



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS

Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular

**COMPARACIÓN TRANSCRIPTÓMICA ENTRE LAS
GLÁNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE *APIS MELLIFERA* Y
*GEOTRIGONA ACAPULCONIS***

TESIS

QUE PRESENTA:

ERIKA CORZO VILLEGAS

Para obtener el Grado de:
LICENCIADA EN CIENCIAS

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Guadalupe Peña Chora

CODIRECTORA DE TESIS
Dra. Jimena Isaias Cid Uribe

Sinodales:

Dra. Sonia Dávila Ramos UAEM (Presidente)
Dr. Ramón Alberto Batista García UAEM (secretario)
Dr. Guadalupe Peña Chora UAEM (Vocal)
Dra. Roberta Salinas Marín UAEM (Suplente)
Dr. Erubiel Toledo Hernández UAGro (Suplente)

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2022

En memoria de Cocoa, Kimi y a las abejas
usadas en este proyecto.

自分の心に従って、笑顔でいればいい。

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) y gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación denominado "Venenos y antivenenos", número 303045.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por apoyo incondicional en cada momento y siempre estar para mí.

A mi gemela Tania y a mi hermana Miriam por tener grandes aventuras juntas y así hacer de mi vida más divertida y feliz.

A mis mascotas Kuro y Aimi por existir.

A la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero, al Dr. Karel J. Estrada, al Dr. Ricardo Ayala Barajas y a la Mtra. Verónica Jiménez Jancito por su apoyo técnico en el proceso de la tesis.

Al Dr. Gustavo Delgado Prudencio y al Dr Juan Carlos Fragoso Jiménez por estar de estar de chismosos, pero muchas gracias por sus consejos, observaciones, enseñanzas y apoyo para mejorar.

Y sobre todo a la Dra. Jimena Isaias Cid Uribe por recibirme, salvarme y enseñarme todo lo necesario para que este proyecto se terminara de manera completa e impecable.

A Sam por motivarme y estar conmigo siempre ayudando a mejorar, siendo un gran amigo con quien podía llegar a hablar de cualquier cosa.

Al clan Mixcoatl Laura, Pablo, Charly, Brenda, Andre, Azul, Diego, Celeste, Hiram, Mitzi, Miguel, Sio, Celic, Angel, Luna y Tania que estuvo conmigo en los momentos más difíciles de la carrera haciéndome sentir mejor dentro y fuera de los scouts.

A la primera generación de la Comunidad Tlahuicas que me toco enseñar, Vania, Pau, Leo, Ale, Mateo, Ome, Meli, Alec y Fa por hacer de mis días divertido, con sus audios y stickers sin sentido a cualquier hora, por su cariño y confianza que siempre me daban alegría de llegar los sábados para pasar los momentos hermosos de la semana, que son los mejores mecos que me pudo tocar. Los quiero mucho, gracias a todos ustedes princes.

A los creadores del universo de Avatar Michael DiMartino y Bryan Konietzko por crear la mejor obra maestra que pude disfrutar desde los 6 años y por seguir el universo en mi nueva etapa de vida, sobre todo por crear a Momo el mejor personaje guía de Aang.

Y a mis amigos de carrera Enrique, Kevin, Yari, Michel, Fernanda, Cinthia, Alexis y Vicki por pasarme los apuntes, clases, tareas, exámenes, por pelarnos en retas de uno y por los momentos de alegría y sufrimiento después de cada examen.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
Planteamiento del problema	1
Hipótesis	1
Justificación.....	1
Objetivo general	2
Objetivos particulares	2
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	3
Antecedentes	3
Jalea real.....	3
Compuestos segregados por las glándulas hipofaríngeas	3
Familia de genes yellow.....	4
MRJP1-10.....	4
RJPL.....	6
Marco teórico	7
Las abejas	7
Tribus de abejas	7
Distribución de las tribus <i>Meliponini</i> y <i>Apini</i>	9
<i>Apis mellifera</i> y <i>Geotrigona acapulconis</i>	11
Ciclo biológico	11
Las glándulas hipofaríngeas (HG)	12
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	15
Biología experimental.....	15
Recolección	15
Identificación de abejas	16
Manejo de abejas	16

Disección e identificación de órganos	16
Biología molecular.....	17
Extracción de RNA	17
Protocolo de extracción de RNA con TRIzol®.....	18
Cuantificación de RNA por espectrofotometría	18
Electroforesis de agarosa	18
Electroforesis capilar	18
Secuenciación masiva	19
Análisis bioinformático.....	19
Análisis de calidad	20
Retirar secuencias no deseadas y de baja calidad	20
Ensamble.....	22
Anotación.....	23
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	26
Recolección de muestras	26
Disección y extracción.....	27
Cuantificación.....	27
Electroforesis en gel de agarosa	28
Electroforesis capilar	29
Análisis de calidad y Ensamble	30
Anotación	31
COG y GO.	32
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	38
CAPÍTULO 6 PERSPECTIVAS.....	38
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	38
REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medición de concentración de extracto de RNA.....	27
Tabla 2. Comparación de las lecturas de <i>G. acapulconis</i> y <i>A. mellifera</i>	30
Tabla 3. Transcritos anotados en Trinotate.....	31
Tabla 4. Transcritos obtenidos en CD-HIT	34
Tabla 5. Transcritos identificados en Tblastn	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de las abejas.....	9
Figura 2. Origen de las tribus <i>Apini</i> y <i>Meliponini</i>	10
Figura 3. Abejas utilizadas en este estudio	11
Figura 4. Sistema glandular en la cabeza de <i>A. mellifera</i>	14
Figura 5. Larva en celda real	14
Figura 6. Metodología de biología experimental.....	15
Figura 7. Metodología de biología molecular.	17
Figura 8. Metodología de análisis bioinformático	19
Figura 9. <i>G. acapulconis</i> en su colmena	26
Figura 10. <i>A. mellifera</i> en un bastidor	26
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa.....	29
Figura 12. Integridad de RNA de obtenido de cabeza de <i>A. mellifera</i> y <i>G. acapulconis</i> ...	30
Figura 13. Diversidad de COG de ambas abejas	32
Figura 14. Número de transcritos de ambas abejas.....	33
Figura 15. Diversidad de yellow, MRJP y RJPL de ambas abejas	36
Figura 16. TPM de los yellow, MRJP y RJPL de ambas abejas	37

RESUMEN

Las diferencias morfológicas de las abejas *A. mellifera* y *G. acapulconis* son claramente visibles. Además, las proteínas de la jalea que secretan estos dos géneros de abejas tienen diferente balance proteico. Así, en este trabajo nos enfocamos en conocer indirectamente la composición proteica de ambas jaleas mediante el análisis transcriptómico de las proteínas expresadas por las glándulas hipofaríngeas (HG), las cuales son las productoras de la jalea. Nuestro estudio demuestra que la jalea real contiene a las proteínas Yellow (por su color observado al separar la Jalea Real) y a las MRJP (por sus siglas en Inglés significa; *Major Royal Jelly Proteins*) que pertenecen a superfamilias de proteínas, las cuales aparte del valor nutricional para las larvas en desarrollo, también tienen funciones importantes para la fisiología y defensa de las abejas. Las MRJP muestran una amplia variedad de funciones. Sin embargo, no han sido totalmente caracterizadas. En ambos géneros de abejas fueron identificadas proteínas de la familia Yellow. Por el contrario, las MRJP solo fueron identificadas en *A. mellifera*. Cabe destacar que en *G. acapulconis* fueron identificadas proteínas RJPL (por sus siglas en Inglés significa; *Royal Jelly Protein-Like*), las cuales son proteínas evolucionadas de las MRJP

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

En México como en todo el mundo las *A. mellifera* son las principales abejas en la producción de miel. Cabe destacar, que existan otras especies de abejas en el país como la *G. acapulconis*. Sin embargo, estas abejas producen menos cantidad de miel. Se piensa que su morfología está relacionada a su la baja producción de miel, ya que la *A. mellifera* es entre 12 a 15 veces más grande que la *G. acapulconis*. Por otra parte, se sabe que la jalea real es un alimento que tiene los componentes nutricionales para que las abejas se desarrollen, y esta es producida por las glándulas hipofaríngeas (HG). Por lo que la composición de las jaleas tendría un impacto directo sobre el desarrollo de ambas abejas, y a su vez impactaría en las diferencias morfológicas entre ambas. Es de nuestro interés conocer la composición de dichas jaleas y estudiar si las familias proteicas presentes en ambas jaleas son expresadas en el transcriptoma de manera diferente.

Hipótesis

Sabemos que la jalea real está relacionada con morfología de las abejas, así que, dado que las abejas *Apis mellifera* y *Geotrigona acapulconis* son diferentes morfológicamente, debería de existir diferencia entre los perfiles transcriptómicos codificantes de las proteínas de la jalea real.

Justificación

La composición proteica de la jalea real es bien conocida en *A. mellifera*. Sin embargo, poco se sabe acerca de la composición proteica de la especie *G. acapulconis*. Por lo tanto, es de nuestro interés conocer las proteínas que se expresan en la jalea de *G. acapulconis*, y que tan similares o diferentes son con respecto a las que se expresan en *A. mellifera*. La secreción de jalea real en *G. acapulconis* es de difícil acceso, por lo que un análisis transcriptómico de las glándulas productoras permitirá conocer de manera indirecta la composición proteica de la jalea en *G. acapulconis* y comparar estas dos especies de abejas.

Objetivo general

Identificar el perfil transcripcional de las proteínas de jalea real de *G. acapulconis* y compararla con *A. mellifera*.

Objetivos particulares

1. Diseccionar las abejas *G. acapulconis* y *A. mellifera* para obtener las glándulas hipofaríngeas
2. Obtener RNA de glándulas hipofaríngeas de *G. acapulconis* y *A. mellifera* para secuenciar el RNA obtenido.
3. Generar el ensamble y realizar la anotación de las secuencias obtenidas anteriormente.
4. Identificar los transcritos de proteínas de las glándulas hipofaríngeas de *G. acapulconis*.
5. Comparar la diversidad de proteínas relacionadas a la jalea real expresadas en las glándulas hipofaríngeas por *A. mellifera* y *G. acapulconis*.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Antecedentes

Jalea real

La jalea real está conformada primordialmente de agua (50-70%), proteínas que conforman del 12 al 18%, carbohidratos principalmente glucosa, fructosa y sacarosa y son alrededor del 10 al 12%, lípidos y ácidos grasos componen del 3 al 8%, y en menor proporción vitaminas hidrosolubles, nucleótidos, polifenoles, hormonas y esteroides (Pina et al., 2018). Asimismo, es un alimento altamente energético que contiene varias vitaminas del grupo B (Ramanathan et al., 2018).

En la jalea real, el conjunto de proteínas mayoritarias son las MRJP1-10 (por sus siglas en inglés *Major Royal Jelly Protein*), las que representan alrededor del 90% del contenido total de las proteínas por lo que se piensa que es el elemento activo primordial de la jalea real (Ramanathan et al., 2018). La jalea real, además de nutricional, se le atribuyen actividades anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias, hipocolesterolémicas, hipotensora, sanitizante, vasodilatadora e inmunomoduladora (Nates-Parra, 2011). Cabe destacar, que la cantidad de jalea real secretada por las HG dependen de la edad de las abejas obreras (Page et al., 1998).

Compuestos segregados por las glándulas hipofaríngeas

Algunos estudios han demostrado que las HG secretan la enzima invertasa, enzima reductora lipasa, diastasa y glucosa-oxidasa (J. Li et al., 2008; Suwannapong et al., 2010). Las enzimas mencionadas son termolábiles y su actividad reduce con el

envejecimiento, por lo cual su presencia sugiere la calidad de la jalea (Ramanathan et al., 2018). Además, segregan ácidos grasos, lípidos neutros, esteroides, hidrocarburos y fenoles (Fratini et al., 2016).

Familia de genes yellow

La familia de genes yellow es quizá una de las más enigmáticas descubiertas hasta ahora. El primer gen caracterizado ("yellow") se identificó por el fenotipo yellow anormal de la cutícula adulta y de las piezas bucales de las larvas de *Drosophila melanogaster* (Biessmann, 1985), lo que sugiere que el gen está implicado en la síntesis del pigmento melánico (Biessmann, 1985; Brehme, 1941.). Se han identificado varios genes similares al yellow en la abeja melífera *Apis mellifera* (Ferguson et al., 2011). En la actualidad se han identificado diez yellow-MRJP (yellow-MRJP1-9, además un pseudogén) (Albert & Kludiny, 2004; Drapeau et al., 2006; Schmitzová et al., 1998). Sin embargo, los análisis filogenéticos muestran que las proteínas yellow forman un grupo monofilético distante de las MRJP (Albert & Kludiny, 2004).

MRJP1-10

Las proteínas principales de la jalea real, las MRJP, constituyen una subfamilia de proteínas estrechamente relacionadas que pertenecen a una superfamilia de proteínas Yellow/MRJP (Radovic et al., 2002). Estas proteínas recibieron su nombre tras su identificación inicial como componente dominante de la jalea real de la abeja melífera (Schmitzová et al., 1998). Debido a su ausencia en los genomas de otros insectos, se pensó que las MRJP se habían diversificado sólo en el género *Apis* y se convirtieron en un componente principal de la jalea real (Albert & Kludiny, 2004;

Ferguson et al., 2011; Schmitzová et al., 1998). Sin embargo, la identificación de homólogos de MRJP en otros himenópteros cuestionó este escenario evolutivo (Smith et al., 2011). Además, los avances en la bioquímica y la neuroanatomía de las abejas melíferas revelaron que las MRJP también se expresan fuera de las HG, como en el cerebro (MRJP1, 3 y 9) (Kucharski et al., 1998) y en el veneno (MRJP8 y MRJP9). También se descubrió que MRJP1 desempeña un papel central en el polimorfismo reina-trabajador, en particular en la determinación del desarrollo de las reinas de las abejas melíferas (Kamakura, 2011). Recientemente se ha demostrado que el fenotipo de la jalea real es probablemente el resultado de la reprogramación epigenética de todo el genoma a través de la metilación del DNA, lo que conduce a patrones divergentes de expresión de genes y desarrollo de tejidos (Kucharski et al., 2008). Las Yellow/MRJP también se han aislado del cerebro de las abejas melíferas, de las glándulas venenosas y de los tejidos de larvas, pupas y adultos. Lo que sugiere que, al igual que los otros miembros de la familia yellow, las Yellow/MRJP tienen papeles multifuncionales y dependientes del contexto en el desarrollo (Drapeau et al., 2006; Peiren et al., 2005; Schmitzová et al., 1998). Además de los MRJP, el genoma de *A. mellifera* comprende 10 genes yellow que también tienen diversos patrones de expresión. Mientras que el yellow-g muestra una expresión ovario específico según la reina, el yellow-h se expresa en las reinas en desarrollo. El yellow-f se expresa en la fase embrionaria tardía, mientras que el yellow-e3 afirma que es el progenitor de la familia mrjp, este último muestra expresión en la glándula hipofaríngea (Ferguson et al., 2011; Qian et al., 2002; Radovic et al., 2002). Por lo tanto, los genes yellow de *Apis* podrían estar asociados al desarrollo (Hojo et al., 2010). Además, ha sido propuesto que MRJP pueden tener

funciones reguladoras en el desarrollo y comportamiento, además de su papel nutricional en la jalea real (Albert et al., 1999.; Schmitzová et al., 1998).

RJPL

Las proteínas de la jalea real (MRJP) de la abeja melífera, no se presenta en todas las abejas. Se ha encontrado un gen similar al MRJP en el abejorro, *Bombus terrestris* conocido como RJPL (por sus siglas en Inglés significa *Royal Jelly Protein-Like*). También se ha demostrado que comparten muchas características con las MRJP de las abejas melíferas. Además, al igual que las MRJP se expresan principalmente en las glándulas hipofaríngeas, aunque los abejorros no producen alimento larvario similar a la jalea real de la abeja melífera (Albert & Kludiny, 2004). Se ha propuesto que la función digestiva/modificadora del alimento era la función original de la proteína MRJP previo a la multiplicación de su gen y la adaptación de una nueva función nutritiva (Kupke et al., 2012). Sin embargo, el RJPL también se expresa en otros lugares diferentes de los HG, como se demostró en la abeja melífera. Esta representa una etapa de prediversificación de la evolución del gen MRJP en abejas. Los datos sugieren que una función glandular dual precedió a la multiplicación de las MRJP en el linaje de las abejas melíferas. En el curso de la evolución de la abeja melífera, las HG cambiaron drásticamente su morfología para cumplir una función de expresión de alimento (Albert & Kludiny, 2004). La función más similar de la RJPL es la de MRJP1 y 2 (Kupke et al., 2012).

Marco teórico

Las abejas

La calidad de nuestra vida está directamente relacionada con la salud de la tierra, pues la población humana es dependiente en enorme proporción de especies animales y vegetales para su supervivencia (Charls. 1862). Un tercio de los alimentos que consumimos está disponible debido a la polinización, y alrededor de la mitad de los animales que polinizan las plantas tropicales son abejas (Toole, 1993). Primero ¿Qué es una abeja? Según Michener (1974), “Las abejas son un conjunto de avispa visitantes de flores que abandonaron sus hábitos de avispa de abastecer sus nidos con insectos o arañas, y empezaron a alimentar a sus larvas con polen y néctar, con secreciones glandulares, al final derivadas de la mismas fuente”. Las abejas son, posiblemente, el conjunto de insectos mejor adaptado a la visita floral y debido al enorme conjunto de especies y a la copiosidad de varias de estas, se transforman en un conjunto importante para la polinización y la reproducción sexual de la mayor parte de las plantas con flores, en particular para muchas plantas de interés agrícola (Michener, 2000).

Tribus de abejas

Pese a su copiosidad y enorme conjunto de especies, para muchos el concepto “abeja” solo se refiere a la abeja doméstica *Apis mellifera*. Por ello es fundamental determinar que la designación “abejas” (Pardo & Nates-Parra, 1994), tiene un sentido más extenso y tiene relación con una cantidad enorme de especies que generalmente pasan desapercibidas para el ser humano, al igual que sus aportes en la polinización de cultivos y producción de alimentos (Ollerton & Cranmer, 2002).

Hay cerca de 25 mil especies de abejas a nivel mundial (ANSA, 2013), donde se reconocen 7 familias de abejas en el planeta: 5 de lengua corta (*Stenotritidae*, *Colletidae*, *Andrenidae*, *Halictidae*, *Melittidae*) y 2 de lengua extensa (*Megachilidae* y *Apidae*) (Michener, 2000). La conducta social, primigenia o avanzada, se muestra en menos del 10% de las especies, originado independientemente en 2 familias: *Halictidae* y *Apidae* (Snelling, 1981). El núcleo familiar *Apidae* tiene a la subfamilia *Apinae*, en donde se hallan diferentes tribus de abejas tanto solitarias como eusociales. Las abejas sociales con 4 tribus, 2 enormemente sociales: Apini (que incluye el género *Apis*) y Meliponini (llamadas “abejas sin aguijón”) (ANSA, 2013). Las 2 tribus restantes son: *Bombini* (llamados “abejorros del páramo”) y tribu *Euglossini* (abejas de las orquídeas). Las primeras son primitivamente sociales y comprenden el género *Bombus*. Por el contrario, las *Euglossini* son mayoritariamente solitarias (figura 1). Cuentan con múltiples géneros *Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea*, *Aglae* y *Exaerete* que son cuasisociales (Nates-Parra, 2005).

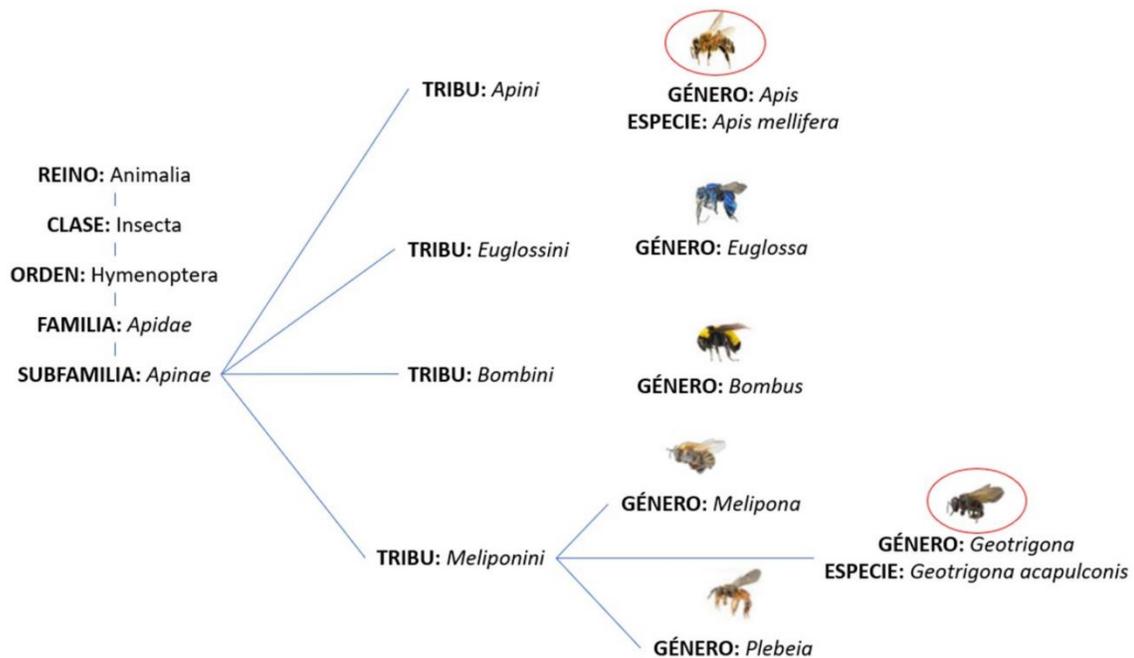


Figura 1. Clasificación taxonómica de las abejas. En esta figura modificado de (Rogel, 2013), se pueden ver los diferentes tipos de abejas que hay en la subfamilia *Apinae*.

Distribución de las tribus *Meliponini* y *Apini*

La tribu *Meliponini*, es parte de la familia Meliponinae (Michener, 2000). También conocidas como meliponinos. Se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales de Australia, América, Asia y Oceanía (figura 2) (Quezada-Euán et al., 2018). En América, estas abejas se encuentran desde México hasta Argentina (Kilani, 1999). En este continente existe la mayor diversidad de meliponinos, con más de 400 especies descritas, mientras que en la región indo-australiana se reportan cerca de 90 especies y en África casi 30 (Zimmerman et al., 1989). Dentro de esta tribu se encuentra género *Geotrigona*. Por otro lado, los Apinos (*Apini*) con un solo género y siete especies, donde una de ellas es la *Apis mellifera* (Inoue et

al., 1984). Tienen una amplia área de distribución con diversas condiciones climáticas y se subdividen en numerosas subespecies. Estas abejas proceden de Asia, Europa y África (figura 2) (Wu et al., 2012), y fueron introducidas al continente americano con la llegada de los conquistadores a estos territorios (Mendizabal, 2005). Desde esa época la especie se adaptó a las nuevas condiciones y hoy en día se considera naturalizada, con poblaciones silvestres establecidas en todo el territorio, y otras poblaciones criadas bajo condiciones de explotación comercial (Nates-Parra, 2005.; Quezada-Euán et al., 2018).

■ Origen de los *Apinis*
■ Origen de los *Meliponinis*

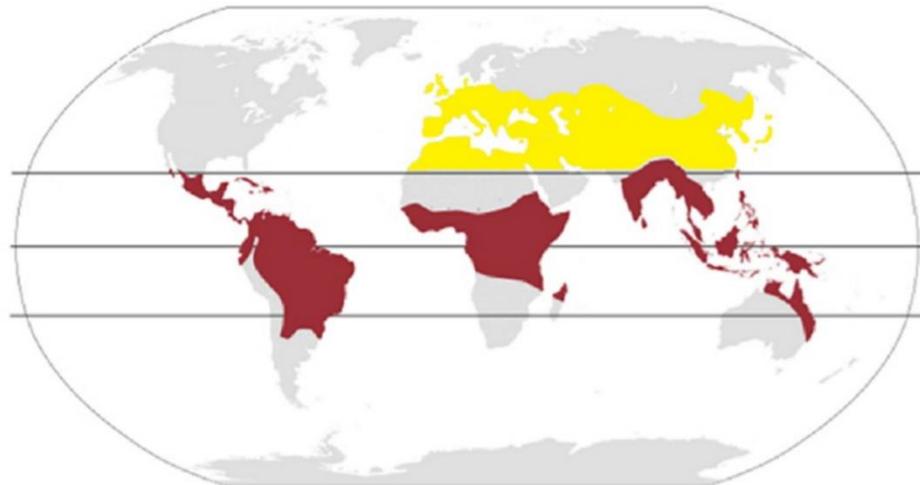


Figura 2. Origen de las tribus *Apini* y *Meliponini*. Esta figura, se puede observar el origen de las tribus *Apis* y *Meliponinis* en el planeta tierra (modificado de Rogel, V. 2013).

Apis mellifera y *Geotrigona acapulconis*

La abeja más utilizada y prácticamente cosmopolita es la *A. mellifera* (figura 3), mientras que el género *Geotrigona* solo está presente entre el centro de México y norte de Argentina (Ala, 1999). En México la especie *G. acapulconis* (figura 3) es endémica de la cuenca del Río Balsas, con registros hasta el Istmo de Tehuantepec (Ala, 1999).

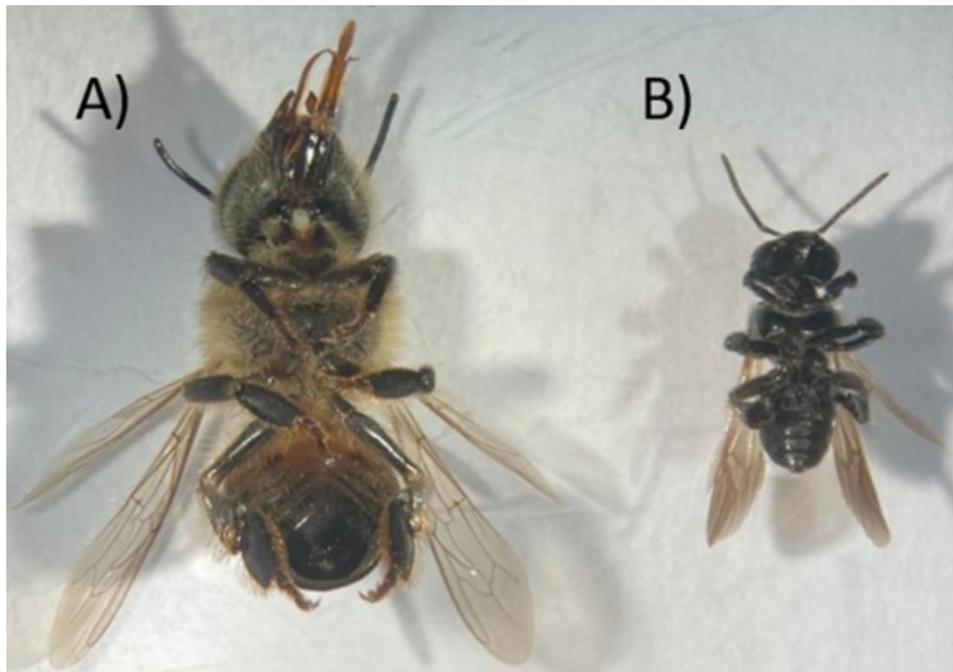


Figura 3. Abejas utilizadas en este estudio. Esta figura se puede ver las diferencias morfológicas de A) *A. mellifera*. y B) *G. acapulconis* (Foto tomado por Corzo, E).

Ciclo biológico

La organización social de ambas especies *A. mellifera* y *G. acapulconis* está dirigida por la reina, que se caracteriza por ser la hembra que puede poner huevos

fecundados de la colonia. Su función principal es vigilar el buen funcionamiento de la colonia a través de la liberación de feromonas para facilitar una labor conjunta de los individuos apoyando la supervivencia (Insuasty-Santacruz et al., 2017). Otra función de la reina es rendir más individuos (obreras, zánganos y otras reinas). El mayor conjunto de individuos que forma la colonia son obreras, que son las encargadas de la construcción, acopio de recursos, alimentación y defensa de la colonia (Quezada-Euán et al., 2018). Los zánganos son los huevos no fecundados. Ellos desempeñan funciones como la producción de calor en la zona de cría, maduración de la miel y el rendimiento de cera (Can-Alonzo et al., 2005).

Los meliponinos poseen una forma especial de reproducir sus crías, las obreras forman previamente las celdas de cría y posteriormente las abastecen de alimento larval, la reina oviposita encima del alimento larval, más adelante las obreras cierran la celda para que la larva inicie el proceso de metamorfosis (Gracia & Dzid, 2008.). Por otro lado, los Apinos mantienen abierta la celda de la cría, por lo que cada cierto tiempo las obreras alimentan a la larva hasta que se vuelva pupa para cerrar la celda y así continuar con su desarrollo (Mistrioni & Carvalho, 2006.). La obrera y el zángano que conforman la colonia tienen una vida entre los 30 y 40 días (Ala, 1999) o incluso hasta más de 50 días (Can-Alonzo et al., 2005) dependiendo de la especie, mientras que la reina vive entre 2-7 años (Can-Alonzo et al., 2005).

Las glándulas hipofaríngeas (HG)

Las HG (por sus siglas en inglés *hypopharyngeal glands*) (figura 4), son muy rudimentarias en la reina y ausentes en el zángano, pero presentes en las obreras (Li et al., 2008). Están compuestas por un par de glándulas situadas en la cabeza

que consta de un tubo largo y sinuoso, al que se adhieren lóbulos sólidos y redondeados. Además, dos canales distintos que se abren por separado en la base de la hipofaringe, y como su nombre lo indica, están por debajo de la faringe; sus conductos corren por debajo del cibario hasta la placa hipofaríngea (Suwannapong et al., 2010), mediante tubos cortos laterales y varios cientos de pequeños cuerpos lobulares denominados acinos, los cuales entregan secreciones a un conducto colector que va a las piezas bucales, cuyo tejido glandular produce el alimento larval (Ilyasov et al., 2020), conocido como “jalea real”. Dicha secreción es presentada como alimento a las larvas y a la reina (Page et al., 1998.). La secreción es lechosa y pastosa, de color blanquecino (figura 5), con una acidez pronunciada (Ilyasov et al., 2020). Esta sustancia se administra a todas las larvas durante los 3 primeros días de crecimiento, pero a partir del cuarto se agrega el polen y miel, para continuar su crecimiento hacia las obreras (huevo fecundado) o los zánganos (huevo sin fecundar) (Li et al., 2008). Mientras que a la reina en toda su vida se va a alimentar de esta sustancia (Page et al., 1998).

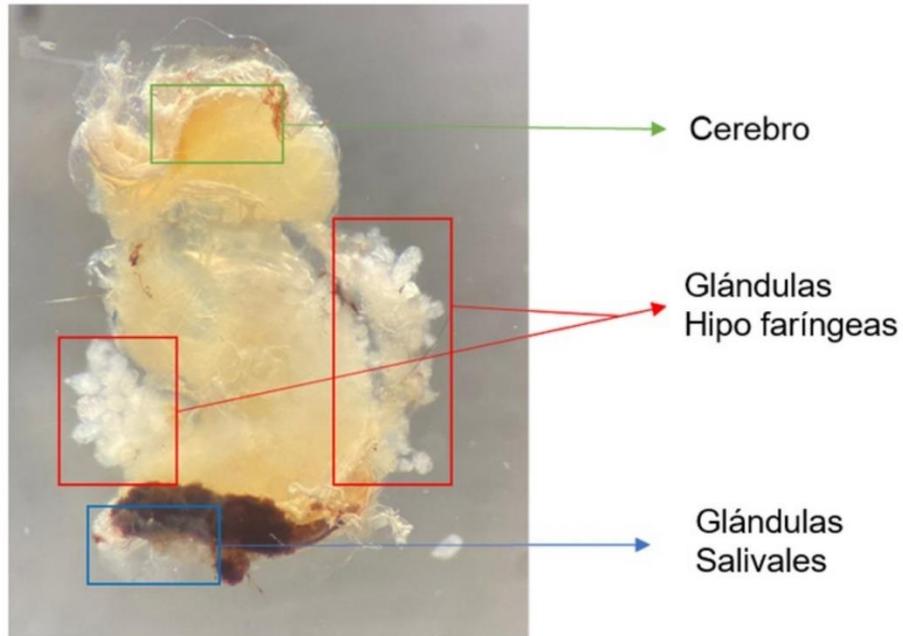


Figura 4. Sistema glandular en la cabeza de *A. mellifera*. Figura del sistema glandular en *A. mellifera* disectado por un bisturí visto desde un estereoscopio. (Foto tomada por Corzo, E) (Li et al., 2008).

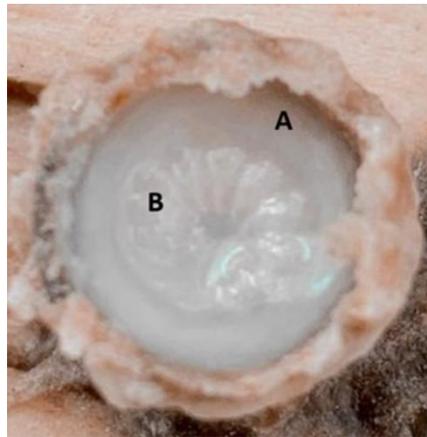


Figura 5. Larva en celda real. Figura tomada en el apiario de la UAEM donde se muestra A) Jalea real y B) larva de *A. mellifera* que absorbe la jalea real para su desarrollo a abeja reina. (Foto tomada por Corzo, E).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

Para el proceso de este proyecto, se emplearon tres áreas de conocimiento, Biología Experimental, Biología Molecular y Bioinformática.

Biología experimental

La metodología usada en biología experimental se puede ver en la figura 6

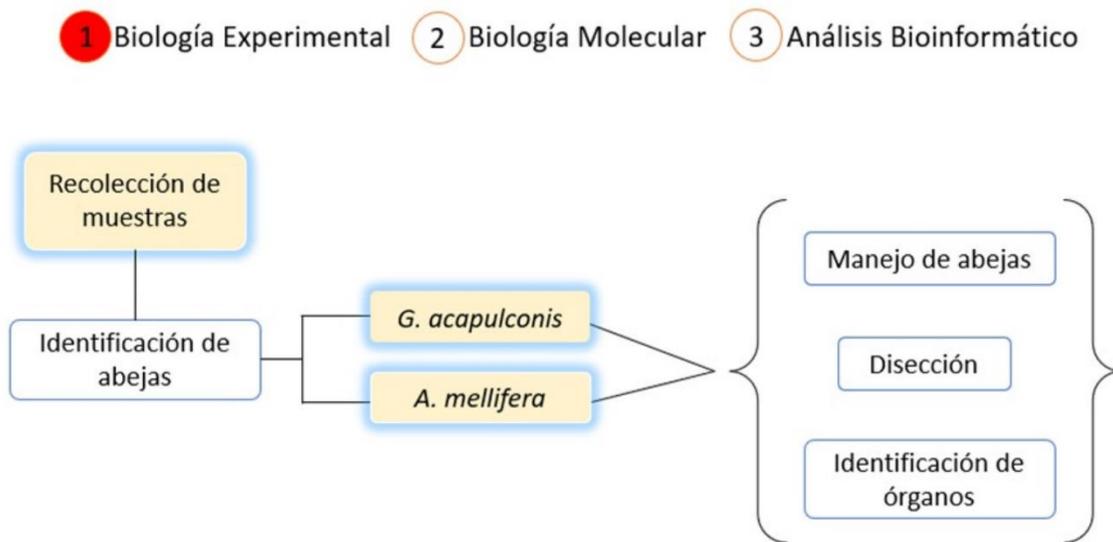


Figura 6. Metodología de biología experimental. Diagrama para visualizar la metodología en biología experimental, donde se va a realizar la identificación de abejas, manejo de abejas, disección e identificación de órganos

Recolección

Para la obtención del material biológico, se recolectaron ejemplares de *G. acapulconis* en Xoxocotla, Morelos. Para *A. mellifera* se recolectaron en el apiario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en Cuernavaca, Morelos.

Identificación de abejas

Para conocer el género y especie de *G. acapulconis*, se enviaron especímenes al Dr. Ricardo Ayala Barajas del Instituto de Biología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. El Dr. Ayala identificó el género y la especie para *Geotrigona acapulconis*. Con respecto a *A. mellifera* ya se sabía de su especie y género por lo que no hubo necesidad de enviar los especímenes a identificar.

Manejo de abejas

Para poder colectar a las *A. mellifera* se usó un traje de apicultor, guantes y velo para prevenir picaduras. También se usó un ahumador para tranquilizar a las abejas y facilitar su manejo. Con *G. acapulconis* no es necesario usar ningún equipo de protección pues estas son inofensivas.

Disección e identificación de órganos

Para identificar las HG en ambas abejas se realizó una disección en la cabeza usando bisturí, pinzas y tijeras estériles y empleando un microscopio estereoscópico.

Biología molecular

La metodología usada en biología molecular se puede ver en la figura 7.

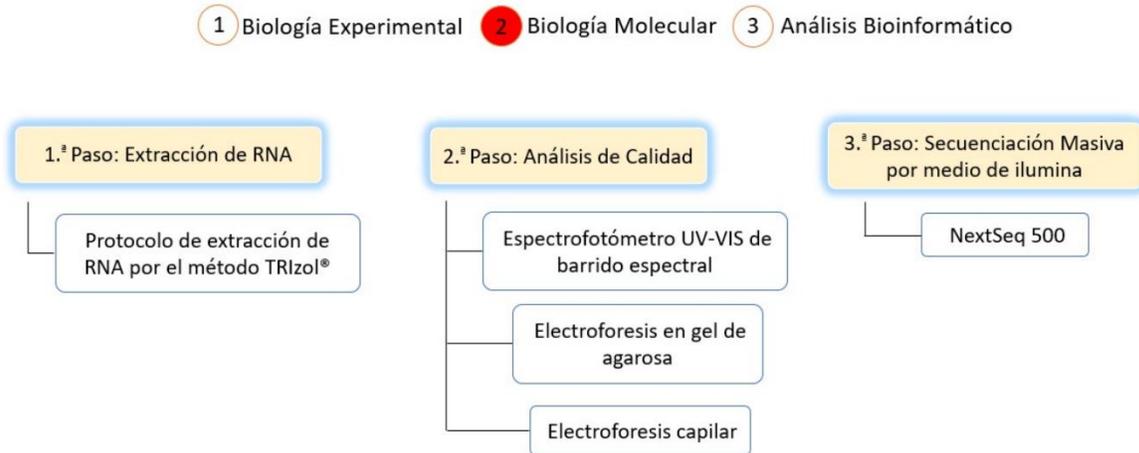


Figura 7. Metodología de biología molecular. Diagrama para visualizar la metodología de biología molecular. Se divide en tres pasos, la extracción de RNA, análisis de calidad y secuenciación masiva.

Extracción de RNA

Las cabezas se diseccionaron para la extracción del RNA, de las especies *G. acapulconis* y de *A. mellifera*. El material se colocó en TRIzol® y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Los órganos se maceraron en un homogeneizador previamente esterilizado. El RNA se extrajo utilizando el reactivo TRIzol®, método de isotiocianato guanidina/fenol (Chomczynski & Sacchi, 1987). Todos los reactivos utilizados eran libres de RNAsas, y el material que se utilizó era estéril.

Protocolo de extracción de RNA con TRIzol®

- I. Macerar las glándulas en un homogeneizador de vidrio con pistilo (Potter), luego dejar 10 min en hielo y transferir a un tubo de microfuga de 1.5 mL
- II. Adicionar 200 µL de cloroformo, dejar incubando por 10 min a temperatura ambiente, centrifugar a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C.
- III. Pasar el sobrenadante a otro tubo de microfuga de 1.5 mL, agregar mismo volumen de isopropanol y dejar 10 min a temperatura ambiente.
- IV. Volver a centrifugar 10 min a 4 °C 14,000 rpm, descartar el sobrenadante y se lavar el pellet 2 veces con 500 µL con etanol frío al 75%.
- V. Dejar secar el pellet 5 min a temperatura ambiente y resuspender en H₂O/Dpc.

Cuantificación de RNA por espectrofotometría

El RNA se cuantificó en el equipo NanoDrop One™ Thermo Scientific a 260 nm.

Electroforesis de agarosa

Para el análisis del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el buffer TBE 1x, corrido a 100 V por 30 min.

Electroforesis capilar

Para medir el tamaño y la concentración precisa de todos los fragmentos genéticos, se solicitó el servicio de secuenciación a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM), donde se usó el equipo Bioanalyzer Agilent 2100 con el protocolo ya establecido por la unidad de UUSMB, este

protocolo se puede visualizar en el siguiente enlace:
http://www.uusmb.unam.mx/?page_id=15.

Secuenciación masiva

La secuenciación masiva de RNA_m fue realizada en la UUSMB del Instituto de Biotecnología-UNAM, usando su propio protocolo, el cual se puede visualizar en el siguiente enlace: http://www.uusmb.unam.mx/?page_id=15. Se uso el equipo NextSeq 500 de la marca Illumina®.

Análisis bioinformático

La metodología que se usara en análisis bioinformático se puede ver en la figura 8.

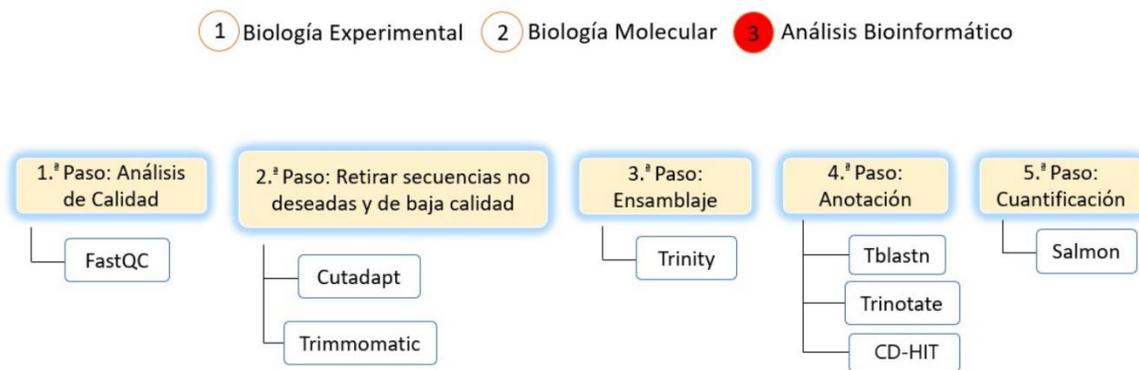


Figura 8. Metodología de análisis bioinformático. Diagrama para visualizar la metodología de análisis bioinformático. Se visualiza cuatro partes, análisis de calidad, retirar secuencias no deseadas y de baja calidad, ensamblaje, anotación y cuantificación.

Análisis de calidad

El análisis bioinformático se realizó en el cluster del IBt-UNAM *Teopanzolco*. El Análisis de calidad se realizó con el programa FastQC 1.11.4. El cual evalúa si los datos cumplen con los estándares de calidad (Brown et al., 2017). También puede proporcionar el contenido de G/C, la calidad de los K-mers, si hay bases clasificadas como N, o si hay una secuencia altamente representativa. Por lo tanto, según los datos del archivo en FastQC, es posible ver rápidamente qué parámetros pueden ser problemáticos a través de gráficos, y tablas de rápido acceso y fáciles de interpretar (García-Martínez et al., 2016).

Retirar secuencias no deseadas y de baja calidad

A menudo es necesario limpiar los datos, como las lecturas de secuenciación de los RNA pequeños que contienen el adaptador de secuenciación 3' porque la lectura es más larga que la molécula que se secuencia (Li et al., 2008). Las lecturas de amplicones comienzan con una secuencia de cebadores. Las colas de poli-A son útiles para extraer el RNA de la muestra, pero a menudo no se desea que estén en las lecturas (Grabherr et al., 2011). Para retirar esas secuencias no deseadas y de baja calidad se usaron los programas cutadapt 1.18 y trimmomatic 0.39. Para esto se usó el siguiente comando.

Cutadapt 1.18:

```
cutadapt -b AGATGTGTATAAGAGACAG -B AGATGTGTATAAGAGACAG -b
CTGTCTCTTATACACATCT -B CTGTCTCTTATACACATCT -q 30,30 --minimum-
length 80 -o SRR1984309_1_trimmed.fastq -p SRR1984309_2_trimmed.fastq
SRR1984309_1.fastq SRR1984309_2.fastq
```

Esto realiza lo siguiente:

- `-b AGATGTGTATAAGAGACAG -B AGATGTGTATAAGAGACAG -b CTGTCTCTTATACACATCT -B CTGTCTCTTATACACATCT` -recortará los adaptadores de Illumina
- `-q 30,30` -recortará las bases con calidad < 30
- `--minimum-length 80` -recortará las lecturas con menos de 80 bases
- `-o SRR1984309_1_trimmed.fastq` -título del nuevo archivo de salida ya recortado
- `SRR1984309_1.fastq SRR1984309_2.fastq` -archivos de entrada

Trimmomatic 0.39:

```
>> java -jar trimmomatic-0.39.jar PE s_1_1_sequence.txt.gz s_1_2_sequence.txt.gz
lane1_forward_paired.fq.gz                lane1_forward_unpaired.fq.gz
lane1_reverse_paired.fq.gz                lane1_reverse_unpaired.fq.gz
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10      LEADING:3          TRAILING:3
SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Esto realiza lo siguiente:

- `ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10` -Corta el adaptador y otras secuencias específicas de la marca Illumina®
- `LEADING:3` -Corta las bases del inicio de una lectura, si está por debajo de 3 de calidad
- `TRAILING:3` -Corta las bases del final de la lectura, si está por debajo de 3 de calidad
- `SLIDINGWINDOW:4:15` -Realiza un recorte en la ventana deslizante de 4 bases, cortando una vez que la calidad media dentro de la ventana sea inferior a 15
- `MINLEN:36` -Elimina la lectura si está por debajo de una longitud las 36 bases

Ensamble

El proceso de descifrar la secuencia, junto con alguna información adicional disponible, a partir de pequeños fragmentos de RNA o DNA se denomina ensamblaje (Camargo-Vega et al., 2015). Para hacer el ensamblaje *de novo* se usó el programa Trinity 3.4.

Este utiliza un algoritmo de Bruijn, un método de programación dinámica. Además, puede detectar isoformas, manejar lecturas de extremo pareado, múltiples tamaños de inserción y trenzado (Grabherr et al., 2011). El tiempo de ejecución es exponencial en relación con el número de ramas del gráfico (Grabherr et al., 2011). Se uso el siguiente comando.

Trinity 3.4:

```
Trinity --seqType fq --max_memory 20G --left condA_1.fq --right condA_2.fq --
min_contig_length 80 --output --CPU 8 --max_memory 20G
```

Esto realiza lo siguiente:

- --seqType fq -Tipo de lecturas fq
- --max_memory 20G -Memoria máxima sugerida para ser utilizada por Trinity donde se puede habilitar la limitación. Proporcionada en Gb de RAM
- --left -Lecturas de la izquierda, uno o más nombres de archivo
- --right -Lecturas de la derecha, uno o más nombres de archivo
- --min_contig_length 80 -Longitud mínima del contig ensamblado para informar (def=200)
- --output -Nombre del directorio de salida
- --CPU 6 -Número de CPUs a utilizar

Anotación

Después de haber obtenido el ensamble, el siguiente paso consiste en realizar una identificación de las secuencias. Así como realizar la predicción y traducción de regiones codificantes con el programa TransDecoder. Posteriormente se asigna la información biológica a los genes previamente predichos (Grabherr et al., 2011). Los programas que se utilizaron para la anotación son Trinotate v3.1.1, CD-HIT 18.04 y Tblastn 2.12.0. Los cuales hacen uso de una serie de base de datos referenciadas. En el caso de Trinotate incluye la búsqueda de homología con bases de datos de secuencias conocidas (BLAST+/SwissProt/Uniref90), la identificación de dominios de proteínas (HMMER/PFAM), la predicción de péptido señal y dominios de transmembrana (signalP/tmHMM), y la comparación con bases de datos de anotación actualmente curadas (bases de datos EMBL Uniprot eggNOG/GO Pathways) (Tellez-Garcia et al., 2021). CD-HIT compara, agrupa y anota las secuencias de proteínas (Fu et al., 2012). Por otra parte, Tblastn fue utilizado para buscar homólogos de una base de datos especializada en proteínas de jalea real, que obtuvimos de UniProt.

Trinotate v3.1.1

```
--run Trinotate --run Trinotate_data
```

Esto realiza lo siguiente:

- `--run Trinotate` –Correr el programa Trinotate
- `--run Trinotate_data` –Nombre del directorio que va a correr el programa

CD-HIT 18.04

```
cd-hit -i archivo_proteinas.faa -T 8 -o archivo_proteinas_ch100.faa -c 0.9 -singles
```

Esto realiza lo siguiente:

- -i archivo_proteinas.faa -Es el nombre del archivo de entrada
- -T 8 -Es el tamaño de la palabra
- -o archivo_proteinas_ch100.faa -Es el nombre del archivo de salida
- -c 0.9 -Significa 90% de identidad, es el umbral de agrupación
- -single -Para ejecutarse en paralelo en un único ordenador

Tblastn 2.12.0

```
tblastn -db nt -query nt.fsa -out results.out -evaluate 0.0001 -outfmt 6
```

Esto realiza lo siguiente:

- -db nt -Es la base de datos
- -query nt.fst -Es el nombre del archivo que se va a buscar
- -out results.out -Es el nombre del archivo de salida
- -evaluate 0.0001 -
- -outfmt 6 -El número de formato de salida

Al obtener los resultados, solo fueron recuperados los transcritos pertenecientes a la familia Yellow/MRJP y RJPL con un e-value mínimo $1e-4$, un 70% de homología y con un tamaño de mínimo 200 aminoácidos. Estos criterios de selección fueron obtenidos al analizar las secuencias depositadas en las bases de datos de las proteínas de jalea real.

Cuantificar

Ya que obtuvimos los transcritos codificantes de proteínas de jalea real, se cuantificó el nivel de la expresión utilizando el programa Salmon, el cual utiliza nuevos

algoritmos (en concreto, acopla el concepto de cuasi-mapeo con un procedimiento de inferencia en dos fases) para proporcionar estimaciones de expresión precisas muy rápidamente (es decir, wicked-fast) y utilizando poca memoria. Salmon realiza su inferencia utilizando un modelo expresivo y realista de los datos de RNA-seq que tiene en cuenta los atributos experimentales y los sesgos comúnmente observados en los datos reales de RNA-seq (Patro et al., 2017). Para realizar dicha cuantificación se usaron los siguientes comandos.

Para preparar el índice en Salmon

```
salmon index -t athal.fa.gz -i athal_index
```

Esto realiza lo siguiente:

- `salmon index` –Indicar a Salmon que va a realizar un índice
- `-t athal.fa.gz` –Archivo con el que va a construir el índice
- `-i athal_index` –Nombre del archivo del índice realizado

Para realizar la cuantificación

```
salmon quant -i athal_index -l UI -1 samp.fastq.gz -2 samp.fastq.gz -o quants
```

Esto realiza lo siguiente:

- `salmon quant` -Indicar a Salmon que va a realizar una cuantificación
- `-i athal_index` -Nombre del archivo del índice
- `-l UI` -Una biblioteca no trenzada de extremos pareados en la que las lecturas se enfrentan entre sí
- `-1 samp.fastq.gz` –Primer archivo donde se va a ser la cuantificación
- `-2 samp.fastq.gz` -Segundo archivo donde se va a ser la cuantificación
- `-o quants` –Nombre del archivo de salida

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Recolección de muestras

En las siguientes figuras se pueden visualizar a las diferentes especies de abejas. La *G. acapulconis* (figura 9) se encontraron en estado silvestre y fueron recolectadas en Xoxocotla, Morelos. Mientras que la *A. mellifera* (figura 10), se encontraban en colmenas en el apiario de la UAEM sede Cuernavaca. Se recolectaron 30 individuos de manera aleatoria para cada especie. Además de las diferencias más notables en cuanto al tamaño ($\sim 30 \mu\text{m}$ en *G. acapulconis* y $\sim 200 \mu\text{m}$ en *A. mellifera*), se observaron diferencias de color. Las HG de *A. mellifera* tienen una tonalidad blanquecina con amarillo y acinos separados. Por el contrario, las de *G. acapulconis* se les vio con un color café oscuro y con los acinos más chicos y mucho más juntos que el de la abeja melífera.



Figura 9. *G. acapulconis* en su colmena. Estas abejas se recolectaron en una colmena silvestre en Xoxocotla, Morelos. (Foto tomada por Corzo, E).



Figura 10. *A. mellifera* en un bastidor. Estas abejas se recolectaron en el apiario de la UAEM sede Cuernavaca. (Foto tomada por García, A).

Dissección y extracción

Se diseccionaron 30 cabezas de ambas especies de abeja, debido a las dimensiones de las Abejas se optó por cortar la cabeza, eliminando las antenas y la lengua. El material extraído se almacenó en TRIzol®. Para el proceso de extracción de RNA se siguió el protocolo descrito en la sección **Protocolo de extracción de RNA con TRIzol®**. Al final el pellet obtenido se disolvió en 50 µL de H₂O/Dpc para su cuantificación.

Cuantificación

El extracto de RNA se cuantificó para ambas especies de abejas en el equipo NanoDrop One™. Se utilizaron 2 µL de muestra para medir la concentración del RNA. En la tabla 1 se muestran las concentraciones de RNA obtenidas.

Tabla 1. Medición de concentración de extracto de RNA. El extracto de RNA se midió en el equipo NanoDrop One™, utilizando solo 2 µL de muestra en ambas abejas.

Especie	RNA (ng/µL)
<i>G. acapulconis</i>	157.7
<i>A. mellifera</i>	308.0

En la tabla 1 se observa que la especie *A. mellifera* obtuvo una concentración de 308.0 ng/µL de RNA. Por otro lado, la especie *G. acapulconis* obtuvo una concentración de 157.7 ng/µL de RNA. La concentración de RNA obtenida para *A. mellifera* representa la concentración promedio normalizada de los niveles de

expresión de RNA para *A. mellifera* (Kim et al., 2022). En el caso de *G. acapulconis* el dato es nuevo, ya que no hay reportes para esta especie, aun así, esta concentración fue suficiente para crear nuevas librerías.

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el buffer TBE 1x, corrido a 100 V por 30 min, para visualizar los pesos moleculares del RNA obtenido, durante la electroforesis se utilizó el marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder (0.1-10 kb) *BioLabs*, ver figura 11. Se puede apreciar en el carril 1 y en el carril 2 una banda con una alta intensidad, la cual se aproximada a la banda del marcador de 1.0 kb; esto en ambas especies, lo cual demuestra indirectamente que el material extraído es idóneo para iniciar el proceso de secuenciación masiva.

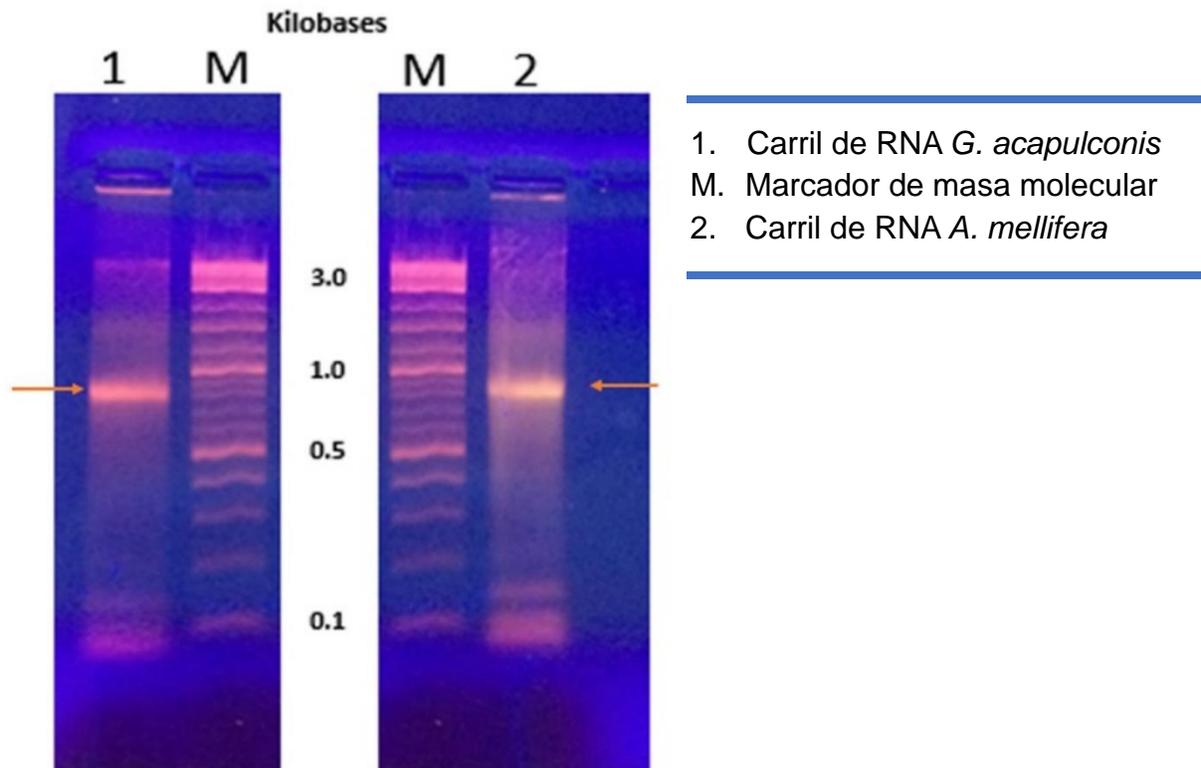


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa. Gel de electroforesis de RNA de las especies de abeja. (Foto tomada Corzo, E). Se observa una intensa banda en ambas especies *A. mellifera* y *G. acapulconis*, estas corresponden al RNA ribosomal, con un peso cercano a 1.0 kb

Electroforesis capilar

Se enviaron 10 µg de RNA de ambas especies de abejas a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología UNAM. Las muestras fueron evaluadas en un chip Bioanalyzer Agilent 2100, el cual es una electroforesis capilar. El resultado presenta una señal claramente correspondiente al RNA ribosómico 18S, pero una señal muy baja al 28S. Al igual que otras muestras de artrópodos no fue posible determinar el RIN (*RNA Integrity Number* por sus siglas en inglés) debido a que ocurre una fractura en el 28S ribosomal, que deriva en dos fragmentos del mismo tamaño que el 18S ribosomal. Este fenómeno también ha sido observado durante el análisis del RNA de alacranes (Cid-Uribe. Jimena, 2020). No se aprecia degradación de las muestras. Las muestras presentan una calidad adecuada, la cual se requiere para realizar el proceso de secuenciación masiva (figura 12).

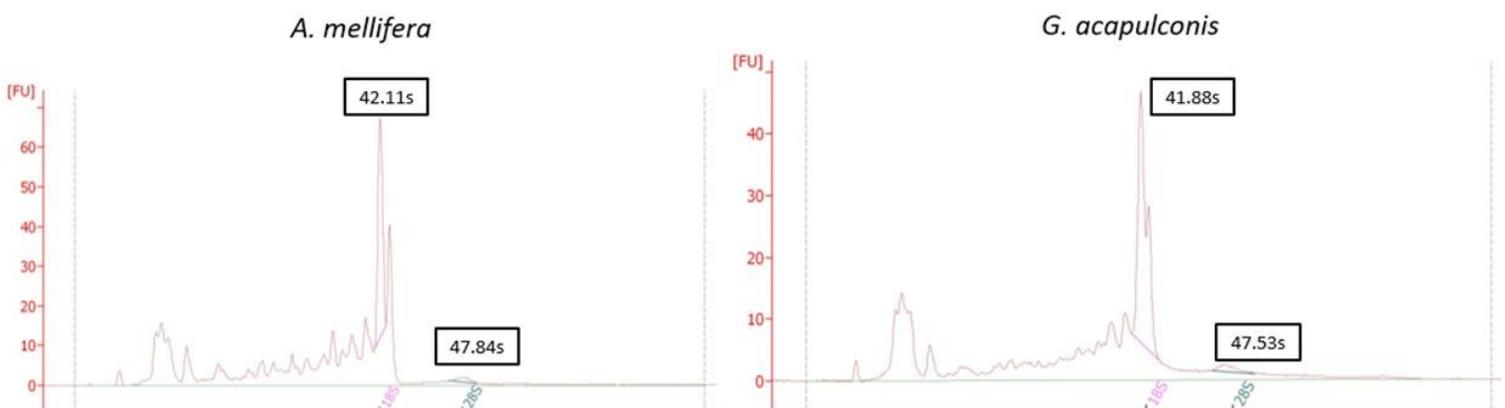


Figura 12. Integridad de RNA de obtenido de cabeza de *A. mellifera* y *G. acapulconis*. Determinadas en un Bioanalyzer Agilent 2100. El parámetro de RIN no es aplicable en muestras de artrópodos

Analisis de calidad y Ensamble

Las lecturas que entregaron la UUSMB fueron obtenidas por el equipo de la marca Illumina®, NextSeq 500, de las cuales las lecturas primarias fueron de 11,684,728 con un tamaño de 76 pb y las lecturas consideradas limpias fueron de 10,492,794 con un tamaño de 36 a 76 pb para *G. acapulconis*, para *A. mellifera* las lecturas primarias entregadas fueron de 13,209,338 con un tamaño de 76 pb y las lecturas limpias fueron de 12,585,393 con un tamaño de 36 a 76 pd ver tabla 5.

Tabla 2. Comparación de las lecturas de *G. acapulconis* y *A. mellifera* obtenidas por UUSMA contra las secuencias limpias.

Especie	Lecturas primarias	Longitud primario	Lecturas limpias	Longitud limpio	Lecturas primarias
<i>G. acapulconis</i> R1	11,684,728	76	10,492,794	36-76	11,684,728
<i>G. acapulconis</i> R2	11,684,728	76	10,492,794	36-76	11,684,728
<i>A. mellifera</i> R1	13,209,338	76	12,585,393	36-76	13,209,338
<i>A. mellifera</i> R2	13,209,338	76	12,585,393	36-76	13,209,338

En la tabla 2 se puede observar que para ambas especies la cantidad de secuencias no deseadas y de baja calidad que se retiraron con los programas cutadapt 1.18 y trimmomatic 0.39 fue de $\approx 1,000,000$ lecturas. Los datos obtenidos en los procesos de limpieza cuentan con la calidad necesaria para iniciar el proceso de ensamblado.

La cantidad de secuencias que se descifraron en la secuencia a partir de los pequeños fragmentos de RNA con el programa Trinity 3.4 para *G. acapulconis* fue de 88,510 secuencias y para *A. mellifera* fue de 68,721 secuencias.

Anotación

Después de tener un exitoso ensamblaje, sigue la identificación de las secuencias y la traducción de nucleótidos a aminoácidos, para eso se usaron los programas TransDecoder v5.5.0, Trinotate v3.1.1, Tblastn 2.12.0 y CD-HIT 4.6.8. Los tres programas se utilizaron para obtener el mayor número de datos.

Trinotate

Tabla 3. Transcritos anotados en Trinotate.

Espece	Transcript id	Prot id	sprotTop	Cog	gene ontology	Pfam
			BLASTPhit		blast	
<i>G. acapulconis</i>	172,630	40,420	17,898	1,404	4,880	15,820
<i>A. mellifera</i>	132,832	41,503	14,816	1,832	4,915	13,406

La tabla 3 nos muestra las cantidades de transcritos en los que se identificaron Dominios Pfam, COG, genes ontólogos y homólogos en las bases de datos. Las cuales van a ayudar a reconocer y comprender las proteínas de jalea real. Cabe destacar que observamos una mayor cantidad de transcritos en *G. acapulconis*. Sin embargo, existen más asignaciones en *A. mellifera* en COG y GO.

Los transcritos con anotación COG y GO obtenidos en Trinotate fueron utilizados para comparar de forma general ambos perfiles transcripcionales (figuras 13 y 14).

COG y GO.

COG (Por sus siglas en ingles *Cluster of Orthologous Genes*) Es una base de datos de grupos de proteínas ortólogas es un intento de clasificación filogenética de las proteínas codificadas en genomas completos. Cada COG incluye proteínas que son homólogas.

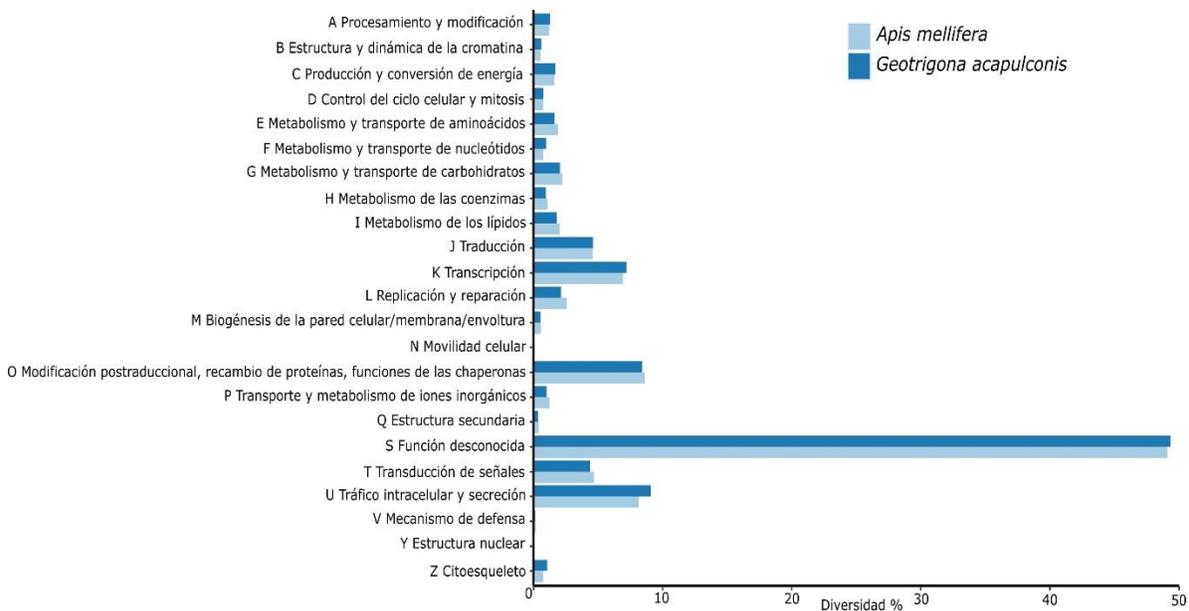


Figura 13. Diversidad de COG de ambas abejas. La gráfica muestra la distribución en diversidad de los tipos de proteínas que se encuentran en las abejas.

En la figura 13 se puede observar que las de mayor diversidad son J, K, O, S, T y U, pero la categoría de interés es la G que son las de metabolismo y transporte de carbohidratos, ya que en esa clasificación se encuentran nuestras proteínas Yellow/MRJP y RJPL porque algunas de ella han sido clasificadas como proteínas de transporte de carbohidratos. Cabe destacar que, a pesar de la diferencia entre el

número de transcritos entre los ensamblados, los perfiles clasificados por COG, no presentan diferencias evidentes.

GO (por sus siglas en inglés *Gene Ontology*) es una herramienta sencilla pero útil para comparar y trazar los resultados de las anotaciones por ontología.

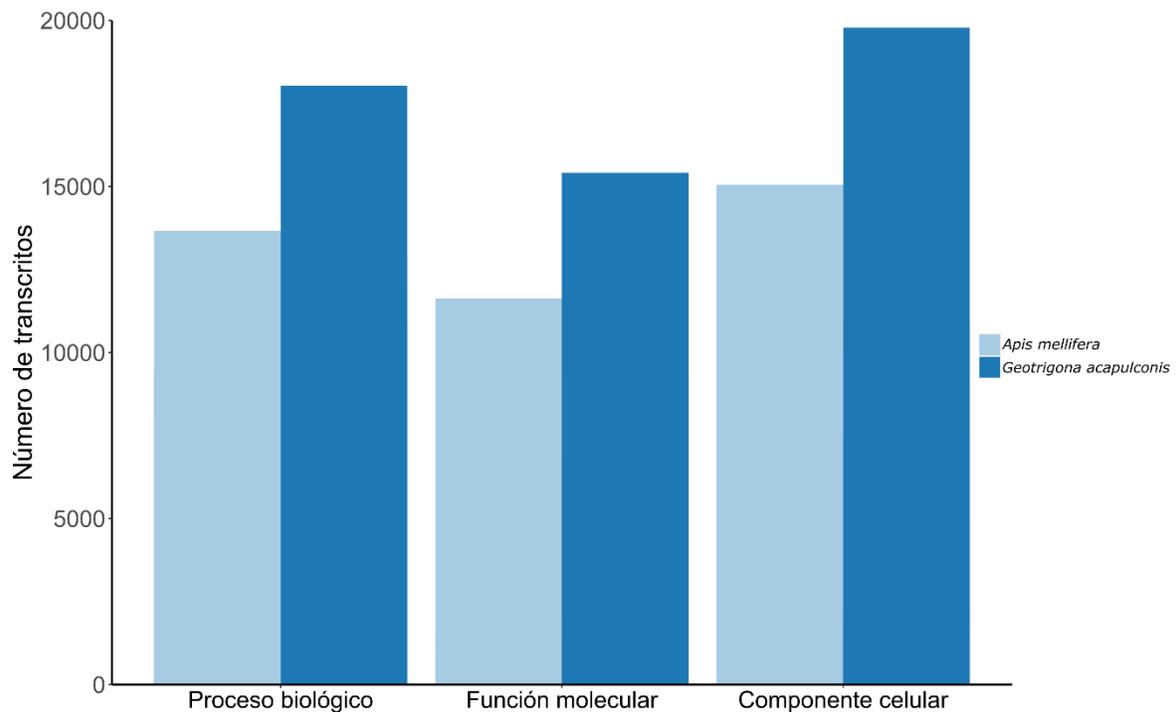


Figura 14. Número de transcritos de ambas abejas. Se muestra el número de transcritos de las clasificaciones de proteínas que se encuentran en las abejas.

En la figura 14 se observa, que en ambas abejas el mayor número de transcritos son de componentes celulares, después tenemos a los procesos biológicos y al final las funciones moleculares. En los procesos biológicos es donde se encuentran los transcritos de interés. Es importante notar que esta representación corresponde al número de transcritos, debido a que *Geotrigona* obtuvo más transcritos en su

ensamble y anotación se observa un mayor número de transcritos con respecto a *Apis*. No obstante, a este fenómeno, el perfil transcripcional de ambas abejas se comporta de manera similar.

CD-HIT

Tabla 4. Transcritos obtenidos en CD-HIT

Espece	gene id	sporotTop	Pfam	Cog
BLASTPhit				
<i>G. acapulconis</i>	15,521	14,473	13,018	4,300
<i>A. mellifera</i>	12,843	12,020	11,081	3,408

Al igual que en el análisis anterior (tabla 4) mostramos los transcritos agrupados e identificados en CD-HIT. En ella nos enseña las cantidades de transcritos identificados, cuantos cuentan con un dominio pfam, proteínas homólogas y genes ortólogos. Las cuales van a ayudar a reconocer y comprender las proteínas Yellow/MRJP y RJPL. Si comparamos la tabla 3 con la tabla 4 se puede observar que, para las identificaciones de genes, blastp, pfam y cog son diferentes es por esto por lo que se utilizan diferentes programas, los cuales nos ayudan a recuperar información faltante, o a reafirmar los datos ya obtenidos.

Tblastn 2.12.0

Tabla 5. Transcritos identificados en Tblastn

Espece	Transcritos
<i>G. acapulconis</i>	214
<i>A. mellifera</i>	524

En la tabla 5 se observa que en *G. acapulconis* se obtuvieron 214 transcritos que tienen similitud con proteínas de jalea real. Con respecto a *A. mellifera* fueron identificados 524 transcritos. Con estos resultados podemos comprobar que la cantidad de transcritos expresados para el complejo Yellow/MRJP para *A. mellifera* es mayor al de *G. acapulconis*. Cabe destacar que la base de datos utilizada en tblastn es específica para proteínas de jalea real.

Al finalizar los análisis de Trinotate, CD-HIT y Tblastn obtuvimos un grupo de secuencias codificantes de proteínas de jalea real de 105 para *A. mellifera* y solo de 22 para *G. acapulconis*. Al analizar la clasificación de estas proteínas las diferencias de las subfamilias entre ambas abejas es evidente.

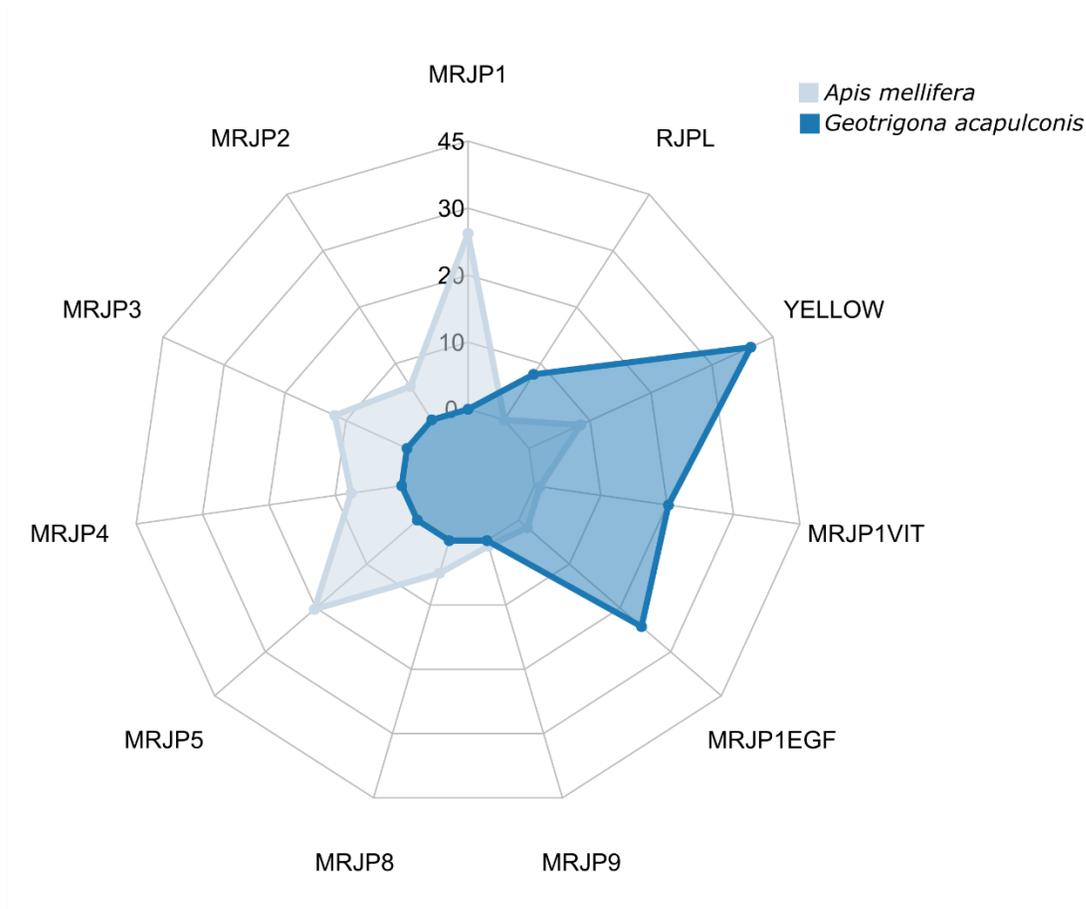


Figura 15. Diversidad de yellow, MRJP y RJPL de ambas abejas. La gráfica muestra la diferencia de diversidad de los yellow, MRJP y RJPL que se encuentran en las dos abejas.

En la figura 15 se observa que evidentemente solo la *A. mellifera* contiene proteínas MRJP, en especial la MRJP1. A diferencia de *A. mellifera*, *G. acapulconis* presenta una mayor diversidad de proteínas MRJP1EGF (por si siglas en Inglés *Epidermal Growth Factor*) y MRJP1VIT (vitelogenina) con 27% y 23% respectivamente. Dichas proteínas no son propiamente MRJP, son proteínas que se unen a MRJP1 y permiten que dicha proteína desarrolle su función. De la misma forma, observamos que *G. acapulconis* tiene mayor cantidad transcritos de yellow que la *A. mellifera* y sobre todo contiene la RJPL.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

- Las proteínas MRJP están ausentes en *G. acapulconis*.
- Se encontraron transcritos de proteínas MRJP1VIT, EGF y RJPL en *G. acapulconis*.
- Se observó mayor cantidad de transcritos de proteínas yellow en *G. acapulconis*.
- En *A. mellifera* los transcritos para proteína más representada es la MRJP1 y en *G. acapulconis* es la yellow.

CAPÍTULO 6 PERSPECTIVAS

- Hacer más comparaciones transcriptómicos con abejas sin aguijón.
- Obtener jalea real de *G. acapulconis* para realizar un estudio proteico.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

A diferencia de las otras dos especies de abejas, las glándulas hipo faríngeas no parecen estar restringidas a la casta de las obreras en los abejorros. Anteriormente, las glándulas HG se describieron en las reinas de los abejorros, pero su presencia en los machos seguía siendo objeto de controversia (Terzo et al., 2007), ya que se ha identificado los HG en los machos de *B. terrestris* (Albert et al., 2014). Una hipótesis a esto es por la diferencia de comportamiento social, las *B. terrestris* son abejas solitarias, por lo que no tienen trabajos específicos mientras que las *G. acapulconis* y *A. mellifera* tiene un comportamiento eusocial en donde hay castas y trabajos específicos para las abejas, por lo que una diferencia de comportamiento

social puede ser respuesta a un cambio evolutivo de la necesidad de que los machos también pudieran alimentar a las larvas, si es que las obreras estuvieran ausentes. Como se mencionó en los resultados, las diferencias morfológicas entre *G. acapulconis* y *A. mellifera* es muy evidente. Cabe destacar que también fueron identificadas diferencias en los perfiles transcripcionales entre ambas abejas. Sin embargo, aún no queda clara la función que desarrollan las subfamilias de proteínas de jalea real.

Además de la expresión de MRJP en las HG de las abejas melíferas, varios estudios independientes informaron sobre la expresión de MRJP en el cerebro (Hojo et al., 2010; Kucharski et al., 1998; Peixoto et al., 2009). En particular, la expresión selectiva de MRJP1 en las células de Kenyon de los cuerpos de los hongos (MBs) puede indicar una importante función no nutritiva, ya que se demostró que los MBs están asociados con la integración sensorial y el aprendizaje y la memoria en las abejas (Hourcade et al., 2010; Komischke et al., 2005; Menzel, 2001). Una proteína similar a la MRJP de una sola copia en los abejorros, que posiblemente representa un estado ancestral de la evolución de la MRJP (Kupke et al., 2012), es un candidato ideal para preguntarse por la función original y la localización de la MRJP tanto en los tejidos secretores como en el cerebro.

Albert et al., 2014 pudieron demostrar que la expresión de RJPL se produce tanto en los HG como en las células de Kenyon del cerebro, lo que indica que este tipo de patrón de expresión no es específico de las abejas, sino que puede representar un estado original en lugar de uno derivado. Además, la distinta localización de RJPL en las células de Kenyon compactas internas se correlaciona con el hallazgo

de Kucharski et al., 1998 obtenido mediante hibridación *in situ* (Kucharski et al., 1998). Las funciones múltiples de las proteínas MRJP en las abejas, sugeridas por el diverso patrón de expresión, no son infrecuentes. Por ejemplo, la proteína más antigua y caracterizada de la familia de proteínas Yellow/MRJP, Yellow, que forma parte de la pigmentación de la cutícula de los insectos, también se sintetiza en los cerebros de *Drosophila*, donde regula decisivamente el comportamiento de cortejo de los machos (Radovic et al., 2002). Por lo que, podría estar relacionada con la diferencia de pigmentación de las abejas. Actualmente, sólo podemos especular sobre una posible función de las proteínas MRJP en el cerebro de las abejas. Una posibilidad podría ser una función como factor de crecimiento implicado en el crecimiento o la plasticidad de las células de Kenyon. La actividad como factor de crecimiento de MRJP1 en el cambio obrero/reina, documentada en detalle por Kamakura (Kamakura, 2011). Otra posibilidad puede residir en la capacidad intrínseca de varias proteínas pertenecientes a la familia Yellow/MRJP para unirse y modificar aminas biógenas como la DOPA y la dopamina (Qian HAN et al., 2002; Xu et al., 2011). Dado que la neuromodulación y la transmisión dopaminérgica son comunes en el cerebro de los insectos (Blenau & Erber, 1998), es posible una participación directa o indirecta de las MRJP neuronales en este tipo de comunicación neuronal es posible, pero se necesitan más estudios para poner a prueba estas ideas (Albert et al., 2014).

Anteriormente se habló de las diferencias del desarrollo de las abejas. Después de que las obreras construyen las celdas de crías, los meliponios las abastecen de alimento larval y cierran la celda, en cambio los Apinos, mantienen abierta la celda

de la cría, por lo que cada cierto tiempo las obreras alimentan a las crías. Esta diferencia de desarrollo hace que los Apinos sean más vulnerables a enfermarse. Hay estudios que analizaron los aspectos beneficiosos del MRJP3 (Kohno et al., 2004; Okamoto et al., 2003), se ha descubierto que el MRJP3 influye en las respuestas inmunitarias de las células T regulando la producción de IL-4, IL-2 e IFN- γ (Kohno et al., 2004). También informan de que el MRJP3 somete la producción de IgE e IgG1, funcionando efectivamente como un agente antialérgico. Adicionalmente, se sabe que MRJP3 funciona como agente antiinflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo* en macrófagos de ratón activados al inhibir la obtención de citoquinas inflamatorias como el TNF-, la IL-6 y -1 (Qu et al., 2008). Por lo que se espera que en *A. mellifera* haya una mayor cantidad de MRJP3 que en *G. acapulconis*. Y así fue, se obtuvo un 13% de MRJP3 en *A. mellifera* y una nula cantidad en *G. acapulconis*.

Las MRJP1-5 tienen función nutricional, mientras que las MRJP6-10 no tienen función nutricional (Schmitzová et al., 1998), por lo que se esperaba encontrar más MRJP1-5 que del 6-10 en ambas especies de abejas. En *A. mellifera* se encontraron mayores cantidades de MRJP1-5, porque las MRJP6, 7 y 10 estuvieron ausentes en ambas abejas y las MRJP8 y 9 se encontraron en pocas cantidades. Las MRJP8 y 9 están relacionadas al veneno de la abeja melífera (Blank et al., 2012; Peiren et al., 2008), por lo que era de esperarse que *G. acapulconis* careciera de ellas. Con las MRJP6, 7 y 10 no se les ha encontrado aun una función específica, no se tiene una repercusión exacta para las especies de abejas. Por otra parte, las yellow están asociados al desarrollo y pueden tener funciones reguladoras en el desarrollo y

comportamiento de las abejas (Buttstedt et al., 2014; Drapeau et al., 2006; Ferguson et al., 2011). En *G. acapulconis*, esta podría tener mayor diversidad de yellow que la *A. mellifera* para reforzar las proteínas MRJP restantes de la *G. acapulconis*. La RJPL solo se ha reportado en abejorros (Albert et al., 2014; Kupke et al., 2012; Terzo et al., 2007), si las proteínas MRJP están ausentes en *G. acapulconis* se esperaría una mayor cantidad de RJPL. Las proteínas predominantes encontradas en *G. acapulconis* fueron las yellow y la RJPL. Al ver los resultados del proyecto, se observó que la *G. acapulconis* no contienen las proteínas MRJP, pero si tiene proteínas que reaccionan con MRJP1 que son MRJP1EGF y MRJP1VIT donde se encontró una mayor diversidad con respecto a *A. mellifera*. De igual manera, las proteínas yellow y RJPL se encuentran más representadas en *G. acapulconis*. Cabe destacar, que la RJPL está ausente en la *A. mellifera*.

REFERENCIAS

- Ala, R. A. Y. (1999). REVISION DE LAS ABEJAS SIN AGUIJON DE MEXICO (HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI). In *Folia Entomol. Mex* (Vol. 106).
- Albert, Š., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzová, J., & Simú Th, J. (2014). *The Family of Major Royal Jelly Proteins and Its Evolution*.
- Albert, Š., & Klaudiny, J. (2004). The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology*, 50(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2003.09.008>
- Albert, Š., Spaethe, J., Grübel, K., & Rössler, W. (2014). Royal jelly-like protein localization reveals differences in hypopharyngeal glands buildup and conserved expression pattern in brains of bumblebees and honeybees. *Biology Open*, 3(4), 281–288. <https://doi.org/10.1242/bio.20147211>
- Biessmann, H. (1985). Molecular analysis of the yellow gene (y) region of *Drosophila melanogaster* (gene regulation/development/mutation/transposable elements). In *Genetics* (Vol. 82). <https://www.pnas.org>
- Blank, S., Bantleon, F. I., McIntyre, M., Ollert, M., & Spillner, E. (2012). The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity. *Clinical and*

Experimental Allergy, 42(6), 976–985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03966.x>

Blenau, W., & Erber, J. (1998). Behavioural pharmacology of dopamine, serotonin and putative aminergic ligands in the mushroom bodies of the honeybee (*Apis mellifera*). In *Behavioural Brain Research* (Vol. 96).

Brehme, K. S. (1941). *GENETICS*. <https://www.pnas.org>

Brown, J., Pirrung, M., & Mccue, L. A. (2017). FQC Dashboard: Integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*, 33(19), 3137–3139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx373>

Buttstedt, A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2014). Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, 89(2), 255–269. <https://doi.org/10.1111/brv.12052>

Camargo-Vega, J. J., Camargo-Ortega, J. F., Joyanes-Aguilar, L., Camargo-Vega -, J. J., Felipe, J., & Joyanes-Aguilar, C.-O.-L. (2015). Conociendo Big Data Knowing the Big Data Conhecendo Big Data Fecha de Recepción: 1 de Octubre de 2014 Fecha de Aceptación: 1 de Diciembre de 2014. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.), Enero-Abril, 24(38)*, 63–77.

Can-Alonzo, C., Quezada-Euán, J. J. G., Xiu-Ancona, P., Moo-Valle, H., Valdovinos-Nunez, G. R., & Medina-Peralta, S. (2005). Pollination of ‘criollo’ avocados (*persea americana*) and the behaviour of associated bees in subtropical Mexico. *Journal of Apicultural Research*, 44(1), 3–8. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101138>

Cid-Urbe. Jimena. (2020, August). *Transcriptoma y proteoma de la glándula venenosa del alacrán Centruroides limpidus: una aproximación a la composición del veneno*. UNAM.

Drapeau, M. D., Albert, S., Kucharski, R., Prusko, C., & Maleszka, R. (2006). Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, 16(11), 1385–1394. <https://doi.org/10.1101/gr.5012006>

Federico M. Mendizabal. (2005). *Abejas (Albatros)*.

Ferguson, L. C., Green, J., Surridge, A., & Jiggins, C. D. (2011). Evolution of the insect yellow gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 257–272. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq192>

Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. In *Microbiological Research* (Vol. 192, pp. 130–141). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>

Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(23), 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>.

- García-Martínez, J., Delgado-Ramos, L., Ayala, G., Pelechano, V., Medina, D. A., Carrasco, F., González, R., Andrés-León, E., Steinmetz, L., Warringer, J., Chávez, S., & Pérez-Ortín, J. E. (2016). The cellular growth rate controls overall mRNA turnover, and modulates either transcription or degradation rates of particular gene regulons. *Nucleic Acids Research*, *44*(8), 3643–3658. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1512>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, *29*(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Gracia, Z. M. A., & Dzid, D. M. (2005.). *Recuperación de saberes y formación para el manejo y conservación de la abeja Melipona beecheii en la Related papers SIMPOSIO " ABEJAS NAT IVAS SIN AGUIJÓN Y SABERES CONT EMPORÁNEOS "*. www.melipona.net
- Hojo, M., Kagami, T., Sasaki, T., Nakamura, J., & Sasaki, M. (2010). Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie*, *41*(2), 194–202. <https://doi.org/10.1051/apido/2009075>
- Hourcade, B., Muenz, T. S., Sandoz, J. C., Rössler, W., & Devaud, J. M. (2010). Long-term memory leads to synaptic reorganization in the mushroom bodies: A memory trace in the insect brain? *Journal of Neuroscience*, *30*(18), 6461–6465. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0841-10.2010>
- Ilyasov, R. A., Lee, M. Iyeol, Takahashi, J. ichi, Kwon, H. W., & Nikolenko, A. G. (2020). A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 27, Issue 12, pp. 3615–3621). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.001>
- Inoue, T., Sakagami, S. F., Salmah, S., & Yamane, S. (1984). *The Process of Colony Multiplication in the Sumatran Stingless Bee Trigona (Tetragonula) laeviceps* (Vol. 16, Issue 2).
- Insuasty-Santacruz, E., Martínez-Benavides, J., & Jurado-Gámez, H. (2017). Determinación melisopalínológica de miel de abejas *Apis mellifera* producida con flora de clima frío, principalmente *Trifolium repens* L. *Veterinaria y Zootecnia*, *11*(1), 74–82. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2017.11.1.6>
- Kamakura, M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, *473*(7348), 478–483. <https://doi.org/10.1038/nature10093>
- Kilani, M. (2005). *Biology of the honeybee*.
- Kim, Y. H., Kim, B. Y., Kim, J. M., Choi, Y. S., Lee, M. Y., Lee, K. S., & Jin, B. R. (2022). Differential Expression of Major Royal Jelly Proteins in the Hypopharyngeal

- Glands of the Honeybee *Apis mellifera* upon Bacterial Ingestion. *Insects*, 13(4).
<https://doi.org/10.3390/insects13040334>
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2004). Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(1), 138–145.
<https://doi.org/10.1271/bbb.68.138>
- Komischke, B., Sandoz, J. C., Malun, D., & Giurfa, M. (2005). Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *European Journal of Neuroscience*, 21(2), 477–485.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03879.x>
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., & Maleszka, R. (2009). *Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation*. <https://www.science.org>
- Kucharski, R., Maleszka, R., Hayward, D. C., & Ball, E. E. (1998). A Royal Jelly Protein Is Expressed in a Subset of Kenyon Cells in the Mushroom Bodies of the Honey Bee Brain. In *Naturwissenschaften* (Vol. 85). Springer-Verlag.
- Kupke, J., Spaethe, J., Mueller, M. J., Rössler, W., & Albert, Š. (2012). Molecular and biochemical characterization of the major royal jelly protein in bumblebees suggest a non-nutritive function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.05.003>
- Li, J., Feng, M., Zhang, Z., & Pan, Y. (2008). Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 39(2), 199–214. <https://doi.org/10.1051/apido:2007059>
- Li, R., Li, Y., Kristiansen, K., & Wang, J. (2008). SOAP: Short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics*, 24(5), 713–714.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn025>
- Manejo racional de las abejas nativas sin aguijón (ANSA)*. (2013).
- ME. DARWIN ON THE DIMORPHIC CONDITION IN PRIMULA*. (1862).
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. In *Learning and Memory* (Vol. 8, Issue 2, pp. 53–62).
<https://doi.org/10.1101/lm.38801>
- Michener, C. (2000). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press.
- Mistrioni RAMOS, J., & Cristina de CARVALHO, N. (2006). *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE ENGENHARIA FLORESTAL-ISSN 1678-3867 PUBLICAÇÃO CI ENTÍFICA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E ENGENHARIA ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOLÓGICO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DE *Apis mellifera**.
- Nates-Parra, G. (2005). *Neotropics.-3000.long-tongue.species.(Apidae.and.Megachilidae),.and. 3000.short-tongue.species.(Colletidae)*.

- Nates-Parra, G. (2011). GENÉTICA DEL COMPORTAMIENTO: ABEJAS COMO MODELO Behavior Genetics: Bees as Model. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 16, Issue 3).
- Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2003). Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sciences*, 73(16), 2029–2045. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00562-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00562-9)
- Ollerton, J., & Cranmer, L. (2002). *Latitudinal trends in plant-pollinator interactions: are tropical plants more specialised?* <http://www.uni->
- Page, R. E., Erber, J., & Fondrk, M. K. (1998). *The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (Apis mellifera L.)*.
- PARDO-P., R., & NATES-P., G. (1994). Aumento de las visitas florales de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en cultivos al usar la feromona de *Nasonov* sintética. *Revista Colombiana de Entomología*, 20(3), 187–192. <https://doi.org/10.25100/socolen.v20i3.10026>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Peiren, N., de Graaf, D. C., Vanrobaeys, F., Danneels, E. L., Devreese, B., van Beeumen, J., & Jacobs, F. J. (2008). Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*, 52(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.05.003>
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., de Graaf, D. C., Devreese, B., van Beeumen, J., & Jacobs, F. J. (2005). The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1752(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.017>
- Peixoto, L. G., Calábria, L. K., Garcia, L., Capparelli, F. E., Goulart, L. R., de Sousa, M. V., & Espindola, F. S. (2009). Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 55(8), 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.005>
- Pina, A., Begou, O., Kanelis, D., Gika, H., Kalogiannis, S., Tananaki, C., Theodoridis, G., & Zotou, A. (2018). Targeted profiling of hydrophilic constituents of royal jelly by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1531, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.019>
- Qian HAN, Jianmin FANG, Haizhen DING, JOHNSON; Bruce M, Jody K, & CHRISTENSEN; Jianyong LI. (2002). Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochemical Journal*, 368(1).
- Qu, N., Jiang, J., Sun, L., Lai, C., Sun, L., & Wu, X. (2008). Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*) and European (*Apis*

- mellifera) honeybees. *Biochemistry (Moscow)*, 73(6), 676–680. <https://doi.org/10.1134/S0006297908060072>
- Quezada-Euán, J. J. G., Nates-Parra, G., Maués, M. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Roubik, D. W. (2018). Economic and cultural values of stingless bees (hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. In *Sociobiology* (Vol. 65, Issue 4, pp. 534–557). Universidade Estadual de Feira de Santana. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3447>
- Radovic, A., Wittkopp, P. J., Long, A. D., & Drapeau, M. D. (2002). Immunohistochemical colocalization of Yellow and male-specific Fruitless in *Drosophila melanogaster* neuroblasts. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 293). www.academicpress.comBBRC
- Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., & Sugunan, V. S. (2018). A review on Royal Jelly proteins and peptides. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 44, pp. 255–264). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.008>
- Schmitzová, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., & Jůdová, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. In *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* (Vol. 54).
- Smith, C. D., Zimin, A., Holt, C., Abouheif, E., Benton, R., Cash, E., Croset, V., Currie, C. R., Elhaik, E., Elsik, C. G., Fave, M. J., Fernandes, V., Gadau, J., Gibson, J. D., Graur, D., Grubbs, K. J., Hagen, D. E., Helmkampf, M., Holley, J. A., ... Tsutsui, N. D. (2011). Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5673–5678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008617108>
- Suwannapong, G., Chaiwongwattanukul, S., & Benbow, M. E. (2010). Histochemical comparison of the hypopharyngeal gland in *Apis cerana fabricius*, 1793 workers and *Apis mellifera linnaeus*, 1758 workers. *Psyche (London)*. <https://doi.org/10.1155/2010/181025>
- Tellez-Garcia, A. A., Álvarez-Martínez, R., López-Martínez, J. M., & Arellano-Carbajal, F. (2021). Transcriptome analysis during early regeneration of *Lumbriculus variegatus*. *Gene Reports*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101050>
- Terzo, M., Coppens, P., Valterova, I., Toubreau, G., & Rasmont, P. (2007). Reduced cephalic labial glands in the male bumblebees of the subgenus *Rhodobombus* Dalla Torre (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de La Societe Entomologique de France*, 43(4), 497–503. <https://doi.org/10.1080/00379271.2007.10697539>
- The Bees of the World*. (2007).
- Toole, C. (1993). *Diversity of native bees and agroecosystems* (J. G. ID. LaSalle, Ed.). Commonwealth Agricultural Bureau Internatinal.
- Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues

- exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(3), 326–329. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.005>
- Xu, X., Oliveira, F., Chang, B. W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., My Pham, V., Elnaiem, D. E., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M. C., Valenzuela, J. G., & Andersen, J. F. (2011). Structure and function of a “yellow” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32383–32393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.268904>
- Zimmerman, J. K., Roubik, D. W., & Ackerman, J. D. (1989). *Asynchronous Phenologies of a Neotropical Orchid and Its Euglossine Bee Pollinator* (Vol. 70, Issue 4).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CORZO VILLEGAS ERIKA** con número de matrícula **10002747** cuyo título es:

“COMPARACIÓN TRANSCRIPTÓMICA ENTRE LAS GLÁNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE APIS MELLIFERA Y GEOTRIGONA ACAPULCONIS”.

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 07 de septiembre del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. SONIA DÁVILA RAMOS	(PRESIDENTE).
DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA	(SECRETARIO).
DR. GUADALUPE PEÑA CHORA	(VOCAL).
DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN	(SUPLENTE).
DR. ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ	(SUPLENTE)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2022-09-07 08:55:06 | Firmante

Hu1ZGTS1q/Z8ii4ppcflqLGMl6alt9pNiPHrD4DF03hP3hxISAXEP1ve3KV1lrqZFZ12PNlcSE9KK3QvWkhtdeSDB6jvL3QnzzgCpdPkaM0tu/hZ8I71ajmOYCUtcKH/LNwCQnG3sf/4Kf0H83PtfjJf+j1CbeU5jL4uKYNGK0UXC3uRmijW3y68UHOgNW7P5VISOShzP+0j+YWBpW2qtqSFv/wdt+S2lXi+SILs8PRo6hVYXD08bNogOcvHgHOUzY+I4FI2oXO+F3rK3RLzyQ3depbj+qetxht6wMzZG8xgd42NMqW+NpzOEmJ53MMNLfoP34RelutBrc+7sl3lxA==

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2022-09-07 09:21:45 | Firmante

FkbAY32swtpxfFRTJZq9pHZI05s/vjA4dU2aCAUuzVE1n77lHAdMjqegM6O4/Qg18fZCihRA38ilXgdeFcCjAOrx3D/vmURzj+Wv4pP8LDH+LZoyJfYlI70Viah79nE+Up99SiQLJXDT3f3TjiohFtgMEq+ezc3MQ5QfxDmW5kYBAE40rYRbRWJttuQIAVep/ZFryAs26G+2jwZs0164zEDb4oocXW+/Bs+JPubz2d485MqdOAawnNu3myaAhaht7SOAokMaghwNDTNCzt2fQzP018vOxR0fPuX7+H7XhTg67iuOl9LwTpoJ5lwljEOzXC8DsrXseOoJ7Gd7TT7A==

ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ | Fecha:2022-09-07 15:56:45 | Firmante

o1VapKm89qZzWVmWgGpHilLUC8ODQ6oEBuE2FmhF47oisONSvndPZkA52VHCLrA5SmoJAAafOg63JcVrDLbhO+aAxxQbF3h6uLvlzhfCX/VkOsuWcXulv0d3Cdj8GBF0Pix6D54FyZ/Zh3MIDKXxJU4qylzDCDkxpQ+YY51kzFLwoygAgGziu1aGrZ2LKjeNMVaMDnuVMNy2xQ+FlutDiLVBN/gBlckfKqHqnaA5laA00u28+Eb6zhFEP9gT/l4PbrINtt1ddKRSELNeXOhDKLbxYLL49dHKXdE5x4PDyp03uRR2SLGW749a3ELWmM81Q+M1+Ny0sPQNA0dstadxVw==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2022-09-11 07:32:20 | Firmante

Q13RME3A0xmR4xqjIRD1n1s2claYxG8foXlvtqStO2J4cPmyLxXIRGkUG9u4CSS3Ss47VVBW5G1wEP8Dun6cgLR111sx/RqeA6lRevjH3K5tG0mCgus4EbmnlMyKrTDGMDvBWmPlMQTpu8ZGncDsqqvviWC6/GpymJ7204RcLI0/nBBBRxFbUKhAqZvSjnW8WgTnzzBlGB91kxhE4/NGQoWeCzD8yR8yev004NkQ+4zhB5BTMK13IEC27AtWTZs7d5jXaNoGB4YXK31NC7THDKJbuxv6LA/krXwgSmlLWdmF/pr21Yfljq7pSpDD2nVq5miFmX5jDn/bwJEYsBJHkzq==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-09-14 03:48:52 | Firmante

Qrm0xxQmHZBlxSaAqhpCm2rOjYJQauTOc8gxf/BORRY/6Owpw+fwX8bj/Sh7w1cQ0k9aCj4G6UL3GS993+JjHmUId6S+DFPg+a4r1nsRz8DEUEb4zWWqYru3grjXlpCkqlrENaV6vdEw0zzCPYq3v9DL0CT146PZVW0sMoXTom4Qxd0piapR4y5Tn77npqLwgMvgyElygr4lQQgaBj0+a+VmbCu2n7KY/yjEXp3NFSNzzYY2pov8Ar+QzSj+U+nLfJvGYS8TzcCKDxWz MizHNAN7YPlamqI8nJBEQaDR4zoT+YIFTvuB07j7/GnAkjUCMi+VZg3J/CyHN+dSg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



WSI3UCpJF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DqkaBJixhOVHqJo0BY0WUW35SThES>

