

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Determinación de genes de proteínas
olfativas asociadas a los receptores de olor
en *Scaptotrigona mexicana***

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

Noé León Estrada

Director

Dr. Julio César Rojas León

El Colegio de la Frontera Sur. Unidad Tapachula

Asesores

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Instituto de Ciencias Biológicas. UNICACH

Dra. Griselda Karina Guillén Navarro

El Colegio de la Frontera Sur. Unidad Tapachula

Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

Mayo de 2025





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;
Fecha: 23 de mayo de 2025

C. Noé León Estrada

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Determinación de genes de proteínas olfativas asociadas a los receptores de olor en

Scaptotrigona mexicana

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dr. Gustavo Rivera Velázquez

Mtro. Reynaldo Moctezuma Román

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Firmas:

Ccp. Expediente

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Abejas.....	13
2.2 Abejas sin aguijón.....	14
2.3 <i>Scaptotrigona mexicana</i>	14
2.4 Nido	15
2.5 Castas	16
2.6 Fisiología olfativa	18
2.7 Clasificación de moléculas asociadas a los receptores de olor	19
2.8 Genes que codifican para proteínas OBPs y CSPs.....	20
2.9 Métodos de estudio moleculares para identificación de receptores de olores	20
2.10 Extracción de ARN y Retrotranscripción	21
2.11 Extracción de ADN.....	21
2.12 Reacción de cadena polimerasa de punto final (PCR)	21
2.13 Identificación a través del marcador Citocromo Oxidasa I (COI)	22
2.14 Análisis filogenético	23
III. ANTECEDENTES.....	24
IV. OBJETIVOS	27
4.1 General.....	27
4.2 Particulares.....	27
V. HIPÓTESIS	27
VI. MÉTODOS	28

6.1 Área de Estudio	28
6.2 Muestras de estudio.....	28
6.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	29
6.4 Extracción de ADN.....	30
6.5 Electroforesis	31
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final	31
6.7 Clonación de productos de PCR	32
6.8 Purificación de Productos de PCR a partir de geles de agarosa	32
6.9 Purificación de Productos de PCR con amplicones específicos	33
6.10 Secuenciación y Análisis Bioinformático	34
6.11 Realización de Dendrogramas	34
VII. RESULTADOS	35
7.1 Extracción de Ácidos Nucleicos (ARN y ADN)	35
7.2 Identificación de especie mediante citocromo oxidasa I (CO1)	37
7.3 Detección de genes OBPs y CSPs en ADNc y ADN genómico.....	38
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES.....	51
X. RECOMENDACIONES.....	52
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en este estudio.	32
Cuadro 2. Parámetros de pureza calidad de ARN de las diferentes muestras de <i>Scaptotrigona mexicana</i> (guardianas, forrajeras, nodrizas) y de <i>Apis mellifera</i>	35
Cuadro 3. Parámetros de calidad de pureza de ADN de las diferentes muestras de <i>Scaptotrigona mexicana</i> (guardianas, forrajeras, nodrizas).	36
Cuadro 4. Especies relacionadas con <i>S. mexicana</i> mediante <i>cox1</i>	38
Cuadro 5. Amplificación por PCR de cada muestra a partir de ADN y ARN	39
Cuadro 6. Muestras de <i>Scaptotrigona mexicana</i> seleccionadas para secuenciamiento	40
Cuadro 7. Secuencias obtenidas de los transcritos y número de acceso designado en el GenBank. (- = no se obtuvo amplicón, += se obtuvo amplicón)	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del estado de Chiapas en donde se encuentra ubicado El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula (Coneval, 2010).	28
Figura 2. Extracción de RNA en gel de agarosa 1.2%, TBE1X, 80V/40 min.....	36
Figura 3. Extracción de ADN en gel de agarosa 0.8%, TBE1X, 80V/40 min. Guardianas (G), Forrajeras(F), Nodrizas(N).....	37
Figura 4. Amplificaciones de ADN mediante citocromo oxidasa I a partir de ADN de Guardianas. PCR con gradiente de temperatura indicado para cada amplicón....	37
Figura 5. Diferentes tamaños de amplicones obtenidos a partir de ARN y ADN, de las diferentes castas.	40
Figura 6. Árbol filogenético CSP2 de la casta forrajera. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo JTT basado en la matriz de distancias. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11. Este análisis involucró 7 secuencias con un total de 92 aminoácidos cada una.	42
Figura 7. Árbol filogenético de CSP6 de la casta guardianas. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo JTT basado en la matriz de distancias. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11. Se analizaron 6 secuencias de 125 aminoácidos cada una.	43
Figura 8. Árbol filogenético OBP4 de la casta forrajeras. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo JTT basado en la matriz de distancias. Se utilizaron 7 secuencias de 118 aminoácidos cada una. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11.....	44
Figura 9. Árbol filogenético OBP8 de las castas forrajeras y guardianas. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Whelan and Goldman basado en la matriz de distancias. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas, de 8 secuencias con 120 aminoácidos cada una. Los análisis se	

realizaron en el software MEGA 11..... 45

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de DNA del gen OBP8 en Nodrizas y Guardianas de *S. mexicana*, con *A. mellifera* y *M. scutellaris*. Este alineamiento se generó con el algoritmo clustal W en el software Snapgene v. 8.0.3 Con color rojo se resaltan las diferencias entre las secuencias..... 49

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de Proteína del gen OBP8 en Nodrizas y Guardianas de *S. mexicana*, con *Apis mellifera* y *M. scutellaris*. Este alineamiento se generó con el algoritmo clustal W en el software Snapgene v. 8.0.3. Con color rojo se resaltan las diferencias entre las secuencias..... 50

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Julio César Rojas León. Gracias por compartirme sus conocimientos sobre insectos y guiarme sobre ello. Por motivarme y plantar esa semilla de la curiosidad para seguir aprendiendo. Por confiar en mi desde el primer día, siempre estaré agradecido por brindarme su apoyo.

A mis asesores, el Dr. Javier y la Dra. Karina por haberse tomado el tiempo de revisar el trabajo, sus observaciones y comentarios, los cuales fueron de mucha ayuda para mejorarlo.

Al laboratorio de biotecnología ambiental y agroecológica, y a su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de sus instalaciones para poder hacer el uso de las mismas.

A mis compañeros de Ecosur, Jordán, Luis, Daniela y Yaneth, por brindarme su apoyo y amistad durante mi estancia, hicieron que todo fuera más divertido.

A la Mtra. Vero y al Mtro. David, muchas gracias por confiar en mí y motivarme siempre a seguir aprendiendo, gracias por su paciencia y entrega, por inspirarme y motivarme para sacar siempre lo mejor de mí, por cuestionarme y hacerme salir de esa zona de confort, a no darme por vencido cuando las cosas salen mal, por brindarme su amistad, apoyo incondicional y cariño, por las risas y los buenos momentos, mucho de esto es gracias a ustedes, los quiero y los estimo.

A mis amigos de carrera, Belén, Pedro y Molano, hicieron que la carrera fuera más divertida y menos pesada, gracias por las risas, los desvelos, palabras de motivación y constante apoyo.

A mis amigos Pablo, Arturo, Natalia, Alicia y Esmeralda, por siempre confiar en mí y decirme palabras de aliento, por alegrarse por mis logros como si fueran suyos.

A mis hermanas, Angie y Mayra, por brindarme palabras de apoyo cuando más lo necesitaba, por siempre escucharme y estar para mí, las quiero.

A mi mamá por enseñarme a perseguir mis sueños, por ser mi pilar, mi apoyo y por creer siempre en mí, eres mi mejor maestra, te amo.

A mi padre por inculcarme que con esfuerzo y dedicación podemos lograr lo que nos propongamos, a no desistir cuando las cosas se pongan difíciles, tus consejos siempre me guían y tus palabras me dan fortaleza, te amo.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mi familia, quienes me han apoyado a lo largo de este camino, los amo y sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A mis hermanos, Angie, Mayra, Ricardo, Tadeo y Leo, por sus palabras de motivación cuando más lo necesitaba.

A mis padres, Noé y Virginia, gracias por su apoyo incondicional durante este tiempo, siempre estaré agradecido con ustedes, mi respeto y admiración por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera lograr esto. Ustedes son el claro ejemplo que con esfuerzo y dedicación podemos cumplir nuestras metas, este logro es de todos. Los amo con todo mi corazón.

RESUMEN

Las abejas poseen gran capacidad de comunicación entre ellas y poder discriminar a otras abejas, insectos y olores; para interpretar estas señales, los insectos utilizan una variedad de componentes moleculares que se centran en varias familias de proteínas receptoras quimiosensoriales que se encuentran en las neuronas olfativas por lo cual la presente tesis busca identificar la presencia de los diferentes quimiosensores y proteínas de odorantes relacionados a los receptores de olor mediante técnicas moleculares. En este trabajo se realizaron extracciones de ARN Y ADN, en subcastas, como guardianas, nodrizas y forrajeras, para identificar los CSPs (proteínas quimiosensoras) y OBPs (proteínas de unión a los odorantes), obteniendo variaciones en la cantidad de proteínas presentes en algunas subcastas, sin embargo, para tener una idea clara sobre nuestros primers, se tiene que hacer un diseño específico de primers para así tener la certeza de que estamos obteniendo el fragmento deseado, sin embargo, este trabajo nos da un acercamiento para poder comprender molecularmente como esta orquestado el sistema olfativo de *Scaptotrigona mexicana*.

Palabras clave: OBPs, CSPs, ADN, ARN.

I. INTRODUCCIÓN

El éxito de los insectos sobre otros animales se debe, en parte, a un elemento fisiológico clave para su supervivencia y reproducción: un sofisticado sistema olfativo. El olfato se orchestra en varios niveles, comenzando con la recepción de olores en la periferia, el procesamiento de señales en los lóbulos antenales, la integración del olfato y otras modalidades sensoriales en los centros de procesamiento superiores del cerebro y, en última instancia, la traducción de señales olfativas en el comportamiento (Leal, 2013).

Para interpretar estas señales, los insectos utilizan una variedad de componentes moleculares que se centran en varias familias de proteínas receptoras quimiosensoriales que se encuentran en las neuronas olfativas. Estas últimas se alojan en una variedad diversa de estructuras parecidas a pelos llamadas sensilas, que se distribuyen de forma no aleatoria en las antenas, los palpos maxilares y los labios. El número y el tipo de sensilas presentes en los apéndices quimiosensoriales varían según la especie, así como de la etapa de desarrollo y el sexo (Suh *et al.*, 2014).

Las familias de proteínas receptoras incluyen receptores de olores, receptores ionotrópicos y receptores gustativos sensibles al dióxido de carbono. Los insectos expresan familias divergentes de genes de receptores de olores, aunque la cantidad de receptores diferentes en una especie determinada varía entre los grupos de insectos, desde 10 hasta varios cientos (Fleischer *et al.*, 2018).

Las proteínas ligadoras de odorantes (OBPs, odorant binding proteins) (son proteínas solubles, las cuales se encuentran en el lumen de las sensilas olfativas en donde se excretan a través de células auxiliares. Por otro lado, las proteínas quimiosensoras (CSP, chemosensing proteins) pertenecen a otra familia, las cuales están involucradas en la detección de semioquímicos o compuestos que afectan la fisiología o comportamiento de los organismos (Zhang

et al., 2012).

Los receptores de olores funcionan junto con los correceptores de olores para determinar la especificidad y la sensibilidad de la recepción olfativa. Así, los receptores de olores juegan un papel importante en el sistema olfativo de los insectos. Por ejemplo, las abejas dependen en gran medida del olfato para varios aspectos de su vida, incluida la búsqueda de alimento, el apareamiento, la navegación y las interacciones sociales. Para ello, su sistema olfativo se ha adaptado para detectar una gran cantidad de moléculas y mezclas complejas, detectando así muchos olores diferentes. Las abejas son recolectores generalistas, es decir, no están atadas a una sola especie de flor para sobrevivir. En consecuencia, su circuito olfativo no está optimizado para detectar la fragancia de unas pocas flores específicas, sino para detectar, discriminar y aprender prácticamente un número infinito de olores (Paoli y Galizia, 2021).

La abeja melífera europea, *Apis mellifera*, es uno de los animales más estudiados y utilizados por el ser humano; sin embargo, existen más de 20 mil especies de abejas productoras de miel. Cuando se habla de abejas y polinización, la abeja melífera es un claro ejemplo y es la que se conoce, la que está más monitoreada, pero las otras nos deben tener atentos porque son las que van a cumplir estas funciones, principalmente en la gran variedad de ecosistemas naturales (Anguiano, 2022).

Los meliponinos (Meliponini) son una tribu de abejas, himenópteros apócritos de la familia Apidae; estas son conocidas vulgarmente como abejas sin aguijón, pegones, aricas, guaro, matoa, matajey (en Venezuela), seño (en Panamá), angelitas (en Colombia) o Meliponas (Costa Rica, México). Son abejas sociales que viven en colonias permanentes como las abejas europeas (Grüter, 2020). Estas abejas sin aguijón se distribuyen a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, desde los 30° de latitud norte hasta los 30° de latitud sur, en Centro y Sudamérica, África, Asia y Australia (Michener, 2000).

Dentro de esta tribu podemos encontrar a *Scaptotrigona mexicana*, la cual es una abeja pequeña, de color negro, que construye sus nidos en los huecos de troncos o ramas, estos nidos se caracterizan por tener una entrada de cera en forma de trompeta. Poseen comportamiento social. Carecen de aguijón como todos los miembros de la tribu Meliponini; sin embargo, tienen mandíbulas poderosas y pueden morder (Padilla-Vargas *et al.*, 2014). No obstante, a pesar de que *Scaptotrigona mexicana* es una especie estudiada en diferentes ámbitos de su historia natural, no se tiene un registro de la caracterización de los receptores de olores. Por ello la importancia del presente trabajo radica en determinar la presencia de genes de los receptores como un primer paso para entender las bases moleculares de la recepción olfativa de esta especie de abeja sin aguijón.

Las abejas cumplen una de las tareas primordiales en el medio ambiente, son uno de los polinizadores más importantes ya que contribuyen a preservar la biodiversidad en ecosistemas forestales y mantienen el equilibrio de los mismos, ya que la pérdida de biodiversidad se vería afectada si las abejas desaparecieran o se vieran minimizadas ocasionando una catástrofe ambiental. Las principales amenazas de *S. mexicana* son el cambio climático, cambio de uso de suelo, uso de pesticidas, la falta de apoyo hacia a los meliponicultores y el desconocimiento del valor comercial de su miel (Sánchez, 2024). Por consiguiente, estudiar la olfacción de esta especie es fundamental para entender su comportamiento y diseñar medidas para protegerlas. El comportamiento y por ende la olfacción puede variar entre las castas de esta especie de abeja. Sin embargo, se desconoce si hay una variación de OBPS y CSPs en esta especie con respecto a las castas que conforman el nido; dado que esta especie ha sido poco estudiada y no se ha reportado información molecular de este tipo.

Mucho del conocimiento sobre el sistema olfativo de las abejas viene de estudios realizados en la abeja melífera y poco se conoce sobre el olfato de los otros tipos de abejas. El presente trabajo busca identificar dos tipos de moléculas

asociadas a los receptores de olores: OBPs y CSPs de las diferentes castas de la abeja *Scaptotrigona mexicana*. Debido a la importancia biológica y económica que tienen las abejas, es fundamental conocer un poco más sobre su complejo sistema olfativo; poco se ha estudiado sobre dichos mecanismos en todas las especies, y la generación de nuevo conocimiento puede sumar a los esfuerzos de conservación de *Scaptotrigona mexicana* y las demás especies pertenecientes a los meliponinos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Abejas

De acuerdo con Miranda *et al.* (2014), se conocen como abejas a un grupo de familias del orden Hymenoptera conocido como “Apiformes” o “Antophila”, estas se diferencian de otros insectos del mismo orden por tener pelos ramificados o plumosos en alguna parte de su cuerpo, y porque el basitarso de la pata posterior es más ancho que los tarsos que le siguen. Muchas de las abejas son más corpulentas y peludas que las avispa, esto hace que puedan diferenciarse fácilmente de éstas, aunque, algunas abejas parásitas son esbeltas y carecen de pelos. Desde el punto de vista de comportamiento, las abejas difieren de otros Himenópteros ya que éstos dependen del polen como fuente de proteína para alimentar a sus crías, así que se podrán encontrar una avispa o una hormiga alimentándose de néctar de una flor, pero no de su polen.

La palabra abeja como comúnmente se conoce, lo reciben los insectos que son pertenecientes a la superfamilia Apoidea del orden Hymenoptera (alas membranosas). En la actualidad, existen poco más de 20 mil especies de abejas en el mundo, están clasificadas en nueve familias, dentro de las cuales seis están presentes en México, con más de 1 800 especies descritas. Dentro de la familia Apidae, se clasifican las abejas del género *Bombus* (abejorros), *Melipona*, *Trigona*, *Euglossa* y *Apis*, siendo esta última la más conocida por sus características de producción por medio de la abeja *Apis mellifera* (Novoa-Guzmán y Correa-Benítez, 2012).

Las abejas son insectos importantes, ya que proveen múltiples beneficios a los humanos. Algunas producen miel y otros productos comercializables que representan la actividad económica de un sector importante de la población en este país. Sin embargo, su principal beneficio es intervenir en la reproducción de las plantas con flor y por eso son indispensables para mantener la salud de muchos ecosistemas. En los últimos años, principalmente por acciones humanas, su población se ha visto diezmada, lo que representa una seria amenaza ecológica global. Una legislación adecuada puede ayudar a protegerlas, procurar el bienestar

del medio ambiente y al mismo tiempo fomentar oportunidades de crecimiento económico (Heiblum, 2019).

2.2 Abejas sin aguijón

La tribu Meliponini compete al grupo de abejas corbiculadas de la subfamilia Apinae y agrupa todas aquellas abejas que son conocidas como “abejas sin aguijón” encontradas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Roubik, 2010). El tamaño puede variar desde aproximadamente 2 mm (*Leurotrigona pusilla*, Moure *et al.*, 1988) hasta 1.5 cm (género *Melipona*, Michener, 2000). Junto a *Apis mellifera*, son las únicas que disponen de un comportamiento altamente social (eusocialidad). Se pueden encontrar varios cientos de especies, sin embargo, el número real es difícil de establecer debido a la abundancia de especies crípticas (Nates-Parra, 2001) y razas geográficas; de las cuales muchas veces estas difieren entre sí en caracteres muy superficiales.

Las abejas sin aguijón están caracterizadas principalmente por tener aguijón reducido, alas con venación débil o reducida y ojos desnudos (excepto en el género *Trichotrigona*, Nates-Parra, 2001); además construyen nidos muy característicos para albergar a sus crías, cuentan con entradas generalmente conspicuas, las cuales, en algunos casos, sirven para identificar especies.

2.3 *Scaptotrigona mexicana*

Scaptotrigona mexicana es una especie eusocial; esta abeja cuenta con mecanismos sofisticados de comunicación (Sánchez *et al.*, 2007). Su distribución va desde Chiapas, la costa del Golfo de México, hasta Tamaulipas. Se pueden encontrar tanto en tierras bajas con Bosque Tropical Perennifolio como en las laderas de las montañas en Bosques de Pino y Mesófilo de Montaña, a una altitud que oscila alrededor de los 1 000 m sobre el nivel del mar. Se pueden encontrar en forma discontinua al sur del Estado de México, en los alrededores de Ixtapan de la Sal, y las montañas cercanas a Zihuatanejo en el extremo más al Oeste de la Sierra Madre del Sur en Guerrero (Ayala, 1999). La miel de las abejas meliponas es

utilizada por los mayas debido a sus propiedades, la cual ayuda al fortalecimiento del sistema inmunológico, la mejora digestiva, dolores de cabeza, quemaduras, inflamación de encías, entre otros padecimientos (Huicochea, 2011).

2.4 Nido

Quero (2004) menciona que el nido es el lugar del enjambre (abejas), es decir, la "casa", la cual les da alojamiento y abrigo, manteniendo un ambiente interno aislado del exterior. Por otro lado, sirve como lugar de cría y almacén donde se acumulan los alimentos y reservas para el invierno. De manera natural el nido de las abejas suele ser un agujero en árboles viejos, piedras, etc. Las propias abejas logran acondicionarlo fabricando los panales de cera que utilizan tanto para la cría como de almacén. El ser humano, para trabajar mejor las colonias de abejas y considerando que la actividad de las abejas no se ve influida por el nido en el que se aloje, fabricó nidos artificiales, denominados colmenas. Lo que distingue una colmena doméstica con otra silvestre se encuentra en la forma externa del nido, siendo la estructura interna y la población de insectos y su comportamiento idéntico en ambas.

Para el desarrollo de la vida social, el primer elemento necesario es la existencia de un nido, en el cual se aloje la colonia de insectos. En su interior el nido está constituido por láminas verticales de cera paralelas, llamadas panales. En los nidos naturales, las abejas son capaces de crear estos panales y los pegan a la parte superior del nido. En las colmenas artificiales, el ser humano proporciona estos panales. Los panales mantienen una separación entre sí de forma constante, e igual al grosor de dos abejas (paso de abejas), de forma que las abejas pueden caminar por la superficie de estos sin estorbarse (Quero, 2004).

La naturaleza aislante e impermeable de la cera con la que están fabricados contribuye al aislamiento térmico y la humedad del nido, mientras que el conjunto de panales paralelos, por su disposición, se divide el nido en cámaras de aire, que logran un aislamiento térmico del exterior, y permiten el mantenimiento de una temperatura constante en el centro (cámara de cría) de 33 a 34 °C. De igual forma,

sirven para acumular los alimentos: néctar y polen para la alimentación de las larvas, o miel como reserva para el invierno. La estructura de los panales es compleja; ya que están formados por una doble capa de celdillas opuestas, de forma de prisma hexagonal cuya base es una pirámide (Quero, 2004).

Las aperturas de los prismas se abren a ambos lados de cada panal, ya que estos prismas están ligeramente inclinados, de forma que su contenido no se derrame cuando estén llenos de néctar. El perímetro hexagonal de las celdillas es el que concede mayor ocupación de superficie del panal, con el menor gasto de material en la formación de las paredes y formación de estructura más robusta (Quero, 2004).

2.5 Castas

Las abejas de todas las razas poseen una jerarquía definida (Quero, 2004), todo enjambre lo forman tres tipos de individuos o castas (Cepero, 2016), diferenciadas por su morfología y fisiología y por su papel biológico en la colmena (Zarco, 2014).

Estas castas tienen una población cuya cantidad fluctúa en dependencia de las condiciones de alimentación disponible (Lara, 2019).

Abeja reina: es la única hembra fértil y fecunda, por lo que se convierte en el centro y vida de la colmena (Ruiz, 2003). La reina se distingue del resto por su longitud, que es mayor al de las obreras, y por las alas, que a pesar de ser del mismo tamaño que las de una obrera, se ven cortas con relación al cuerpo (Lara, 2019). Poseen aguijón, pero solo lo usan para luchar contra otras reinas, cuando se desarrollan las demás larvas reales, y si surgen dos reinas en el mismo momento, se desarrolla un combate a muerte, donde la vencedora se convierte en la única reina (Herrero-García, 2004). La función biológica de la abeja reina en la colmena es la reproducción y cohesión del enjambre, controla a la población mediante feromonas, que también se usan para inhibir la fertilidad de las obreras (Lara, 2019).

Abeja obrera: son hembras que constituyen casi la totalidad de la población de la colmena y cumplen la mayoría de las funciones, son el elemento productor y

directivo en el enjambre (Rubiano, 2016). Se nombran obreras, porque son las que realizan el trabajo, producen miel y cera, fabrican panales, colectan polen, limpian la colmena, mantienen el orden. Son infecundas y también son las más pequeñas del enjambre (Rodríguez, 2012). Estas cumplen diferentes tareas en dependencia de la edad. Por lo que según la secretaria de Agricultura y Ganadería (2005), podemos encontrar a las obreras realizando diferentes tipos de tareas:

- Nodrizas: Estas abejas alimentan a las larvas de la colmena, con una sustancia glandular lechosa mejor conocida como jalea real y más tarde con una mezcla de miel y polen llamada sustancia blanca (Salas, 2000).
- Aseadoras: cumplen con la función de limpiar la colmena, sacando las larvas y abejas muertas, también eliminan de la colmena cualquier objeto o cuerpo extraño (Salas, 2000).
- Ventiladoras: se encargan de ventilar la colmena para mantener estable la humedad y la temperatura interna. Las crías para poder desarrollarse necesitan temperaturas entre 34 y 36 °C y humedad de 65 a 75 %.
- Constructoras: fabrican panales. La construcción de panales consta de dos etapas: la primera etapa es el operculado a cargo de las obreras constructoras jóvenes y la segunda etapa consta de la construcción de panales a cargo de las obreras más viejas. La cera que se utiliza para la construcción de estos panales es producida por el cuerpo de las abejas (Salas, 2000).
- Guardianas: protegen la colmena. Es un periodo previo al pecoreo, su función es evitar la entrada de abejas de otras colmenas, insectos y otros animales ajenos a la colmena.
- Pecoreadoras: el pecoreo radica en salir de la colmena a colectar polen, néctar, agua y propóleo. El polen y el propóleo lo acarrean en una cestilla ubicada en las patas traseras y el néctar en su estómago (Salas, 2000).
- Exploradoras: exploran fuentes de alimento y nuevas casas, son las obreras más viejas de la colmena. Cuando localizan alimento, agua o nueva morada, regresan a la colmena y avisan a sus semejantes por medio de danzas.

- Abeja Zángano: son los machos de la colmena, nacen de un huevo no fecundado. Cumplen una doble función, fecundar a la reina y proporcionar calor al nido de cría (Herrero-García, 2004). Su vida es efímera, estos dependen en su totalidad de las obreras para su alimentación, además de depender del clima y la calidad del alimento para su desarrollo (Lara, 2019) Viven aproximadamente tres meses, pero cuando la colonia no dispone de un suministro adecuado de alimentos, son expulsados de la colmena y las obreras van tras ellos, realizando la matanza masiva de los zánganos, para administrar las reservas (Lara, 2019).

2.6 Fisiología olfativa

Padilla *et al.*, (2007) mencionan la importancia de las antenas en las abejas, ya que estas juegan un papel muy importante en el papel de la comunicación. En ellas se localizan una gran parte de los receptores de olfato y gusto. El sentido del olfato es fundamental en la búsqueda de alimento. Por mencionar ejemplos se puede decir que una planta en floración puede producir como media entre 40 y 50 compuestos volátiles diferentes que determinan su “olor”.

Las sensilas son órganos receptores que se encuentran en la superficie de las antenas, clasificándose en siete tipos diferentes. El grupo principal es el formado por las sensilas tricoideas. Para hacer un símil podemos decir que son estructuras muy parecidas a los pelos y en la antena de una obrera hay unas 3 000 sensilas de este tipo (Padilla *et al*, 2007).

El tamaño de las sensilas tricoideas permite realizar registros electrofisiológicos, los cuales han demostrado su papel como receptores olfativos. Se ha demostrado que estos receptores son sensibles a diferentes componentes producidos en las glándulas de Nasanov, así como a un amplio rango de olores de las plantas y flores (Galizia, 2021).

El sistema olfativo es una red neuronal compleja organizada en múltiples neuropilos altamente interconectados. Cada uno de ellos es un circuito neuronal complejo en sí mismo que comprende miles de neuronas con interacciones de retroalimentación y retroalimentación dentro y entre los neuropilos. Así, el correlato

neural de un estímulo olfativo es el resultado del procesamiento local dentro de los neuropilos olfativos y de las interacciones globales entre los neuropilos (Paoli y Galizia, 2021).

Guidobaldi y Guerenstein (2012) explican que la función del sistema olfativo a nivel periférico es informar al cerebro en fracciones de segundo, sobre la calidad, cantidad y características temporales del estímulo olfativo. Se debe informar sobre la identidad del olor, si es un compuesto simple o una mezcla de olores, y en este caso no solo las identidades de los componentes y las proporciones en los que se encuentran. Por otro lado, se debe informar la concentración absoluta de los compuestos percibidos y finalmente si el estímulo se presenta en forma continua o intermitentemente, y en este último caso, con qué frecuencia.

2.7 Clasificación de moléculas asociadas a los receptores de olor

Cuando hablamos de OBPs y CSPs, nos referimos a los genes de proteínas asociadas a los receptores de olor, estos receptores se encuentran en los seres vivos, los cuales ayudan a poder ejecutar acciones referentes a los olores, tales como los insectos. Es muy importante saber que los insectos dependen mucho de su sistema olfativo, en el cual los OBPs o CSPs, entregan una molécula hidrofóbica a los receptores de olor, no obstante, cuando el odorante entra al sistema olfativo, el odorante es encapsulado por el OBPs o CSPs, este es hidrofílico con un centro hidrófobo para así poder llevar el odorante al receptor y enviar la señal al cerebro. Una vez haya llegado al receptor, esta es eliminada ya sea por una trampa molecular o una reacción química. Sin embargo, su expresión en tejidos no olfativos nos da indicios que también pueden funcionar como portadores generales de otros procesos fisiológicos y de desarrollo (Forêt y Maleszka, 2006).

Los CSPs regularmente se expresan en otras partes del cuerpo, sin embargo, están especializadas en las glándulas o células secretoras, los OBPs y CSPs, se distribuyen en diferentes estructuras quimiosensoras y otras partes del cuerpo. Su expresión es vital, durante el ciclo de vida en insectos sociales, debido a que su presencia en las diferentes castas proporciona información de gran

utilidad para así poder comprender los papeles fisiológicos de estas proteínas solubles en la comunicación química (Calvello *et al.*, 2005).

2.8 Genes que codifican para proteínas OBPs y CSPs

Calvello *et al.* (2005), nos dicen que hasta el momento se conocen pocas proteínas que han sido identificadas en insectos sociales, sin embargo, el estudio más extenso se ha realizado en la abeja *Apis mellifera*, en la cual se han reportado cinco genes que codifican para la familia de OBPs (ASP1: Danty *et al.*, 1999; ASP2: Briand *et al.*, 2001; ASP4: AAL60417; ASP5: AAL60422; ASP6: AAL60421), en el caso de los CSPs, existen seis genes que son codificantes (ASP3c: Briand *et al.*, 2002; W-AP1: Kamikouchi *et al.*, 2004; BB17:BI510373; AmelCG4, AmelCG5, AmelCG6: Wanner *et al.*, 2004). En la avispa *Polistes dominulus* se han identificado OBPs y CSPs, no obstante, no se encontraron secuencias ortólogas de la abeja de la miel. Curiosamente, la CSP de *P. dominulus* fue encontrada como específica de antenas, mientras que todos los estudios previos en otras especies de insectos habían demostrado que las OBPs solo se encuentran en las antenas, mientras que los CSP se habían detectado en diferentes órganos.

2.9 Métodos de estudio moleculares para identificación de receptores de olores

Se ha observado que en el sistema social de la colmena hay cambios hormonales que explican el por qué no todas las abejas se desarrollarán a través de las tareas en el orden común; por lo cual hacer un estudio molecular en los receptores de olor es importante debido a que gracias a estas técnicas podemos ver si existe alguna variación entre los individuos que conforman un nido de abejas sin aguijón, ya que al estudiar diferentes castas podemos identificar si las abejas tienen más sensibilidad a los odorantes en comparación a otras por las actividades que realizan (Mortensen *et al.*, 2013).

2.10 Extracción de ARN y Retrotranscripción

La obtención de ARN de calidad es la base para el desarrollo de técnicas moleculares, si no, podría complicar seriamente los resultados de procedimientos posteriores a la extracción, que necesitan intensa labor, tiempo adicional y altos costos. Extraer ARN no siempre es una tarea sencilla, esta molécula es menos estable que el ADN y la presencia de contaminantes como ARNsas, proteínas, polisacáridos y ADN genómico pueden desafiar su obtención (Zakaria *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la presencia de estos contaminantes puede interferir con la amplificación de los ácidos nucleicos (Vermeulen *et al.*, 2011).

A partir de la extracción de ARN se logró sintetizar ADNc para buscar los transcritos de OBPs y CSPs ligadas a los receptores de olor expresados en nuestro sistema de estudio, ya que los cebadores utilizados fueron sintetizados de las regiones codificantes de cada gen.

2.11 Extracción de ADN

La extracción de ADN es una técnica con la cual se obtiene una muestra de ADN genómico de células nucleadas, preservando la integridad y obteniendo un producto limpio de contaminantes, que permiten usarse para cualquiera de las estrategias que se utilizarán para la secuenciación de genes (Cruz-Enríquez *et al.*, 2021). Al obtener ADN, nos da el punto de partida para la mayoría de los análisis genéticos; incluso obteniendo bajas cantidades de ADN, es posible amplificar genes específicos *in vitro* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) (Cervantes, 2003).

2.12 Reacción de cadena polimerasa de punto final (PCR)

De acuerdo con Reece *et al.* (2011), la PCR es una técnica utilizada normalmente en laboratorio, la cual tiene como objetivo hacer muchas copias de una región de interés de ADN. El propósito de la PCR es poder producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda examinarse o usarse de alguna otra manera. Un ejemplo de esto es el ADN amplificado por PCR, este se puede secuenciar,

visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido para otros experimentos. Los componentes indispensables para una reacción de PCR son la *Taq* polimerasa, cebadores o primers, ADN molde y nucleótidos (los bloques básicos del ADN). Los reactivos se sitúan en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN. La PCR se compone de tres pasos: La desnaturalización que se eleva a una temperatura de 96 °C, en la cual la reacción se calienta bastante, a tal punto de poder separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para dar el siguiente paso, el cual es el alineamiento, la temperatura oscila entre los 55-65 °C. En este paso la reacción se somete a un cambio de temperatura para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla. Como último paso, se hace una extensión final, en la cual la temperatura de la reacción se eleva a 72 °C con la finalidad de que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y se sinteticen así nuevas cadenas de ADN.

2.13 Identificación a través del marcador Citocromo Oxidasa I (COI)

Una de las principales problemáticas con la que cuentan los biólogos son el número desconocido de especies alrededor del mundo y la extinción de varios taxones, incluyendo los que no están descritos (Frankham *et al.*, 2004). Sin embargo, estas problemáticas han hecho que los investigadores busquen técnicas fiables que sean de bajo costo para poder complementar la identificación y descubrimiento de especies basándose en las principales características morfológicas. Se emplea una nueva técnica molecular, denominada código de barras, la cual se basa en la secuencia del gen mitocondrial del citocromo oxidasa I (COI), (Hebert *et al.*, 2003). Esta región se ha empleado con éxito ya que se ha logrado identificar una gran variedad de taxones y esto se ha aplicado para todas las formas de vida. Los cebadores universales o casi universales se diseñaron a partir de secuencias de COI conservadas de taxones lejanamente relacionados.

2.14 Análisis filogenético

De acuerdo con Peña (2011), la finalidad de realizar estos análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) con esto se logra evidenciar la historia evolutiva de un grupo taxonómico de interés. El objetivo final es un árbol filogenético reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas resultan de "descendencia con modificación" (Darwin, 1859) entre especies ancestrales y descendientes. Una forma de cumplir con este objetivo es por medio de la búsqueda de indicios de descendencia con modificaciones en las especies, ya sea caracteres morfológicos o moleculares. Hablando de filogenética, el grupo que contiene la especie ancestral, donde se manifestó este estado de carácter, y todas sus especies descendientes se denomina por clado o grupo monofilético, igualmente, parte fundamental de las prácticas filogenéticas son las relaciones ancestro–descendientes la cual se estima a partir de los caracteres estudiados, y cuya relación se trata de representar en los árboles filogenéticos.

III. ANTECEDENTES

Suh *et al.* (2014) expresan que la señalización olfativa es un componente crucial en la historia de vida de los insectos. El desarrollo de mecanismos precisos y paralelos para analizar la enorme cantidad de información química del medio ambiente y otras fuentes ha sido esencial para su éxito evolutivo. Son las neuronas sensoriales olfativas las que reconocen y discriminan una amplia gama de sustancias químicas volátiles que se originan en presas, plantas huésped y congéneres. Se encargan de transmitir información sobre las fuentes de alimentos, sitios de oviposición y parejas al cerebro, provocando comportamientos evocados por olores distintos.

Sin embargo, se deben realizar estudios enfocados a otras ramas; por lo cual Fleischer *et al.* (2018), consideran que las investigaciones de las últimas décadas han avanzado sobre el conocimiento de las bases moleculares que subyacen en la recepción de compuestos de olor y mecanismos de transducción de señales en las neuronas sensoriales olfativas. Se ha logrado un gran progreso en el estudio del olfato de insectos, impulsado por la genómica basada en las herramientas de bioinformática y los rápidos avances en los análisis funcionales.

El lenguaje químico en los insectos es muy influyente, ya que mediante esto encuentran alimento, discriminan a sus depredadores y buscan el apareamiento con otros ejemplares de su misma especie. Debido a esto, Balbuena *et al.* (2024), mencionan que la captación de información química del medio ambiente es crucial para la supervivencia y reproducción de los insectos; además de las interacciones sociales (reina-obrera, interacciones huésped-parásito, procesamiento neuronal, etc.). La recepción quimiosensorial ocurre principalmente en las antenas y parte del aparato bucal de los insectos, cuando el estímulo entra en contacto con los quimiorreceptores ubicados dentro de las sensilas. Por ejemplo, los genes de receptores quimiosensoriales han sido estudiados en himenópteros sociales como hormigas, abejas y avispas. Sin embargo, aunque las abejas sin aguijón son un grupo representativo de abejas eusociales, se desconoce sobre sus propiedades

odoríferas, gustativas y ionotrópicas.

El sistema olfativo de los insectos capta dos tipos de proteínas que están asociadas a este, las proteínas de unión a los odorantes y las proteínas quimiosensoras que se encargan de transportar los odorantes a los receptores de olor; a lo cual, Calvello y colaboradores (2005), mencionan que la expresión de proteínas quimiosensoras (CSPs) y las proteínas de unión a los odorantes (OBPs) en individuos de diferentes castas y edades se han monitoreado en tres especies de himenópteros sociales, en los cuales se realizaron las PCR con cebadores específicos y anticuerpos policlonales. En la avispa del papel, *Polistes dominulus*, los OBPs se expresan en antenas, alas y patas en todas las castas. Mientras que los CSPs se expresan constantemente en las antenas y en algunos casos también en las patas.

La recepción olfativa es fundamental para los insectos, ya que dependen en gran medida de ella, no obstante, no se le ha dado mucha importancia a este tipo de investigaciones en otros grupos. Paoli y Galizia, (2021) reportaron que, con menos de un millón de neuronas, la abeja *Apis mellifera* es capaz de realizar comportamientos complejos mediados por el olfato y proporciona un modelo ideal para investigar la neurofisiología del circuito olfativo y la base de la percepción y el aprendizaje olfativo. En ese trabajo, se revisaron los aspectos más fundamentales del olfato de la abeja: primero, se discutió qué olores dominan su entorno y cómo las abejas los usan para comunicarse y regular la homeostasis de la colonia; luego, se describió la neuroanatomía y la neurofisiología del circuito olfativo; finalmente, se exploraron los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la formación de la memoria olfativa.

A pesar de la gran cantidad de estudios en *A. mellifera*, es poca la información que se conoce sobre meliponinos; por lo que Carvalho *et al.* (2017) realizaron un estudio con *Melipona escutellaris*, utilizando dos ejemplares de cada casta (reina, obrera y macho recién emergido) y larvas predefecatorias. Se

diseccionó la cabeza de todas las muestras para posicionar mejor las antenas en el tubo del microscopio. En esta primera investigación basada en microscopía electrónica de barrido de la morfología, larvas y sensilas antenales en *M. escutellaris* mostraron que, además de las diferencias entre machos, obreras y reinas en sus sensilas antenales, las cabezas de las larvas tienen estructuras similares a las sensilas inmaduras que posiblemente indican una puerta de entrada para las feromonas y otras sustancias químicas del alimento de las larvas.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

- Determinar la presencia de genes (*OBPs* y *CSPs*) asociados a los receptores de olores en las diferentes castas de *Scaptotrigona mexicana*.

4.2 Particulares

- Identificar los genes *OBPs* y *CSPs* expresados en las diferentes castas de *Scaptotrigona mexicana*.
- Confirmar la identificación de *Scaptotrigona mexicana* mediante el marcador de citocromo oxidasa 1 (*CO1*).
- Analizar las diferencias entre las secuencias obtenidas de *OBPs* y *CSPs* entre castas con secuencias de bases de datos.

V. HIPÓTESIS

Los genes asociados a receptores de olores (*OBPs* y *CSPs*) se detectarán por rt-PCR punto final, y estarán presentes de manera diferencial en las castas de *Scaptotrigona mexicana*.

VI. MÉTODOS

6.1 Área de Estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Agroecológica (LaBTAA), el cual pertenece a los laboratorios institucionales; en este mismo se realizan investigaciones de diferentes indoles ya que es multidisciplinario, este se ubica en las instalaciones de El Colegio de la Frontera Sur, unidad Tapachula, Chiapas, México (Figura 1).



Figura 1. Mapa del estado de Chiapas en donde se encuentra ubicado El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula (Coneval, 2010).

6.2 Muestras de estudio

Se utilizaron ejemplares de la especie *Scaptotrigona mexicana* proporcionados por el laboratorio de abejas de El Colegio de la Frontera Sur, con la finalidad de conocer si existe variación de las proteínas (OBPs y CSPs) asociadas a los receptores de olor de las tres subcastas: guardianas, forrajeras y nodrizas. Para esto se empleó la metodología de Carvalho *et al.* (2017), para lo cual se diseccionaron las abejas, cortando tres cabezas de cada subcasta y guardándolas en tubos de 1.5 ml con solución RNA later (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) para conservarlas a -80 °C.

6.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo de las cabezas de las abejas por medio del kit de extracción Pure® Link RNA mini kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Se maceraron las muestras con un pistilo agregando 300 µl de buffer de lisis a cada tubo, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos. Se recuperaron 300 µl de muestra y se transfirieron a un tubo limpio al cual se le agregaron 300 µl de etanol frío. Se homogenizó la muestra por inversión y posteriormente se transfirieron 600 µl a la columna del kit. Se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm por 30 segundos, se desechó el filtrado y se reinsertó la columna en el tubo de colecta, se agregaron 700 µl del buffer wash I, para después centrifugar las muestras a 12 000 rpm por 30 segundos; se desechó el flujo y se reinsertó la columna en el tubo de colecta. A continuación, se agregaron 80 µl de DNAsa I para eliminar residuos de ADN que puedan contener las muestras, se incubaron las muestras por 15 minutos a temperatura ambiente; se agregó buffer wash I, posteriormente se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm por 30 segundos; se desechó el fluido de los tubos de colecta y se reinsertaron las columnas en los tubos de colecta, seguidamente se agregaron 500 µl de buffer wash II y se centrifugó a 12 000 rpm por 30 segundos. Se desechó el fluido de los tubos de colecta y se insertaron las columnas en tubos nuevos de 1.5 ml, se centrifugó a 12 000 rpm por dos minutos para eliminar el etanol residual, seguidamente se agregaron 55 µl de agua libre de RNAsas, se incubaron las muestras por cinco minutos a temperatura ambiente y se realizó una última centrifugación a 14 000 rpm por 1 minuto para eluir el RNA de la columna. Este se guardó a -80 °C.

El ARN aislado se transcribió inversamente a ADNc usando el kit de reactivos de Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific), agregando 4 µl de 5x reaction mix buffer, 2 µl de Maxima enzyme, 12 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl del templado de ARN, teniendo como volumen final 20 µl. Posteriormente, las muestras se metieron al termociclador para llevar a cabo la reacción de la transcriptasa inversa (RT-PCR), se utilizó el programa del fabricante con una temperatura de desnaturalización de 25 °C por 10 minutos, seguido de una

temperatura de alineamiento de 50 °C por 15 minutos, posteriormente la reacción se detuvo a 85 °C de durante cinco minutos, y se conservó a -20 °C hasta su uso posterior.

6.4 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de las abejas guardianas siguiendo el protocolo de DNeasy® Blood & Tissue Handbook de Qiagen. Se maceraron las muestras con la ayuda de un pistilo, posteriormente se agregó 180 µl de buffer ATL, seguido de 20 µl de proteinasa K, se le dio un pequeño vortex a la muestra para después incubarla por una hora a 56 °C en un thermomixer, seguido de esto se agregó 200 µl de buffer AL a la muestra, se centrifugó a 12 000 rpm por un minuto y se procedió a transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de etanol frío, se homogenizó por inversión y se transfirió a la columna del kit; como siguiente paso se colocó la muestra en una centrifuga a 8 000 rpm por un minuto, se desechó el flujo y se reinsertó la columna en un tubo nuevo de colecta, se realizó un primer lavado con buffer AW1 agregando 500 µl, seguido a esto se centrifugó la muestra a 8 000 rpm por 1 minuto, se desechó el flujo del tubo de colecta, se reinsertó la columna en un tubo nuevo de colecta y se hizo otro lavado con el buffer AW2 agregando 500 µl. Una vez agregado el buffer AW2 se centrifugó la muestra a 14 000 rpm por tres minutos, se desechó el flujo y se reinsertó en el tubo de colecta, consiguiente a esto se volvió a centrifugar la muestra a 14 000 rpm por tres minutos para secar la membrana; se insertó la columna en un tubo de 1.5 ml y se agregaron 55 µl de buffer AE, se incubó cinco minutos a temperatura ambiente. Como último paso se centrifugó la muestra a 8 000 rpm por un minuto para eluir el ADN y se guardó a -80 °C.

6.5 Electroforesis

Para verificar la calidad de la extracción se visualizaron las muestras de ADN y ARN en un gel de agarosa al 1.5%, una vez el gel polimerizado se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó TBE 1X hasta cubrirlo por completo. Posteriormente, al gel se le depositó en el primer carril 1.5 µl de marcador de peso molecular OminMARK (BH OneMark) 100 RTU (100-3 000 bps). Por cada 1 µl de buffer de carga (Blue/Orange loading dye), suplementado con Sybr Green I, se agregaron 5 µl de muestra. La mezcla homogenizada se colocó en diferentes pozos; el tiempo de corrida del gel fue de 80V por 40 minutos en la fuente de poder Power pack™ HC de Bio-Rad. El gel se visualizó en el transiluminador Kodak Gel Logic 200 Imaging System

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final

Una vez teniendo el ADNc listo de las muestras, se realizó una máster mix con los genes específicos de cada región a analizar, los cebadores son de origen de la abeja europea (*Apis mellífera*). Se utilizó un volumen final de 20 µl por muestra, la máster mix tenía una concentración de 1x y los cebadores utilizados estaban a una concentración final de 0.2 pM, para la PCR con los cebadores, se utilizaron 2 µl de ADNc, de igual forma se utilizaron 2 µl de ADN para las PCR de citocromo oxidasa I. En el siguiente cuadro se pueden ver los primers utilizados, secuencias, tamaño del producto de PCR (pb) y temperatura de alineamiento (Cuadro 1). Los primers para Csp y OBP utilizados fueron tomados del artículo Carvalho y colaboradores (2017), mientras que los de COI son los primers universales de Folmer y colaboradores (1994). Se verificaron mediante PCR in silico con sus genes blancos correspondientes utilizando el software SnapGene (www.snapgene.com).

Cuadro 1. Primers utilizados en este estudio.

Primers	Secuencias	Producto (Pb)	TaO
Csp2	Fw 5' GGAAACGGAAGAGACGCAAGCT 3' Rv 5' TTACGAAACTCCGGCATACTGCT 3'	351	50 °C
Csp6	Fw 5' ATGAAGATTATACTACCAAATATGATGATATGGACA 3' Rv 5' TTAATTATTTTTTGCAAATTGCAATCCAT 3'	375	50 °C
OBP4	Fw 5' GACACGGTAGCAATTCTATGCTCG 3' Rv 5' TTAATTTCCAGCAATCTTTTCTAATTCATC 3'	408	51 °C
OBP8	Fw 5' ATGACGATTGAGGAGTTGAAGAAAAC 3' Rv 5' TTACGGAGCTAAGTAGAGCTCCTTATCG 3'	360	51 °C
LCO1490/H CO2198	Fw 5' GGTC AACAAATCATAAAGATATTGG 3' Rv 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	708	52 °C

TaO. - Temperatura de alineamiento óptima.

6.7 Clonación de productos de PCR

La clonación se efectuó con el protocolo del kit CloneJet (Thermo-Fisher Scientific, MA USA), que utiliza el plásmido pJet 1.2 como vector, siguiendo las especificaciones del fabricante.

6.8 Purificación de Productos de PCR a partir de geles de agarosa

Para el caso de algunas amplificaciones por PCR, los amplicones mostraron algunas bandas inespecíficas. Se seleccionó y cortó la banda correspondiente al tamaño del amplicón reportado en trabajos anteriores y verificado por PCR in silico para cada juego de primers. Para la purificación de las muestras se utilizó el zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, de la marca Zymo Research. Se seleccionaron las muestras a las cuales se iba a cortar el fragmento del gel, posteriormente se agregaron tres volúmenes de buffer ADB a cada volumen de gel extirpado (ejemplo: 100 µl/mg, agregar 300 µl de buffer ADB), consiguientemente se incubaron los fragmentos de gel a 55 °C hasta que quedará una mezcla homogénea, se le dio una pequeña agitación en el vortex y se agregó la agarosa derretida a una columna

zyomo-spin del kit y se centrifugó a 10 000 rpm por un minuto, se desechó el flujo del tubo de colecta, seguidamente, se agregó 200 µl de DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 10 000 rpm por 30 segundos. Se repitió el lavado para eliminar cualquier residuo a la muestra, se desechó el fluido del tubo de colecta. Después se insertó la columna en un tubo de recuperación de 1.5 ml, se agregó 30 µl de agua libre de nucleasas (Promega) directo a la matriz de la columna, luego se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente, *a posteriori* se centrifugó a 10 000 rpm por un minuto para eluir el DNA, listo para usar.

6.9 Purificación de Productos de PCR con amplicones específicos

En el caso de las muestras cuyas PCRs mostraron productos únicos (sin bandas inespecíficas) se utilizó el sistema de purificación GenElute™ PCR Clean-Up kit. Primeramente, para el óptimo rendimiento se debe de preparar la columna en un tubo de colecta, agregando 500 µl de Column preparation solution, luego se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm durante un minuto, *a posteriori* se desechó la solución. Se agregó tres volúmenes de binding buffer a un volumen de la reacción de PCR y se mezcló; posteriormente se transfirió la solución a una columna con su respectivo tubo de colecta, se centrifugó a 12 000 rpm por un minuto y se desechó el buffer. Se reemplazó la columna y se agregaron 500 µl de Wash solution, seguidamente de una centrifugación a 12 000 rpm por un minuto, se desechó el buffer y se realizó una centrifugación para secar la membrana a 12 000 rpm durante dos minutos. Seguidamente se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 ml, se eluyó en 30 µl de agua libre de nucleasas (Promega) y se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente; a la postre, se hizo una centrifugación a 12 000 rpm por un minuto y se obtuvo el producto de PCR eluído y purificado.

6.10 Secuenciación y Análisis Bioinformático

El producto de PCR se envió a secuenciar a la empresa MacroGen, Inc. en Seúl, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se revisaron, procesaron y compararon con los electroferogramas obtenidos para determinar la limpieza y confiabilidad de la lectura. Se alinearon las secuencias forward y reverse para generar una secuencia consenso. Esto se realizó con el software Mega, versión 11 (Tamura *et al.*, 2021). Posteriormente se analizaron por medio de los algoritmos tipo BLAST de la base de Datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y la base de datos BOLD Systems (<https://www.boldsystems.org/index.php>) para el caso de la secuencia de COI. Los alineamientos de las secuencias de proteínas también se realizaron en el software Mega 11.

Después del análisis, si hubo algunas secuencias que no tenían la calidad adecuada para depositarse en el Genbank, se repitieron los PCRs y su posterior clonación de acuerdo con el protocolo del Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Agroecológica (LaBTAA). Los plásmidos obtenidos de esta manera se enviaron a secuenciar como se explicó en el párrafo anterior y se analizaron de la misma manera.

6.11 Realización de Dendrogramas

Se utilizó el algoritmo tipo BLASTX para localizar las secuencias de proteínas más parecidas a las que se obtuvieron, posteriormente se descargaron las secuencias y se hicieron los alineamientos, pruebas de modelos de máxima verosimilitud y generación de dendrogramas con el software Mega 11.

VII. RESULTADOS

7.1 Extracción de Ácidos Nucleicos (ARN y ADN)

De acuerdo con Cariaga-Martínez y Zapata (2007), para medir la calidad de las extracciones se utilizó el índice 260/280 el cual mide la pureza de ARN y ADN de las muestras donde 2.0 nos indica pureza aceptable en ARN, (Cuadro 2), en el caso de ADN los índices de pureza son de 1.6 a 1.8 (Cuadro 3), por lo que las extracciones están dentro de los valores óptimos de calidad. De igual forma se pueden observar las muestras correspondientes a *Apis mellífera* como control positivo de los cebadores previamente mencionados (OBPs y CSPs), y las diferentes subcastas de *Scaptotrigona mexicana*; tales como guardianas, forrajeras y nodrizas (Figura 2), donde “M”, representa el marcador de peso molecular y las muestras biológicas están representadas por letras.

Asimismo, se observan las muestras de ADN, en donde “M” está representando el marcador de peso molecular y las muestras son representadas por letras (Figura 3).

Una vez corroborada la calidad de las muestras, con estos resultados pudimos realizar las pruebas de PCR.

Cuadro 2. Parámetros de pureza calidad de ARN de las diferentes muestras de *Scaptotrigona mexicana* (guardianas, forrajeras, nodrizas) y de *Apis mellífera*.

Muestra	Pozo	I260/280	Concentración
Guardianas	G	2.18	79.0 ng/μl
Forrajeras	F	2.14	39.4 ng/μl
Nodrizas	N	2.18	159.4 ng/μl
<i>Apis mellífera</i>	A	2.08	217.2 ng/μl

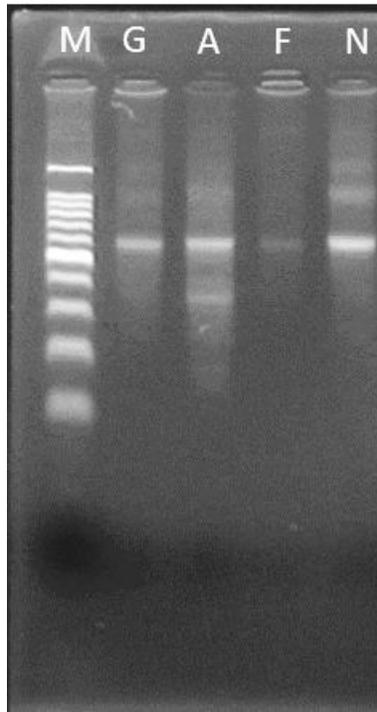


Figura 2. Extracción de ARN en gel de agarosa 1.2%, TBE1X, 80V/40 min

Cuadro 3. Parámetros de calidad de pureza de ADN de las diferentes muestras de *Scaptotrigona mexicana* (guardianas, forrajeras, nodrizas).

Muestra	Pozo	I260/280	Concentración
Guardianas	G	1.99	156.8 ng/μl
Forrajeras	F	2.03	191.8 ng/μl
Nodrizas	N	2.10	210 ng/μl

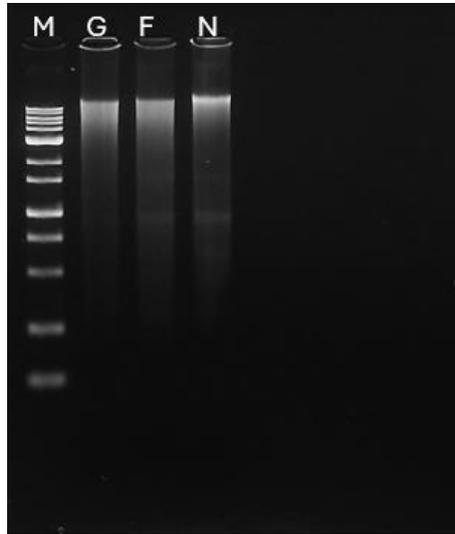


Figura 3. Extracción de ADN en gel de agarosa 0.8%, TBE1X, 80V/40 min. Guardianas (G), Forrajeras(F), Nodrizas(N).

7.2 Identificación de especie mediante citocromo oxidasa I (CO1)

Se obtuvo el ADN de la casta de guardianas. Los productos se visualizaron en gel de agarosa obteniendo los siguientes resultados y seleccionando las últimas dos diluciones para su identificación: 1:20 y 1:50 (Figura. 4). Después de la secuenciación se obtuvo en el electroferograma más de una señal, por lo cual no se logran definir las bases nitrogenadas correspondientes.

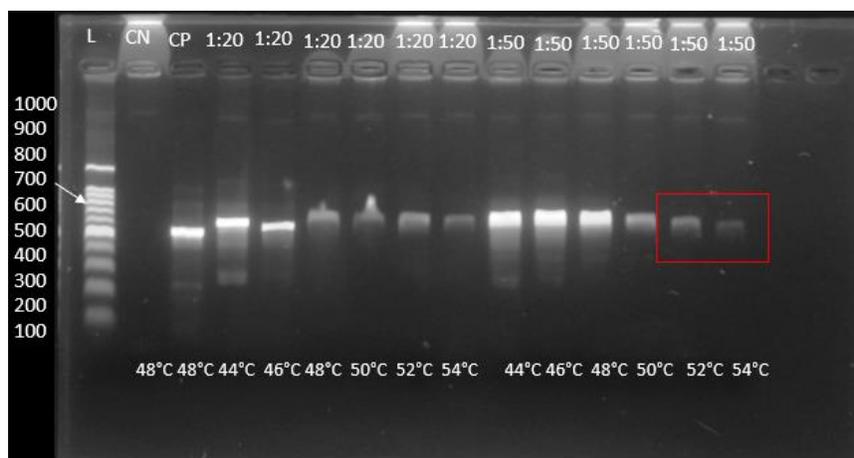


Figura 4. Amplificaciones de ADN mediante citocromo oxidasa I a partir de ADN de Guardianas. PCR con gradiente de temperatura indicado para cada amplificación.

Se procedió a clonar el producto de PCR para poder obtener una secuencia clara de cada casta. La secuencia perteneciente a la casta de Guardianas se depositó en la base de datos del Genbank con el número de acceso PQ480022.1, posteriormente, se hizo una tabla evaluando el porcentaje de similitud con otras especies, la cobertura y el e-value (Cuadro 4). Con los resultados de un análisis BLAST, el cual analiza las secuencias que se encuentran en el NCBI, dándonos las especies con mayor similitud con relación al citocromo oxidasa I.

Cuadro 4. Especies relacionadas con *S. mexicana* mediante cox1.

Espece	Porcentaje de similitud	Cobertura	E-value
<i>S. mexicana</i>	100.00%	100%	0.0
<i>Oxytrigona sp</i>	97.72%	92%	0.0
<i>Melipona melanoventer</i>	96.61%	87%	0.0
<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	96.82%	88%	0.0
<i>Scaptotrigona polysticta</i>	96.96%	74%	0.0
<i>Scaptotrigona hellwegeri</i>	97.77%	88%	0.0

7.3 Detección de genes OBPs y CSPs en ADNc y ADN genómico

Se realizaron las PCR punto final tanto para ARN y ADN, en las cuales podemos ver que para algunas muestras biológicas no amplificaban para ambas moléculas (Cuadro 5). En el caso del OBP8 y CSP6, se realizó una PCR secundaria para poder amplificar el producto, ya que en la primera PCR no se alcanzaba a visualizar el amplicón.

Cuadro 5. Amplificación por PCR de cada muestra a partir de ADN y ARN.

Gen	Castas					
	Forrajeras		Guardianas		Nodrizas	
	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
OBP4	✓	✓	✓	✓	✓	X
OBP8	✓ sec	✓ sec	✓ sec	✓ sec	✓ sec	✓ sec
Csp2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Csp6	X sec	X sec	X sec	✓ sec	X sec	X sec

Sec= PCR Secundaria

✓ = Amplificación positiva por PCR

X = Amplificación negativa por PCR

Con la ayuda del software SnapGene, se realizó un alineamiento de los diferentes genes. Posteriormente se diferenciaron por casta, gen y origen, con la finalidad de realizar la secuenciación de las mismas. Las muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen (Corea del sur), ver (Cuadro 6 y Figura 5).

Cuadro 6. Muestras de *Scaptotrigona mexicana* seleccionadas para secuenciamiento.

Muestra	Casta	Gen	Origen
C1	Forrajera	Csp2	ADNc
C6	Guardiana	Csp6	ADNc
C7	Nodriza	OBP8	ADNc
C8	Nodriza	OBP8	ADNc
C4	Forrajera	OBP4	ADNc
C10	Guardiana	Cox1	ADN
C9	Guardiana	Cox1	ADN
C2	Forrajera	Csp2	ADN

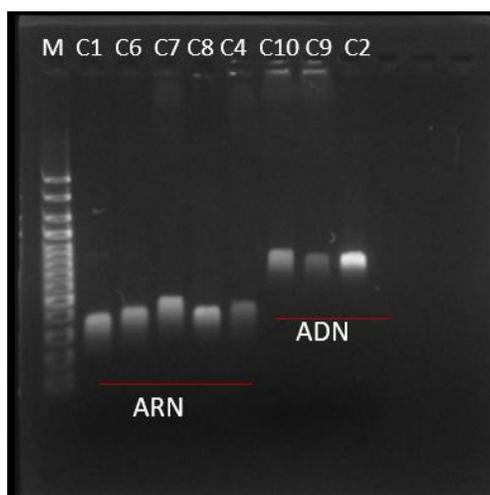


Figura 5. Diferentes tamaños de amplicones obtenidos a partir de ARN y ADN, de las diferentes castas.

Así mismo, se analizaron las secuencias obtenidas de los transcritos y se subieron al GenBank con su correspondiente número de acceso, casta, gen y la presencia de los transcritos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Secuencias obtenidas de los transcritos y número de acceso designado en el GenBank. (- = no se obtuvo amplicón, += se obtuvo amplicón).

Casta	GEN			
	CSP2	CSP6	OBP4	OBP8
Forrajera	+ (235 Pb)	-	+ (285 Pb)	+ (364 Pb)
Acceso NCBI	PP977266		PP977268	PP977270
Guardiana	-	+ (327 Pb)	-	-
Acceso NCBI		PP977267		
Nodriza	-	-	-	+ (282 Pb)
Acceso NCBI				PP977269

Las secuencias de ADN obtenidas se tradujeron a la correspondiente secuencia de proteína, esto nos permitió compararlas con otras secuencias de meliponinos similares encontradas en el Genebank, y de este modo realizar los árboles filogenéticos para ver la cercanía entre las diferentes especies relacionadas con los diferentes genes estudiados. Esto se realizó con la ayuda del software Mega 11. (Figura. 6), para la proteína Csp2 se utilizó a *Eciton burchelli* como especie externa y se observa que *Melipona bicolor* y *Melipona quadrifasciata* están emparentada y *Scaptotrigona mexicana* (Forrajeras) presenta cercanía con estas especies.

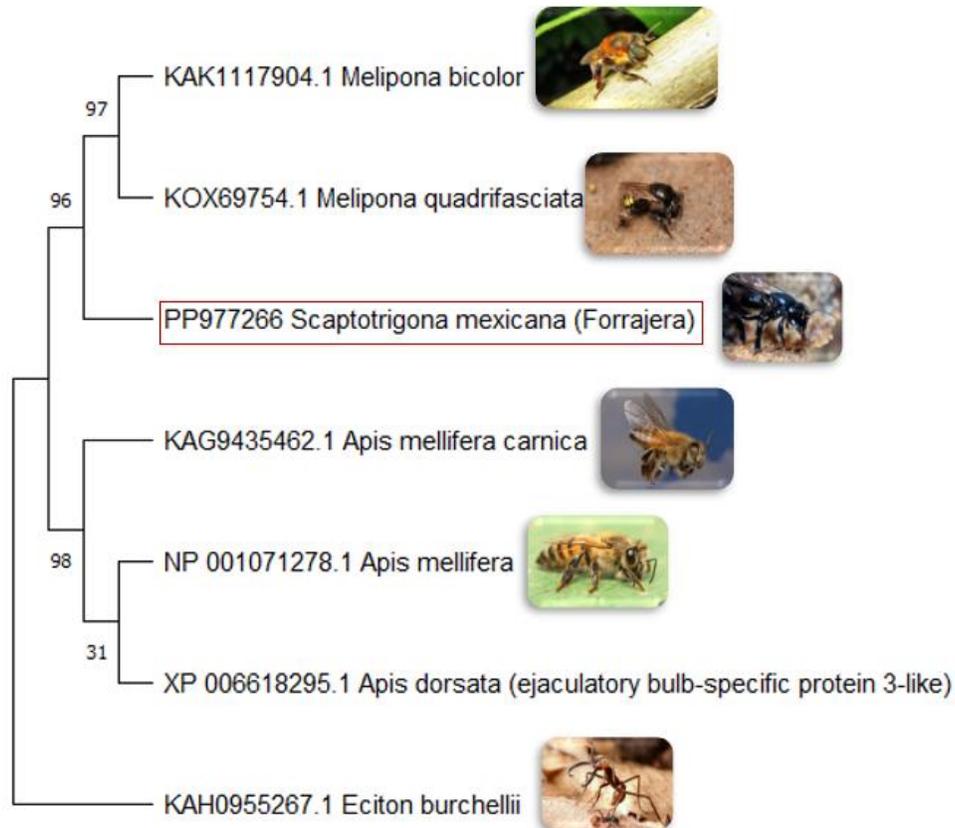


Figura 6. Árbol filogenético CSP2 de la casta forrajera. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo JTT basado en la matriz de distancias. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11. Este análisis involucró 7 secuencias con un total de 92 aminoácidos cada una.

Con respecto de CPS6, se observa una cercanía mayor entre los ejemplares *Apis mellifera* y *Melipona scutellaris*, seguida por *Apis cerana cerana* y a mayor distancia *Scaptotrigona mexicana*. Nuestra especie de estudio muestra una mayor relación con *A. cerana cerana* como se puede ver en la (Figura 7), en el cual la especie externa es *Tropodothorax elegans*.

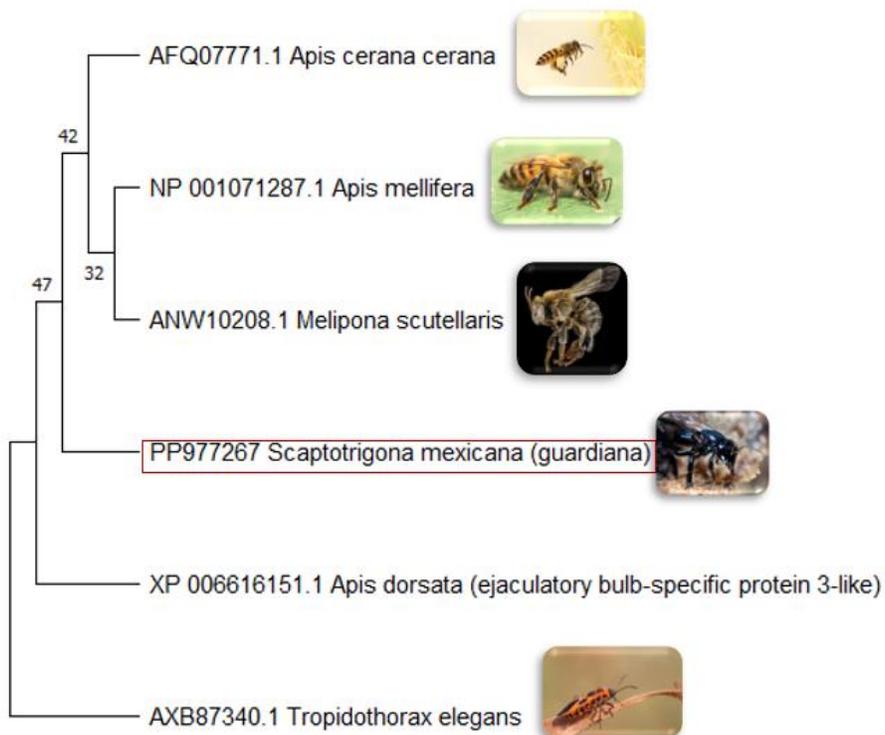


Figura 7. Árbol filogenético de CSP6 de la casta guardianas. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo JTT basado en la matriz de distancias. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11. Se analizaron 6 secuencias de 125 aminoácidos cada una.

Al analizar el OBP4 se observa una similitud con un 98% de confianza entre *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* (Forrajeras), ver (Figura 8), usando como especie externa a *Megalopta genalis*.

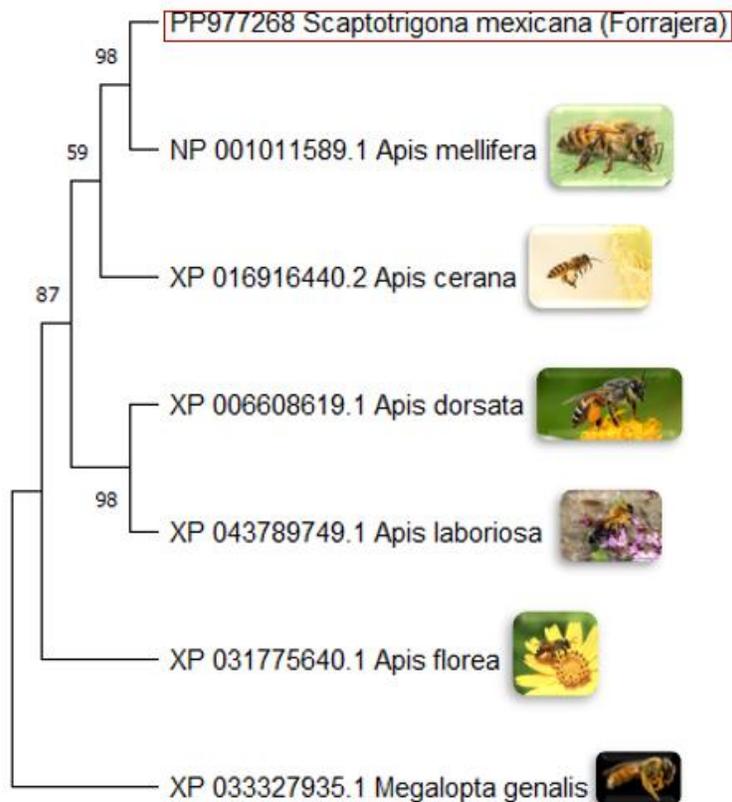


Figura 8. Árbol filogenético OBP4 de la casta forrajeras. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo JTT basado en la matriz de distancias. Se utilizaron 7 secuencias de 118 aminoácidos cada una. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11.

Para el OBP8 se analizaron dos castas (nodrizas y forrajeras), para esto se utilizó a *Meteorus pulchicornis* como especie externa. De acuerdo con esto, la casta de las forrajeras presentó una mayor cercanía con *Melipona scutellaris*, a diferencia de las nodrizas, las cuales están más cercanas con *Apis mellifera*, como se puede observar en la (Figura 9).

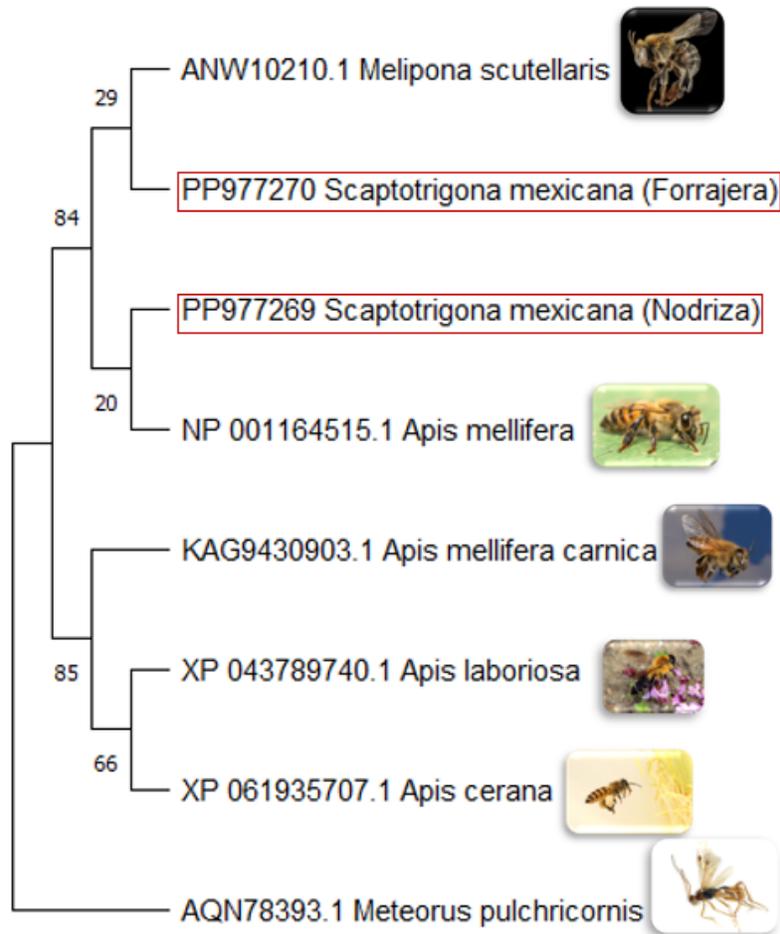


Figura 9. Árbol filogenético OBP8 de las castas forrajeras y guardianas. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Whelan and Goldman basado en la matriz de distancias. El árbol consenso se infirió a partir de 1000 réplicas, de 8 secuencias con 120 aminoácidos cada una. Los análisis se realizaron en el software MEGA 11.

VIII. DISCUSIÓN

Los insectos confían en gran parte en estímulos olfatorios para su reproducción y supervivencia. Para comprender la fisiología y el papel comportamental y ecológico del sistema olfativo, hay que conocer las señales detectadas en condiciones naturales (Guidobaldi y Guerenstein, 2012). No se conoce mucho el aspecto molecular de las abejas, y en especial de las meliponas. Sin embargo, se sabe que los órganos olfatorios se encuentran en las antenas, específicamente en las sensilas, las cuales captan los olores emitidos por diferentes floraciones. Una vez captados estos olores se adentran en las sensilas, en las cuales se transportan por un medio acuoso, la proteína es hidrofóbica y el receptor es hidrofílico con un centro hidrofóbico para así poder transportar el odorante a su receptor y emitir la señal hacia el cerebro y pueda ejecutar una acción. Se sabe que las proteínas receptoras cumplen la función de detección de olores y transducción de señal. Para poder estudiar a estos receptores en su estructura molecular es importante conocer la estructura de su genoma y transcriptoma por lo que una de las limitaciones en este trabajo fue el no tener cebadores específicos provenientes del transcriptoma de *S. mexicana*, por lo cual se utilizaron los cebadores reportados de la abeja de la miel (*Apis mellifera*), cuyo genoma y transcriptoma han sido secuenciados (Webster, Matthew, NCBI Project PRJNA477511).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se demostró la presencia de OBPs y CSPs en *S. mexicana* por medio de PCR punto final. Además, se demostró que hay una variación en la expresión de las proteínas estudiadas, ya que en algunas subcastas se puede observar la presencia de algunos OBPs y CSPs y en otras no. Sin embargo, esto no quiere decir que no tengan estos genes, ya que, podrían estar expresados, pero por debajo del límite de detección de la técnica utilizada. Por esto, se recomienda usar cebadores específicos de las especies a analizar, para así observar diferencias en la expresión, sobre todo si éstas son sutiles. (Guidobaldi y Guerenstein, 2012). La secuenciación del transcriptoma permite obtener las secuencias específicas de los genes de interés, sin embargo, aún con primers más específicos es necesaria la confirmación de la secuencia por medio de la

secuenciación de los productos de PCR, tal como se comprobó en este caso y nuestros productos amplificados se verificaron con la secuenciación y se comprobó que pertenecían a los genes estudiados.

No obstante, además de la PCR de punto final utilizada en este trabajo, también existen otras técnicas que son utilizadas para replicar muchas veces los fragmentos de ADN, como la RT-PCR, la cual se utiliza en diversas aplicaciones, como el análisis de expresión génica, ya sea cuantitativa o cualitativa, utilizando sondas Taqman, las cuales tienen fluoróforos unidos a su extremo 5' y los extintores o quencher unidos a su extremo 3', las sondas TaqMan mientras estén intactas, la fluorescencia del colorante indicador tiende a extinguirse, gracias a esto podemos detectar al amplicón a partir de cebadores específicos, asegurando que sea el fragmento de interés a estudiar. En comparación a la PCR punto final, la PCR cuantitativa (qPCR) es superior ya que esta tiene mayor confiabilidad en los resultados puesto que los cebadores ya han sido sintetizados de las regiones específicas de estudio ubicadas en el transcriptoma. Otra aproximación es el estudio del proteoma, que en combinación con la genómica permitió detectar una expresión diferencial de las proteínas antenales expresadas entre las diferentes castas de *A. mellifera* (Fang *et al*, 2010). Estas técnicas pueden utilizarse para estudios futuros en *Scaptotrigona mexicana*.

Un aspecto importante es comprobar la identidad de la especie de estudio de manera molecular como complemento a la taxonómica, para ir conformando un perfil integrativo que posteriormente puede irse complementando con datos sobre la ecología, morfometría, nicho climático, actividad reproductiva, o comportamiento, entre otras características (Sukumaran y Gopalakrishnan, 2015) De acuerdo con Daza (2018), el fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I es de aproximadamente 648 pb en la región del gen mitocondrial, el cual nos sirve como código de barras para la identificación taxonómica, esta técnica nos ayudó a corroborar que la especie que estábamos trabajando es *S. mexicana*, dándonos como resultado 100% de porcentaje de similitud. Debido a la importancia socioeconómica de la especie, consideramos que el aporte de secuencias a las

bases de datos incrementa el conocimiento a nivel mundial de esta especie de importancia para nuestro país.

Ríos *et al.* (2009) nos dicen que los marcadores moleculares están considerados como estimadores de la vida evolutiva de los organismos, ya que se evalúan las relaciones filogenéticas desde diferentes niveles jerárquicos. Crisci (2002), menciona que los marcadores moleculares mayormente utilizados en la sistemática son por la secuenciación de ADN, el cual tiene una mayor ventaja sobre otros marcadores. Por la comparación de genes homólogos de diferentes taxones, esta relación puede establecerse por el método de alineamiento múltiple de secuencias, ya sea de ADN o proteína en el caso de genes codificantes, tal como se hizo en este estudio para generar los árboles filogenéticos y ver la cercanía de cada uno de los genes evaluados con los de otras especies. En algunos casos las secuencias más cercanas a nuestra especie eran provenientes de otras abejas, tanto de la tribu meliponini: *Melipona scutellaris*, *Apis cerana cerana*, *Melipona bicolor* y *Melipona quadrifasciata*; como de la tribu Apini, podemos suponer que esto es debido a la poca información existente en las bases de datos sobre estas secuencias para genes de otros géneros y otras especies.

Se realizó el alineamiento de secuencias de proteínas ya que mediante este proceso se puede explorar las similitudes o diferencias entre los OBPs y CSPs de las diferentes castas, o con otras especies de abejas e insectos, ya sea una parte de la proteína o toda la proteína. En la siguiente figura (Figura 10) se muestra el alineamiento de DNA de las secuencias de OBP8 obtenidas por PCR en Forrajeras y nodrizas. Como podemos ver, las secuencias muestran un 100% de similitud en ambas castas, lo cual nos habla del alto grado de conservación de estos genes. Cuando esta secuencia se traduce a proteína nos permite identificar si hay algunas características estructurales que puedan estar asociadas a la función, como modificaciones post traduccionales (Edman y Begg, 1967). Sin embargo, no se encontró una diferencia entre estos genes entre las castas estudiadas, tal como se observa en la (Figura 11) en donde el alineamiento entre las secuencias de OBP8 entre forrajeras y nodrizas de *S. mexicana* no muestra diferencias entre sí, ni con la

Consensus

- ▶ S. mexicana...BP8_Nodriza
- ▶ S.mexicana...8_Forrajera
- ▶ Apis mellifera OBP8
- ▶ Melipona scutellaris_OBP8

Consensus

- ▶ S. mexicana...BP8_Nodriza
- ▶ S.mexicana...8_Forrajera
- ▶ Apis mellifera OBP8
- ▶ Melipona scutellaris_OBP8

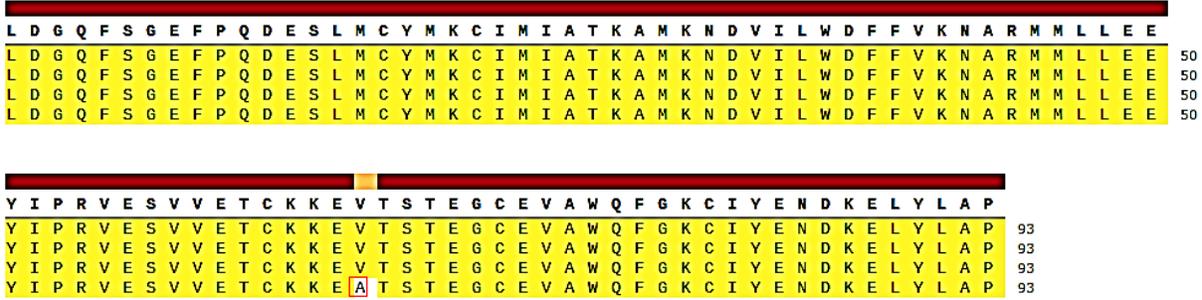


Figura 11. Alineamiento de las secuencias de Proteína del gen OBP8 en Nodrizas y Guardianas de *S. mexicana*, con *Apis mellifera* y *M. scutellaris*. Este alineamiento se generó con el algoritmo clustal W en el software Snappgene v. 8.0.3. Con color rojo se resaltan las diferencias entre las secuencias.

IX. CONCLUSIONES

Scaptotrigona mexicana está en el grupo de las abejas sociales, ya que su gran capacidad de interactuar con ejemplares de su nido las hace trabajar de forma efectiva para llevar a cabo tareas específicas dentro de este.

- En este estudio, se confirmó mediante identificación molecular con el marcador mitocondrial CO1 que la abeja estudiada es *Scaptotrigona mexicana*.
- En esta especie se detectaron OBPs y CSPs en su material genético, particularmente Se detectaron los genes de OBP4 y OBP8 en las castas de forrajeras y nodrizas y CSP2 y 6 en guardianas y forrajeras mediante PCR de punto final.
- También se logró secuenciar por el método de Sanger los genes de OBPs y CSPs en las castas de *S. mexicana* antes mencionadas.
- Por su parte se encontró una similitud entre las secuencias de Proteína de OBPs y CSPs de *S. mexicana* con otras especies de meliponinos y *A. mellifera*, por lo que son secuencias altamente conservadas entre estas especies.
- En cuanto a las castas de forrajeras y nodrizas, no se encontró una diferencia significativa entre las secuencias de DNA y proteína de OBP8.

X. RECOMENDACIONES

Para tener información molecular más precisa sobre *S. mexicana* se necesita secuenciar el transcriptoma, saber cuántas familias de OBPs y CSPs se encuentran asociadas en los receptores de olor, de igual forma es importante sintetizar los cebadores específicos para los genes seleccionados y así poder evaluar la expresión de los genes mediante qPCR en las diferentes castas: reina, forrajera, nodrizas y zánganos.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Anguiano, R. 2022. Abejas, imprescindibles para la sobrevivencia humana. Boletín UNAM-DGCS-407: Ciudad Universitaria. https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2022_407.html. Consultado el 20 de febrero de 2024.
- Ayala, R. 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Instituto de Biología. UNAM. México. <file:///C:/Users/nleon/Downloads/MELIPONINIMEXComprimido.pdf>. Consultado el 20 de marzo de 2024.
- Balbuena, M. S., Latorre-Estivalis, J. M. y Farina, W. M. 2024. Identification of chemosensory genes in the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi*. *Gene genomes genetics*. 14(5): 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkae060>.
- Briand, L., Nespoulous, C., Huet, J.C., Takahashi, M. y Pernollet, J.C. 2001. Ligand binding and physico-chemical properties of ASP2, a recombinant odorant-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur. J. Biochem.* 268: 752–760. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.01927.x
- Briand, L., Swasdipan, C., Nespoulous, V., Bezirard, F., Blon, J. C., Huet, P., Ebert, P. y Pernollet, J.C. 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *Eur. J. Biochem.* 269: 4586–4596. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03156.x
- Calvello, M., Brandazza, A., Navarrini, A., Dani, F.R., Turillazzi, S., Felicioli, A. y Pelosi, P. 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 297-307. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.01.002.
- Cariaga-Martínez, A. E. y Zapata, P.D. 2007. El Laboratorio de Biología Molecular. Ed. Universitaria de Misiones. Argentina. pp. 259. ISBN 978-950-579-073-9.
- Carvalho, W. J., Fujimura, P., Bonetti, A. M., Ricardo, L., Cloonan, K., da Silva, N. M., Borges, E. C., UeiraVieira, C. y Leal, W. S. 2017. Caracterización de sensilas

antenas, morfología de larvas y genes olfativos de *Melipona scutellaris* abeja sin aguijón. PLOS ONE. *Revista generalista* de la editorial Public Library of Science. 12 (14). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174857>.

Cepero, A. 2016. Monitorización de los principales patógenos de las abejas para la detección de alertas y riesgos sanitarios. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.

Cervantes, J. L. 2003. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Revista Médica Herediana*. 14(4): 230-233. ISSN 1729-214X.

Coneval. 2010. Informe anual sobre la situación de pobreza y rezago social. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/32878/Chiapas_089.pdf. Consultado el 22 de octubre de 2024.

Crisci, J. V. 2002. La sistemática biológica de nuestro tiempo. Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 54: 49-59. <file:///C:/Users/nleon/Downloads/95-Lasistemicabiologicadenuestrotiempo.pdf>. Consultado el 10 de noviembre de 2024.

Cruz-Enríquez, J. A., Espinosa-Padilla, S.E. y Medina-Torres. E.A. 2021. Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. *Alergia Asma Inmunología Pediátricas*. 30 (2): 50-53. DOI: 10.35366/101642.

Danty, E., Briand, L., Michard-Vanhee, C., Perez, V., Arnold, G., Gaudemer, O., Huet, D., Huet, J.C., Ouali, C., Masson, C. y Pernollet, J.C. 1999. Cloning and expression of a queen pheromone-binding protein in the honeybee: an olfactory-specific, developmentally regulated protein. *J. Neurosci.* 19:7468–7475. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07468.1999.

Darwin, C. R. 1859. On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favored races in the struggle for life. Ed. John Murray, Londres. pp. 466.

Daza, L. 2018. Uso del gen citocromo oxidasa i (coi) y código de barras en estudios de genética y biología molecular para la identificación de especies animales. Escuela

de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/21038/1049620140.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Consultado el 13 de noviembre de 2024.

Edman, P y Begg, G. 1967. A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry* (en inglés) 1 (1): 80-91. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1967.tb00047.x.

Fang, Y., Song, F., Zhang, L., Wolstedji, D., Bin Han, A., Feng, M y Li, J. 2012. Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.), *Journal of Proteomics*. 75(3):756-773. ISSN 1874-3919. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.012>.

Frankham, R., Ballou J. D. y Briscoe D. A. 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK. DOI:10.1017/CBO9780511817359.

Fleischer, J., Pregitzer, P., Breer, H y Krieger, J. 2018. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. Springer International Publishing. DOI: 10.1007/s00018-017-2627-5.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lut, R. y Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 3(5):294-9. PMID: 7881515.

Forêt, S. y Maleszka, R. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*. 16: 1404-1413. DOI: 10.1101/gr.5075706

Guidobaldi, F. y Guerenstein, P. 2012. El sistema olfativo de los insectos, 46-71. En: J. C. Rojas y E. A. Malo. eds. Temas Selectos en Ecología Química de Insectos. El Colegio de la Frontera Sur. México. pp. 446.

Grüter, C. 2020. Stingless Bees: Their Behaviour, Ecology and Evolution. Ed. Springer. NewYork. pp. 385. ISBN: 978-3-030-60090-7.

Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L. y De Waard J. R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270(1512): 313–321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.

Heiblum, A. 2019. Abejas: Insectos polinizadores. INCyTU: oficina de inforamción

científica y tecnológica para el congreso de la unión.
https://foroconsultivo.org.mx/INCYTU/documentos/Completa/INCYTU_19-031.pdf.
Consultado el 7 de mayo de 2024.

- Herrero-García, F. 2004. Las abejas y la miel. Ed. Caja España. España. pp. 83. ISBN: 8495917149, 9788495917140.
- Huicochea, L. 2011. Dulce manjar, sabores, saberes, y rituales curativos en torno a la miel de las meliponas. *Ecofronteras*. *file:///C:/Users/nleon/Downloads/721-Texto%20del%20art%C3%ADculo-754-1-10-20131129.pdf*. Consultado el 28 de octubre de 2024.
- Kamikouchi, A., Morioka, M. y Kubo, T. 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. *Zoological Science*. 21: 53–62. DOI: 10.2108/02890003(2004)21[53:IOHAGE]2.0.CO;2.
- Lara, J. 2019. Biología, toxicología y terapéutica de especies venenosas de interés veterinaria en Nicaragua. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua.
- Leal, W. S. 2013. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*. 58(1): 373–391. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153635.
- Michener, C. D. 2000. The bees of the World. Ed. Johns Hopkins University Press. pp. 913. ISBN: 0801861330, 9780801861338.
- Miranda, K., Palmera, K y Sepúlveda, P. 2014. Abejas. INFOZOA: boletín de zoología. 6: 1-11. ISSN: 2346-1837.
- Moure J.S., de Camargo, J.M.F. y García, M.V. 1988. Uma nova especie de *Leurotrigona pussilla* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Serie Zoología. 4(2):145-154. ISSN: 0077-2232.
- Mortensen, A.N., D.R. Schmehl, and J.D. Ellis. 2013. *Apis mellifera Linnaeus, and subspecies (Insecta: Hymenoptera: Apidae)*. EENY-568. Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Moure J.S., de Camargo, J.M.F. y García, M.V. 1988. Uma nova especie de *Leurotrigona pussilla* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Boletim do Museu Paraense Emilio

- Goeldi, Serie Zoología. 4(2):145-154. ISSN: 0077-2232.
- Nates-Parra, G. 2001. Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombia*. 2 (3) 233 – 248. ISSN: 0124-5376
- Novoa-Guzmán, E. y Correa-Benítez, A. 2012. *Manual de Patología, Diagnóstico y Control de las Principales Enfermedades y Plagas de las Abejas Melíferas*. México D.F.
https://atlasabejas.agricultura.gob.mx/pdfs/PATOLOGIA_DIAGN_CNTRL_ENFR_MDDS_ABEJAS_MELIFERAS.pdf. Consultado el 15 de junio de 2024.
- Padilla, F., Flores, J. y Pérez, A. 2007. Los órganos de los sentidos de las abejas (I). Departamento de zoología: campus Rabanales.
https://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos_libros/2007_Sentidos_1_El_Colmenar.pdf. Consultado el 9 de marzo de 2024.
- Padilla-Vargas., P. J., Vasquez-Davila., M. A., García-Guerra. T. G. y Albores-González, M. L. 2014. Pisilnekmej: una mirada a la cosmovisión, conocimientos y prácticas nahuas sobre *Scaptotrigona mexicana* en Cuetzalan, Puebla, México. *Etnoecología*. 10 (1): 37-40. <https://es.scribd.com/document/600577347/EE10-1-37-40>. Consultado el 3 de abril de 2024.
- Paoli, M. y Galizia G. C. 2021. Olfactory coding in honeybees. *Cell and Tissue Research*. 383: 35–58. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03385-5>.
- Peña, C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*. 2 (18): 265-267. ISSN: 1727-9933.
- Quero, A. 2004. Las abejas y la apicultura. Universidad de Oviedo, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Oviedo, España.
https://www.mieldemalaga.com/data/Las_abejas_y_la_apicultura.pdf. Consultado el 14 de febrero de 2024.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. y Jackson, R. B. 2011. Amplifying DNA: The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning. Ed. Pearson. San Francisco, CA. pp 414-416.
- Ríos, E., Mejía-Ruíz, H. y Álvarez-Castañeda, S. T. 2009. Marcadores moleculares: una

revolución en la zoología. Academia mexicana de ciencia. México. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf. Consultado el 24 de julio de 2024.

Rubiano, M. 2016. Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblamiento de las colmenas en España: estudio de causas y consecuencias. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de sanidad animal, Facultad de Veterinaria. Madrid. España.

Ruiz, B. 2003. Módulo de apicultura. Instituto Nacional de Agricultura (INA). Tegucigalpa. Honduras. ISBN: 99926-670-3-6.

Roubik, D. W. 2010. Ecology and Natural History of Tropical Bees. Cambridge University Press. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511574641>

Salas, R. 2000. Manual de apicultura para el manejo de abejas africanizadas. Programa para el desarrollo de la pequeña y mediana industria apícola en Honduras. Honduras. <https://dicta.gob.hn/files/2019,Manual-tecnico-de-apicultura.pdf>. Consultado el 19 de abril de 2024.

Sánchez D., Kraus F.B., de Jesús Hernández M. and R. Vandame, 2007. Experience, but not distance, influences the recruitment precision in the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Naturwissenschaften* 94: 567–573. DOI: 10.1007/s00114-007-0229-z.

Sánchez, D. 2024. Abejas bajo amenaza por actividades humanas. El Colegio de la Frontera Sur. Consultado el 24 de octubre de 2024. Disponible en: <https://www.ecosur.mx/abejas-bajo-amenaza-por-actividades-humanas/>

Scheuermann, E. y Smith, D. 2019. Odor-Specific Deactivation Defects in a *Drosophila* Odorant-Binding Protein Mutant. *Genetics*. 213(3). DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302629>.

Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG). 2005. Manual Técnico de Apicultura. Tegucigalpa, Honduras. DICTA. <https://dicta.gob.hn/files/2019,Manual-tecnico-de-apicultura.pdf>. Consultado el 23 de septiembre de 2024.

Snapgene Software. 2025. www.snapgene.com

- Suh, E., Bohbot, J. y Zwiebel, L. J. 2014. Señalización olfativa periférica en insectos. *ELSEVIER*. 6: 86-92. DOI: 10.1016/j.cois.2014.10.006.
- Sukumaran, S., & Gopalakrishnan, A. 2015. Integrative taxonomy – Methods and Applications
- Tamura, K., Stecher, G. y Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027.
- Vermeulen, J., De preter, K., Lefever, S., Nuystens, J., De Vloed, F., Derveaux, S., Hellemans, J., Speleman, F. y Vandesompele, J. 2011. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*. 39(9): 63. DOI: 10.1093/nar/gkr065.
- Wanner, K.W., Willis, L.G., Theilmann, D.A., Isman, M.B., Feng, Q. y Plettner, E. 2004. Analysis of the insect os-d-like gene family. *J. Chem. Ecol.* 30: 889–911. DOI: 10.1023/b:joec.0000028457.51147.d4
- Webster, M. 2018. Apis mellifera Biosample SAMN09259743. Uppsala University. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN09259743/>
- Zarco, J. 2014. De abejas reinas y obreras: Más allá de la identidad genética. Divulgación de la ciencia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. <http://www.cienciorama.unam.mx/#!titulo/307/?de-abejas-reinas-y-obreras---mas-alla-de-la-identidad-genetica>. Consultado el 7 de agosto de 2024.
- Zakaria, Z., Umi, S. H., Mokhtar, S. S., Mokhtar, U., Zaiharina, M. Z., Aziz, A. T. y Hoh, B. P. 2013. An alternate method for DNA and RNA extraction from clotted blood. *Genetics and Molecular Research*. 12(1): 302–311. DOI: 10.4238/2013.February.4.4
- Zhang, W., Cui, H., & Wong, L. J. C. 2012. Application of Next Generation Sequencing to Molecular Diagnosis of Inherited Diseases. *Topics in Current Chemistry*, 19–45. doi:10.1007/128_2012_325.