos de las flores como color, forma y olor, y usan esta información para forrajear con mayor eficiencia en ciertas flores (Menzel, 1999; Grüter *et al*, 2011). La constancia floral es importante para las plantas ya que gracias a este proceso se puede asegurar la polinización (Seeley, 1995; Grüter *et al*, 2011).

La elección de flores no es aleatoria, ésta tiende a reducir el tiempo de forrajeo, el riesgo y costo energético, llevando en general a la optimización de las ganancias. Las abejas dirigen su búsqueda de fuentes de alimento de acuerdo no sólo a la experiencia individual, sino también a la información transferida dentro de la colonia, siendo uno de los beneficios de su sociedad (Greggers y Menzel, 1993).

La organización eficiente del forrajeo normalmente implica comunicación entre las abejas ya que éstas pueden reclutar a otras, cambiar de colectoras de néctar a colectoras de polen o agua, tomar decisiones para cambiar a una nueva fuente de recursos o para explotarlos de forma más eficiente, y así cumplir con los requerimientos cambiantes de la colonia (Bradbear, 2009). Esta comunicación también sirve para dirigir las hacia parches de recursos que sean provechosos, a través de mecanismos como: rastros de feromonas o la danza del coleteo (*waggle dance*; véase Figura 5 y 6). Esta danza transmite información flexible, sobre la ubicación (dirección y distancia) dentro del rango de vuelo de la colonia y que puede ser comunicada (Seeley, 1995; Hart y Ratnieks, 2000; Leadbeater *et al.*, 2006).

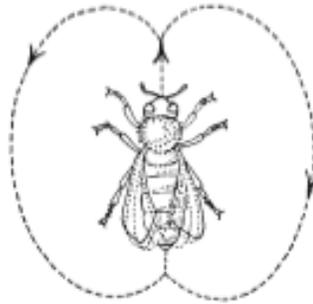


Figura 5. *Waggle dance*.
Fuente: Barth (1982 en Tarpy, 2004).

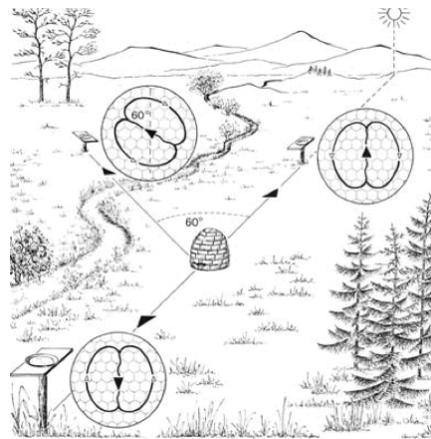


Figura 6. Ubicación del recurso
Fuente: Von Frisch (1976 en Tarpy, 2004)

6.1.8 Distancia de vuelo

Las abejas generalmente forrajean en flores que se encuentran a menos de 2 a 3 km de distancia de la colmena (Ratnieks, 2002 en Bradbear, 2009; Sherry y Mitchell, 2007; SENASICA, 2008); aunque hay registros de abejas que vuelan hasta 8 km (Ribbands, 1951) y 14.4 km, pero distancias inferiores a los 5 kilómetros son las más comunes (Ratnieks, 2002 en Bradbear, 2009). Sin embargo, cuanto más cerca se encuentren las flores de las colonias de abejas, más rápido será el transporte de los recursos (néctar y polen) y gastarán una menor cantidad de energía teniendo un mayor rendimiento (SAGARPA, 2001).

6.1.9 Transformación de néctar a miel

Las obreras forrajeadoras recolectan el néctar de las flores y lo transportan dentro de su buche melífero hacia la colonia, donde lo transfieren a una o varias obreras, las cuales lo depositan en las celdas (Hart y Ratnieks, 2001; Alfaro *et al.*, 2010).

La transformación de néctar a miel, se produce debido a cambios químicos y físicos. Los químicos inician cuando el néctar se encuentra en el buche, ya que las abejas le adicionan enzimas como la invertasa que hidroliza la sacarosa presente en el néctar a glucosa y fructosa. Los cambios físicos se deben a la evaporación, en la cual el néctar pierde hasta una tercera parte de su contenido de humedad durante el almacenamiento en la colmena, al madurar las abejas cierran la celda con una tapa de cera (opérculo) y al final de este proceso, el néctar es convertido en miel (Moguel, *et al.*, 2005).

6.2 Miel

6.2.1 Definición y composición

La definición de acuerdo a la Norma del *Codex Alimentarius* para la miel, dice:

*“Se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje” (CODEX STAN 12-1981).*

La miel es una solución sobresaturada de azúcares simples, está compuesta esencialmente de fructosa y glucosa, y en menor proporción, una mezcla de otros carbohidratos, enzimas, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, cera y partículas sólidas derivadas de la recolección, como el polen (véase Cuadro 6). El sabor y el aroma cambian, ya que derivan de la planta de origen. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada. La miel no debe contener aditivos, sustancias inorgánicas u orgánicas extrañas a su composición (CODEX STAN 12-1981).

Cuadro 6. Componentes básicos de la miel

Contenido	Descripción	Porcentaje
Humedad	Contenido de agua	≤ 20
Azúcares	Fructosa	21.7-53.9
	Glucosa	20.4-44.4
	Sacarosa	0.0-7.6
Minerales	Calcio, hierro, magnesio, potasio, cobre, etc.	0.02-1.03
Enzimas	Diastasa, invertasa, glucoxidasa	>0.1
Sólidos insolubles en agua	Partículas de cera, insectos, material vegetal, polen, etc.	0.1

Fuente: elaboración propia con datos del CODEX STAN 12-1981 y Bradbear (2009).

De acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX 2006, el color varía (véase Figura 7) por lo que puede ser blanca agua, extra blanca, blanca, extra clara ámbar, ámbar clara, ámbar y oscura. La miel se puede oscurecer por diversas razones, principalmente por el envejecimiento y la exposición a altas temperaturas. La magnitud de este proceso está influenciada por su origen botánico (SENASICA, 2008). La composición química de la miel depende principalmente de las fuentes vegetales de las cuales proviene, aunque también se ve influenciada por factores externos, como el manejo durante su extracción y almacenamiento, así como de las condiciones meteorológicas (Moguel, *et al*, 2005).



Figura 7. Gama de colores de la miel colectada en la península de Yucatán. **Fuente:** Pamela Narváez Torres

La calidad de la miel se manifiesta a través de sus diferentes propiedades como son el sabor, color y aroma (Bradbear, 2009; Alfaro *et al.*, 2010), mismas que son producto de las especies vegetales de la zona y que le confieren su origen botánico. El manejo inapropiado de la miel puede reducir su calidad, los factores que más influyen en ello son: las temperaturas elevadas, el tiempo de almacenamiento y contenido de humedad mayor a 21%, los cuales ocasionan fermentaciones, cambio de sabor, crecimiento microbiano, formación de hidroximetilfurfural, etc. (Moguel *et al.*, 2005), conservar una humedad apropiada (18%) ayuda a mantener las

propiedades de la miel y su calidad fisicoquímica (Alfaro *et al.*, 2010).

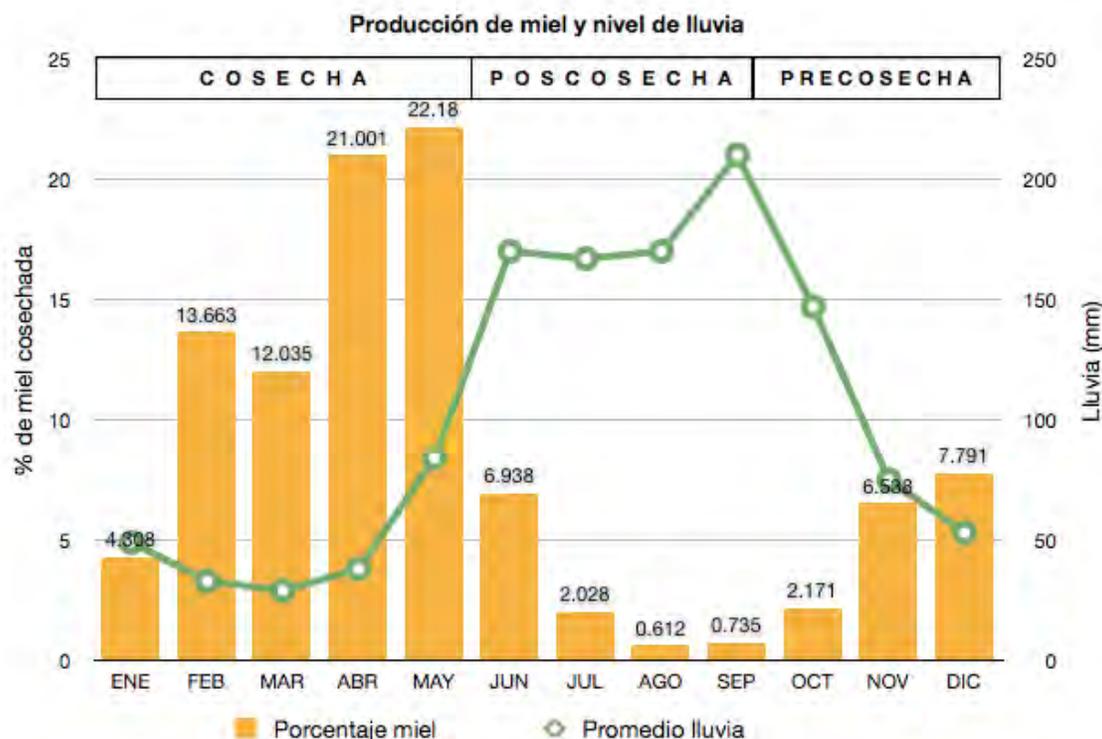
El polen mientras no rebase el 0.1% de los sólidos insolubles en agua permitidos en la miel no cambia la calidad de la ésta, sino que le confiere su origen botánico y geográfico, el cual nos permite conocer en qué región se produjo (Alfaro *et al.*, 2010).

La calidad e inocuidad de la miel se garantiza y conserva al cumplir con los parámetros establecidos en el CODEX STAN 12-1981, en la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006 así como en la Comisión Internacional de la Miel (Alfaro *et al.*, 2010).

6.2.2 *Ciclo apibotánico en la Península de Yucatán*

La producción de miel tiene amplias fluctuaciones a lo largo del año, ya que depende de los recursos nectaríferos y poliníferos disponibles por la flora de la región. Estos recursos están muy relacionados con las condiciones ambientales como la lluvia, el frío o calor, las cuales tienen efecto en la floración de las plantas que usan las abejas para el desarrollo de su colonia. El ciclo apibotánico o de producción de miel en la Península de Yucatán tiene tres etapas (véase Gráfica 3): Precosecha de octubre a diciembre, Cosecha de enero a mayo y Poscosecha de junio a septiembre (Alfaro *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2011).

De junio a octubre se presenta la temporada de lluvias que coincide con la pre y poscosecha (véase Gráfica 3), la miel que se produce en este período sólo representa el 8-9% del total anual y es de menor calidad, ya que muestra porcentajes de humedad más elevados. Una alta proporción de plantas de la familia Fabaceae presentan su floración durante esta temporada. En noviembre y diciembre, durante la transición de la temporada de lluvias a la de secas, se da la floración de plantas trepadoras de la familia Convolvulaceae (Echazarreta *et al.*, 1997; Alfaro *et al.*, 2011; SIAP, 2013).



Gráfica 3. Producción de miel (toneladas) y cantidad de lluvia (mm) en la Península de Yucatán.
Fuente: Elaboración propia con datos de CONAGUA (2010), INEGI (2011) y SIAP (2013).

Entre la vegetación de la península de Yucatán predominan las plantas de la familia Fabaceae. A pesar de esto, más del 90% de la cosecha anual de miel de la península toma lugar durante la época de secas, 42% durante la floración del chamizo o *tahonal* (*Viguiera dentata*, familia Asteraceae) que ocurre entre diciembre y febrero; y 48% durante la del *ts'iitsilche'* (*Gymnopodium floribundum*, familia Polygonaceae) entre marzo y mayo (Echazarreta *et al.*, 1997). Entre las principales mieles que se cosechan en la época de secas también podemos encontrar la de *kàn chu núup* (maya), hueso de tigre o madera dura (*Thouinia paucidentata*); *pukte'* (maya) o cacho de toro (*Bucida buceras*); *chakàah* (maya), almácigo o palo mulato (*Bursera simaruba*), entre otras (Alfaro *et al.*, 2010; CICY, 2010a; CONAFOR, 2013a y 2013b; IBUNAM, 2011).

La flora de la Península de Yucatán ha sido reconocida por su importante contribución a la apicultura; se conocen numerosas especies de plantas que son visitadas por las abejas melíferas. Según la base de datos florísticos de diversos herbarios de la Península de Yucatán y de la CONABIO, las abejas melíferas visitan alrededor de 900 especies. En los estudios melisopolinológicos realizados en las mieles peninsulares, los autores no han reportado a la soya como una especie vegetal que sea fuente de alimento para las abejas (Echazarreta *et al.*,

1997; Villanueva-Gutiérrez, 2002; Alfaro *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2011)

6.3 Soya, *Glycine max*

Es una planta del orden Fabales que pertenece a la familia Fabaceae, especie *Glycine max* (L.) (Pratap *et al.*, 2012). Es uno de los granos más cultivados en el mundo, siendo E.U.A. el principal productor seguido por Brasil, Argentina, China e India (Chiari *et al.*, 2005b; FAOSTAT, 2013). La soya es uno de los principales cultivos para producción de aceite, y también tiene una gran importancia en la alimentación como legumbre. Este grano ha sido parte de muchos programas de mejoramiento genético y consecuentemente, ha habido un incremento considerable en su producción en las últimas dos décadas. La variedad de soya GM tolerante al herbicida ha tenido un éxito comercial enorme, y se ha convertido en el cultivo GM líder a nivel mundial (Pratap *et al.*, 2012).

6.3.1 Generalidades de la especie

Es una planta anual, herbácea, de tallo rígido y erecto (véase Figura 8), poco ramificada y de altura variable (50-150cm); las hojas, tallos y vainas son pubescentes. La soya presenta diferentes tipos de hojas: las primeras son simples, opuestas y todas las demás alternas y trifoliadas; las simples son ovaladas y las trifoliadas son ovaladas o lanceoladas (Bastidas, 1994; Valencia, 2006, Pratap *et al.*, 2012). Su ciclo vegetativo va desde 90 hasta 130 días



dependiendo de la variedad del cultivo (Monsanto, 2008).

Figura 8. Planta de soya en el cultivo del Rancho El Cenit en Campeche. **Fuente:** Pamela Narváez Torres

La soya se caracteriza por presentar dos períodos bien definidos de crecimiento y desarrollo: el primero es el vegetativo, comprendido entre la emergencia de los cotiledones y el inicio de la floración; el segundo es el reproductivo, que abarca desde la floración hasta la madurez del grano (Valencia *et al.*, 2006). La soya emerge a los cinco días de haber sido sembrada, cuando las condiciones de profundidad, humedad y temperatura del suelo son óptimas (Bastidas, 1994).

Los diferentes cultivos de soya presentan tres tipos de hábito de crecimiento: determinado, indeterminado y semi-determinado. En el determinado las plantas detienen su crecimiento en altura cuando comienza la floración, y generalmente la yema terminal se transforma en inflorescencia. En el indeterminado el crecimiento vegetativo continúa más allá del período de desarrollo de las vainas, el tallo no termina en inflorescencia. La soya semi-determinada tiene tallos indeterminados que terminan su desarrollo vegetativo abruptamente después del período de floración (Agudelo y Riveros, 1994; FAO, 1995; Valencia, 2006, Monsanto, 2008).

Es una planta de día corto, el tiempo de oscuridad es el factor que controla e induce la respuesta fotoperiódica, y la floración ocurre cuando el día se hace más corto. Las distintas variedades de soya tienen diferentes respuestas a la longitud del día, lo que hace que ciertas características de la planta se vean alteradas, como: días a floración, a madurez, altura de la planta, número de vainas, etc. (Maldonado *et al.*, 2010a y b).

6.3.2 Flor

Las estructuras florales varían desde grupos compactos de 2 a 35 flores, hasta flores espaciadas en racimos (FAO, 1995). Una sola planta puede tener hasta 800 flores (McGregor, 1976). La soya tiene una flor papilionácea (fabácea) típica, pequeña y sécil, hermafrodita, mide de 6 a 7mm con un cáliz tubular de cinco sépalos irregulares, y una corola de cinco pétalos que consiste en uno de mayor tamaño o “estandarte”, dos pétalos alados laterales, y dos delanteros denominados “quilla” (véase Figura 9). La flor puede ser blanca o morada clara (véase Figura 10), dependiendo de la variedad (Bastidas, 1994; Valencia, 2006).

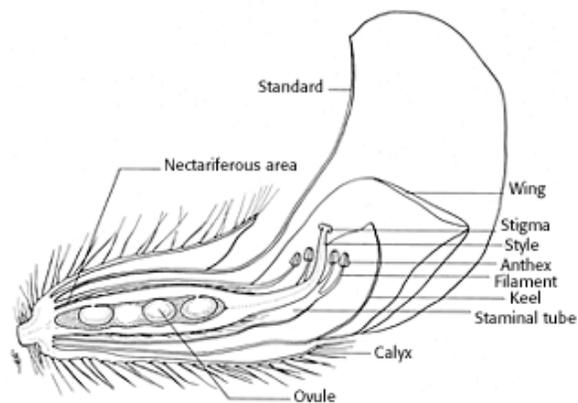


Figura 9. Corte longitudinal de la flor de soja
Fuente: McGregor (1976)



Figura 10. Flor morada de soja.
Fuente: Pamela Narváez Torres

El androceo consiste en 10 estambres diadelfos en los que los filamentos de 9 están fusionados, dejando el estambre posterior libre. El pistilo es unicarpelado y tiene de uno a cuatro óvulos. Los órganos reproductores femeninos maduran aproximadamente un día antes que los masculinos (Carlson y Lersten, 1987 en Palmer *et al.*, 2001; Pratap *et al.*, 2012).

A pesar de ser una especie autógama, poco atractiva para los insectos polinizadores, la flor posee la mayoría, si no es que todas, las características de una flor entomófila, ya que cuenta con un nectario anular en la base del gineceo que ofrece una recompensa a los insectos pecoreadores (Gallez, 2005).

Las flores de soja se abren temprano en la mañana, dependiendo de las condiciones meteorológicas, y la apertura puede retrasarse por condiciones de baja temperatura o clima húmedo (Chiari *et al.*, 2005a).

6.3.3 Néctar y polen

El néctar es blanco y acuoso. El Departamento de Agricultura y Alimentación de Australia Occidental (2005) midió el contenido total de azúcar por flor, éste fue de 50%, y la producción de néctar fue de 0.048 μ l por flor en un período de 24 horas (DAF, 2005), mientras que Erickson (1975b) reportó que algunas flores pueden producir hasta 0.5 μ l.

Se ha demostrado que el néctar presenta de 35-53% de contenido de sacarosa, con un promedio de 43.6% (Jaycox, 1970 en Palmer *et al.*, 2001; DAF, 2005). Aunque la cantidad de

néctar producido por flor sea pequeño, la densidad floral es muy alta en áreas de cultivo, convirtiéndolo en una atractiva fuente de alimento para los insectos nectarívoros. Aunado a esto, las plantas que crecen en temperaturas más elevadas producen una mayor cantidad de néctar que las que lo hacen en temperaturas bajas (Keogh *et al*, 2010).

El pellet de polen (pelota de polen recolectada por las abejas) es color café grisáceo (DAF, 2005). El grano de polen es esferoidal, de exina lisa (psilado), presenta tres poros y tres colpos (véase Figura 11), por lo que se dice que es tricolporado (Lieux, 1977). Palmer y colaboradores (1978 en Palmer, 2001) reportaron un rango de 3740 a 7600 granos de polen por flor entre 5 diferentes variedades de soya que analizaron.

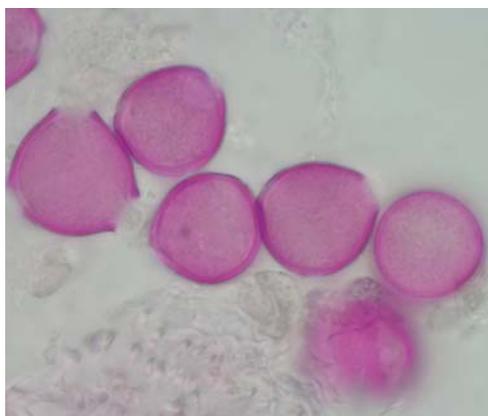


Figura 11 Granos de polen de soya en glicerogelatina teñida con fucsina básica. **Fuente:** Rita Alfaro Bates.

La liberación de polen normalmente ocurre un poco antes o un poco después de que la flor abra, algunas veces ocurre con la flor cerrada (la flor se autopoliniza). El polen pocas veces puede ser transportado por el viento, pero puede ser transportado de flor en flor a través de los insectos, y la polinización cruzada natural raramente ocurre a distancias mayores de 10 a 15 metros (Monsanto, 2008).

6.3.4 Reproducción

La soya generalmente se autopoliniza, aunque las tasas de polinización cruzada natural han sido observadas en un rango de 0.03% y 35%. (Erickson, 1975a; Pratap *et al.*, 2012). Las anteras maduran en la yema floral y vierten su polen directamente hacia el estigma de la misma flor, asegurando un alto grado de autopolinización (Erickson, 1975a; Stelly y Palmer, 1985 en Pratap *et al.*, 2012). Los insectos pequeños como los trips (tisanópteros) y las abejas melíferas

son los principales responsables de la polinización cruzada en la soya cultivada (Pratap *et al.*, 2012), donde la mayoría de los estudios que se han realizado sobre el tema se han llevado a cabo en Estados Unidos (Wisconsin), y en Brasil.

La semilla se desarrolla rápidamente después de la fecundación. A los 7 días se inician los cotiledones, en 12 días se definen los sistemas tisulares del hipocótilo, a los 14 días se forman los primordios de las hojas primarias y a los 30 días se diferencia el primordio de la primer hoja trifoliada (Valencia, 2006)

6.3.5 Vaina y semilla

El fruto de la soya es una vaina pubescente color verde que va perdiendo este color conforme madura, tornándose generalmente café (véase Figura 12). Su tamaño es de 2 a 7 cm, y el número de semillas varía de 1 a 5 por vaina aunque normalmente se dan 2 ó 3. Las vainas se encuentran en grupos de 3 a 15 (McGregor, 1976; Valencia, 2006).



Figura 12. Vaina pubescente en proceso de maduración. **Fuente:** Pamela Narvárez Torres.

La semilla de soya varía de forma, color y tamaño. La forma varía de esférica a achatada y alargada. Las semillas de las variedades cultivadas generalmente tienen forma oval, la cutícula presenta color amarillo, verde, negro o varios tonos de café, siendo el amarillo el más común entre las variedades comerciales (Bastidas, 1994; Valencia, 2006; Pratap *et al.*, 2012).

La semilla de soya contiene fundamentalmente proteína (40%) y aceite (15%-20%). (Estrada, 2008), y estos componentes están correlacionados negativamente entre sí, pudiéndose

clasificar las variedades por alto contenido de aceite y baja proteína y viceversa (Bastidas, 1994; FAO, 1995).

6.3.6 Origen y Distribución

China posee los registros escritos más antiguos sobre el cultivo de soya, considerándose que en este país se dio su domesticación (Qiu y Chang, 2010). Este cultivo se adapta a las regiones subtropicales y tropicales (Monsanto, 2008). El género *Glycine* subgénero *Soja* que incluye a las especies *G. max*, *G. soja* y *G. gracilis* se desarrollan de manera silvestre en algunos países de Asia, como son: Corea, Taiwán, Japón, noroeste de China y suroeste de Rusia (Qiu y Chang, 2010), pero actualmente la soya se siembra de manera comercial en más de 90 países (FAOSTAT, 2013).

Estudios realizados en Japón muestran que la soya silvestre, *Glycine soja*, es comúnmente visitada por insectos de las familias Apidae (*Apis cerana* y *Xylocopa appendiculata circumvolans*), Halictidae (*Halictus aerarius*, *Lasioglossum exiliceps*), Megachilidae (*Megachile kyotensis*, *M. nipponica nipponica*), Vespidae (*Oreumenes decoratus*), Heliethidinae (*Heliethis marítima adaucta*) y Lycaenidae (*Everes argiades hellotia*) (Fujita et al., 1997).

Hasta el momento no se han reportado especies silvestres o malezas genéticamente compatibles con la soya cultivada en México. *Glycine max* exclusivamente genera híbridos fértiles cuando se cruza con especies del subgénero *Soja* (CONABIO, 2012).

6.3.7 Relación de la soya y las abejas melíferas

La inflorescencia de la soya puede contener entre 2 y 35 flores, cada planta puede tener hasta 800 flores y cada flor es capaz de producir una vaina que usualmente contiene 3 ó 4 semillas; entre el 13-57% de las vainas se logran. La floración usualmente se mantiene entre cuatro y seis semanas, y puede llegar a haber más de medio millón de flores en media hectárea (Mc Gregor, 1976).

Aunque la cantidad de néctar producido por flor sea pequeña, la densidad floral es muy alta en áreas de cultivo, convirtiendo a la soya en una buena fuente de alimento para los insectos forrajeadores (Chiari et al., 2005a; Keogh et al, 2010).

Existen pocos estudios de la polinización en la soya. Erickson (1975a) realizó estudios en E.U.A. y encontró un incremento de 5-20% en la productividad de la soya al ser polinizada por

abejas melíferas. De acuerdo a este autor, los principales vectores del polen son las abejas, en especial las melíferas. La soya compete de buena forma por la atención de estos insectos al presentar concentraciones de azúcar en néctar arriba del 25%. Los datos de sus estudios mostraron que es posible incrementar la productividad a través de la selección de variedades de soya que sean atractivas para las abejas.

Estudios más recientes realizados por Chiari y colaboradores (2005b) en Brasil (Hacienda Experimental del Iguatemi) también sugieren que la polinización llevada a cabo por *A. mellifera* fue responsable del incremento en la productividad de la soya, donde la producción de semilla fue mayor en áreas descubiertas (57.73%) y cubiertas (50.64%) con colonias de abejas melíferas que en las cubiertas sin abejas. Además el incremento promedio en el número de vainas fue de 61.38% mayor que en la zona cubierta sin abejas.

Chiari y colaboradores (2005) reportaron que el período de antesis en las flores de soya fue mayor en cultivos cubiertos sin abejas; lo que indica que la flor permaneció abierta más tiempo que las de los cultivos con abejas. Este hecho sugiere que las flores “esperaron” al agente polinizador y realizaron auto-fecundación como último recurso.

6.3.8 Variedades convencionales utilizadas en la Península de Yucatán

El INIFAP desarrolló diferentes variedades de soya en respuesta a la demanda de los productores de este cultivo en el trópico. Entre las variedades convencionales que encontramos desde 2009 y 2010 para la Península de Yucatán están la Huasteca 200 y la Huasteca 400. Estas variedades son propiedad intelectual del INIFAP, y se encuentran inscritas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (Maldonado y Ascencio, 2010; Maldonado *et al.*, 2010b).

La variedad Huasteca 200 es producto del cruzamiento entre la variedad F81-5344 y la Santa Rosa. Tiene baja sensibilidad al fotoperiodo corto del trópico, por lo que tiene una excelente adaptación en siembras tardías de verano. Tiene entre sus características: floración a 52 días de la siembra y un ciclo de 118 días. Presenta hábito de crecimiento semideterminado, es de tallo erguido con ramificaciones, la altura de la planta va de 95 a 109 cm y presenta pubescencia café. Los folíolos son medianos de forma ovoide y las flores de color blanco. La altura de las primeras vainas va de 18 a 23 cm (véase Cuadro 7), presentan de 2 a 3 granos y estos son de color amarillo con hilio de color café (Maldonado y Ascencio, 2010).

La variedad Huasteca 400 se obtuvo por selección individual del material Dois Marcos 301. Es resistente a las diferentes plagas y enfermedades presentes en el trópico, con buena adaptación al fotoperiodo del trópico húmedo. Esta variedad inicia la floración a 46 días de la siembra y su madurez fisiológica ocurre a 111 días de ésta. Es de tallo erguido con buena ramificación, presenta hábito de crecimiento determinado, es de tamaño medio a alto con una altura máxima de 80 cm, con vainas basales a 16 cm del suelo. Los folíolos son ovales puntiagudos y las flores son de color morado claro (véase Cuadro 7). Las vainas con pubescencia café tienen de 2 a 3 granos esféricos, estos son de color amarillo con hilio marrón claro (Maldonado *et al.*, 2010b).

Estas variedades son resistentes a las enfermedades y plagas presentes en el trópico mexicano. Están adaptadas a las regiones tropicales de tierras bajas con clima húmedo y subhúmedo y temperatura media de 25 a 27°C con precipitaciones anuales de 800 a 1,000 mm, siendo el período óptimo de siembra del 15 de junio al 25 de julio (véase Cuadro 7). Estas características se encuentran en regiones con potencial productivo para este grano en el trópico de México.

Cuadro 7. Características de las variedades tropicales de soya que se siembran en la Península de Yucatán

	Huasteca 200	Huasteca 400	Soya GM
Fecha de siembra	15 jun-25 jul	15 jun-25 jul	15 jun-31 jul
Color de la flor	Blanca	Morada	Morada
Floración (días)	52	46	45
Fecha de floración	06 ago-15 sep	31 jul-09 sep	30 jul-1 4sep
Altura planta (cm)	95-109	80	92
Altura vaina (cm)	18-23	16	7-12
Madurez (días)	118-122	111	120-125
Rendimiento promedio (ton/ha)	2.3-2.9	2.63	2

Fuente: Elaboración propia con datos de Estrada-Vivas (2010), Maldonado y Ascencio (2010), Maldonado *et al.*, (2010b) y MONSANTO (2010 y 2012) .

La presencia del transgén no altera las características biológicas de la soya a excepción de la tolerancia conferida al glifosato. Las características fenológicas de la variedad GM son muy similares a las variedades comerciales convencionales ya que en general se encuentran en el mismo rango de madurez fisiológica como: días de floración, altura al primer nudo, número de nudos y granos por vaina (Monsanto, 2010)

En la variedad Huasteca 200 el porcentaje de proteína (véase Cuadro 8), el contenido de ácido graso oleico y el bajo contenido de linolénico indican que el grano de esta variedad es de muy buena calidad (Maldonado y Ascencio, 2010). Los contenidos de aceite y proteína de la Huasteca 400 se encuentran dentro del rango de niveles que demanda la industria nacional (Maldonado *et al.*, 2010b).

Cuadro 8. Contenido de aceite y proteína

Componente	Contenido (%)		
	Huasteca 200	Huasteca 400	Soya GM
Proteína	43.23	36.52	41.35
Aceite	20.84	20.81	20.41
Ácidos grasos			
Palmítico	10.00	15.23	10.00
Estéarico	3.72	3.70	3.70
Oleico	21.91	25.5	20.00
Linoléico	57.22	49.08	52.00
Linolénico	6.38	5.75	8.00

Fuente: Elaboración propia con datos de Maldonado y Ascencio (2010), Maldonado *et al.*, (2010b), Taylor *et al.*, (1999) y CERA, (2009).

Las investigaciones realizadas por el INIFAP en suelos mecanizados del estado de Yucatán indican que las condiciones de suelo y clima son propicias para el cultivo de la soya. Para los ambientes tropicales o de días cortos se requieren variedades con período juvenil largo o baja sensibilidad al fotoperiodo corto para garantizar que la planta se desarrolle adecuadamente y tenga un buen rendimiento (Maldonado y Ascencio, 2010).

6.3.9 Variedad genéticamente modificada

Monsanto Comercial S.A. de C.V. desarrolló la variedad de Soya Solución Faena® (Soya SF), evento MON-Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2), que presenta tolerancia al herbicida Faena® (Roundup®) para el control de malezas en el cultivo de ésta. En este evento se introdujo el gen *cp4 epsps* proveniente de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4, el cual codifica la enzima CP4 EPSPS (CP4 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa), naturalmente tolerante al glifosato y perteneciente a la familia de proteínas EPSPS, que se encuentran de forma común en el medio ambiente (Monsanto, 2008; CERA, 2009).

El glifosato, ingrediente activo del herbicida Solución Faena®, actúa como inhibidor competitivo

de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), ésta es esencial en la ruta bioquímica del shikimato, que participa en la producción de los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano. Esta inhibición da lugar a la supresión del crecimiento y a la muerte de la planta (Steinrucken y Amrhein, 1980; CERA, 2009).

El gen insertado que confiere resistencia al glifosato codifica para una versión bacteriana de la enzima. Esta enzima es altamente insensible a la inhibición por el glifosato y por lo tanto cumple con las necesidades metabólicas de aminoácidos aromáticos de la planta (CERA, 2009). Cuando las plantas convencionales son rociadas con glifosato, no pueden producir los aminoácidos aromáticos necesarios para sobrevivir. En cambio, la Soya SF posee la proteína CP4 EPSPS, lo que le da la capacidad de sobrevivir al ser tratada con el herbicida, ya que ésta es mucho menos sensible a la inhibición por el glifosato (Monsanto, 2012; CERA, 2009).

La soya SF fue producida a través de transformación por biobalística de células vegetales de la variedad comercial A5403 de Asgrow Seed Co. El plásmido (vector) PV-GMGT04 (véase Figura 13) utilizado pertenece a *Escherichia coli*, y contiene los genes que codifican para la tolerancia al glifosato y la producción de β -glucuronidasa (gen gus), un marcador detectable. La expresión del gen CP4 EPSPS es regulada por el promotor 35S mejorado (E35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP4) de *Petunia hybrida*, y un elemento de terminación de la transcripción de la nopalina sintasa (nos 3') de *Agrobacterium tumefaciens*. El péptido de tránsito facilita la translocación de la EPSPS sintasa hacia el cloroplasto, el sitio de biosíntesis de aminoácidos aromáticos y del de acción del glifosato (véase Cuadro 9) (Berdal y Holst-Jensen, 2001; Monsanto, 2008; CERA, 2009). En el cuadro 6 se indican las secuencias de DNA que fueron transferidas dentro del genoma de la soya Solución Faena® evento MON-04032-6.

Cuadro 9. Secuencias genéticas transferidas dentro del genoma de la soya SF, evento MON-04032-6.

Elemento genético	Tamaño (kb)	Función
P-E35S	0.61	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciadora duplicada.
CTP4	0.23	Región N-terminal de la secuencia peptídica de transferencia a cloroplasto del gen <i>epsps</i> de <i>Petunia hybrida</i> . La secuencia CTP fue fusionada a la terminación-N del gen <i>cp4 epsps</i> para transferir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, sitio de actividad de EPSPS y de la acción fisiológica del glifosato

cp4 epsps	1.36	Región C-terminal del gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS) de la bacteria <i>Agrobacterium</i> sp. cepa CP4 tolerante al herbicida glifosato.
NOS 3'	0.26	Región 3' no traducida del gen nopalina sintasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . La secuencia NOS 3, aislada del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , provee la señal de poliadenilación para una expresión estable.

Fuente: Monsanto (2008).

Diversas secuencias genéticas que se encuentran presentes en el plásmido PV-GMGT04 (véase Figura 13) empleado en la transformación genética no fueron integradas en el genoma de la soya Solución Faena® evento MON-04032-6. Estos elementos son: **KAN** (*nptII*) que es el gen de la neomicina fosfotransferasa tipo II del plásmido pKC7, esta enzima confiere resistencia a antibióticos usados para la selección de plásmidos de *Escherichia coli*. **Ori-pUC**, origen de replicación del plásmido pUC1119 de *E. coli*. El operón **LAC**, contiene la secuencia codificadora parcial *lacI* de *E. coli*, el promotor Plac, y una secuencia codificadora parcial para la β -d-galactosidasa de pUC 119. **P-MAS**, región promotora de la manopina sintasa TR 2'. **GUS**, región codificante del gen de la β -glucoronidasa, la expresión de este gen es utilizada como marcador de transformación. **7S 3'** es la región 3' no traducida de la subunidad alfa 7S de la proteína de almacenamiento de la soya. **CMoVb** (FMV), gen promotor 35S del virus el mosaico de la *Srcophularia*, así como **CTP4**, **cp4 epsps** y **NOS 3'** (Monsanto, 2008).

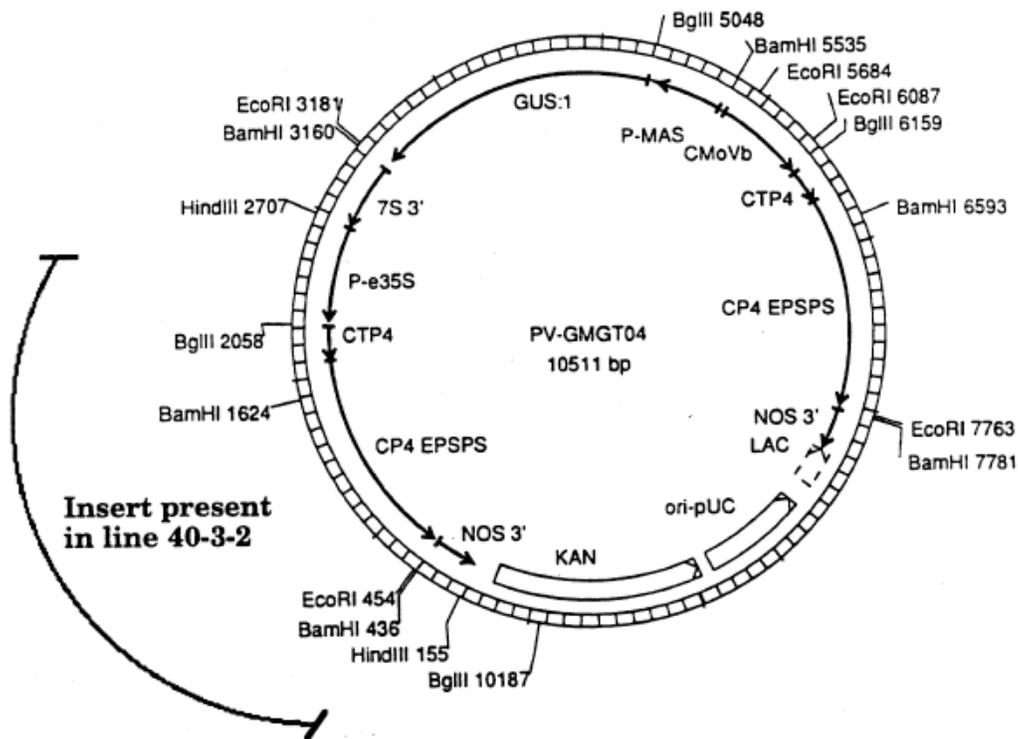


Figura 13. Mapa del plásmido PV-GMGT04 empleado en la transformación genética de la línea de soya parental A5403 de donde se obtuvo la soya Solución Faena® evento MON-04032-6.

Fuente: Tomado de Monsanto (2008)

El glifosato no es selectivo, es de aplicación post-emergente y de amplio espectro, cuando se aplica en una planta el herbicida es absorbido a través de las hojas y el tejido suave del tallo (CERA, 2009).

La enzima EPSPS está presente en todas las plantas, bacterias, hongos, pero no en los animales, ya que nosotros no sintetizamos nuestros propios aminoácidos aromáticos. La ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos no está presente en mamíferos, aves o en formas de vida acuática, por lo que el glifosato tiene muy poca o nula toxicidad para estos organismos. Esta enzima está normalmente presente en alimentos derivados de fuentes vegetales y microbianas (CERA, 2009).

6.3.10 Siembra de soya GM en la Península de Yucatán

En el año 2000 Semillas y Agroproductos Monsanto solicitó por primera vez un permiso para la liberación experimental de Soya SF al ambiente en el estado de Campeche, proceso que se repitió cada año hasta 2008. En el estado de Yucatán se comenzó con la siembra experimental

de soya SF tras la solicitud del promovente en 2003, y se repitió en 2005, 2007 y 2008 donde ya se incluyó a Quintana Roo (CIBIOGEM, 2005, 2006, 2007 y 2008).

En el 2010 y 2011 se aprobó la siembra piloto en 12,000 ha y 30,000 ha respectivamente de soya SF en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Las solicitudes 009/2010 y 014/2011 (véase Cuadro 10) fueron realizadas por Monsanto Comercial S.A. de C.V. para el ciclo agrícola P-V 2010 y 2011. La superficie sembrada en 2010 fueron 12,000 ha y del 2011 no se tiene el dato preciso (CIBIOGEM 2010 y 2011). De acuerdo a Estrada-Vivas (2010), en el ciclo P-V 2010 la siembra de la soya SF se localizó en 24 ejidos en el sur de Yucatán, con una extensión aproximada de 3,000 ha y la cultivaron 105 productores.

En febrero de 2012 Monsanto Comercial S.A. de C.V. presentó la primer solicitud para la siembra comercial de esta soya (véase Cuadro 10), la extensión solicitada fue de 60,000 ha para el ciclo P-V 2012 (CIBIOGEM, 2012). Todas estas solicitudes fueron autorizadas para siembra, aunque no todas se llevaron a cabo.

Cuadro 10. Solicitudes de permiso presentadas por Monsanto para la liberación experimental, piloto y comercial de la Soya SF en la Península de Yucatán

Año	2007	2008	2010	2011	2012
Solicitud	010	002	009	014	007
Fecha	15/06	19/02	28/04	16/03	29/02
Promovente	S. y A. Monsanto	Monsanto Comercial		Monsanto Comercial	
Organismo	<i>Glycine max</i> (L.)		<i>Glycine max</i> (L.)	<i>Glycine max</i> (L.)	
Evento	MON-04032-6		MON-04032-6	MON-04032-6	
Tipo	Experimental	Experimental	Piloto	Piloto	Comercial
Extensión	10,000	7,200	12,000	30,000	60,000*
Estados	Campeche, Quintana Roo y Yucatán		Campeche, Quintana Roo y Yucatán		

Fuente: Elaboración propia con datos de Registro Nacional de OGMs en la página de la CIBIOGEM (2007, 2008, 2010, 2011, 2012). * Solicitud para la siembra de 230,000ha en Regiones de la Península de Yucatán, Planicie Huasteca y Chiapas.

6.4 Implicaciones de la siembra de soya GM en la Península de Yucatán

La soya GM contiene genes que le permiten ser tolerante al herbicida glifosato. Desde el año 2000 se empezó a sembrar soya GM (evento MON-Ø4Ø32-6) en la Península de Yucatán, primero a través de certificados y luego de permisos que se fundamentan en evaluaciones de riesgo. En la Península de Yucatán los cultivos de soya GM y los apiarios pueden coincidir en tiempo y espacio, haciendo que la presencia de polen de esta planta en la miel sea una posible realidad. En septiembre del 2011 el Tribunal de Justicia de la Unión Europea (TJUE) dictaminó

que la miel que contenga trazas de polen GM debería recibir aprobación regulatoria antes de ser comercializada en Europa (TJUE, 2011).

En ese mismo año, la SAGARPA autorizó la siembra piloto de 30,000ha de soya SF en la Península de Yucatán y para el 2012 autorizó la siembra comercial de 60 mil hectáreas. En 2011 la siembra de soya SF se llevó a cabo en una extensión menor a la solicitada (no se reporta el dato exacto) (CIBIOGEM 2011 y 2012); mientras que para 2012 los apicultores de la región impidieron, mediante dos suspensiones obtenidas en juicio de amparo, que la siembra comercial de soya SF se llevara a cabo (Pérez, 2012), y en su lugar se sembró soya de las variedades Huasteca 200 y Huasteca 400.

La decisión del TJUE es resultado de la denuncia interpuesta en el 2005 por el apicultor alemán Karl Heinz Bablok, que encontró trazas de polen GM en sus colmenas. Se detectó la presencia de DNA de maíz Bt (MON 810, resistente a insectos) y de toxinas Bt en el polen colectado en sus colonias, considerando que el apicultor mantenía sus apiarios a 500 m de campos de cultivo donde el gobierno del Estado libre de Baviera sembraba este maíz en campos experimentales. También se analizaron muestras de miel, y en éstas se encontraron pequeñas cantidades de DNA proveniente del polen de este cultivo (TJUE, 2011; Waltz, 2011 Woller, 2012).

El 6 de septiembre de 2011 el TJUE emitió una sentencia sobre el litigio de Karl Heinz Bablok y cuatro apicultores más contra el Freistaat Bayern (Estado Libre de Baviera), dictaminando que el polen presente en la miel ya no constituye en sí mismo un OGM, ya que ha perdido su capacidad reproductiva y carece de toda posibilidad para transferir material genético. El polen no es un cuerpo extraño ni una impureza, sino un componente normal de ese producto, que debe calificarse de “ingrediente”. La miel que contiene polen derivado de un OGM es un alimento producido a partir de OGM y de acuerdo a lo que indica el Reglamento 1829/2003 de la Unión Europea (sobre alimentos y piensos modificados genéticamente), los alimentos producidos a partir de OGMs no pueden comercializarse sin autorización previa.

No obstante a la advertencia por parte de la Unión Europea de exigir a los países exportadores de miel, garanticen que ésta no lleva trazas de polen GM, el volumen exportado en el año 2011 alcanzó las 26,888 toneladas, con un valor de 90.4 millones de dólares, que representa la cifra más alta registrada en los últimos 10 años por concepto de exportación de miel (SIAP, 2013; INEGI, 2012b; FAOSTAT, 2013). La soya MON-Ø4Ø32-6 se aprobó para consumo en la Unión

Europea en el 2005 (CERA, 2009)

A finales del siglo pasado, se introdujeron a Europa los OGM, y desde ese suceso la mayoría de los consumidores de ese continente los han rechazado y han pedido que sean etiquetados para que puedan elegir de manera informada los productos que van a consumir (Woller, 2012).

La coincidencia geográfica entre las zonas de producción de miel y los polígonos propuestos por el promovente para la liberación de soya SF al ambiente, podría hacer posible la presencia de polen de soya en las mieles producidas en la Península de Yucatán, provocando así el rechazo de los comercializadores y consumidores europeos hacia mieles que contengan polen GM. Esto ha creado gran preocupación entre los exportadores y apicultores peninsulares, ya que pone en peligro la exportación de la miel al Continente Europeo (CONABIO, 2012).

VII. METODOLOGÍA

Parte de este trabajo de tesis se desarrolló en paralelo con el Departamento de Apicultura de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), como parte del proyecto: “Determinación y cuantificación de granos de polen de soya (*Glycine max* L.) en miel de abeja (*Apis mellifera*) y su relación con el comportamiento de éstas, en áreas de cultivo cercanas a apiarios de la península de Yucatán”. El objetivo fue conocer y relacionarse con la metodología empleada en campo por los apicultores e investigadores.

Todo el trabajo en campo se realizó en Campeche y Yucatán (véase 7.1 Sitio de estudio); el trabajo en laboratorio se desarrolló en las instalaciones del Departamento de Apicultura (UADY) en Mérida y en la Facultad de Ciencias de la UNAM en el Distrito Federal. La parte molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Capacitación Ambiental (CENICA).

7.1 Sitio de estudio

El área de estudio planteada para este proyecto es la Península de Yucatán, en particular los estados de Campeche y Yucatán. Se seleccionaron sitios donde se registró que los cultivos de soya y los apiarios que producen miel de abeja, *Apis mellifera*, coinciden en tiempo y espacio. También se tuvo conocimiento de que en estos sitios se sembró soya SF durante el 2011 (P-V 2011) y soya convencional en 2012 (P-V 2012).



Figura 14. Mapa de la Península de Yucatán. Estados de Campeche y Yucatán (Google Earth, 2013)

7.1.1 Estado de Campeche

El estado de Campeche (véase Figura 14) tiene una extensión de 57,507 km² que representan el 2.9% del territorio nacional. Está dividido en 11 municipios (INEGI, 2012g) y tiene una población de 822,441 habitantes. Colinda al norte con el Golfo de México y Yucatán; al este con Quintana Roo y Belice; al sur con Tabasco y Guatemala y al oeste con Tabasco y el Golfo de México. Predomina el clima cálido subhúmedo con lluvias en verano en el 90.7% de su territorio, el 9.2% presenta clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y el 0.1% clima semiseco muy cálido o cálido. La temperatura media anual es de 26.5°C, la más alta rebasa los 30°C y la mínima es de 18°C. Las lluvias son abundantes durante el verano, y la precipitación total anual varía entre 1,200 y 2,000 mm, y en la región norte, de clima semiseco, es alrededor de 800 mm anuales (INEGI, 2012g).

Dentro del estado se encuentran cinco áreas naturales protegidas, tres son Reservas de la Biosfera, una es Área de Protección de Flora y Fauna y la otra es Zona Sujeta a Conservación Ecológica. Abarcan 19,037.4 km² que equivalen aproximadamente al 35% de la superficie del estado. Los diferentes tipos de vegetación que conforman Campeche son: selva alta perennifolia y subperennifolia, selvas mediana y baja caducifolias y subcaducifolias, selva baja espinosa, sabana, manglar, popal-tular, vegetación halófito y gipsófila; así como vegetación marina y de agua dulce, las cuales en conjunto ocupan una extensión aproximada de 53,833 km² (Berrón-Ferrer *et al.*, 2003).

Los principales cultivos cíclicos por volumen durante el 2010 fueron: maíz, arroz palay, sandía, soya, sorgo, chile verde, calabaza, frijol y cacahuate; y los principales cultivos perennes fueron: caña de azúcar, mango, naranja, papaya, toronja, zapote y limón (INEGI, 2012g).

Dentro del estado, en el municipio de Campeche, se eligieron 2 sitios de estudio: el Rancho El Cenit y los Apiarios de Los Laureles. El Sitio de Los Laureles se dividió en 2 localidades (Los Laureles y San Miguel de Allende), debido a la localización de sus apiarios y cultivos, considerando que 4 apiarios se encontraban cerca de un cultivo y otros 2 apiarios cerca de otro cultivo.

Sitio #1. Rancho El Cenit

Ubicación: Tixmucuy, Campeche, Campeche.

Coordenadas: 19°43.819'N, 90°4.364'O

Coordenadas del Cultivo: 19°43.500'N, 90°5.220'O

Variedad Utilizada: Huasteca 400

Extensión del cultivo: 35 hectáreas

Cuadro 11. Localización de los apiarios del sitio 1 y su distancia al cultivo de soya.

Apiario	Latitud	Longitud	Distancia mínima al cultivo de soya (m)
Apiario 1	19° 42.030'N	90° 5.971'O	2933.85
Apiario 2	19° 42.676'N	90° 5.950'O	1903.40
Apiario 3	19° 43.175'N	90° 5.725'O	990.89
Apiario 4	19° 43.575'N	90° 5.213'O	23.50

Sitio #2 San Miguel de Allende

Ubicación: San Miguel de Allende, Campeche, Campeche.

Coordenadas: Mismas que las del cultivo 1.

Cultivo 1: 19°23.628'N, 89°59.193'O

Variedad Utilizada: Huasteca 200

Extensión del cultivo: 50ha

Cuadro 12. Localización de los apiarios del sitio 2 y su distancia al cultivo de soya.

Apiario	Latitud	Longitud	Distancia mínima al cultivo de soya (m)
Apiario 1	19°23.018'N	89°59.938'O	1723.33
Apiario 2	19°23.660'N	89°58.588'O	1060.67
Apiario 3	19°24.025'N	89°58.292'O	1740.74
Apiario 4	19°25.190'N	89°58.250'O	3320.76

Sitio #3 Los Laureles

Ubicación: Los Laureles, Campeche, Campeche.

Coordenadas: 19°29.168'N, 89°59.647'O

Coordenadas del cultivo #2: 19°31.852'N, 89°59.023'O

Variedad Utilizada: Huasteca 200

Extensión del cultivo: 7ha

Cuadro 13. Localización de los apiarios del sitio 3 y su distancia al cultivo de soya.

Apiario	Latitud	Longitud	Distancia mínima al cultivo de soya (m)
Apiario 5	19°32.563'N	89°59.203'O	1348.57
Apiario 6	19°31.750'N	89°57.245'O	3115.55

7.1.2 Estado de Yucatán

El estado de Yucatán (véase Figura 14) tiene una extensión de 39,612.2 km², que representan el 2.0% del territorio nacional. Está dividido en 106 municipios y tiene una población de 1,955,577 habitantes. Colinda al norte con el Golfo de México, al este con Quintana Roo; al sur con Campeche y Quintana Roo y al oeste con el Golfo de México y Campeche. El 84.5% de la superficie estatal presenta clima cálido subhúmedo con lluvias en verano; el 13.8% es semiseco muy cálido y cálido, mientras que el 1.7% es clima seco muy cálido y cálido. La temperatura media anual es de 26°C, la temperatura máxima promedio es alrededor de 36°C y la temperatura mínima promedio es de 16°C. La precipitación media estatal es de 1,100 mm anuales, y las lluvias se presentan en verano entre los meses de junio y octubre (INEGI, 2012a).

Dentro del estado se encuentran doce Áreas Naturales Protegidas: cuatro reservas, dos parques estatales, un área natural protegida de valor escénico, histórico y cultural; dos Parques Nacionales, un área de protección de flora y fauna y dos reservas de la biosfera. Ocupan un área de 3,404.8 km² que representan el 8.59% del territorio estatal (Ruíz y Arellano, 2011). En el estado se presentan diversas comunidades vegetales: vegetación de dunas costeras, manglar, selva baja caducifolia, selva mediana subcaducifolia, selva mediana subperennifolia, selva baja inundable, sabanas, petenes, comunidades de hidrófilas y vegetación secundaria (Flores-Guido, *et al.*, 2010).

En Yucatán, los principales cultivos cíclicos son: maíz, pepino, calabacita, sandía, chile verde, hortalizas, tomate rojo, camote, soya y cilantro; mientras que los principales perennes son: pastos, naranja, limón, papaya, aguacate, mamey y henequén (INEGI, 2012a).

Dentro de este estado, se eligieron 3 sitios en el municipio de Tekax: Los apiarios de San Pedro Tzula, El Rancho Cach y el Rancho Palma.

Sitio #4 San Pedro Tzula

Ubicación: San Pedro Tzula, Tekax, Yucatán.

Coordenadas: 19°55.057'N, 89°31.375'O

Coordenadas del Cultivo #1: 19°55.738'N, 89°34.638'O

Variedad utilizada: Huasteca 400

Extensión del cultivo: 15ha

Coordenadas del Cultivo #2: 19°55.433'N, 89°33.685'O

Variedad utilizada: Huasteca 200

Extensión del cultivo: 50ha

Cuadro 14. Localización de los apiarios del sitio 4 y su distancia a los cultivos de soya.

Apiario	Latitud	Longitud	Distancia mínima al cultivo de soya #1 (m)	Distancia mínima al cultivo de soya #2 (m)
Apiario 1	19°55.898'N	89°33.944'O	1249.35	863.12
Apiario 2	19°55.491'N	89°34.347'O	682.46	981.20
Apiario 3	19°55.605'N	89°34.502'O	340.65	1278.67
Apiario 4	19°55.905'N	89°34.584'O	320.36	1618.34
Apiario 5	19°55.361'N	89°33.553'O	2014.73	268.29
Apiario 6	19°55.809'N	89°33.285'O	2363.79	982.96
Apiario 7	19°55.696'N	89°32.696'O	3388.04	1794.92
Apiario 8	19°54.990'N	89°32.140'O	4570.28	2815.69

Sitio #5 Rancho Cach

Ubicación: Noh Halal, Tekax, Yucatán.

Coordenadas: 19°48.38'N, 89°22.711'O

Coordenadas del Cultivo: 19°48.554'N, 89°22.600'O

Variedad utilizada: Huasteca 200 y Huasteca 400

Extensión del cultivo: 5ha

Cuadro 15. Localización del apiario del sitio 5 y su distancia al cultivo de soya.

Apiario	Latitud	Longitud	Distancia mínima al cultivo de soya (m)
Apiario 1	19°48.558'N	89°22.540'O	104.43

Sitio #6 Rancho Palma

Ubicación: Poccheil, Tekax, Yucatán.

Coordenadas: 19°46.908'N, 89°21.829'O

Coordenadas del cultivo: 19°46.908'N, 89°22.540'O

Variedad utilizada: Huasteca 200

Extensión del cultivo: 20 ha

Cuadro 16. Localización de los apiarios del sitio 6 y su distancia al cultivo de soya.

Apiario	Latitud	Longitud	Distancia mínima al cultivo de soya(m)
Apiario 1	19°44.027'N	89°23.393'O	6003.21
Apiario 2	19°44.280'N	89°23.406'O	5600.40
Apiario 3	19°44.783'N	89°23.572'O	4980.66
Apiario 4	19°45.727'N	89°22.365'O	2392.31
Apiario 5	19°46.878'N	89°21.771'O	44.57

7.2 MÉTODOS EMPLEADOS EN EL CAMPO

7.2.1 Georreferenciación de apiarios y marcación de colmenas

Con la ayuda de un GPS se georreferenciaron 24 apiarios y los terrenos de los cultivos de soya que se encontraban cercanos a éstos. Dentro de los apiarios, se abrieron las colmenas para marcar con plumón indeleble los panales (los panales contienen las celdas) que estaban vacíos o que se encontraban en proceso de llenado, mientras ocurría la floración de la soya. Las colmenas fueron marcadas en la tapa para su fácil distinción (e.g. si el cuadro estaba localizado en la Caja 1 del Apiario 1 se marcaba: A1C1).

Se dejaron llenar los panales por un período de 15 días, para después realizar la colecta de panales y posteriormente la extracción de miel.

7.2.2 Observación del comportamiento de forrajeo de las abejas dentro del cultivo de soya

La finalidad de estas observaciones fue evaluar el comportamiento de forrajeo de las abejas melíferas, *A. mellifera*, en las flores de soya; conocer si las abejas las visitan, si lo hacen para coleccionar polen, néctar o si no resultan atractivas para ellas. La cantidad de néctar producido por cada flor es pequeña, pero la densidad floral es muy alta y el área de cultivo es generalmente grande, lo que lo convierte en una buena fuente de alimento (Chiari *et al.*, 2005^a; Keogh *et al.*, 2010), principalmente al considerar que la floración de la soya ocurre durante las épocas críticas para las colonias de abejas debido a la falta natural de flujos de néctar y polen en el campo.

Las observaciones se llevaron a cabo durante dos días consecutivos, de 08:00h a 16:00h. Fue necesario determinar qué plantas iban a ser observadas, por lo que se seleccionaron 5 dentro del cultivo y 5 de la periferia; se registro el número de inflorescencias, se georreferenciaron y marcaron con un listón para facilitar su distinción y localización dentro del cultivo. Las observaciones se dividieron en 5 períodos de dos horas, 08:00h, 10:00h, 12:00h, 14:00h y 16:00h. Al inicio de cada período se utilizaron diversos equipos como luxómetro, termómetro, etc., para registrar diversos factores físicos como velocidad del viento, temperatura, luz y humedad, así como las condiciones meteorológicas (e.g. nublado, soleado, lluvioso, etc.).

Durante cada período se observaron 5 inflorescencias por planta, cada una por 1 minuto, se registró en una tabla el número de abejas que llegaban a la planta, a qué inflorescencia, el tiempo que permanecían en cada flor y si coleccionaban néctar y/o polen, tal y como se indica en el cuadro 17.

Cuadro 17. Formato de registro de visitas de las abejas a las flores de soya.

Planta	Inflorescencia	Abeja	Polen	Néctar	Tiempo
-	-	-	-	-	-

7.2.3 Análisis del contenido de azúcar del néctar del buche melífero de las abejas

En las flores de soya la cantidad de néctar por flor es más elevada a altas temperaturas, fluctúa

significativamente entre variedades de 0.2 a 0.5 μL . El contenido total de azúcar en el néctar varía de 37 a 45%, la concentración de ésta se incrementa y el volumen se disminuye con el tiempo y la temperatura (Chiari *et al.*, 2005a).

Este análisis se llevó a cabo para conocer la concentración de azúcar contenida en el buche melífero, y así, comparar estos valores con los reportados para las flores de soya en la literatura. Al término de cada período de observación se capturaron con una red entomológica entre 5 y 10 abejas que se encontraban forrajeando en las plantas de soya, y se colocaron en un tubo eppendorf para guardarlas en una hielera durante 20 ó 30 minutos hasta que se adormecieran, y cuando estaban adormecidas se les apretó suavemente el abdomen para que regurgitaran el contenido del buche melífero (véase Figura 15); una vez tomadas las muestras las abejas capturadas se liberaron cerca de donde fueron colectadas.



Figura 15. Proceso de toma de muestra de la abeja y lectura con el refractómetro.

El néctar regurgitado se colectó con un capilar de 5 μL para analizarlo mediante un refractómetro digital marca VEE GEE, modelo PDX-95 (véase Figura 15); el resultado obtenido en el refractómetro es expresado en °Brix (°Bx), que corresponde al contenido de azúcar en una solución acuosa, en este caso, en el néctar. Un grado Brix representa un gramo de sacarosa en 100 gramos de solución.

7.2.4 Colecta de miel

Al término de la floración de la soya en el área cultivada (15 días después), se regresó a los apiarios a realizar la colecta de miel en las colmenas que fueron marcadas y etiquetadas con anterioridad, donde se observó si las abejas habían llenado las celdas de los panales que se

encontraban vacías antes del inicio de la floración de la soya. La colecta de miel consistió en cortar un cuadro de panal que se encontraba con miel madura (operculada) y depositarlo en un contenedor plástico con tapa, cerrarlo y etiquetarlo. Cada contenedor se etiquetó con los siguientes datos: Localidad, fecha de colecta, apiario, colmena y número de muestra. Este proceso se realizó en cada apiario para cada colmena y panal marcados con anterioridad. Se llenaron los contenedores que se consideraron suficientes o los que se pudieron obtener sin afectar a la colonia ni al apicultor.

7.3 Métodos empleados en el laboratorio

7.3.1 Extracción de la miel del panal

La miel de los panales colectados de las colonias seleccionadas se extrajo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Apicultura de la UADY. Para extraer la miel de los panales y eliminar todos los residuos de cera, partes de abeja o plantas, se montaron filtros o coladores contruidos con tela tricot sujetos con una liga a la parte superior de un vaso de precipitado de 100 ó 200 mL. Se utilizaron guantes nuevos para cada muestra al sacar los pedazos de panal de los contenedores y colocarlos sobre la tela tricot, donde se desopercularon para dejar escurrir la miel hacia el vaso de precipitado. Se trasvasó la miel hacia un contenedor plástico nuevo y se etiquetó con los siguientes datos: Localidad, fecha de colecta, apiario, colmena y número de muestra.

7.3.2 Método cualitativo de análisis melisopolinológico (Von Der Ohe et al., 2004)

El procesamiento de las muestras de miel de esta investigación, se basó en el método de Von Der Ohe *et al.* (2004) para recuperar el polen. Se procesaron las 32 muestras colectadas en este trabajo; este método se llevó a cabo por duplicado y consistió en: pesar 10g de miel en un tubo para centrifuga de 50 ml, añadir 20ml de agua destilada a 40°C y disolver por inversión. Agitar al vórtex para homogeneizar y después centrifugar dos veces durante 10 minutos a 3,000 rpm; decantar el sobrenadante con mucho cuidado. Resuspender el sedimento en 20 ml de agua destilada a 41°C y centrifugar a 3,000 rpm por 5 minutos, decantar el sobrenadante y lavar las paredes del tubo con agua destilada. Como actividad extra y para poder realizar la acetólisis, con una micropipeta se pasó el volumen del tubo de 50 ml a un microtubo de 1.5 ml y se completó a 1.5 ml; finalmente, para centrifugar por 10 minutos a 3,000 rpm. El producto

final de este método consistió en sedimentos polínicos.

7.3.3 *Acetólisis de Erdtman, 1969*

La acetólisis es un método que permite observar las características estructurales de los granos de polen. Está basado en la destrucción de la celulosa y del contenido celular de éstos, mediante el uso de ácidos que limpian y de esta forma permiten el reconocimiento de las estructuras útiles para llevar a cabo la identificación de los granos de polen (Alfaro *et al.*, 2010). El método de acetólisis, da como resultado, granos de polen traslúcidos y con la estructura de la exina visible (Lieux, 1980).

Se analizaron 14 muestras de polen obtenidas a partir de miel, y éstas fueron acetolizadas siguiendo el método de Erdtman (1969). Se realizaron adecuaciones al método con la finalidad de utilizar menores volúmenes de reactivos y contar con mayor seguridad al procesar las muestras.

En la acetólisis se usan diversos ácidos que pueden ser tóxicos, por lo que fue indispensable trabajar en una campana de extracción de gases y usar guantes desechables. Se inició a partir de los sedimentos polínicos de la miel obtenidos en el método descrito en la sección 7.3.2. En el último paso de éste método, se dejaron los sedimentos en 1.5ml de agua. Para iniciar con la acetólisis fue necesario centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos y decantar el sobrenadante. La acetólisis consistió en: resuspender el sedimento en 500 µl de ácido acético glacial y homogeneizar; centrifugar a 3,000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante en un frasco ámbar para desechos ácidos. Adicionar 500 µl de mezcla acetolítica (anhídrido acético + ácido sulfúrico, 9:1) y agitar los tubos para homogeneizar. Llevar a ebullición por 5 minutos a baño maría, centrifugar y decantar con mucho cuidado. Fue necesario añadir 500 µl de agua destilada para después realizar un lavado que consistió en: agitar al vórtex, centrifugar y decantar. Se añadieron 2 gotas de glicerol+agua (1:1) y se repitió el proceso de lavado. La última parte del proceso fue el montaje en el portaobjetos donde se selló con esmalte transparente de uñas para la observación al microscopio.

7.3.4 *Hidróxido de potasio al 10% (modificado de Caccavari y Cilla, 2010) y Lugol*

Caccavari y Cilla (2010) emplearon el método de hidróxido de potasio (KOH) al 10% para la remoción de cargas escopales (pequeñas bolas de polen que transportan las abejas en la corbícula o escopa localizada en las patas posteriores y que hacen al humedecer el polen con

secreciones bucales y néctar (Campos *et al.*, 2008)). El KOH es utilizado en una serie de técnicas para la separación y extracción química del contenido de polen del tracto digestivo de insectos, de las anteras de ejemplares de herbario, material fresco y de perfiles sedimentarios. Este procedimiento es más sencillo que la acetólisis y proporciona buenos resultados, aplicado al polen no daña la exina, por lo que no se pierden los caracteres de valor taxonómico necesarios para la identificación, además fue incluido ya que las mieles contenían muchos residuos de material orgánico en el sedimento.

El compuesto esencial de esta técnica es el KOH al 10%. Como medio de montaje y suspensión se utilizó agua-glicerina coloreada. Para su preparación, se utilizó un baño maría a 50°C, donde a 70 ml de agua destilada se adicionaron 2 g de cristales de fenol, agitando hasta disolver con una varilla de vidrio. Se añadieron 230 ml de glicerina a la solución acuosa de fenol para disolver 50 mg de cristales de fucsina básica. Se procesaron 17 muestras de sedimentos polínicos de la miel extraídos en el método 7.3.2.

Para iniciar este método fue necesario centrifugar los sedimentos polínicos a 3,000 rpm por 10 minutos y decantar el sobrenadante. Al polen contenido en tubos eppendorf se añadió KOH al 10% por goteo, hasta cubrir, y los tubos se colocaron a baño María por 10 minutos a 40°C agitando levemente al menos una vez. Se retiraron del baño maría y se les añadió agua destilada hasta 3/4 del tubo para centrifugar a 2,000 rpm por 10 minutos y decantar el sobrenadante. Se agregó una alícuota de 60 µl de agua-glicerina coloreada. Se homogeneizó el contenido para extraer 20 µl con una micropipeta y ponerlos sobre el portaobjetos, se selló con esmalte transparente de uñas para su observación al microscopio.

Se procesaron 6 muestras con Lugol después de la extracción de sedimentos polínicos (7.3.2), se agregó una gota a los sedimentos y se montó en un portaobjetos para su observación al microscopio. Esta prueba está basada en la reacción del Yodo con las partículas de almidón características de los granos de polen de soya que hacen más fácil su identificación.

7.3.5 *Análisis al microscopio*

Para este análisis se utilizó un microscopio óptico trinocular para fotografía Carl Zeiss Axiostar plus con los objetivos de 10X, 40X y 100X, con una cámara Sony (Modelo No. SSC-DC54A) incorporada, y las fotomicrografías se tomaron en la computadora con el programa PlayTVDVR. La medición de los granos de polen para su identificación se realizó con el objetivo de 100X.

Para la identificación del polen de soya se preparó material de referencia con flores de los cultivos de San Pedro Tzula (Huasteca 200) y de El Cenit (Huasteca 400).

7.3.6 Extracción de polen contenido en la miel

Los siguientes procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del CENICA, el cual cumple con un sistema estricto de gestión de calidad, además cuenta con metodologías validadas para la detección, cuantificación e identificación de eventos transgénicos específicos mediante PCR-PF y PCR-TR. Para validar los métodos utilizados trabaja con Materiales de Referencia Certificados, obtenidos principalmente del Instituto de Materiales y Medidas de Referencia que forma parte del Centro de Investigaciones Comunes de la Comunidad Europea (INECC, 2013).

En este laboratorio se realizaron las extracciones de polen de la miel, así como los métodos moleculares para la detección de eventos GM. La extracción se llevó a cabo a través de un método sencillo basado en diluciones, centrifugaciones y lavados, para eliminar los azúcares y otros componentes naturales de la miel, y así, obtener el polen. La extracción de polen se realizó por duplicado (e.g. muestra 50A y 50B), y para cada duplicado se necesitaron 50 ml (70 g aprox.) de miel. En el caso donde las muestras no contenían suficiente cantidad de ésta, la extracción sólo se realizó 1 vez (E.g. 51A).

Se colocaron 50 ml (x2) de miel en un vaso de precipitado y se añadieron 50 ml (x2) de agua destilada estéril, se mezcló con un asa estéril y se calentó sobre una parrilla eléctrica por 10 minutos a 70°C; se usó un agitador magnético para homogeneizar a 400rpm. Una vez que la muestra estuvo homogénea, se dividió en tubos de 50ml, de plástico y fondo cónico, graduados; la división entre tubos se hizo en volúmenes iguales. Los tubos se marcaron con el número de muestra, grande y claramente: 50Aa, 50Ab, 50Ba, 50Bb.

Se centrifugó por 10 minutos a 4,500 rpm a 22°C. Se revisó que se formara un pellet y se centrifugó de nuevo por el mismo tiempo y velocidad. El sobrenadante se decantó para resuspender el pellet con 5 ml de agua destilada estéril. Se repitió el centrifugado y se decantó el sobrenadante; se unió el volumen de los dos tubos pares en uno solo (50Aa con 50Ab; 50Ba con 50Bb) para aforar con 5 ml de agua destilada estéril. Se centrifugó, decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 500 µl de agua destilada estéril. Se pasó el volumen de cada muestra a su respectivo tubo de 2 ml con 100 mg de perlas de vidrio; los tubos se marcaron claramente (50A, 50B, 51A, etc.), y se dejaron reposar toda la noche a

temperatura ambiente.

7.3.7 Extracción de DNA a partir del polen

El método empleado para la extracción y purificación del DNA fue el de bromuro de cetiltrimetilamonio (por sus siglas en inglés CTAB), el cual es apropiado para la extracción y purificación de DNA obtenido a partir de plantas y alimentos derivados de éstas, siendo particularmente apto para la eliminación de polisacáridos y compuestos polifenólicos que podrían afectar la pureza y calidad del DNA. Este método ha sido probado en ensayos de validación para detectar OGMs (Lipp *et al.*, 1999 y 2001).

Las células vegetales pueden ser lisadas con el detergente iónico CTAB, el cual forma un complejo insoluble con ácidos nucleicos en un medio bajo en sales. Bajo éstas condiciones, los polisacáridos, compuestos fenólicos y otros contaminantes se quedan en el sobrenadante, y pueden ser eliminados mediante lavados. El DNA es solubilizado al incrementar la concentración de sales y precipitado con isopropanol y etanol. Debido a la composición similar que existe entre los lípidos de la membrana celular y el detergente, el CTAB tiene la función de capturar los lípidos que constituyen la membrana nuclear y celular. Este método está basado en tres etapas principales: lisis de la membrana celular, extracción del DNA y su precipitación (Somma, 2007).

Se partió de la extracción realizada en el punto 7.3.6; se agitaron todas las muestras en un vórtex a velocidad máxima por un minuto. Se agregó 1ml de CTAB 2X e incubó en el Thermomixer por 30 minutos a 65°C con agitación máxima. Se realizó una digestión enzimática al agregar 10 µl de RNAsa A, se mezcló por inversión para incubar por 20 minutos a 37°C con agitación máxima. Se añadieron 20 µl de Proteinasa K y se incubó por 60 minutos a 65°C con agitación máxima.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 minutos a 13,200 rpm. Se colocó 1 ml de cloroformo en un tubo nuevo de 2 ml, a éste se le añadió 1 ml del sobrenadante y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 10 minutos a 13,200 rpm. Se transfirió la capa superior, alrededor de 800 µl, a un tubo de 1.5 ml y se agregaron 640 µl de isopropanol (etapa de precipitación) y se dejaron reposar las muestras toda la noche a -20°C.

En la última etapa del proceso, se centrifugó por 10 minutos a 13,200 rpm. Para asegurar el

DNA en el pellet, se centrifugó por segunda vez. Se agregaron 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 13,200 rpm, decantando el sobrenadante para dejar secar el tubo boca abajo sobre una sanita; ya que estaba seco, se puso en el evaporador por 20 minutos; se tapó para guardar el tubo con el pellet de DNA en el ultracongelador a -70°C.

7.3.8 Cuantificación de DNA

El método más común para cuantificar DNA es por una medición de absorbancia. Los ácidos nucleicos absorben luz a una longitud de onda de 260 nm, por lo que la concentración de éstos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco (Somma, 2007). Para llevar a cabo esta medición se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000, que sólo requiere de 2 µl de muestra para llevar a cabo la cuantificación.

En este procedimiento, se disolvió el pellet obtenido con el método descrito en el apartado 2.3.6 en 40 µl de agua inyectable y se colocó en el Thermomixer a 55°C por 5 minutos. Se le dieron pequeños golpecitos al tubo para homogeneizar y se puso en la microcentrífuga para darle un rápido *spin*. Se levantó el brazo del NanoDrop; con una micropipeta con punta con filtro, se homogeneizó la muestra y se tomaron 2 µl que se colocaron en el pedestal de medición, se bajó el brazo y se inició la medición usando el software instalado en la computadora. Al finalizar cada medición se limpió el pedestal con un paño limpio y seco.

7.3.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase chain reaction* o PCR), es una técnica que está basada en la detección de secuencias específicas de DNA en el genoma del organismo estudiado. Hace posible la amplificación selectiva de una región del DNA y permite conocer la presencia o ausencia del transgén en la planta de interés, al basarse en la detección de secuencias reguladoras que flanquean al gen introducido; estas secuencias son utilizadas como iniciadores en la fase de elongación llevada a cabo por la enzima polimerasa. Para la detección específica del transgén es necesario conocer el tipo de modificación genética, la secuencia del gen introducido y los elementos reguladores (promotor y terminador) que lo flanquean. Es importante que para el análisis, se cuente con una cantidad mínima de la muestra de DNA en buen estado (Terrón, 2008).

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación *in vivo* del DNA. Esta técnica consiste en la repetición de un ciclo (véase Figura 16) constituido por tres fases: 1) Desnaturalización del

DNA molde por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir DNA bicatenario en DNA monocatenario; 2) Hibridación de los dos iniciadores (*primers*), al descender la temperatura, se induce la unión de los iniciadores a las zonas complementarias de DNA desnaturalizado, ya que los iniciadores son idénticos en secuencia a una región de cada una de las dos hebras; 3) Elongación de la cadena de DNA por adición de nucleótidos (cuatro dNTPs) a partir de los iniciadores usando la enzima DNA polimerasa como catalizador. Tras cada ciclo, las hebras de DNA recién sintetizadas pueden servir de DNA molde para el ciclo siguiente (Somma y Querci, 2007b; Terrón, 2008).

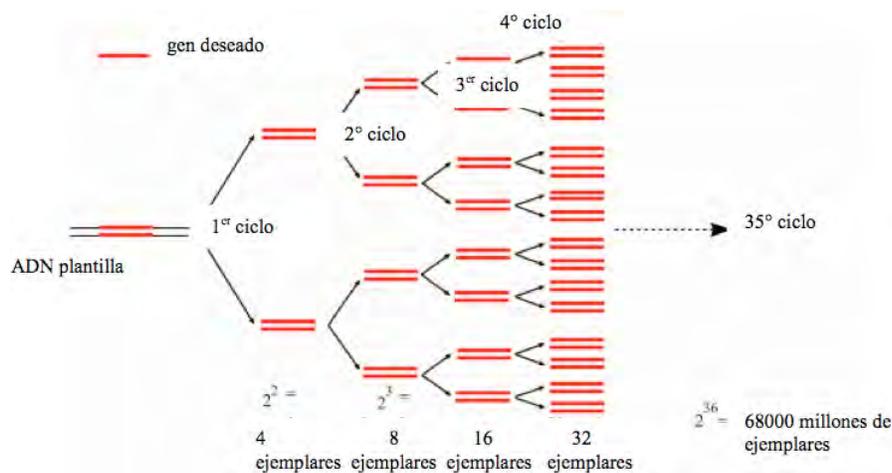


Figura 16. Amplificación exponencial del DNA mediante PCR (Somma y Querci, 2007b)

Todas las muestras de polen obtenidas con el método descrito en el punto 7.3.7 fueron analizadas a través de PCR-TR, para detectar polen convencional o genéticamente modificado; las muestras que resultaran negativas a la presencia de polen de soja fueron analizadas por PCR Punto Final (PCR-PF) para la detección de DNA vegetal.

Para las dos técnicas se preparó el material necesario a usar en el área limpia: micropipetas, puntas para micropipeta con filtro y de desplazamiento positivo, hielo, microtubos de 1.5ml, tiras de 8 microtubos para PCR, tapas de microtubos para PCR y agua inyectable; se esterilizó la campana con luz UV por 15 minutos con todo el material desechable a utilizar dentro de ésta. Se marcaron claramente los tubos que se utilizaron para evitar confusiones.

Primero se empleó la técnica de PCR-TR para detectar el gen endógeno de la soja, Lectina, en todas las muestras, se utilizó este gen ya que es específico de esta planta; las que resultaron positivas se analizaron para detectar el evento transgénico, MON-Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2). Esta

técnica consistió en preparar en un microtubo de 1.5 ml una mezcla de reactivos, para las reacciones que fueran necesarias más una, conforme se indica en el cuadro 18. Se dividió el volumen final en las tiras de microtubos, a cada uno se le añadieron 21 μ l de la mezcla y 4 μ l del DNA molde de cada muestra. A los controles negativos se añadieron 4 μ l más de agua destilada estéril en lugar de DNA, y a los controles positivos se los agregó DNA de soya GM, evento MON-Ø4Ø32-6; a todas las tiras se les dio un ligero *spin* en la microcentrífuga.

Cuadro 18. Reactivos necesarios para llevar a cabo PCR-TR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para reacción de 25 μ l (μ l)	Volumen para X+1 reacciones (μ l)
Agua ultrapura	--	--	7.5	
TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	1X	12.5	
Iniciador F	10 μ M	150nM	0.375	
Iniciador R	10 μ M	150nM	0.375	
Sonda	5 μ M	50nM	0.25	
DNA molde	50ng/ μ l	200ng	4	4 μ l por reacción
			25	25 μ l por reacción

El Iniciador F (forward), el R (reverse) y la sonda (P) dependieron de lo que se quisiera analizar. Para la detección de Lectina se utilizaron los iniciadores Lec F y Lec R, y la sonda Lec P; mientras que para la detección del evento transgénico MON-Ø4Ø32-6 se emplearon los iniciadores GTS-F y GTS-R y la sonda GTS-P. Para las muestras de DNA que no se encontraban a una concentración de 50 ng/ μ l, fue necesario aumentar los microlitros de DNA y disminuir los del agua a añadir, para que todas las reacciones contaran con 200 ng/ μ l. Todos los iniciadores, sondas, controles positivos y otros reactivos fueron facilitados por el Laboratorio de Biología Molecular del CENICA.

Los tubos con las reacciones se colocaron en el equipo para PCR-TR; en la computadora se utilizó el *software 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection Software v1.3* de Applied Biosystems, donde se eligió el gen a identificar, el número de ciclos y se capturó la información de cada muestra. Se utilizó el mismo programa de ciclos y temperaturas tanto para la detección de Lectina como para la de MON-04032-6. La reacción de amplificación (véase Figura 17)

consistió en una etapa de 2 minutos a 50°C necesaria para la óptima actividad de la Uracil-ADN glucosilasa (UNG), seguida de una de 10 minutos a 95°C para activar a la enzima *Taq* DNA polimerasa. El resto de la reacción consistió en 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturalización y 1 minuto a 60°C para la alineación y extensión. El tiempo de la reacción fue de 1h y 40 minutos.

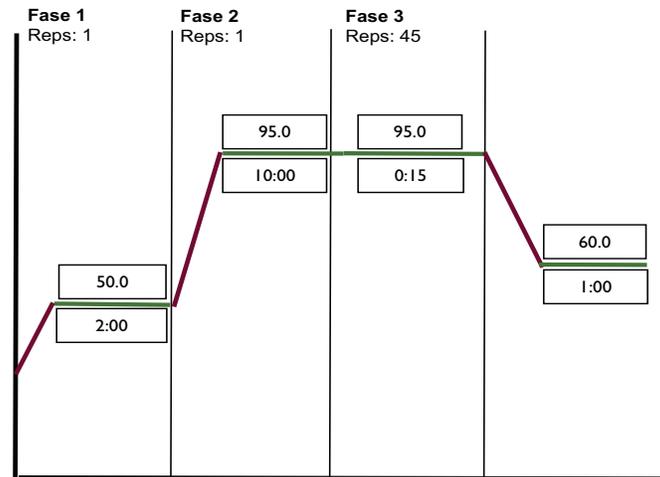


Figura 17. Protocolo del termociclador de PCR-TR para detección de Lectina y del evento Mon04032-6.

La técnica de PCR-PF se realizó para detectar DNA vegetal, en particular, la presencia del gen *rbcl*, que codifica para la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) del genoma del cloroplasto (Lin *et al*, 2000). La elaboración de la mezcla de reactivos fue similar a la de PCR-TR, consistió en añadir en un microtubo de 1.5 ml los reactivos que se indican en el cuadro 19, para las reacciones que fueran necesarias más una. Se dividió el volumen final en las tiras de microtubos, a cada uno se le añadieron 22 µl de la mezcla y 3 µl del DNA molde de cada muestra. A los controles negativos se añadieron 3 µl más de agua destilada estéril en lugar de DNA, y a los controles positivos se los agregó DNA de soya GM; a todas las tiras se les dio un ligero *spin* en la microcentrífuga.

Cuadro 19. Reactivos necesarios para llevar a cabo PCR-PF

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para reacción de 25µl (µl)	Volumen para X+1 reacciones (µl)
Buffer PCR	10X	1X	2.5	
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5	
MgCl ₂	25mM	2.5mM	2.5	
Iniciador rbcl F	20uM	0.5uM	0.625	
Iniciador rbcl R	20uM	0.5uM	0.625	
TaqDNA Polymerase	0.025U/ul	0.025U/uL	0.125	
Agua ultrapura	---	---	15.125	
DNA molde	50ng/ul	150ng	3	3 µl por reacción
			25	25 µl por reacción

El Iniciador F (forward) y el R (reverse) utilizados fueron rbcl F y rbcl R respectivamente. Al igual que en el PCR-TR para las muestras de DNA que no se encontraban a una concentración de 50 ng/µl, fue necesario aumentar los microlitros de DNA y disminuir los del agua a añadir; E.g. si la concentración de la muestra era de 30 ng/µl, se añadían 5 µl de DNA y 13.125 µl de agua.

Los tubos con las reacciones se colocaron en el termociclador para PCR-PF; en el equipo se eligió el programa para la amplificación del gen *rbcl*. La reacción consistió en 3 fases (véase Figura 18): en la Fase 1 se elevó la temperatura de la reacción a 95°C por 3 minutos para activar la enzima *Taq* DNA polimerasa y llevar a cabo una desnaturalización inicial del DNA. La Fase 2 se dividió en 3 etapas, la etapa 1 fue de desnaturalización, la temperatura fue de 95°C por 30 segundos; la etapa 2 fue de alineación donde la temperatura bajó a 55°C por 30 segundos, y en la etapa 3 se llevó a cabo la extensión a 72°C por 1 minuto. La Fase 3 fue de 3 minutos a 72°C para la extensión final.

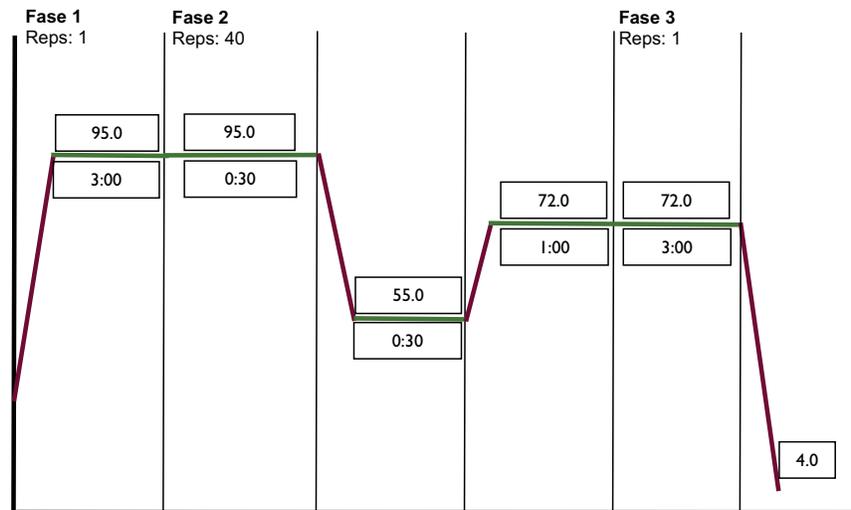


Figura 18. Protocolo del termociclador de PCR-PF para detección del gen endógeno rbcl.

Los resultados de PCR-PF se analizaron a través de la electroforesis en gel de agarosa.

7.3.10 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica que se emplea para separar macromoléculas en función de la carga eléctrica, el tamaño y otras propiedades físicas. Consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como tamiz molecular, separando las moléculas en función de su tamaño (Somma y Querci, 2007a). Cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del DNA cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Westermeier, 2005).

El DNA puede localizarse en el gel de agarosa tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante. La agarosa es un polisacárido lineal formado por la repetición de la unidad básica, la agarobiosa. Los geles de agarosa presentan grandes poros y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes. Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida (Somma y Querci, 2007a).

Las muestras que se analizaron por electroforesis fueron las obtenidas por PCR-PF. Para llevar a cabo la electroforesis se disolvió 1.6 g de agarosa en 80ml de buffer TAE 1X. Se calentó la mezcla en el microondas hasta obtener una solución transparente y se dejó enfriar un poco

para añadir 2 μL de colorante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (no contiene bromuro de etidio); se mezcló y vertió la solución en un molde para gel, se colocó un peine con el número de pozos necesarios y se dejó solidificar. Una vez solidificado el gel, se retiró cuidadosamente el peine.

Se llenaron tres cuartas partes de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X para después colocar el gel de agarosa. El gel quedó cubierto por una capa aproximada de 2-5mm de buffer. En el primer y último pozo se cargaron 4 μL de marcador molecular Lonza FlashGel™ DNA Marker 100-4000bp. Las muestras se analizaron por duplicado, por lo que a cada muestra le correspondían dos pozos; en cada pozo se cargó, con una micropipeta, 10 μL de producto de PCR y 5 μL de buffer de carga.

Se conectaron los cables de la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programaron 80 volts por 90 minutos. Después de transcurrido el tiempo de electroforesis, se sacó el gel de la cámara y se colocó en un transiluminador UV donde se fotografiaron los resultados.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Resultados de campo

8.1.1 Georreferenciación de apiarios, marcación de colmenas y extracción de las muestras de miel

Se georreferenciaron 24 apiarios y 7 cultivos en 6 sitios. En el siguiente mapa se indica la ubicación de éstos en los estados de Campeche y Yucatán.



Figura 19. Ubicación geográfica de los sitios dentro de Campeche y Yucatán (Google Earth 2013).

El sitio #1 (Rancho El Cenit en Tixmucuy, Campeche, Campeche) se visitó el 27 de septiembre de 2012 para marcar las colmenas en los 4 apiarios. Se regresó el 05 de octubre para realizar las observaciones relacionadas al forrajeo de las abejas en el cultivo de soya. A pesar de haber marcado los 4 apiarios, el apicultor encargado sólo nos permitió muestrear el #4 (A4, véase Figura 20), del cual extrajimos 4 muestras el 09 de Octubre. El siguiente mapa muestra la ubicación de los apiarios (A) en relación con el cultivo de soya Huasteca 400 (H400).



Figura 20. Mapa del Rancho El Cenit, área del cultivo de soya (H400) y distribución de los apiarios (A) en relación con éste. Barra de escala=1000m (Google Earth 2013). Nota: el área señalada del cultivo (H400) no representa la extensión real de éste.

Los sitios #2 y 3 son: San Miguel de Allende y Los Laureles en Campeche, Campeche. Se decidió dividir los apiarios en dos sitios diferentes, ya que 4 apiarios se encuentran cerca de un cultivo y otros 2 apiarios cerca de otro (véase Figura 21), y la distancia entre los cultivos era superior a 15km. Se visitaron el 28 de septiembre de 2012 para marcar las colmenas y el 17 de octubre para realizar la colecta de muestras. En total se colectaron 12 muestras de miel: cuatro en el apiario 2 (A2), una en A3, una en A4, tres en A5 y tres en A6. Debido a las malas condiciones del terreno por las lluvias no fue posible visitar el Apiario 1 por lo que no se obtuvieron muestras de miel de éste.

Las muestras colectadas presentaron un peso bajo, ya que los cuadros que fueron marcados no se llenaron como se esperaba en el período comprendido entre el 28 de septiembre y el 17 de octubre. El peso de éstas osciló entre 17 y 115g (el peso esperado para el análisis molecular es de 200g). El siguiente mapa muestra la ubicación de los apiarios (A) en relación con los cultivo de soya Huasteca 200 (H200).



Figura 21. Mapa de Los Laureles (izquierda) y de San Miguel de Allende (derecha) localización de los cultivos de soya (H200) y distribución de los apiarios (A) con respecto a éstos. Barra de escala=1000m. (Google Earth 2013).

Los tres sitios de Yucatán se encuentran en el municipio de Tekax, el primero es San Pedro Tzula (Sitio #4); en este se georreferenciaron 8 apiarios y 2 cultivos (véase Figura 22) el 29 de septiembre. La colecta de muestras se realizó el 16 de octubre y se obtuvieron 41 frascos. El único apiario del que no se obtuvieron muestras fue del 7, dado que se encontraba plagado de hormigas. El apicultor cosechó la miel del apiario 8, por lo que él nos proporcionó las muestras de éste. El siguiente mapa muestra la localización de los apiarios (A) con respecto a los dos cultivos (H200 y H400) del sitio.



Figura 22. Mapa de San Pedro Tzula, localización de los cultivos de soya (H) y distribución de los apiarios (A). Barra de escala=1000m (Google Earth 2013).

Otro sitio de Yucatán es el #5, el Rancho Cach, en este solamente hay un apiario que se encuentra a poco más de 100m del cultivo (véase Figura 23). Se colectaron 5 muestras el 18

de octubre. En el cultivo se observaron tanto flores blancas (Huasteca 200) como flores moradas (Huasteca 400). El siguiente mapa muestra la disposición del apiario y el cultivo.



Figura 23. Mapa del Rancho Cach, localización del área de cultivo de soya (H200/400) y del apiario (A). Barra de escala=100m. (Google Earth 2013). Nota: el área señalada del cultivo no representa la extensión real de éste.

El Sitio #6 corresponde al Rancho Palma ubicado en Poccheil, Tekax, Yucatán. Se marcaron 5 apiarios (véase Figura 24) el 30 de septiembre y se colectaron 21 muestras el 18 de octubre. De los 24 apiarios georreferenciados, en este sitio se encontraron los 3 (A1, A2 y A3) más alejados de un cultivo al ubicarse entre 4.8 y 6km del más cercano. En el siguiente mapa se puede observar la disposición de los apiarios donde el A1 se localiza a 6 km de H200.



Figura 24. Mapa del Rancho Palma, localización del área de cultivo de soya (H) y distribución de los apiarios (A) en relación con ésta. Barra de escala=1000m (Google Earth 2013). Nota: el área señalada del cultivo (H200) no representa la extensión real de éste.

En total se colectaron 83 muestras en los 6 sitios, el número y volumen de estas estuvo en función de la cantidad que los apicultores nos permitieran extraer, para no afectarlos a ellos ni a las colonias, ya que la extracción de muestras se realizó en el período de precosecha que es crítico para las abejas. Del total de muestras colectadas 48 se trajeron al Distrito Federal en forma de polen para observaciones al microscopio o muestras de miel para los análisis moleculares.

En el Cuadro 20 se presentan las muestras empleadas en esta tesis. Se observan los sitios en los que fueron colectadas, el apiario del que provienen con la distancia al cultivo más cercano, el peso y el tipo de análisis por el que fueron procesadas, ya sea melisopalinológico (acetólisis, KOH o Lugol) o molecular (PCR-TR, PCR-PF).

Cuadro 20. Muestras por sitio, apiario, distancia al cultivo más cercano, peso y tipo de análisis.

Muestra	Sitio	Apiario	Distancia al cultivo (m)	Peso (g)	Tipo de análisis
1	SPT	1	863.12	137.98	Acetólisis y KOH
2	SPT	1	863.12	162.34	Molecular
3	SPT	1	863.12	80.76	Acetólisis y KOH
4	SPT	1	863.12	111.83	Molecular
5	SPT	1	863.12	91.27	Acetólisis y KOH
6	SPT	1	863.12	116.58	Molecular
7	SPT	3	340.65	99	Acetólisis y KOH
8	SPT	3	340.65	131.66	Molecular
9	SPT	3	340.65	71.41	Acetólisis y KOH
10	SPT	3	340.65	82.3	Molecular
11	SPT	3	340.65	105.97	Molecular

12	SPT	3	340.65	92.87	Molecular
13	SPT	3	340.65	61.1	Acetólisis y KOH Molecular
14	SPT	3	340.65	62.2	Molecular
15	SPT	3	340.65	23.93	Acetólisis y KOH
16	SPT	4	320.36	107.74	KOH y Lugol
17	SPT	4	320.36	139.35	Molecular
18	SPT	4	320.36	102.91	Molecular
19	SPT	4	320.36	86.77	Molecular
20	SPT	5	268.96	76.87	Molecular
21	SPT	5	268.96	92.5	Acetólisis y KOH
22	SPT	5	268.96	103.84	Molecular
23	SPT	5	268.96	173.84	Acetólisis y KOH
24	SPT	5	268.96	200.75	Molecular
25	SPT	6	982.96	152.43	Molecular
26	SPT	6	982.96	94.81	Acetólisis y KOH
27	SPT	6	982.96	76.32	Molecular
28	SPT	6	982.96	112.33	Molecular
29	SPT	6	982.96	74.60	Acetólisis y KOH
30	SPT	8	2815.69	329.07	Molecular
31	SPT	8	2815.69	287.78	Acetólisis y KOH
32	SMA	2	1060.67	115.28	Molecular
33	LAU	5	1348.57	105.17	Molecular
34	LAU	6	3115.55	101.93	Molecular
35	PAL	1	6003.21	138.71	Molecular
36	PAL	1	6003.21	114.38	Acetólisis y KOH
37	PAL	1	6003.21	137.68	Molecular
38	PAL	2	5600.40	105.22	Molecular
39	PAL	3	4880.66	86.84	KOH y Lugol
40	PAL	3	4880.66	109.15	Molecular
41	PAL	4	2392.31	154.43	Molecular
42	PAL	4	2392.31	262.25	Molecular
43	PAL	4	2392.31	92.61	KOH y Lugol
44	PAL	4	2392.31	136.41	Molecular
45	CAC	1	49.98	102.71	Acetólisis y Lugol. Molecular
46	CAC	1	49.98	153.15	KOH y Lugol
47	SPD	1	863.12	361.08	Molecular
48	CEN	4	23.50	96.43	Lugol. Molecular

SPT= San Pedro Tzula, SMA= San Miguel de Allende, LAU= Los Laureles, PAL=Rancho Palma, CAC= Rancho Cach, CEN= Rancho El Cenit.

En total se observaron al microscopio 19 muestras para buscar polen de soya y 29 se procesaron por PCR-TR o PCR-PF y electroforesis en gel de agarosa.

8.1.2 Observación del comportamiento de las abejas dentro del cultivo de soya

Las observaciones se llevaron a cabo el 5 (día 1) y 6 (día 2) de octubre en el sitio #1, Rancho El Cenit, en un Cultivo de 35ha de soya Huasteca 400. Esta parte de la metodología solamente se realizó en este sitio, ya que era el que se encontraba en la etapa de floración indicada para la observación y el acceso a éste fue sencillo. Algunos de los cultivos de los otros sitios ya presentaban más vainas que flores, otro contratiempo que se presentó fue la dificultad para

entrar a estas localidades por las malas condiciones de los caminos debido a las lluvias.

Durante el día 1 de observaciones se presentó una temperatura promedio de 34.8°C y viento de 3 km/h. El día se mantuvo soleado desde las 08:00 hasta las 12:00, alrededor de las 13:00 se nubló y a las 14:20 comenzó a llover intensamente, la lluvia se detuvo después de las 16:30 (véase Cuadro 21).

Cuadro 21. Factores físicos que se registraron durante el día 1.

	8:00	10:00	12:00	14:00	16:00
Viento	3.2km/h	3.5km/h	2.5km/h	2.6km/h	3.2km/h
Temperatura	30°C	36.7°C	38.4°C	39.1°C	29.8°C
Luz	326 lux	1054 lux	1077 lux	808 lux	74 lux
Humedad	60.17%	40.60%	33.40%	33.80%	69.40%
Tiempo	Soleado	Soleado	Soleado	Nublado-lluvia	Lluvia

Se seleccionaron 10 plantas, 5 del centro del cultivo y 5 de la periferia. En cada planta se observaron 5 inflorescencias, el número de éstas no varió entre el día 1 y el día 2, lo que si presentó un cambio fue el número de flores. Cabe señalar que solamente se contaron las flores que estuvieran completamente abiertas o que pudieran ser visitadas por las abejas. Las plantas 1 y 5 (centro) presentaron más flores en el día 2, mientras que las demás plantas tuvieron menos (véase Cuadro 22).

Cuadro 22. Plantas observadas durante el día 1 y el día 2 con el número de inflorescencias y flores

	Ubicación	# Inflorescencias	#Flores	
			Día 1	Día 2
Planta 1	Centro	12	36	39
Planta 2	Centro	11	17	11
Planta 3	Centro	12	25	23
Planta 4	Centro	14	27	19
Planta 5	Centro	7	15	16
Planta 6	Periferia	17	44	41
Planta 7	Periferia	15	40	31
Planta 8	Periferia	23	66	45
Planta 9	Periferia	16	32	26
Planta 10	Periferia	12	56	38

Durante los 5 períodos de observación del día 1 se registraron un total de 6 abejas. Los períodos de las 08:00h y 10:00h son los que presentaron una mayor cantidad de visitas de abejas con dos cada uno. A las 12:00h y 14:00h sólo se observó una por período (véase Cuadro 23). A las 14:15h comenzó a llover y para el período de las 16:00h ya no se observaron abejas en el cultivo debido a la intensidad de la lluvia.

Cuadro 23. Registro de visitas de las abejas a las flores de soya en el día 1.

Hora	Planta	Inflorescencia	Abeja	Néctar	Tiempo (seg.)
8	2	4	1	Sí	7
		5	1	Si	3
	8	4	2	Sí	2
10	6	3	3	Sí	3
		1	4	Sí	2
	8	4	4	Sí	2
		5	4	Sí	2
12	1	3	5	Sí	3
14	9	1	6	Sí	3
		4	6	Sí	1
		5	6	Sí	3
16	-	-	-	-	-

En el segundo día la temperatura promedio fue de 34.1° y el viento de 1.15 km/h. El día estuvo nublado entre las 08:00h y las 10:00h, soleado entre las 12:00h y 14:00h, y comenzó a llover a partir de las 16:00h (véase Cuadro 24). No se tomaron los factores físicos del último período debido a la intensidad de la lluvia.

Cuadro 24. Factores físicos que se registraron durante el día 2

	8:00	10:00	12:00	14:00	16:00
Viento	0km/h	1.5km/h	1.7km/h	0km/h	
Temperatura	27.1°C	30.1°C	32.4°C	46.7°C	
Luz	109 lux	797 lux	937 lux	842 lux	
Humedad	86.70%	56.10%	63.70%	20.50%	
Tiempo	Nublado	Poco Nublado	Soleado	Soleado	Lluvia

Al igual que en el día 1 el total de abejas observadas en el día 2 fue de 6; se observaron tres en el período de las 10:00h, dos a las 12:00h y una a las 08:00h (véase Cuadro 25).

Cuadro 25. Registro de visitas de las abejas a las flores de soya en el día 2.

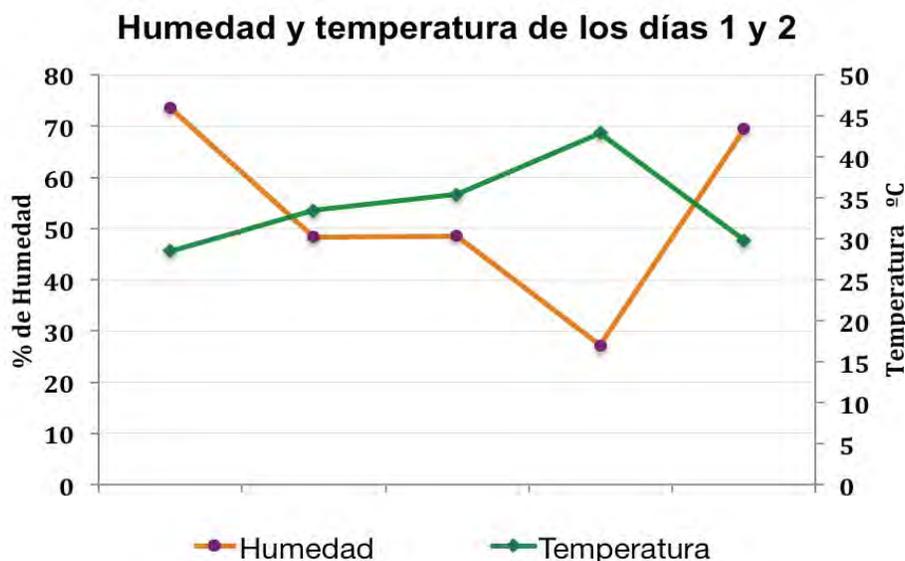
Hora	Planta	Inflorescencia	Abeja	Néctar	Tiempo (seg.)
8	1	1	1	Sí	3
	4	3	2	Sí	2
10	7	2	3	Sí	1
		5	3	Sí	2
	9	1	4	Sí	2
12	1	1	5	Sí	3
	7	4	6	Sí	2
14	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-

Todas las abejas observadas en las flores de soya se detuvieron a coleccionar néctar (véase Figura 25) y no se observó ninguna que estuviera coleccionando polen. Una abeja registró el mayor tiempo de colecta al posarse 7 segundos en una flor, y las 11 abejas restantes lo hicieron entre 1 y 3 segundos por flor. Este es un lapso muy corto de colecta de este recurso, lo cual indica la pequeña cantidad de néctar que se produce en los nectarios de las flores de soya. De acuerdo a la literatura, mientras más tiempo pase una abeja en una flor, mayor es la disponibilidad de néctar presente en ésta (Ministry of Agriculture, 2013).



Figura 25. Abejas visitando las flores de soya Huasteca 400 en el Rancho El Cenit.

Aún en los períodos que presentaron lluvia se realizaron observaciones en las flores, pero las abejas ya no estaban presentes en el cultivo, por esta razón los períodos de las 16:00 no presentan ningún registro de la presencia de abejas forrajeadoras en los cultivos. Los períodos en los que se registraron abejas forrajeadoras en los cultivos de soya presentaron condiciones de tiempo de soleadas a nubladas con un rango de temperatura de 27° a 39.1°C (véase Gráfica 4); a las 14:00h del día 2 la falta de abejas se pudo deber a la elevada temperatura, ya que en este período se registraron 46.7°C de temperatura ambiente.



Gráfica 4. Promedio de humedad y temperatura de los Días 1 y 2.

Existen estudios que indican que la temperatura y la lluvia tienen un efecto importante en la actividad forrajeadora de las abejas melíferas, cesando su actividad cuando la temperatura es menor a 8°C, muy limitada debajo de los 16°C, siendo el rango óptimo entre 16°C y 35°C (Keogh, *et al.*, 2010; FAOSTAT, 2013; Ministry of Agriculture, 2013). Por otro lado, temperaturas encima de los 37°C son igualmente desfavorables, ya que las abejas dejan de forrajear néctar y polen para coleccionar agua y así disminuir la temperatura interna de la colmena (FAOSTAT, 2013).

Las observaciones del comportamiento de forrajeo de las abejas, así como el análisis del contenido de azúcar en el néctar del buche melífero, se realizaron a principios del mes de octubre; si tomamos los factores físicos que se presentaron estos días, como lluvia y temperatura, y los comparamos con los históricos para la región, nos podemos dar cuenta que estos no varían significativamente y que el estudio se llevó a cabo en dos días habituales de octubre, representativos de la temporada de lluvias (CONAGUA, 2010; CENECAM, 2013).

8.1.3 Análisis del contenido de azúcar en el néctar contenido en el buche melífero

Este análisis se realizó con la finalidad de conocer la concentración de azúcar contenida en el néctar del buche melífero de las abejas, y así, comparar estos valores con los reportados en la literatura para las flores de soya; por esta razón sólo se capturaron abejas que se encontraran forrajeando en las flores de soya.

El resultado obtenido en el refractómetro, corresponde al porcentaje de azúcar contenido en una solución, en este caso el néctar. En el día 1 (5 de octubre) se colectaron un total de 25 abejas, 10 en los períodos de las 08:00 y 10:00h, y 5 en el período de las 12:00. Durante los períodos de lluvia no se observaron abejas en el cultivo por lo que no fue posible su colectarla. Los resultados se registraron en cuadros (Cuadros 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32) que indican el individuo colectado (1,2,3,4, etc.), los milímetros (mm) llenados en el capilar de 5 μ l con el néctar regurgitado, el volumen al que esos mm equivalen, los °Brix o porcentaje de azúcar en el néctar y la temperatura a la que se realizó la medición.

Cuadro 26. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 8:00h, día 1.

Individuo	mm	Volumen (μ l)	°Brix	Temperatura
1	51	4.64	4.1	29.2°C
2	54	4.91		
3	34	3.09	38.4	31.2°C
4	46	4.18		
5	64	5.82		
6	77	7	39.1	31.2°C
7	5	0.45	31.4	31.8°C
8	79	7.18		
9	41	3.73	32.2	31.9°C
10	65	5.09		

Como se puede observar, en la columna de °Bx se utilizó el néctar de varios individuos para realizar esta medición; esto, porque en algunas ocasiones el refractómetro no era capaz de leer volúmenes por debajo de 50 μ l (algunas veces debajo de 100 μ l), por lo que se tuvo que reunir el néctar de varios individuos para poder hacer la medición. La diferencia de volúmenes para llevar a cabo la medición se pudo haber debido a la evaporación de la muestra por el tiempo entre toma y toma y a las altas temperaturas.

Cuadro 27. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 10:00h, día 1.

Individuo	mm	Volumen (μ l)	°Brix	Temperatura
1	31	2.82	51.5	39.8°C
2	77	7		
3	13	1.18		
4	79	7.18		
5	9	0.82	36.4	40.5°C
6	66	6		
7	59	5.36		
8	60	5.45	46.0	38.3°C
9	63	5.73		
10	6	0.54		

Cuadro 28. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 12:00h, día 1.

Individuo	mm	Volumen (µl)	°Brix	Temperatura
1	33	3	42.0	33.5°C
2	135	12.27		
3	42	3.82	42.5	30.7°C
4	68	6.18		
5	55	5	27.4	29.5°C

La lluvia no permitió que se colectaran abejas en los períodos de las 14:00 y 16:00h.

Durante el día 2 se capturaron 35 abejas, de nuevo 10 se capturaron a las 08:00 y 10:00h, 9 a las 12:00h y 6 a las 14:00h; la lluvia de las 16:00 no permitió los vuelos de forrajeo de las abejas impidiendo la colecta de éstas.

Cuadro 29. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 08:00h, día 2

Individuo	mm	Volumen (µl)	°Brix	Temperatura
1	73	6.63	11.5	26.2°C
2	78	7.09	12.2	26.7°C
3	68	6.18	19.2	27.1°C
4	10	0.90	31.6	27.4°C
5	9	0.81		
6	33	3		
7	0	0		
8	31	2.82		
9	11	1	31.4	28.2°C
10	93	8.45		

Cuadro 30. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 10:00h, día 2

Individuo	mm	Volumen (µl)	°Brix	Temperatura
1	59	5.36	26.1	30.6°C
2	16	1.45	20.2	30.5°C
3	55	5		
4	41	3.72	19.6	30.9°C
5	125	11.36	22.3	31°C
6	14	1.27	15.4	31°C
7	59	5.36		
8	7	0.63		
9	59	5.36	24.3	31.1°C
10	124	11.27	16.4	31.3°C

Cuadro 31. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 12:00h, día 2

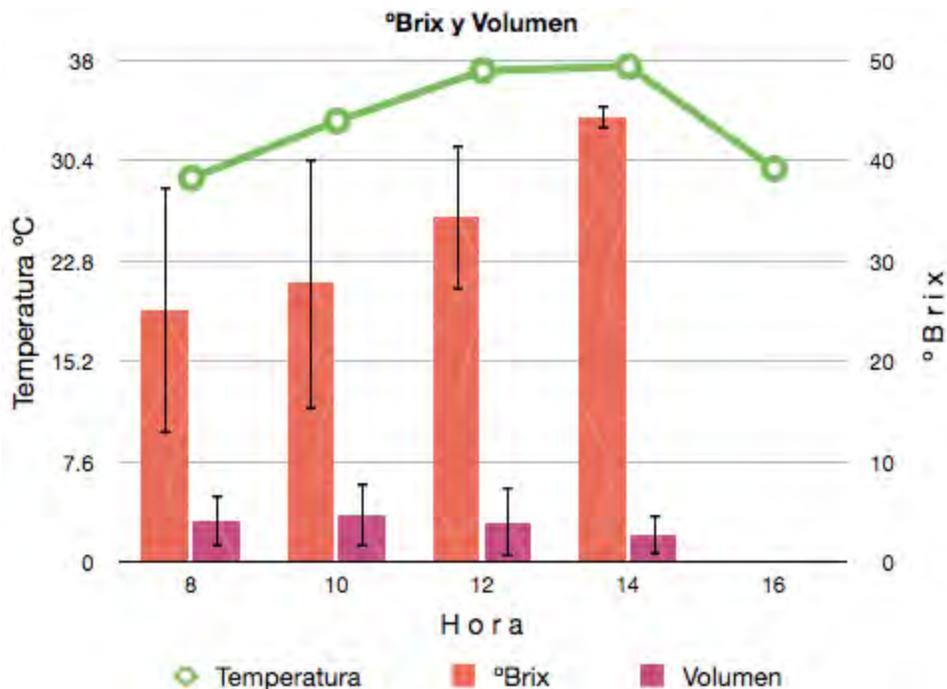
Individuo	mm	Volumen (μ l)	°Brix	Temperatura
1	74	6.72	30.3	45.2°C
2	0	0		
3	78	7.09		
4	53	4.81		
5	0	0	-	-
6	0	0	-	-
7	36	3.27	29.7	47.3°C
8	0	0		
9	33	3		

Cuadro 32. Contenido de azúcar en el néctar colectado por las abejas en el cultivo de soya a las 14:00h, día 2

Individuo	mm	Volumen (μ l)	°Brix	Temperatura
1	22	2	43.5	37.4°C
2	19	1.72		
3	64	64		
4	22	2	45.2	37.7°C
5	47	4.27		
6	3	0.27		

Las plantas de soya que son sembradas en zonas con altas temperaturas tienden a producir mayores volúmenes de néctar que las que se cultivan en zonas templadas; éste volumen fluctúa significativamente entre las diferentes variedades con un rango de 0.2 a 0.5 μ L por flor. La concentración de azúcar en el néctar varía de 37 a 45%, y ésta se incrementa con el tiempo y la temperatura, por lo que el volumen disminuye. Debido a la evaporación del agua en el néctar, mientras mayor sea la temperatura mayor será la concentración de azúcar en éste. (Chiari *et al.*, 2005).

El volumen regurgitado por las abejas varió desde 0 μ l hasta 12.27 μ l, estudios indican que el buche o estómago melífero de las abejas tiene una capacidad de hasta 50 μ l. Los °Brix se encontraron entre 4.1°Bx a 29°C y 51.5°Bx a 39.8°C. La siguiente gráfica muestra la distribución de los datos en cuanto al volumen y los grados Brix (°Bx) en relación con las temperaturas registradas por período.



Gráfica 5. Promedio y desviación estándar del volumen y °Brix por período en relación con la temperatura. Se tomaron los datos de los dos días. (Los valores del volumen (μ l) se leen con el eje Y2).

En la Gráfica 5 podemos ver las medias y desviaciones estándar del volumen y °Brix de las muestras tomadas de las abejas. Los datos nos indican que:

- Conforme fue aumentando la temperatura fue disminuyendo el volumen de néctar e incrementando la concentración de azúcar en el néctar (°Bx).
- La desviación estándar es mayor en los volúmenes que en la concentración de azúcar. Esto se debió a que algunas de las abejas no cargaban nada de néctar y otras traían más de 12 μ l, mientras que los °Bx variaron menos, considerando que el azúcar siempre está presente en el néctar pero a diferente concentración, dependiendo del horario de visita de las abejas. La media de las medias del volumen fue de 3.85 μ l con un rango de variación de 12.27 μ l. Es posible que la variación en los volúmenes colectados de néctar esté relacionada con el número de flores visitadas aunque esto no fue comprobado.
- Tomando en cuenta que las abejas se colectaron forrajeando en las flores de soya y que presentan constancia floral, el promedio de la concentración de azúcar en el néctar recuperado por regurgitación de las abejas fue de 32.91°Bx, con un rango de variación 47.4°Bx y una desviación estándar de 12.06°Bx.

8.2 **Resultados de las metodologías empleadas en el laboratorio**

8.2.1 *Montaje de muestras para observación al microscopio. Acetólisis, Hidróxido de potasio al 10% y lugol.*

Se destinaron 19 muestras de miel para detección de polen de soya; del total de las muestras de polen extraídas, 18 fueron observadas por duplicado y 1 de forma individual (por falta de volumen para hacer el duplicado), por lo que al final se contaron con 37 sedimentos polínicos. De estos 37 sedimentos, 14 se procesaron a través de acetólisis (para identificar), 17 con KOH (para buscar) y 6 con Lugol (para corroborar la identificación de los granos de polen de soya).

Para poder identificar los granos de polen de soya, se realizaron montajes de referencia a partir de polen colectado de las anteras de las flores de soya de las variedades Huasteca 200 (San Pedro Tzula) y Huasteca 400 (El Cenit). El polen de referencia fue acetolizado y montado en gelatina glicerizada teñida con fucsina básica, y el Lugol se utilizó para teñir el contenido de almidón que caracteriza a los granos de polen de soya (véase Figura 27).

Se realizó la descripción del grano de soya Huasteca 200 y Huasteca 400 y se comparó con la descripción oficial realizada por Lieux (1977), estos granos poseen las siguientes características: mónada (unidad de dispersión que consiste en un solo grano de polen), isopolar (las caras distal y proximal son idénticas), esferoidal; presenta tres colpos (aberturas elongadas situadas en la región ecuatorial), con tres poros por lo que se le denomina tricolporado, raramente son tetracolporados. El grano es psilado, ya que la pared de éste presenta una superficie lisa (véase Figura 26). Los granos de polen de los cultivos utilizados para este trabajo son ligeramente más pequeños que los reportados por Lieux (1977), los de Huasteca 200 y 400 miden entre 20-22 μ m de diámetro, mientras que los de Lieux midieron entre 26-29 μ m.

La Figura 26 muestra los granos de polen de soya bajo diferentes tratamientos, la primera imagen (a) fue tomada de Koti *et al.* (2004), en ésta se aprecian claramente las características del polen como los colpos, poros y la exina psilada. Cuando se montó el polen fresco con gelatina glicerizada teñida con fucsina básica se pudieron observar los poros y colpos, sin embargo, cuando se acetolizó y tiñó con lugol no fue tan sencillo observar los últimos.

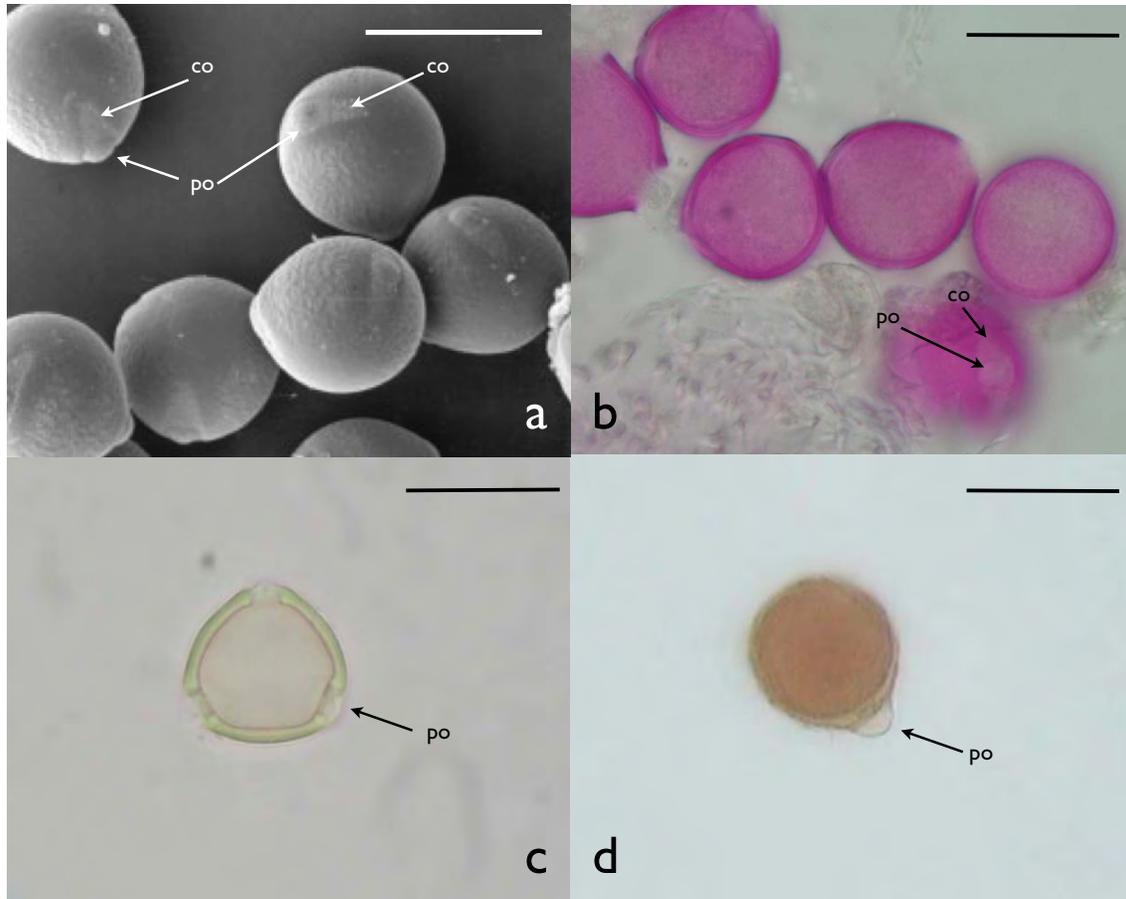


Figura 26. Granos de polen de soya (1000X). (a) Microscopía electrónica de barrido, vistas polares y ecuatoriales (De Koti *et al*, 2004); (b) Polen sin acetolizar montado en gelatina glicerizada teñida con fucsina básica vistas polares y ecuatoriales (De Rita Alfaro Bates, 2012), (c) acetólisis vista polar (De Rita Alfaro Bates, 2012) y (d) lugol vista ecuatorial (De Pamela Narváez Torres, 2013). Las flechas indican los poros (po) y colpos (co). Barras de escala=20µm.

El polen que fue más abundante entre las muestras observadas fue el de *Thouinia paucidentata*. Esta planta es de hábito arbóreo y puede alcanzar hasta 15 m de alto, en maya se le conoce como *k'an chunuup* y en español como hueso de tigre o madera dura. En la Península de Yucatán se distribuye en los tres estados y se extiende hacia Centroamérica en Belice y Guatemala (CICY, 2010b).

La presencia de numerosos granos de polen de esta planta en todas las muestras se debió principalmente a 3 factores:

- Es una especie abundante en la vegetación natural de la Península de Yucatán; muy utilizada por las abejas melíferas como fuente de néctar y polen.
- Su período de floración se presenta entre octubre y noviembre, extendiéndose en algunas ocasiones hasta enero (Palacios-Chavez *et al.*, 1991; Alfaro *et al.*, 2010; CICY, 2010b),

adelantándose o retrasándose de acuerdo a las condiciones meteorológicas; la extracción de la miel empleada en este estudio se realizó durante el mes de octubre, justo cuando ésta se encontraba en floración.

- Cercanía entre la ubicación de los apiarios seleccionados para este estudio y las áreas de distribución natural de la planta en los estados de Campeche y Yucatán (véase Figura 27).

Thouinia paucidentata está reconocida como una planta melífera, fuente de polen para las abejas y es común encontrarla en los sedimentos polínicos de la miel de la Península conformando mieles uni o multiflorales (Alfaro et al.,2010). La presencia de numerosos granos de polen de esta especie en todas las muestras de miel nos confirma que estaba en floración en los alrededores de los apiarios muestreados coincidiendo con la floración de los cultivos de soya y con la época de colecta.

Otros granos de polen que fue común encontrar aunque en menor proporción correspondieron a diferentes especies de las familias Asteraceae, Convolvulaceae y Fabaceae. Las figuras 28 (acetólisis), 29 (KOH) y 30 (Lugol) presentan la variedad de polen encontrada. El polen de soya se caracteriza por su forma, tamaño y lo evidente de sus endoaperturas anilladas. Su identificación en el material que no fue acetolizado se dificultó debido a la similitud en estructura y tamaño que presentan algunas vistas polares y ecuatoriales de la forma triporada de *Thouinia*, además de que resultaron muy abundantes; por lo que en algunos casos para diferenciarlos mejor fue necesario adicionar lugol a las muestra y calentarla para remarcar los granulos de almidon característicos del contenido celular de la soya.

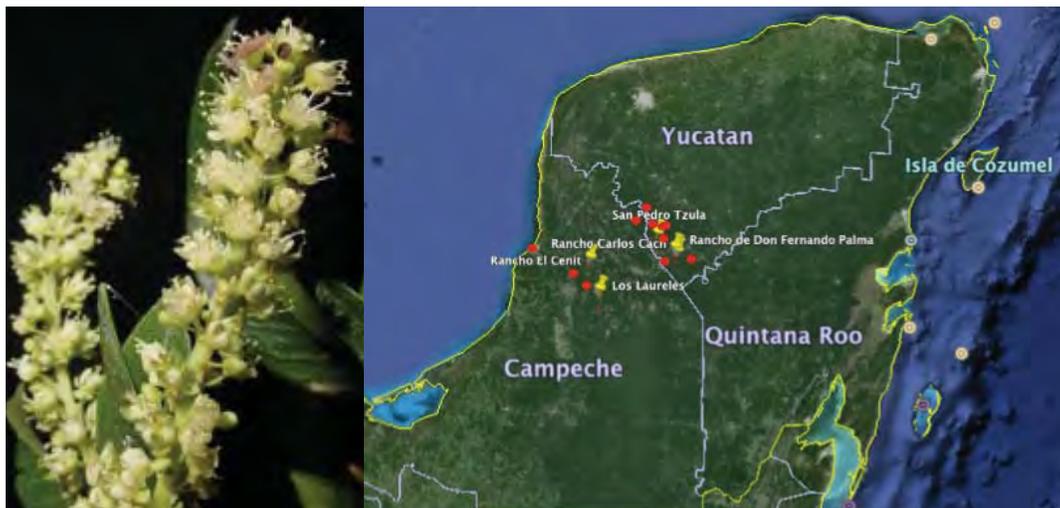


Figura 27. Inflorescencia de *T. paucidentata*, mapa de su distribución (puntos rojos) y ubicación de los sitios de estudio. (Google Earth 2013 con datos del CICY, 2010b).

Muestras procesadas a través de acetólisis

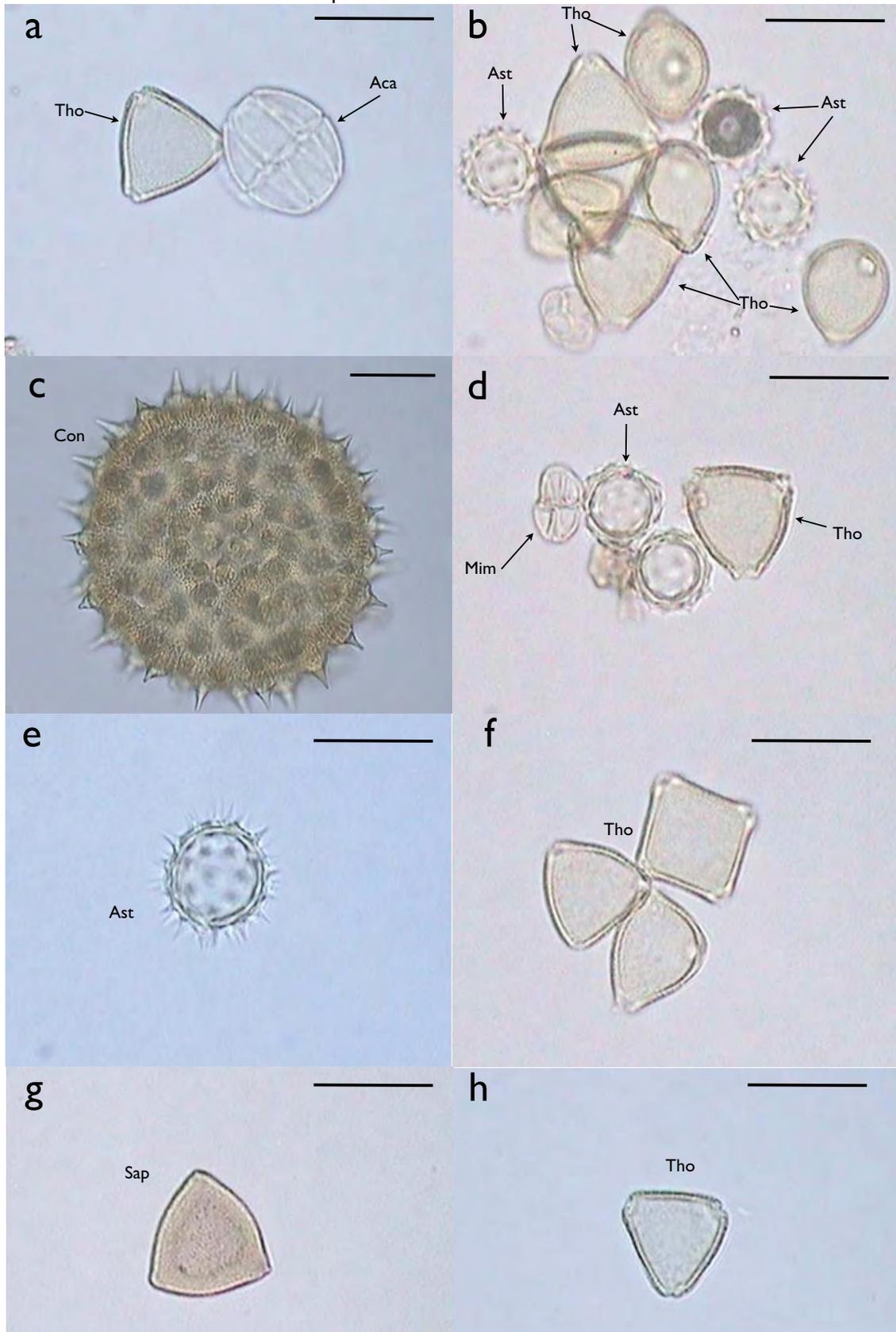


Figura 28. Granos de polen acetolizados (100X). (a) Vista polar de un grano de *Thouinia paucidentata* (Tho) y ecuatorial de una políada; de *Acacia anguntissima* (Aca); (b) vista polar y ecuatorial de granos de Tho y de la familia Asteraceae (Ast); (c) polen de la familia Convolvulaceae (Con); (d) Polen de la familia Ast., de *Mimosa bahamensis* (Mim) y de Tho; (e) grano de Ast; (f) granos triporados y tetraporado de Tho; (g) grano de polen triangular de la familia Sapindaceae (Sap); (h) vista polar de grano triporado de Tho. (De Pamela Narváez Torres, 2012 y 2013). Barra de escala=20µm.

Muestras procesadas con KOH al 10% y teñidas con agua-glicerina coloreada (fucsina básica)

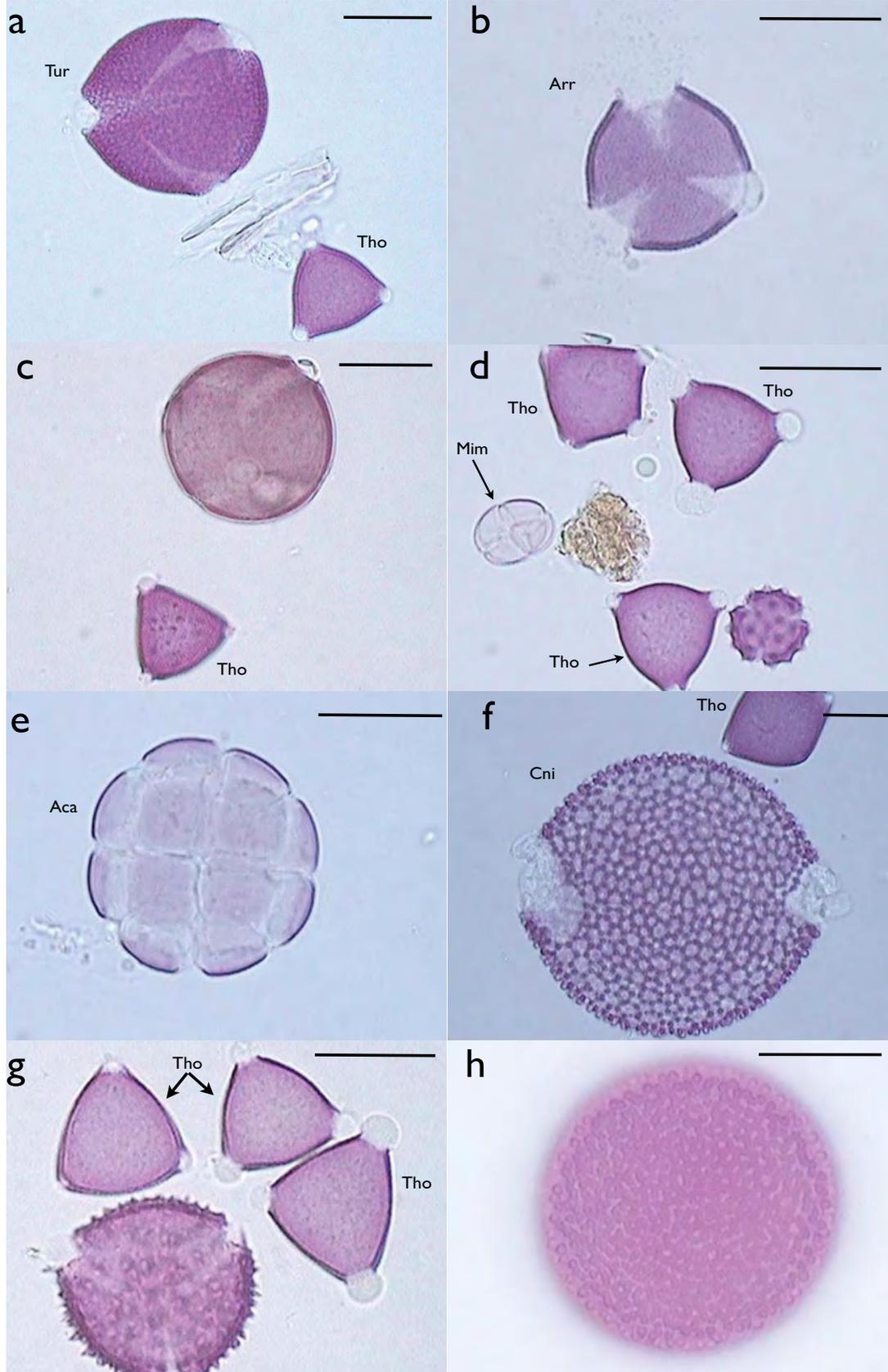


Figura 29. Granos de polen procesados con KOH(100X). (a) Grano esferoidal tricolporado de *Turnera diffusa* (Tur) y de Tho; (b) grano tricolporado de *Arrabidaea sp.* (Arr) (c) grano de Tho y tetracolporado; (d) Granos de Tho, Mim y un tricolporado con ornamentación; (e) políada de *Acacia gaumeri* (Aca); (f) grano de Tho y grano esferoidal grande con ornamentación reticulada en la exina de *Cnidoscolpus sp* (Cni); (g) polen de Tho y grano tricolporado con exina espinulosa; (h) grano esferoidal, inaperturado, grande con ornamentación en la exina (De Pamela Narváez Torres, 2012 y 2013). Barra de escala=20µm.

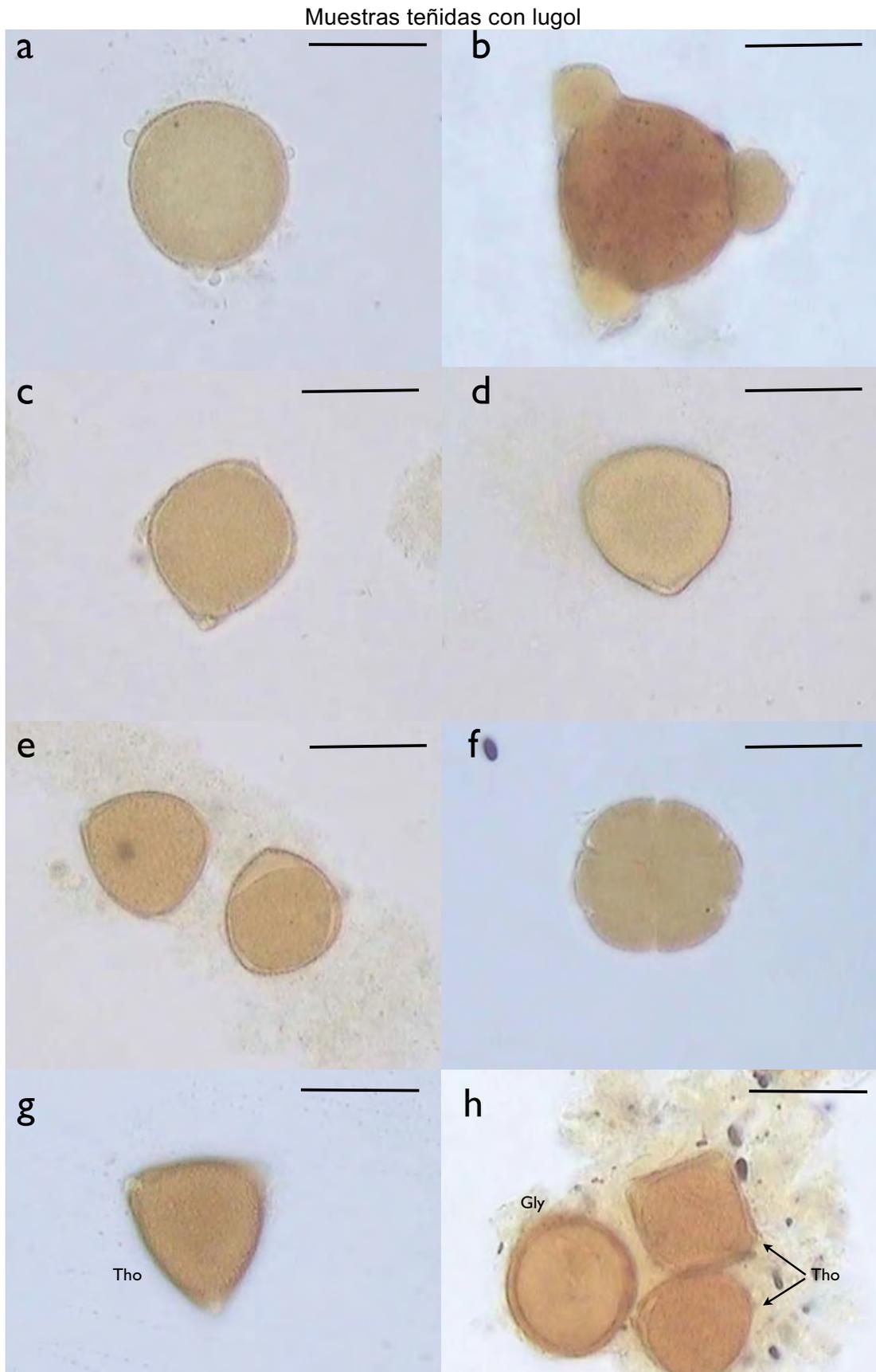


Figura 30. Granos de polen (100X). (a) Grano esférico triporado; (b) grano esférico triporado; (c) polen cuadrangular; (d) polen triangular; (e) granos triangulares; (f) peltada; (g) grano de Tho; (h) Grano de *Glycine max* (Gly) y de Tho (De Pamela Narváez Torres, 2012 y 2013). Barra de escala=20 μ m.

La técnica en la que se tiñeron los sedimentos polínicos con Lugol (véase Figura 30) no permitió reconocer las estructuras de forma adecuada, ésta no dio los resultados esperados ya que enmascaró las estructuras al sobreteñirlas, haciendo difícil la identificación.

Debido a que la abundancia de granos de polen en las muestras hace difícil la identificación del material fresco e incluso el acetolizado, se probaron diferentes técnicas para seleccionar la que permitiera visualizar e identificar con mayor claridad el polen de soya. De las 19 muestras analizadas se tiene la certeza de que solamente en la muestra #39 proveniente del Rancho Palma se encontró polen de soya (véase Figura 30-h).

8.2.2 Cuantificación de DNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa

De las 29 muestras que se decidieron procesar por métodos moleculares, se obtuvieron 58 por los duplicados y triplicados de éstas (véase Cuadro 14). Once muestras no se pudieron analizar al no contener cantidad suficiente de DNA como para ser procesadas por PCR-TR; seis tenían un duplicado en el grupo con suficiente DNA y cinco se perdieron totalmente ya que representaban 3 muestras y sus duplicados (13A, 13B, 27A, 37A, 37B).

Cada reacción de PCR-TR se compone de 25 μl de solución, de los cuales 7.5 μl corresponden a agua, 4 μl al DNA muestra (11.5 μl total) y 13.5 μl son de la enzima, iniciadores y sonda. Se requiere que la concentración del DNA sea de 50 ng/ μl para que en total se añadan 200 ng. Como las concentraciones de las muestras fueron muy variadas, en el caso donde eran mayores a 50ng/ μl se realizaron diluciones para llevarlas a esta concentración, cuando éstas eran menores se ajustaron en la cantidad de agua, donde ésta se disminuía, y se incrementaba la de DNA agregada a la reacción hasta completar los 200 ng. Las concentraciones de DNA menores a 16 ng/ μl no se procesaron porque ya eran muy bajas y no se podía compensar con el volumen de agua.

El equipo de PCR-TR mide la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda en cada ciclo. Durante los primeros ciclos no va a haber suficiente fluorescencia que pueda ser detectada, pero la reacción rápidamente produce más amplicones y la fluorescencia emitida empieza a incrementar. El programa de computadora que trabaja con el equipo de PCR-TR muestra las gráficas de amplificación que presentan la fluorescencia detectada en el número de ciclos que se han realizado (Holst-Jensen, 2001; Applied Biosystems, 2011; IRIC, s.a.).

El Ct (*cycle threshold*) es el punto de intersección de una curva de amplificación con el valor del umbral; la medida del Ct se toma al inicio de la fase exponencial, cuando la curva es lineal (IRIC, s.a.). El valor del Ct es inversamente proporcional a la cantidad de DNA a amplificar, por consiguiente, mientras más elevado es el número de copias iniciales del gen blanco, más rápido se va a observar un incremento en la fluorescencia, y más bajos serán los valores del Ct (Rodríguez y Rodríguez, 2006; WVDL, s.a.).

En el siguiente cuadro se observan las muestras con sus duplicados o triplicados (1a,1b,1c), la distancia al cultivo más cercano, la concentración de DNA después de la extracción de la miel por el método de CTAB y el ciclo o Ct al cual el producto de amplificación pasó el umbral durante la PCR-TR para Lectina y el evento MON- Ø4Ø32-6 (GTS 40-32).

Cuadro 33. Resultados de la PCR-TR para la presencia de Lectina y del evento MON- Ø4Ø32-6

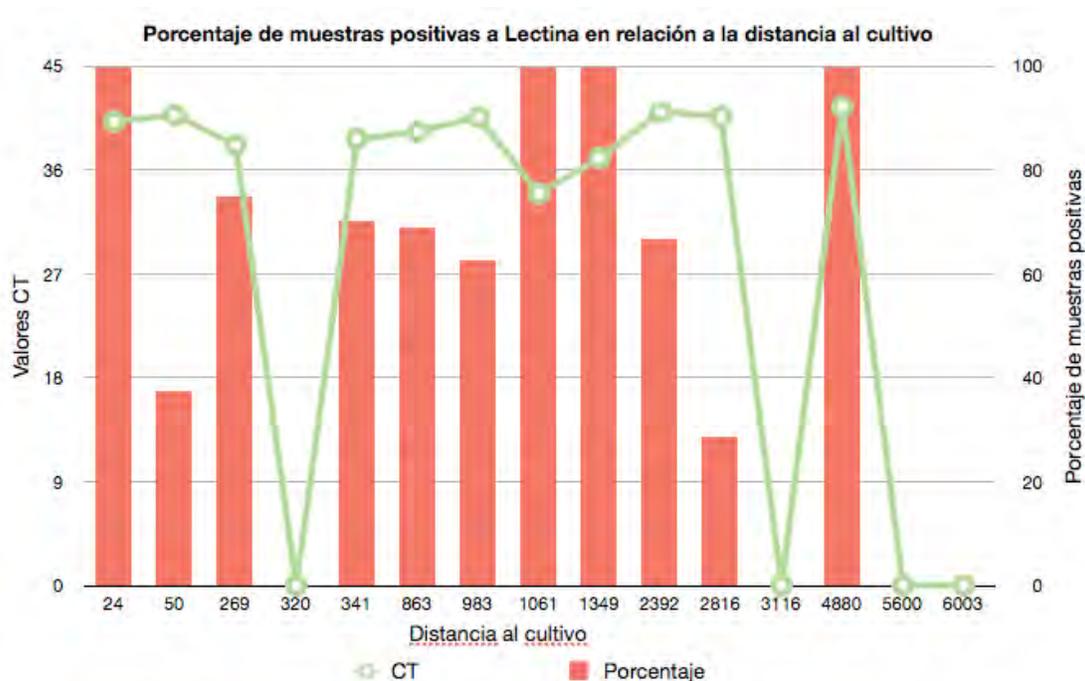
Muestra	Distancia al cultivo	DNA [ng/µL]	LECTINA	LECTINA	LECTINA	LECTINA	GTS 40-32	GTS 40-32	GTS 40-32	GTS 40-32
Prueba1	na	293.25	39.04	-			-	-		
Prueba2	na	189.3	-	-						
2A	863.12	18.5	38.46	37.54			-	-		
2B		17.9	-	39.47						
2C		164.0	-	-	38.08	38.31	39.25	40.66	43.41	-
4A	863.12	27.9	39.23	-			-	43.1	-	-
4B		6.1								
6A	863.12	76.2	40.17	39.49			44.21	-		
6B		73.1	-	37.77	44.1	39.65	-	-		
8A	340.65	46.01	-	37.70	-	38.16	-	-		
8B		54.01	36.29	37.32	37.14	-	-	42.18		
9A	340.65	45.0	37.32	36.94	39.59	41.01	41.38	-		
9B		25.3	41.23	39.9			-	-		
9C		26.2	-	-	-	38.5				
13A	340.65	10.6								
13B		6.5								
14A	340.65	29.4	40.33	39.72			-	-		
18A	320.36	6.0								
18B		7.0								
18C		39.5	-	-						
19A	320.36	31.7	-	-						
20A	268.96	15.4	36.7	38.16			-	-		
20B		31.9	-	-						
22A	268.96	31.4	42.79	-	37.28	38.57	-	-		
22B		23.8	40.91	39.79			-	-		
24A	268.96	59.8	35.27	-	35.55	38.24	-	-		
24B		41.0	36.95	37.37			-	-		
25A	982.96	10.8								
25B		24.5	42.47	-	-	-	-	-		
27A	982.96	9.7								
28A	982.96	45.5	44.53	39.48			-	42.68	-	-
28B		42.4	38.01	38.34			-			
30A	2815.69	17.9	-	-						
30B		30.8	-	-						
30C		29.9	-	40.74	40.44			-	-	
32A	1060.67	34.3	34.71	33.59			-	-		
32B		139.0	34.25	33.26			-	-		
33A	1348.57	24.4	35.44	35.36			-	-		
33B		71.5	37.36	39.95			-	-		

34A	3115.55	198.2	-	-					
34B		56.5	-	-					
35A	6003.21	16.7	-	-					
35B		0.9							
37A	6003.21	1.7							
37B		9.0							
38A	5600.40	1.78							
38B		48.4	-	-					
40A	4880.66	27.4	40.35	39.22		-	-		
40B		14.1	43.94	42.23					
41A	2392.31	36.3	42.65	41.50		-	-		
41B		63.1	40.12	40.56		-	-		
42A	2392.31	31.9	38.79	41.94		-	-		
42B		26.6	-	-					
44A	2392.31	170.6	-	39.36		-	-		
44B		83.3	43.01	-					
45A	49.98	42.3	40.34	-		-	-		
45B		53.7	42.58	-					
47A	49.98	36.6	-	-					
47B		49.7	-	39.23		-	-		
48A	23.50	66.9	40.17	40.16		-	-		

Se muestra la distancia a los cultivos, la concentración de DNA de las muestra y los Ct por cada repetición. Los signos "-" muestran que no se llevó a cabo la amplificación por lo que se toman como resultados negativos. Na=no aplica.

Los controles positivos generalmente presentan Ct menores que las otras muestras (IRIC, s.a.). Los Ct menores a 29 indican una reacción positiva fuerte que habla del alto contenido de DNA blanco en la muestra, 30-37 son reacciones positivas que indican cantidades moderadas del DNA; 38-45 son reacciones débiles por una mínima cantidad del DNA blanco (WVDL, s.a.).

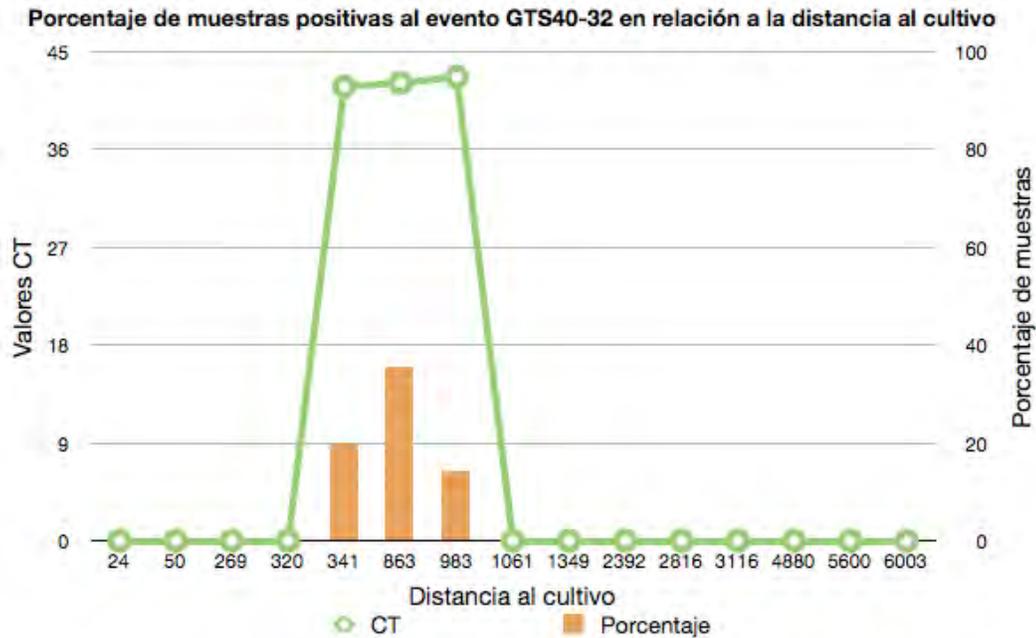
En la siguiente gráfica podemos observar el porcentaje de muestras por distancia que resultaron positivas a la presencia de Lectina. Por ejemplo, el 100% de las muestras que fueron colectadas a 24 metros del cultivo resultaron positivas, pero el Ct promedio de éstas fue de 40.16 (mínima cantidad de DNA blanco). Los Ct más bajos se registraron para las muestras ubicadas a 1061 m del cultivo con un promedio de 33.95 (reacciones positivas con cantidad moderada del DNA).



Gráfica 6. Porcentaje de muestras positivas a la presencia de Lectina en relación con la distancia al cultivo más cercano.

En total se analizaron 26 muestras (46 con duplicados) por PCR-TR para detectar la presencia del gen endógeno de la soya, lectina; se obtuvieron 113 resultados, 21 positivos con Ct por debajo de 38, 48 mostraron señales de amplificación después del Ct 38, y 44 resultaron negativas.

Todas las muestras que tuvieron un Ct en la prueba de lectina se analizaron para detectar la presencia del evento MON- Ø4Ø32-6, de los 68 resultados obtenidos en la prueba de lectina solamente en 8 se obtuvieron Ct para el evento, y éstos fueron elevados siendo el mínimo 39.25 y el máximo 44.21; lo que nos indica la baja cantidad del gen en las muestras. En la Gráfica 4 se observa el porcentaje de muestras por distancia que resultaron positivas a la presencia del evento MON- Ø4Ø32-6. Para la distancia de 863 m se realizaron 14 análisis de 3 muestras (véase Cuadro 33), el 36% de éstas resultaron positivas con un Ct promedio de 42.12 (véase Gráfica 7).



Gráfica 7. Porcentaje de muestras positivas a la presencia del evento MON- Ø4Ø32-6 en relación con la distancia al cultivo más cercano.

Durante el año 2012 no se sembró soya GM en la Península de Yucatán, y en los sitios en los que se realizó este trabajo se cultivaron las variedades Huasteca 200 y 400. La presencia de polen de soya GM en las muestras sin que existiera físicamente el cultivo durante esa época, pudo haberse debido a que las abejas almacenan el polen en las celdas para después utilizarlo como alimento, y este polen sale de la celda cuando las abejas lo ingieren o porque cae en la miel. El polen del evento MON- Ø4Ø32-6 que se encontró en las muestras pudo haber estado almacenado en las celdas desde el ciclo P-V de 2011, y al llevar a cabo la extracción y filtrado de las mieles en 2012, llegó a las muestras de miel, dando como resultado Ct muy bajos en la PCR-TR. Otras opciones pudieron haber sido que las abejas lo hayan ingerido de forma accidental al tomar el néctar, pasando al buche melífero y luego a la miel.

8.2.3 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-PF

Las muestras que resultaron negativas a la presencia de Lectina fueron analizadas a través de la técnica de PCR-PF, se buscó amplificar el gen *rbcL* para confirmar que la extracción de DNA vegetal se llevó a cabo de forma exitosa y que las muestras de miel a

pesar de no contener DNA de soya, sí lo hicieron de otras plantas.

El gen *rbcL* contiene 140pb y codifica para la subunidad grande de la enzima ribulosa1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo) del genoma del cloroplasto (Lin *et al*, 2000; Bærholm *et al.*, 2010). Este gen fue elegido para identificar DNA vegetal en las muestras de miel ya que es prácticamente universal en todo el Reino Plantae (García-Murria, 2006).

Después de llevar a cabo la técnica de PCR-PF los productos resultantes de la amplificación se visualizaron a través de electroforesis en gel de agarosa. Por el número de pares de bases que se estaban buscando, se decidió emplear un marcador molecular de 100-4000pb (Lonza FlashGel™ DNA Marker) ya que en el gel se marcan 8 bandas entre las 4000 y 100pb. Para que el resultado fuera positivo se esperaba una banda entre la de 100 y 200pb (véase Figura 14), ya que el gen *rbcL* tiene 140pb.

El Cuadro 34 muestra los resultados observados en el gel de agarosa. Las muestras que resultaron negativas a la presencia de DNA vegetal fueron los controles negativos (CN), una 34A, una 19A y una 30B. Los resultados positivos se reportaron de acuerdo a la intensidad de la banda observada en el gel.

Cuadro 34. Resultados de la PCR-PF analizados por electroforesis en gel de agarosa.

Muestra	Resultado 1	Resultado 2
Control Negativo	-	-
Control Positivo	+++	+++
P2	+	++
34A	+	-
44B	++	+
19A	++	-
42B	++	+
35A	+	+
30B	-	+
47A	++	++
38B	+++	+++
20C	+++	+++
18C	+++	++
30A	++	++

Se muestran los resultados negativos (-), y los positivos de acuerdo a la intensidad de estos comparados con el control (+++).

Las muestras que resultaron positivas se observaron en el gel con diferentes intensidades; la intensidad de las bandas en el gel refleja la concentración de las moléculas de *rbcL*; y mientras más intensa sea la banda, mayor es la concentración de este gen. El control positivo (CP) fue el de mayor intensidad (véase Figura 14) y el que se

tomó como referencia para asignarle valores a los otros resultados. Las muestras 18C, 20C y 38C (véase Cuadro 34 y Figura 31) son algunas de las que resultaron positivas, lo que nos indica que las muestras de miel contenían DNA vegetal que no provenía de la soya.

De las muestras que resultaron negativas sus duplicados sí dieron señal de amplificación en baja intensidad, esto puede indicar que la concentración del gen en la muestra fue muy baja y que al momento de llevar a cabo el procedimiento se pudo no haber tomado suficiente DNA.

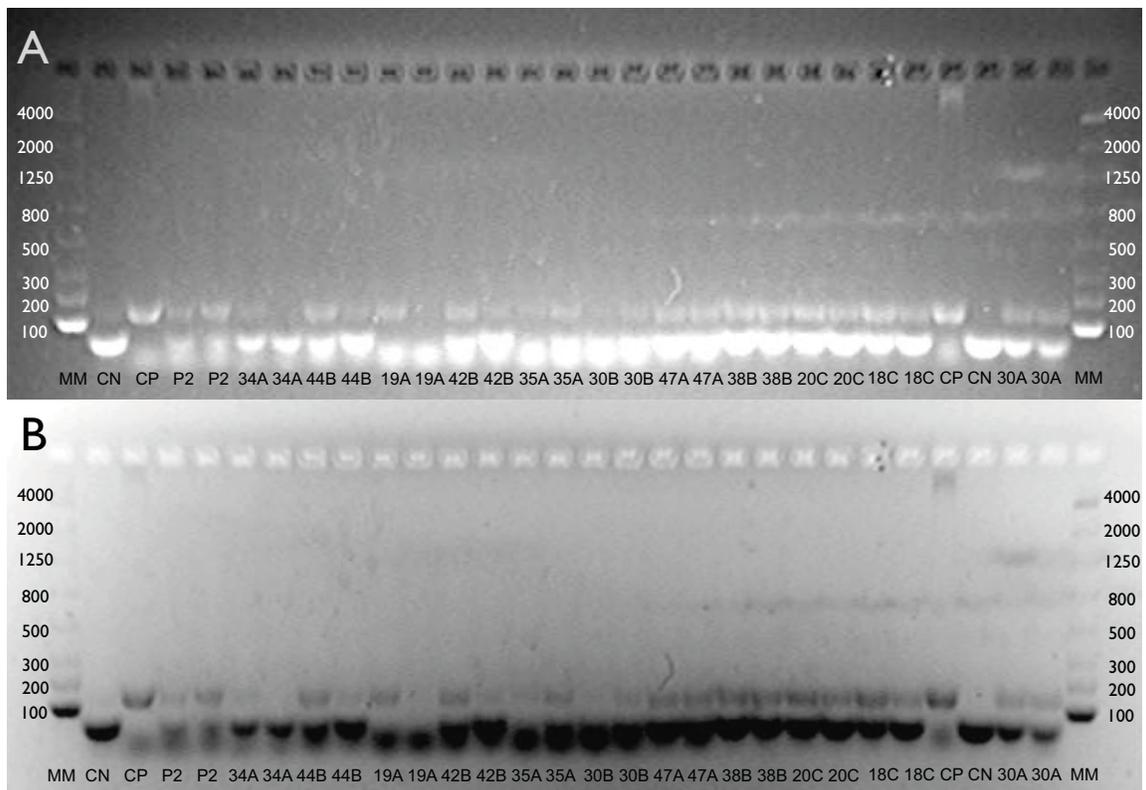


Figura 31. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa, fotografía de los resultados con A) Iluminación UV, y B) negativo. El DNA de tamaño conocido (MM=marcador molecular) se muestra en el primer y último carril. CN=Control Negativo, CP=Control Positivo, P2=Muestra Prueba 2. Cada canal contenía 10 μ L de producto de PCR y 5 μ L de buffer de carga.

En la Figura 31, aparte de las bandas del gen *rbcL* (140pb) se observan unas bandas mucho más intensas debajo de las 100pb, éstas se conocen como “*primer-dimers*” en inglés o dímeros de cebadores o iniciadores en español. Generalmente se observan como una banda de entre 30 y 50pb de intensidad moderada a alta y son distinguibles de la banda blanco ya que ésta es generalmente más grande que 50pb. Ocurren

frecuentemente como resultado del apareamiento de bases entre dos iniciadores por poseer algo de complementariedad en su extremo 3'. Dado que la DNA-polimerasa elonga en sentido 5'-3', un iniciador puede permitir a la enzima que a partir de su extremo 3' continúe polimerizando según el templado constituido por el otro iniciador. Debido a que el *primer-dimer* contiene una o ambas secuencias de los iniciadores, sus secuencias complementarias proporcionan una plantilla excelente para amplificaciones adicionales. En el siguiente ciclo, cada hebra de *primer-dimer* puede actuar como un nuevo templado resultando en una alta eficiencia de amplificación en este pequeño producto (McPherson y Møller, 2006; Martín, s.a.)

A pesar de la intensidad de los *primer dimers*, estos no obstaculizan la observación de los resultados que se estaban buscando, por lo que su presencia no debería significar un problema de interpretación de los mismos.

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE MEDIDAS DE MANEJO

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se concluye que la miel de abeja, *Apis mellifera*, que se produce en los estados de Campeche y Yucatán contiene concentraciones relativamente bajas de granos de polen de soya *Glycine max*. La presencia del polen o DNA de soya convencional y/o GM en la miel se pudo haber debido a que:

- Las abejas visitan en baja frecuencia los cultivos de soya para la colecta de néctar, sin observar el comportamiento de la colecta de polen.
- En caso de que no estén colectando el polen directamente, es posible que las abejas lo hayan ingerido durante la colecta del néctar, pasando al buche melífero en donde es regurgitado en las celdas de almacenamiento de los panales, concentrado y madurado hasta su operculamiento, permaneciendo ahí hasta la cosecha.
- Cuando las abejas se posan sobre una flor, el polen de ésta puede adherirse a los pelos plumosos del cuerpo de las abejas, llevándolo así hacia la colmena.
- Los apicultores generalmente complementan la dieta de las abejas en tiempo de escasez, alimentándolas con harina de soya y otros productos (Álvarez, 2002), es posible que al proveerles la harina, ésta haya llegado a la miel.

Al no haberse llevado a cabo la siembra de soya SF en el período PV-2012, la miel con polen o DNA de esta soya se pudo haber debido a:

- Que en los panales se pudo haber almacenado polen de este evento (MON-Ø4Ø32-6) durante el ciclo P-V de 2011 y al momento de la extracción se incorporó de forma accidental en la miel extraída en el mes de octubre de 2012.
- Otra razón pudo haber sido la siembra sin permiso de soya SF durante el 2012.

A pesar de haber realizado análisis moleculares cualitativos que nos indican la presencia o ausencia de un gen, por los resultados obtenidos podemos decir que las concentraciones del polen de soya tanto convencional como GM en la miel son muy

bajas, lo cual implica que las abejas no están utilizando el polen de esta planta como una fuente importante de alimentación.

La posibilidad de falsos positivos o negativos en los análisis moleculares es muy baja en un laboratorio certificado como el del CENICA, ya que como se mencionó, éste cumple con un sistema estricto de gestión de calidad y cuenta con metodologías validadas para detección, cuantificación e identificación de eventos específicos y de casos en los que un resultado falso pueda llegar a ocurrir; aparte de que ha participado en estudios comparativos con otros laboratorios, obteniendo los resultados esperados en todos los casos de análisis cualitativo. Sin embargo, el riesgo de obtener falsos positivos o negativos siempre se encuentra presente, para evitarlo se siguieron completamente las metodologías y se llevaron los controles positivos y negativos, los cuales siempre arrojaron resultados correctos.

Las desigualdad en los resultados obtenidos entre los dos métodos de detección empleados se pudieron haber debido a la diferencia de sensibilidad de estos; la sensibilidad de los moleculares es más elevada comparada con la de melisopalinológicos. A pesar de lo anterior, resultó muy importante la combinación de los métodos ya que permitió conocer que hay concentraciones muy bajas de polen de soya tanto convencional como GM en la miel, y gracias a la revisión al microscopio pudimos saber qué plantas están visitando con mayor frecuencia las abejas para coleccionar polen y que el paisaje no limita las opciones de forrajeo de las mismas a los monocultivos de soya durante la temporada de lluvias.

Las posibles medidas de manejo que se podrían llevar a cabo para evitar la presencia de polen de soya GM en la miel que es producida en los estados de Campeche y Yucatán son las siguientes:

- Que los apicultores extraigan la miel y limpien los panales una vez terminada la floración de la soya, previo a los flujos importantes de miel, después de la Precosecha para eliminar cualquier residuo de granos de polen de la soya. El período en el cual la miel puede adquirir polen de soya GM va a depender del momento de la siembra y floración, pero éste generalmente corresponde a la temporada de lluvias entre septiembre y noviembre (cuando la siembra es tardía).
- Evitar la alimentación complementaria de las abejas con harina de soya GM.

- Los resultados obtenidos sugieren que las mieles producidas a distancias iguales o menores a 1,349m de los cultivos de soya podrían contener polen de esta especie; por lo que sería importante ubicar los apiarios a más de 1,500m ó hasta 2,000m de distancia del cultivo de soya GM más cercano, y 3,000m en caso de la miel orgánica certificada (Bird *et al.*, 2013).
- Una alternativa final puede ser la utilización de las diversas variedades de soya Huasteca desarrolladas por el INIFAP para la región.

Resulta importante seguir las recomendaciones de manejo para que la miel pueda ser clasificada como “libre de OGM” o que cualquier presencia se tome como “adventicia o técnicamente inevitable” y por lo tanto no presente como consecuencia requerir el etiquetado para su comercialización y exportación hacia el mercado Europeo.

A raíz de la sentencia del TJUE en el caso Bablok, la CE propuso que se aclarara la situación del polen en la miel para definirlo como un *componente natural* de ésta en lugar de que se considere un *ingrediente*. En Octubre de este año el Comité de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad Alimentaria del Parlamento de la UE se va a reunir para votar la propuesta de la CE, en caso de que se apruebe, el polen dejaría de verse como un ingrediente de la miel y no tendría que ser indicado en la lista de ingredientes.

Se considera importante realizar más análisis e investigaciones que ayuden a responder las dudas que restan con respecto al tema, análisis moleculares cuantitativos que nos permitan conocer la cantidad de polen GM presente en la miel; ya que el polen debe ser mencionado en la etiqueta como un ingrediente si la cantidad de GM es mayor al 0.9% del total de este en la miel (esto aplica sólo para eventos autorizados en el mercado Europeo). Además ampliar investigaciones que ayuden a determinar la distancia a la que se deben establecer los apiarios de los cultivos GM en la región.

IV. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Agudelo, O., y Riveros, G. (1994). Fisiología de la soya. En *El cultivo de la Soya. Manual de Asistencia Técnica* (pp. 35–52). Palmira: Instituto Colombiano Agropecuario.
- Alfaro, R., Burgos, A., Moguel, Y., Godínez, L., Villanueva, R., Romero, O., Velázquez, C. (2011). *Plan para promover una Denominación de Origen de mieles de la Península de Yucatán*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo.
- Alfaro, R., González, J., López, E., Ortiz, J., y Martínez, E. (2007). Orígenes botánicos de la miel del Estado de Yucatán, México. *Memorias del XXI Seminario Americano de Apicultura. Mazatlán, Sinaloa. ONA, Gobierno del Estado de Sinaloa*. Consultado el 02/06/2013, en: <http://seminariodemazatlan2007.blogspot.mx/2007/08/orgenes-botnicos-de-la-miel-del-estado.html>
- Alfaro, R., González, J., Ortiz, J., Viera, F., Burgos, A., Martínez, E., y Ramírez, E. (2010). *Caracterización palinológica de las mieles de la Península de Yucatán* (p. 152). Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Álvarez, C. (2002). *Suplementación proteica en abejas, alimentadas con harina de lupino y harina de soya*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.
- Applied Biosystems. (s.a.). *Essentials of Real Time PCR* (pp. 1–8). E.U.A.
- Applied Biosystems. (2011). *Real-time PCR: Understanding Ct* (pp. 1–6). E.U.A.
- Applied Biosystems. (2010). *TaqMan® Universal PCR Master mix* (p. 60). E.U.A.: Applied Biosystems.
- ARGENBIO. (2000). *Evaluación de la seguridad de la soja Roundup Ready, Evento 40-3-2* (p. 41). Argentina: Argenbio.
- Ayala-Arcipreste, M. (2001). *La Apicultura de la Península de Yucatán: Un acercamiento desde la ecología humana*. CINVESTAV.
- Bastidas, G. (1994). Aspectos botánicos de la planta de soya. En *El cultivo de la Soya. Manual de Asistencia Técnica* (pp. 25–34). Palmira: Instituto Colombiano Agropecuario.
- Batlloori, E. (2012). *Justificación Técnica-científica para emitir opinión favorable a solicitudes de zonas libres de cultivos de organismos genéticamente modificados en el Estado de Yucatán* (p. 270). Mérida.
- Bærholm, I., Fraser, M., Willerslev, E., y Gilbert, M. T. P. (2010). Characterisation of insect and plant origins using DNA extracted de small volumes of bee honey. *Arthropod-Plant Interactions*, 4(2), 107–116.
- Berdal, K., y Holst-Jensen, A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Research and Technology*, 213(6), 432–438.

- Berrón-Ferrer G. E., M. Arteaga-Aguilar, R. Noriega-Trejo, L.R. Martínez, L. Godínez-García, y J. Vargas-Soriano (2003). *Las áreas naturales protegidas del estado de Campeche*. Nueva Época Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México, 623, 24-29.
- Biosafety Clearing-House, y Convention on Biological Diversity. (2013). Modified Organism MON-04032-6- Roundup Ready soybean. *Modified Organisms Database*. Consultado el 15/05/2013, en: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14796>
- Bird, K., Tompkins, S., Leeks, D., Garrett, S., y Saunders, N. (2013). *Impact of the European Court of Justice ruling on the Honey Directive and Relevant Existing Legislation*. European Parliament.
- Birkman, L., Van den Bosse, E., Carreno, I., Vogt, A., Weistra, K., y Oortwijn, W. (2013). *Clarifying the status of pollen in honey* (p. 62). Bruselas: European Parliament, Directorate for Impact Assessment and European Added Value. Consultado en <http://www.europarl.europa.eu/delegations/es/studiesdownload.html?languageDocument=EN&file=96270>
- Bogdanov, S. (2002). *Harmonised methods of the International Honey Commission* (p. 62).
- Bradbear, N. (2009). *Bees and their role in forest livelihoods*. (FAO, Ed.) *Food and Agricultural Organization* (1st ed., p. 194). Rome: FAO.
- Broadman, P., Schöne-Michling, M., Broll, H., Hird, H., Lubenow, H., Ullman, S., y Laube, I. (2010). *Characterisation of honey by molecular biological methods* (p. 1).
- Caccavari, M., y Cilla, G. (2010). Remoción química como nueva alternativa a la remoción mecánica para el estudio del polen transportado en las escopas de abejas silvestres. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 12(2), 25–262.
- CENECAM. (2013). Estación: Hopelchén. *Red de Estaciones CENECAM*. Consultado el 13/05/13, en: <http://www.cenecam.gob.mx/estacion.php>
- CERA. (2009). MON-04032-6 (GTS 40-3-2). *GM Crop Database*. Consultado el 18/08/2012, en: http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=ShowProd&data=GTS+40-3-2
- Chiari, W. C., Arnaut de Toledo, V. de A., Colla, M. C., Attencia, V. M., Martins, F., Satie, C., Magalhães, H. R. (2005a). Floral Biology and Behavior of Africanized Honeybees *Apis mellifera* in Soybean (*Glycine max* L . Merrill). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(3), 367–378.
- Chiari, W. C., Arnaut DeToledo, V. D. A., Colla, M. C., Braz de Oliveira, A., Shiguero, E., Attencia, V. M., Hitomi, M. (2005b). Pollination of Soybean (*Glycine max* L . Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 31–36.
- CIBIOGEM. (2005). *Resoluciones 2005*.
- CIBIOGEM. (2006). *Resoluciones 2006*.
- CIBIOGEM. (2007). *Resoluciones 2007*.
- CIBIOGEM. (2008). *Resoluciones 2008*.

- CIBIOGEM. (2009). *Resoluciones 2009*.
- CIBIOGEM. (2010). *Resoluciones 2010*.
- CIBIOGEM. (2011a). *Registro 2011*.
- CIBIOGEM. (2011b). *Resoluciones 2011*.
- CIBIOGEM. (2012a). *Resoluciones 2012*.
- CIBIOGEM. (2012b). *Registro 2012*.
- CICY. (2010a). *Gymnopodium floribundum*. *Flora de la Península de Yucatán*. Consultado el 25/05/2013, en: http://www.cicy.mx/sitios/flora_digital/ficha_virtual.php?especie=1986
- CICY. (2010b). *Thouinia paucidentata* Radlk. *Flora de la Península de Yucatán*. Consultado el 07/01/2013, en: http://www.cicy.mx/sitios/flora_digital/ficha_virtual.php?especie=2135
- Codex Alimentarius. CODEX STAN 12-1981. Codex norma para la miel (2001). Consultado el 20/09/2012 en: http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/310/cxs_012s.pdf
- CONABIO. (2009). *Viguiera dentata* (Cav.) Spreng. *Malezas de México*. Consultado el 05/03/13 en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/viguiera-dentata/fichas/ficha.htm#9>. Referencias
- CONABIO. (2012). *Resultado del análisis de riesgo a la solicitud 007/2012 para la liberación al ambiente de Glycine max (L.) Merr. genéticamente modificado* (Vol. 6, p. 72). Distrito Federal.
- CONAFOR. (2013a). *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Consultado el 10/05/2013, en: [http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/894Bursera simaruba.pdf](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/894Bursera%20simaruba.pdf)
- CONAFOR. (2013b). *Bucida buceras* L. Consultado el 10/05/2013, en: [http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/892Bucida buceras.pdf](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/892Bucida%20buceras.pdf)
- CONAGUA. (2010). *Estadísticas del agua en México, edición 2010*. (SEMARNAT, Ed.) (p. 258). Distrito Federal: CONAGUA.
- Court of Justice of the European Union. (2011). *Honey and food supplements containing pollen derived de a GMO are foodstuffs produced de GMOs which cannot be marketed without prior authorisation. PRESS RELEASE No 79 / 11* (Vol. 2003, pp. 1–2). Luxembourg.
- Couvillon, M., Wenseleers, T., Imperatriz-Fonseca, V., Nogueira-Neto, P., y Ratrieks, F. (2008). Comparative study in stingless bees (Meliponini) demonstrates that nest entrance size predicts traffic and defensivity. *Journal of evolutionary biology*, 21, 194–201.
- DAF. (2005). *Honey bee pollination benefits for crops and orchards in Western Australia*. Department of Agriculture and Food in Western Australia. Consultado el 26/05/2013, en: [http://www.agric.wa.gov.au/action/ATOZ?s=875 902710,term=pollination](http://www.agric.wa.gov.au/action/ATOZ?s=875%20902710,term=pollination).
- Darwin, C. (1859). *El origen de las especies* (10th ed., p. 455). México: Editorial Porrúa.

- De Camargo, A., Lopes, C., Marchini, L., y Fernandes, P. (2000). Espectro polínico de amostras de miel de *Apis mellifera* L., coletadas na Bahia. *Botânica e Fisiologia Vegetal*, 59(1), 1–6.
- Diario Oficial de la Federación. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (2005). Consultado en <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf>
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., Boyle, D. L., y Schapaugh, W. T. (2013). Soybean Pollen Anatomy, Viability and Pod Set under High Temperature Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199(3), 171–177.
- Duan, J., Marvier, M., Huesing, J., Dively, G., y Huang, Z. (2008). A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS one*, 3(1), 1–6.
- Echazarreta, C., Quezada-Euán, J., Medina, L., y Pasteur, K. (1997). Beekeeping in the Yucatan Peninsula : development and current status. *Bee World*, 78(3), 115–127.
- Einspanier, R. (2001). Quantifying genetically modified material in food: searching for a reliable certification. *European Food Research and Technology*, 213(6), 415–416.
- Erickson, E. (1975a). Effect of Honey Bees on yield of three soybean cultivars. *Crop Science*, 15, 84–86.
- Erickson, E. H. (1975b). Variability of floral characteristics influences honey bee visitation to Soybean blossoms. *Crop Science*, 15, 767–771.
- Esch, H., y Burns, J. (1996). Distance estimation by foraging honeybees. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 155–62. Consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317542>
- Estrada-Vivas, J. (2010a). Paquete tecnológico para la producción de soya. *INFOCAMPO. Gaceta rural de Yucatán*, 12–14.
- Estrada-Vivas, J. (2010b). *Producción de soya en el cono sur de Yucatán* (pp. 3–6). Mérida.
- European Parliament. (2007). *Reglamento (CE) N° 1829/2003 del parlamento europeo y del consejo sobre alimentos y piensos modificados genéticamente* (pp. 1–39).
- European Commission. (2010). *A decade of EU-funded GMO research (2001-2010)* (p. 264). Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, y European Network of GMO Laboratories. (2010). *Compendium of reference methods for GMO analysis* (p. 264). Italy: Joint Research Centre of the European Commission.
- FAO. (1990). Adverse natural factors and pests. En *Beekeeping in Africa*. (p. 130). FAO. Consultado en <http://www.fao.org/docrep/t0104e/t0104e0c.htm>
- FAO. (1995). *El cultivo de la Soja en los Trópicos. Mejoramiento y producción* (p. 254). Roma: FAO.
- FAOSTAT. (2013). Producción, ganadería primaria. Producto: miel natural. Consultado el 30/04/13 en: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=569&lang=es#ancor>

- Fewell, J., y Winston, M. (1992). Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee , *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30, 387–393.
- Financiera Rural. (2011). *Monografía de la Miel* (p. 10). México.
- Flores-Guido, J., Durán, R., y Ortiz, J. (2011). Comunidades terrestres. Comunidades vegetales terrestres. En R. Durán y M. Méndez (Eds.), *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (pp. 125–129). Mérida: CICY, PPD-FFMAM, CONABIO, SEDUMA.
- Free, J. (1963). The flower constancy of honeybees. *Journal of Animal Ecology*, 32(1), 119–131.
- Fujita, R., Ohara, M., Okazaki, K., y Shimamoto, Y. (1997). The Extent of Natural Cross-Pollination in Wild Soybean (*Glycine soja*). *Journal of Heredity*, 88(2), 124–128.
- Fundación Produce Chiapas A.C., y ITESM. (2003). *Programa Estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología del Estado de Chiapas. Cadena Agroalimentaria de la Soya*. (p. 62). Chiapas.
- Gallez, L., Andrada, A., Valle, A., Gil, M., y Continanza, F. (2003). *Polen de soja (Glycine max L.) en mieles del centro-oeste Pampeano* (p. 11). Bahía Blanca.
- García-Murria, M. de J. (2006). *Regulación redox de la RUBISCO: contribución estructural y funcional del par de residuos conservaos Cys172 y Cys 192*. Universidad de Valencia.
- Garibyan, L., y Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4.
- Google Earth 7.1.1.1888. 2013. Mapa de la Península de Yucatán.
- González-Acereto, J., y De Araujo, C. (2005). *Manual de Meliponicultura Mexicana* (pp. 5–12). Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Fundación Produce Guerrero A.C.
- González, O., Hernández, C., y Morales, B. (2009). *Alemania como posibilidad de mercado para la miel mexicana*. Tesina de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional.
- Greggers, U., y Menzel, R. (1993). Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32, 17–29.
- Grüter, C., Moore, H., Firmin, N., Helanterä, H., y Ratnieks, F. (2011). Flower constancy in honey bee workers (*Apis mellifera*) depends on ecologically realistic rewards. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 1397–402.
- Güemes-Ricalde, F., Echazarreta, C., Villanueva, R., Pat, J., y Gómez, R. (2003). La apicultura en la Península de Yucatán. Actividad de subsistencia en un entorno globalizado. *Revista Mexicana del Caribe*, VIII(16), 117–132.
- Hagler, J., Mueller, S., Teuber, L., Machtley, S., y Van Deynze, A. (2011). Foraging range of honey bees , *Apis mellifera* , in alfalfa seed production fields. *Journal of Insect Science*, 11(144), 1–12.

- Hart, A., y Ratnieks, F. (2001). Why do honey-bee (*Apis mellifera*) foragers transfer nectar to several receivers? Information improvement through multiple sampling in a biological system. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(4), 244–250.
- Hornitzky, M. (2004). *How much canola pollen is in canola (Brassica napus) honey?* (p. 10). Canberra.
- Hutchins, M., Evans, A., Garrison, R., y Schlager, N. (Eds.). (2003). *Grzimek's Animal Life Encyclopedia* (2^a ed., p. 489). Canada: Thomson Gale.
- INECC. (2013). Laboratorio de Detección de OGM del INE. Consultado el 23/04/2013 en: <http://www.inecc.gob.mx/bioseguridad-laboratorio-lab>
- INEGI. (2010). *Balanza comercial México* (p. 158). México: INEGI.
- INEGI. (2011). *Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2010. Exportación en dólares* (p. 720). México: INEGI.
- INEGI. (2012a). *Perspectiva estadística Yucatán. Marzo 2012* (p. 96). México: INEGI.
- INEGI. (2012b). *Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2011. Exportación en pesos* (p. 720). México.
- INEGI. (2012c). *Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2011. Exportación en dólares* (p. 720). México: INEGI.
- INEGI. (2012d). *El sector alimentario en México 2012* (p. 308). México: INEGI.
- INEGI. (2012f). *La apicultura en la Península de Yucatán. Censo agropecuario 2007* (p. 63). México: INEGI.
- INEGI. (2012g). *Perspectiva estadística Campeche Diciembre 2012* (p. 93). México: INEGI.
- INEGI. (2013). *Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 2012* (p. 783). México: INEGI.
- IBUNAM. (2011). *Gymnopodium floribundum*. -IBUNAM:MEXU:OAX1201188. *UNIBIO: Colecciones Biológicas*. Consultado el 23/06/2013, en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX1201188>
- Intertek. (2011). *Global Honey Traceability* (p. 4). INTERTEK.
- IRIC. (s.a.). *Information on qPCR results* (pp. 1–3). Institute of Research in Immunology and cancer. University of Montreal.
- James, D., Schmidt, A.-M., Wall, E., Green, M., y Masri, S. (2003). Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(20), 5829–5834.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., y Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC bioinformatics*, 8(131).

- Kaya, Z., Binzet, R., y Orcan, N. (2005). Pollen analyses of honeys de some regions in Turkey. *Apiacta*, 40, 10–15.
- Keogh, R., Robinson, A., y Mullins, I. (2010). Case Study 31. Soybean. In *Pollination Aware. The real value of Pollination in Australia*. Leederville: Rural Industries Research Development Corporation.
- Koti, S., Reddy, K. R., Kakani, V. G., Zhao, D., y Reddy, V. R. (2004). Soybean (*Glycine max*) pollen germination characteristics, flower and pollen morphology in response to enhanced ultraviolet-B radiation. *Annals of botany*, 94(6), 855–864.
- Leadbeater, E., Raine, N., y Chittka, L. (2006). Social Learning: Ants and the meaning of teaching. *Current biology*, 16(9), R323–5.
- Lee, C., Egli, D., y Herbek, J. (2005). Predicting soybean first flowering date. *EDIS SS-AGR-184*, (3), 29–30.
- Lieux, M. H. (1977). Secondary Pollen Types Characteristic of Louisiana Honeys. *Economic Botany*, 31, 111–119.
- Lieux, M. H. (1980). Acetolysis Applied to Microscopical Honey Analysis. *Grana*, 19, 57–61.
- Lieux, M. H. (1981). An analysis of Mississipi (U.S.A.) honey: Pollen, color and moisture. *Apidologie*, 12(2), 137–158.
- Lin, H., Chiang, J., y Shih, D. Y. (2001). Detection of Genetically Modified Soybeans by PCR Method and Immunoassay Kits. *Journal of Food and Drugs Analysis*, 9(3), 160–166.
- Lin, J., Fleming, R., Kuo, J., Matthews, B., y Saunders, J. (2000). Detection of plant genes using a rapid, nonorganic DNA purification method. *BioTechniques*, 28(2), 346–50. Consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683746>
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., y Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 212(4), 497–504.
- Lipp, M., Broadman, P., Pietsch, K., Pauwels, J., y Anklam, E. (1999). IUPAC Collaborative trial study of a Method to Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder. *Journal of AOAC International*, 82(4), 923–928.
- Magaña, M., Aguilar, A., Lara, P., y Sanginés, R. (2007). Caracterización socioeconómica de la actividad apícola en el estado de Yucatán, México. *Agronomía*, 15(2), 17–24.
- Maldonado, N., y Ascencio, G. (2010). Huasteca 200, variedad de soya de baja sensibilidad al fotoperiodo corto para el trópico de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(5), 707–714.
- Maldonado, N., Ascencio, G., y Aguirre, E. (2010a). *Soya. Huasteca 400, nueva variedad de soya para el trópico húmedo* (Vol. 400, pp. 45–46). Altamira, Tamaulipas.
- Maldonado, N., Ascencio, G., y Gill, H. (2009). Huasteca 300, Nueva variedad de soya para el sur de Tamaulipas. *Agricultura Técnica en México*, 35(4), 481–485.

- Maldonado, N., Ascencio, G., y Gill, H. (2010b). Huasteca 400 Nueva variedad de soya para el sur de Tamaulipas, oriente de San Luis Potosí y Norte de Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(5), 687–692.
- Martín, E. (s.a.). *Introducción al diseño de primers* (p. 12).
- Martínez, L. (2010). Estudio de caso: la apicultura en el estado de Campeche. En G. Villalobos-Zapata y J. Mendoza (Eds.), *La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado* (pp. 502–504). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur.
- Masterson, J. (2007). *Apis mellifera scutellata*. *Smithsonian Marine Station at Fort Pierce*. Consultado el 25/11/13, en: http://www.sms.si.edu/IRLSpec/A_m_scutellata.htm
- Mazzara, M., Munaro, B., Larcher, S., Grazioli, E., Delobel, C., Savini, C., y Van de. (2007). *Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line 40-3-2 Using Real-time PCR. Validation Report and Protocol* (p. 45). Italy: Joint Research Centre of the European Commission.
- McGregor, S. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants* (p. 849). Tucson: USDA.
- Medina, L., Martín, S., Espinosa-Montaña, L., y Ratnieks, F. (2002). Reproduction of Varroa destructor in worker brood of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental & Applied Acarology*, 27(1-2), 79–88. Consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12593514>
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185(4), 323–340.
- Ministry of Agriculture. (2013). Apiculture Factsheet #111. *Apiculture*. Consultado el 10/06/2013, en: http://www.agf.gov.bc.ca/apiculture/factsheets/111_foraging.htm
- Moguel, B., Echazarreta, C., y Mora, R. (2005). Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. *Técnica Pecuaria en México*, 43(3), 323–334.
- Monsanto Comercial S.A. de C.V. (2008). *Solicitud de permiso para la liberación al ambiente en programa experimental del Organismos Genéticamente Modificado Soya Solución Faena (MON-04032-6) en el estado de Chiapas, durante el ciclo agrícola primavera-verano (PV) 2008*. (p. 108). Distrito Federal.
- Monsanto Comercial S.A. de C.V. (2010). *Solicitud de permiso de liberación al ambiente en etapa piloto del organismo genéticamente modificado soya Solución Faena MON-04032-6 (GTS 40-3-2) Chiapas, Ciclo Primavera-Verano 2010*. (p. 169). Distrito Federal.
- Monsanto Comercial S.A. de C.V. (2012). *Solicitud de permiso de liberación al ambiente en etapa comercial. Soya Solución Faena*. (Vol. 6, pp. 1–61). Distrito Federal.
- Monsanto Company. (2000). *Updated Molecular Characterization and safety assessment of Roundup Ready Soybean event 40-3-2* (pp. 1–20). St. Louis.
- Morse, R., y Calderone, N. (2000). The Value of Honey Bees As Pollinators of U . S . Crops in 2000. *Bee Culture Magazine*, 1–15.

Norma Mexicana, NMX-F-036-NORMEX 2006. ALIMENTOS – MIEL- ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.

Ojar, C. (2002). Africanized Honey bee. *Introduced Species Summary Project. Columbia University*. Consultado el 15/04/13, en: http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoff-burg/invasion_bio/inv_spp_summ/Apis_mellifera_scutellata.htm

Palacios-Chávez, R., Ludlow-Wiechers, B., y Villanueva, R. (1991). *Flora palinológica de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México*. Chetumal: Centro de investigaciones de Quintana Roo. Consultado en: http://repositorio.ine.gob.mx/ae/ae_006749.pdf

Palmer, R. G., Gai, J., Sun, H., y Burton, J. W. (2001). Production and Evaluation of Hybrid Soybean. *Plant Breeding Reviews*, 21, 263–307.

Palmer, R. G., Perez, P. T., Ortiz-Perez, E., Maalouf, F., y Suso, M. J. (2009). The role of crop-pollinator relationships in breeding for pollinator-friendly legumes: from a breeding perspective. *Euphytica*, 170, 35–52.

Pérez, M. (2012, Julio 23). Apicultores logran impedir la siembra de soya transgénica en el sureste del país. *La Jornada*. Distrito Federal. Consultado en <http://www.jornada.unam.mx/2012/07/23/sociedad/038n1soc>

Phillips, T. (2008). Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology. *Nature Education*. Consultado el 31/07/2013, en <http://www.nature.com/scitable/topicpage/genetically-modified-organisms-gmos-transgenic-crops-and-732>

Porter-Bolland, L., Medina, M., Montoy, J., Montoy, P., Martin, G., y May, G. (2009). *Flora melífera de La Montaña, Campeche: su importancia para la apicultura y para la vida diaria* (p. 322). Xalapa: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, Instituto de Ecología A.C.

Pratap, A., Gupta, S. K., Kumar, J., y Solanki, R. K. (2012). Soybean. In S. K. Gupta (Ed.), *Technological Innovations in Major World Oil Crops* (Vol. 1, pp. 293–321). New York, NY: Springer New York.

Qaim, M. (2009). The Economics of Genetically Modified Crops. *Annual Review of Resource Economics*, 1(1), 665–693.

Qiu, L., & Chang, R. (2010). The Origin and History of Soybean. En G. Singh (Ed.), *Soybean. Botany, production and uses* (CABI., p. 494). Londres.

Querci, M., Jermini, M., y Van de Eede, G. (Eds.). (2007). *Análisis de la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en muestras de alimentos* (p. 10). Italy: Joint Research Centre of the European Commission.

Quezada-Euán, J., Medina, L., González, J., y Moo, H. (2001). Biología de las abejas sin aguijón. *Memorias del curso de Biología, Reproducción y manejo de las abejas sin aguijón*. Departamento de Apicultura. Universidad Autónoma de Yucatán 1–6.

Ratnieks, F. (2000). How far do bees forage? *Bee improvement*, 6, 10–11.

- Ratnieks, F., y Visscher, K. (1996). Agricultural Impact of Africanized Honey Bees in Sinaloa, Mexico. *California Agriculture*, 50, 24–28.
- Ribbands, C. (1951). The flight range of the Honey-Bee. *Journal of Animal Ecology*, 20(2), 220–226.
- Rodriguez, M., y Rodriguez, W. (2006). *PCR en Tiempo Real*. IBT. UNAM (pp. 6–9).
- Ruiz, H., y Arellano, J. (2011). Instrumentos y Estrategias. Áreas Naturales Protegidas. En R. Durán y M. Méndez (Eds.), *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (pp. 414–419). Mérida: CICY, PPD-FFMAM, CONABIO, SEDUMA.
- SAGARPA. (2001). *Manual Básico de Apicultura* (p. 52). México: SAGARPA.
- SAGARPA. (2010). Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *Claridades Agropecuarias*, (199), 1–34.
- Salem, M. a., Kakani, V. G., Koti, S., y Reddy, K. R. (2007). Pollen-Based Screening of Soybean Genotypes for High Temperatures. *Crop Science*, 47(1), 219–231.
- Secretaría de Economía. (2007). Proyección internacional del sector apícola mexicano, 6(12), 1–4.
- Secretaría de Economía. Información Estadística y Arancelaria. *Sistema de consulta de información Estadística por País*. Consultado el 03/04/13, en: <http://www.economia.gob.mx/comunidad-negocios/comercio-exterior/informacion-estadistica-y-arancelaria>
- Seeley, T. (1995). *The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies*. Cambridge, Mass. Harvard University Press.
- SENASICA. (2008). *Manual de buenas prácticas de producción de miel* (p. 33). México: SENASICA.
- SENASICA. (2009a). *Manual de buenas prácticas pecuarias en la producción de miel* (Vol. 01, p. 69). México: SAGARPA. SENASICA.
- SENASICA. (2009b). Permiso de la solicitud 0063/2009. Distrito Federal: SAGARPA. SENASICA.
- SENASICA. (2012a). *Oficio CI-2012/19. Reporte final de actividad con motivo de la solicitud 01472011 de Permiso de Liberación al ambiente de soya genéticamente modificada*. (pp. 1–3). Distrito Federal.
- SENASICA. (2012b). *Oficio CI-2012/36. Información sobre el permiso de liberación contenido en el oficio BOO.04.03.02.01-4377* (pp. 1–3). Distrito Federal: SAGARPA. SENASICA.
- Sherry, D., y Mitchell, J. (2007). Neuroethology of foraging. In D. Stephens, J. Brown, y R. Ydenberg (Eds.), *Foraging. Behavior and Ecology* (pp. 61–104). E.U.A.: University of Chicago Press.
- SIAP [En Línea]. (2013). Anuario estadístico de la producción agrícola. *Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Consultado el 10/02/2013, en: www.siap.gob.mx

- Sleper, D. A., y Shannon, J. G. (2003). Role of Public and Private Soybean Breeding Programs in the Development of Soybean Varieties Using Biotechnology. *Journal of Abrobiotechnology Management & Economics*, 6(1-2), 27–32.
- Somma, M. (2007). Extraction and Purification of DNA. En *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms* (pp. 2–18). World Health Organization.
- Somma, M., y Querci, M. (2007a). Electroforesis en gel de agarosa. En *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos* (pp. 1–12). World Health Organization.
- Somma, M., y Querci, M. (2007b). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). In *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos* (pp. 1–34). World Health Organization.
- Steinrücken, H., y Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl- shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemichal and Biophysical Research Communications*, 94(4), 1207–1212.
- Tarpy, D. (2004). *The Honey bee dance language* (pp. 1–3). North Carolina: North Carolina Cooperative Extension Service.
- Taylor, N. B., Fuchs, R. L., MacDonald, J., Shariff, a R., y Padgette, S. R. (1999). Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4469–4473. Consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10552835>
- Terrón-Cuadrado, M. (2008). *Técnicas moleculares en la detección de organismos genéticamente modificados en los alimentos* (p. 32). Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Terry, C., y Harris, N. (2001). Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries. *European Food Research and Technology*, 213(6), 425–431.
- Thermo Scientific. (2009). NanoDrop 2000 / 2000c Spectrophotometer. Wilmington, E.U.A.: Thermo Scientific.
- Toledo, R. (2003). *Fases de desarrollo del cultivo de soja* (p. 12). Argentina.
- Torres.Colín, L., Fuentes-Soriano, S., y Delgado-Salinas, A. (2010). Estudio palinológico del género *Macroptilium* (Benth.) Urb. (Leguminosae) en México y Centroamérica. *Acta Botánica Mexicana*, 91, 51–69.
- Townsend, B., y Llewellyn, D. (2002). Spatian and temporal regulation of a soybean (*Glycine max*) lectin promoter in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*). *Functional Plant Biology*, 29, 835–843.
- Tribunal de Justicia de la Unión Europea. (2011). *La miel y los complementos alimenticios que contienen polen derivado de un OMG son alimentos producidos a partir de OMG que no pueden comercializarse sin autorización previa. COMUNICADO DE PRENSA n° 79 / 11* (pp. 1–2). Luxemburgo.

- USDA, y APHIS. (2007). *In response to Monsanto Petition 06-178-01p seeking a Determination of Non-regulated Status for Roundup Ready 2 Yield Soybean MON 89788* (pp. 1–18).
- Valencia, R., Carmen, H., Vargas, H., y Arrieta, G. (2006). Variedades mejoradas de soya para zonas productoras actuales y potenciales de Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4(2-3), 7–15.
- Valentini, A., Miquel, C., y Taberlet, P. (2010). DNA Barcoding for Honey Biodiversity. *Diversity*, 2(4), 610–617.
- Vandame, R., y Álvarez-Buylla, E. (2012, Junio 12). Miel y Transgénicos, ¿La imposible coexistencia? *La Jornada*. Distrito Federal. Consultado en <http://www.jornada.unam.mx/2012/06/12/opinion/020a2pol>
- Vee Gee. (2010). *PDX Series. Digital Refractometers* (p. 2). Kirkland, E.U.A.: VEE GEE Analytical Instruments.
- Vidal, J. (2009). *Manifestación de Impacto Ambiental Modalidad Regional. Establecimiento de Nueva Zona de Riego en el Rancho El Cenit*. (p. 88). Campeche.
- Villanueva-Gutiérrez, R. (2002). Polliniferous plants and foraging strategies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 50(3-4).
- Von Der Ohe, W., Persano, L., Piana, M., Morlot, M., y Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, 18–25.
- Waiblinger, H.-U., Ohmenhaeuser, M., Meissner, S., Schillinger, M., Pietsch, K., Goerlich, O., Broll, H. (2012). In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA de pollen in honey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7(3), 243–254.
- Waltz, E. (2011). European ruling raises specter of mandatory GM pollen tests on honey. *Nature biotechnology*, 29(11), 958.
- Westermeier, R. (2005). *Electrophoresis in Practice* (4^o ed., p. 390). Alemania: Wiley-VCH.
- Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Van Bockstaele, E., y De Loose, M. (2001). Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *European Food Research and Technology*, 213(2), 107–112.
- Woller, T. (2012). Contenido de polen transgénico, consecuencias y oportunidades en la comercialización de miel. En *Notiabeja* (pp. 2–9). México: SAGARPA.
- Woodward, S., y Quinn, J. (2011). *Encyclopedia of invasive species. De Africanized honeybees to Zebra mussels* (pp. 106–109). Greenwood: Library of Congress.
- Zimmermann, A., Lüthy, J., y Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *European Food Research and Technology*, 207(2), 81–90. Consultado en <http://link.springer.com/article/10.1007/s002170050299>