

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POLEN APÍCOLA UTILIZANDO LA
REGIÓN ITS2 COMO MARCADOR**

Por:

ALHELÍ SOLANO SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización molecular de polen apícola utilizando la región ITS2 como marcador

Por:

ALHELÍ SOLANO SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



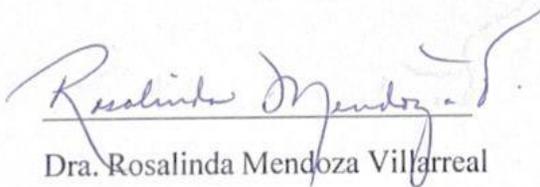
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Director principal



Dra. Lihua Wei

Director externo



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Co-Asesor



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización molecular de polen apícola utilizando la región ITS2 como marcador

Por:

ALHELÍ SOLANO SÁNCHEZ

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para
obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

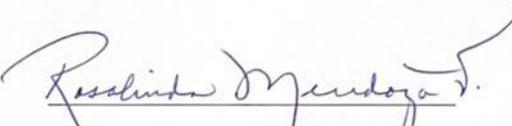
Aprobada por:



M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez
Presidenta



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Sinodal



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Sinodal





M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Alhelí Solano Sánchez

Autor Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi querida familia

Por darme la oportunidad de salir de casa para explorar nuevos horizontes, por diariamente alentarme para enfocarme y perseverar en mis estudios, por cuidarme a la distancia asegurándose de que nunca me faltara nada para poder continuar con mi carrera. Gracias por depositar en mi la confianza de que, aún lejos, cumpliría con mis responsabilidades académicas. Y especialmente, gracias por nunca ser un obstáculo en mi camino y permitirme elegir siempre libremente mi propio destino.

A mi Alma Terra Mater

Gracias a la gloriosa Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, el lugar que me brindó educación de calidad, los recursos necesarios e incontables oportunidades para mi desarrollo profesional. Pero, sobre todo, gracias por proporcionarme el entorno que me dio la oportunidad de superarme personalmente. Fue un privilegio formar parte de esta institución, que se convirtió en mi segunda casa, sin duda, fue el lugar de los momentos más valiosos en mi vida como estudiante. ¡Gracias UAAAN! ¡Buitres por siempre!

A mi asesor

El Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio y con ello la oportunidad de adquirir el conocimiento necesario para desarrollar habilidades que, sin duda, serán de gran utilidad en mi futuro.

A mis profesores

Quienes me transmitieron con paciencia su conocimiento y valiosos consejos para la vida más allá del salón de clases, alentándome siempre a definir mi siguiente objetivo para avanzar con determinación.

A mis verdaderos amigos

Por convertirse en mi segunda familia y ser un pilar fundamental en este camino al recordarme constantemente que no debo subestimarme y que poseo la capacidad para alcanzar mis metas. Gracias por haber sido un lugar seguro cuando mis emociones estaban a flor de piel por el estrés del momento, por celebrar conmigo mis logros y por haberme mantenido fuerte para no desistir en el trayecto.

A Dios

Por haberme dado la vida, la salud, las oportunidades y la fortaleza que me han permitido avanzar, salir adelante y disfrutar cada etapa de mi vida. Agradezco cada momento vivido lleno de alegría al rodearme siempre de personas buenas, y, sobre todo, por apartar de mi camino aquello que no es para mí.

A mis compañeros

De generación que fueron compañía y apoyo a lo largo de estos cuatro años de estudio, sin cada uno de ustedes la experiencia no habría sido la misma.

A todos

Los que alguna vez me apoyaron y fueron especiales para mí, sé que sin los momentos vividos y las enseñanzas que me quedaron tras tomar caminos distintos, no sería la persona en la que me he convertido ahora.

DEDICATORIA

A mi madre y padre

Norma Sánchez Vásquez y Efraín Solano Alinarez. Esta no es mi meta final, pero sí una muy importante que he podido finalizar con éxito gracias a su amor inagotable, apoyo y confianza constante desde mis primeros pasos en la vida. Madre, esto lo logré porque los valores y principios con los que me criaste me ayudaron a superar cada obstáculo en el camino, porque ver cómo salías adelante con valentía aun cuando el dolor era insoportable me hizo fuerte y valiente de corazón y mente. Padre, si he llegado hasta aquí, ha sido porque sé que siempre harás todo lo posible para ayudarme a conquistar el mundo, y porque gracias a tu ejemplo, vivo con humildad, manteniéndome fiel a mis convicciones.

Queridos padres, si he llegado hasta aquí es porque me han dado más de lo que alguna vez tuvieron, sacrificándose para brindarme más de lo necesario únicamente para hacerme feliz. Si he llegado hasta aquí, es porque tengo el privilegio de llamarlos padres. ¡Muchas gracias, este logro es de ustedes!

A mi hermana

Jazmín Solano Sánchez. Fuiste mi ejemplo a seguir desde que tengo memoria, siempre aspiré a ser tan valiente, comprometida y perseverante como tú, aunque sé el costo de ello solo tú lo conoces verdaderamente, sin embargo, te hará feliz saber que, tu hermana menor es más fuerte y responsable, gracias a ti. Reconozco que, sin tu guía como hermana mayor, nunca hubiera logrado alcanzar mis metas. Fuiste la persona que me animó a salir de casa en busca de mejores oportunidades y que en el trayecto siempre me extendió la mano para llevarme al siguiente escalón, gracias a ello, puedo presentar este trabajo, gracias a que siempre te preocupaste por mí, incluso más de lo yo lo hacía, y a que siempre hiciste más de lo que te correspondía.

Aprecio profundamente todo lo que has hecho por mí, gracias por siempre ser mi guía.

A Valeria Elizabeth Cavazos Durón

Por ser la única amiga que me acompañó fielmente desde el inicio hasta el final de esta aventura, por haber sido mi consuelo y refugio emocional en mis momentos más débiles, por ser honesta y hacerme ver mis errores, por transmitirme y enseñarme la importancia del respeto y la empatía, pero, sobre todo por mantenerme siempre sensata y enfocada.

A Juan Alejandro Alcocer Bautista

Por haber sido una fuente inagotable de apoyo y motivación, por ser un hogar cuando todo se me derrumbaba, por ser más de lo que significa la palabra “amigo”, por nunca dudar en estar para mí y porque tus consejos y perspectiva de la vida me dieron la valentía de dejar de lado la fantasía para afrontar la realidad de la vida.

A Ángel Ramsés Castro Arguello

Esto también es obra tuya querido amigo. Porque sin tu compañía en este camino nunca hubiera aprendido a confiar en mí. Porque tu amistad me dio la seguridad de que mis dudas e incertidumbres siempre tendrían una respuesta. Gracias por tantas enseñanzas y por recordarme que tengo la capacidad de lograrlo todo, te admiraré siempre.

A María José Espinosa Vilchis

Por haber duplicado mi alegría y restar mis angustias, sin tu compañía, el camino habría sido muy aburrido. Estar aquí se lo debo también a tu amistad, porque siempre me hizo sentir segura y fuerte para continuar adelante.

A María José Rodríguez Cantero

Por tu apoyo incondicional, por arroparme cuando estaba por desistir, por protegerme aún a mis espaldas, por cuidarme y preocuparte por mi como si fuéramos hermanas. Esto también es tuyo, porque sin tus cuidados no hubiera logrado llegar al final.

A Gary de Jesús Rodríguez García

Por siempre ser un apoyo incluso a la distancia, por guiarme con sabiduría y por ayudarme a encontrar mi rumbo cuando me encontraba confundida, sin tus consejos en algunos momentos de mi vida me habría perdido.

A Valeriano Carrillo Carrillo

Llegar al final de esta etapa ha sido posible gracias a tu ayuda constante y a demostrarme que los límites solo existen en nuestra mente. Si concluí este trabajo y cada semestre fue porque mis dudas siempre eran resueltas por tu humildad al compartirme de tu conocimiento. Siempre serás una inspiración amigo.

A Rosa María Herrera Trejo

Tu llegada fue inesperada, pero muy necesaria, pues gracias a ti conocí la resiliencia, la solidaridad y la perseverancia para conseguir lo que deseamos. Gracias por confiar en mí y por tantos momentos buenos.

A Caeli Jazmine Calvo Aguilar

Haber llegado hasta este punto en mi vida y ser la persona que soy hoy se debe en gran parte a tu lealtad, consejos, apoyo y escucha incondicional. Gracias por ser mi compañera de vida, por recibirme siempre con los brazos abiertos al regresar a casa y por celebrar cada paso del camino junto a mí.

A mis amigos

Vanesa Cruz, Ximena Hernández, Abigail Castañeda, Arnoldo Beltrán, Saúl Ignacio, Osvaldo Rodríguez, Juan Hernández, Laura Gómez, Sheyla Chávez, Mauricio Anuar, Jonathan Méndez, Belén Vásquez y Nayelly Avilés por quererme, acompañarme, cuidarme, enseñarme, escucharme y animarme en cada momento de mi vida. Estoy profundamente agradecida.

A mí

Por todas las veces en las que tuve que sacar fuerzas de donde no había para seguir adelante; por afrontar con valentía el miedo y la inseguridad en cada obstáculo; porque, aun cuando otros sembraron dificultades en mi camino, siempre elegí el entendimiento por encima del rencor. Por haber sido responsable y firme en mi camino, sin privarme de disfrutar y crear momentos que recordaré con nostalgia y gratitud.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos	4
IV. HIPÓTESIS.....	5
V. ANTECEDENTES.....	6
5.1 Polen apícola.....	6
5.1.1 ¿Qué es?	6
5.1.2 Obtención del polen apícola.....	8
5.1.3 Importancia económica	12
5.1.4 Importancia ecológica	15
5.2 Códigos de barras de ADN	17
5.2.1 ¿Qué son?	17
5.2.2 Inicios del código de barras de ADN	19
5.2.3 Códigos de barras de ADN para plantas	20

5.2.4	ITS.....	22
5.2.5	ITS2.....	23
5.2.6	Procedimiento experimental	24
5.3	Importancia de las características moleculares del polen apícola	25
5.3.1	Detección de plantas alergénicas por medio del polen	31
5.3.2	Detección de plantas transgénicas por medio del polen	32
5.3.3	Detección de plantas invasoras por medio del polen	33
5.4	Sistemas de clonación con el pGEM®-T Easy Vector.....	34
5.5	BLAST.....	36
5.5.1	BLASTn.....	36
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1	Amplificación	38
6.2	Clonación.....	40
6.3	Transformación en cepas de <i>E.coli</i>	41
6.4	Secuenciación	43
6.5	Análisis BLAST.....	43
VII.	RESULTADOS.....	44
7.1	Extracción de ADN genómico.....	44
7.2	Amplificación del fragmento ITS2.....	44
7.3	Transformación en cepas de <i>E.coli</i>	45
7.4	PCR de verificación.....	45
7.5	Purificación.....	46
7.6	Secuenciación	47
7.7	Análisis BLAST.....	48
VIII.	DISCUSIÓN.....	49

IX.	CONCLUSIONES	55
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corbícula.....	6
Figura 2. Morfología del polen de diversos orígenes botánicos	7
Figura 3. Polinización de la abeja melífera.	9
Figura 4. Cazapolen	9
Figura 5. Recolección del polen cazado.....	10
Figura 6. Ejemplo de “barcoding gap”.....	19
Figura 7. Regiones de tres genomas en plantas candidatos como códigos de barras.....	21
Figura 8. Región ITS con sus subregiones ITS1 e ITS2.	22
Figura 9. Métodos moleculares para la identificación de especies.	27
Figura 10. Pasos en la metacodificación de ADN de polen.....	27
Figura 11. Presencia de <i>Apis melífera</i> en México y cambios en número de colmenas por estado.....	28
Figura 12. Regiones apícolas en México.	29
Figura 13. Ejemplos de especies melíferas en la Península de Yucatán.	30
Figura 14. Registros de especies de mezquite en México 2021.....	32
Figura 15. Elementos del vector de clonación	35
Figura 16. Componentes del vector pGEM®-T Easy.	35
Figura 17. Espacio de búsqueda completo de BLAST.	36
Figura 18. Etapas del proceso de BLASTn.....	37
Figura 19. Procedimiento para la purificación por centrifugación.	39
Figura 20. Gel de electroforesis de los ADN genómicos obtenidos en cada tratamiento.	44
Figura 21. Productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS2.	44
Figura 22. Colonias resultantes de la transformación de los productos de ligación.	45
Figura 23. Gel de electroforesis de los productos de la PCR en colonia	46

Figura 24. Gel de electroforesis del ADN plasmídico purificado.....	46
Figura 25. Cromatograma de <i>Alnus cordata</i> , marcador ITS2.....	47
Figura 26. Cromatograma de <i>Brassica Juncea</i> , marcador ITS2.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedio en 2000 y 2009 de productos derivados de las abejas en México.....	13
Tabla 2. Impacto de la polinización de abejas melíferas en cultivos de diversos países. 14	
Tabla 3. Nombre, ubicación y longitud aproximada de ADN barcodes utilizados en plantas con mayor frecuencia.	21
Tabla 4. Tasas de éxito en la identificación de plantas y animales a nivel de especie utilizando ITS2.....	23
Tabla 5. Familias y géneros representativos de la flora apícola en Tamaulipas.	29
Tabla 6. Cebadores y programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN.....	38
Tabla 7. Mezcla para realizar PCR (GoTaq MasterMix de Promega TM).....	38
Tabla 8. Mezcla para preparar reacciones de ligación.	40
Tabla 9. Cebadores utilizados para la amplificación de ADN plasmídico	42
Tabla 10. Programa de PCR utilizado para la amplificación de ADN plasmídico.	42
Tabla 11. Especies identificadas por medio de BLASTn.	48

ABREVIATURAS

5'-ETS: External Transcribed Spacer/ Región Espaciadora Transcrita Externa.

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNe: Ácido desoxirribonucleico ambiental.

BLAST: Basic Local Alignment Tool/ Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

BOLD: Barcode of Life Data Systems / Sistema de datos de Código de Barras de Vida.

CBOL: Consortium for the Barcode of Life/ Consorcio para el Código de Barras de la Vida.

COI: Citocromo c Oxidasa I.

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide/ Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

g: Gramos.

kDa: Kilodalton.

kg: Kilogramos.

Kb: Kilobase.

ITS: Internal Transcribed Spacer/ Espaciador interno transcrito.

matK: Maturasa K.

MCS: Multiple Cloning Site/ Sitio de Clonación Múltiple.

mg: Miligramos.

min: Minutos.

ml: Mililitros.

mm: Milímetros.

NCBI: National Center for Biotechnology Information/ Centro Nacional de Información Biotecnológica.

ng: Nanogramo.

NGS: Next Generation Sequencing/ Secuenciación de Próxima Generación.

OGM: Organismo Genéticamente Modificado.

ORI: Origen de replicación.

pb: Pares de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction/ Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCR-PF: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Punto Final.

PFNM: Producto forestal no maderable.

psbA-trnH: Espaciador Intergénico de Cloroplasto.

PVP: Polyvinylpyrrolidone/ Polivinilpirrolidona.

rbcL: Ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa.

rpm: Revoluciones por minuto.

rpoCI: Subunidad β' de la ARN polimerasa codificada por plastidio.

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction/ Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.

s: Segundos.

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate/ Dodecil Sulfato de Sodio.

T: Timina.

μ l: Microlitros.

μ M: Micromol.

V: Voltios.

RESUMEN

El polen apícola tiene un impacto económico y ecológico significativo debido a sus propiedades nutricionales, lo cual resalta la importancia de identificar su origen botánico, debido a que además de su utilización con fines comerciales también puede ser empleado en investigaciones científicas en áreas botánicas, farmacológicas, etc. Dado que la identificación microscópica presenta muchas limitantes, en esta investigación se utilizó la herramienta molecular “Códigos de barras de ADN” empleando a la región ITS2 como marcador molecular para la discriminación de especies. Debido a que esta técnica demanda ADN de alta calidad se realizó una extracción de ADN basada en el protocolo optimizado de Wei et al., (2023), además de una PCR en la cual los cebadores utilizados permitieron la amplificación de la región ITS2 en las muestras de ADN. Los productos obtenidos fueron secuenciados mediante la técnica de Sanger. A través del análisis bioinformático BLAST, se lograron altos porcentajes de identificación a nivel de género en 11 secuencias, aunque a nivel de especie solo se identificaron siete secuencias, mientras que tres presentaron dos especies probables y, en cuatro muestras se identificó una misma especie (*Melampodium divericatum*). Este estudio evaluó y corroboró la universalidad del marcador ITS2, destacando su capacidad de amplificación y secuenciación, especialmente se destaca su alta efectividad en la discriminación de taxones vegetales a nivel de género y con menor eficacia a nivel de especie.

Palabras clave: Polen, ADN, Identificación, ITS2, BLAST.

I. INTRODUCCIÓN

El polen apícola es la aglutinación de polen de una especie (polen monofloral) o de distintas especies vegetales (polen multifloral) efectuado por abejas pecoreadoras que utilizan sus secreciones salivares y néctar para humedecer, dar adherencia y formar conglomerados de 1.4 a 4 mm de tamaño, los cuales son transportados a la colmena por medio de las corbículas de las patas de las abejas, constituyendo la fuente principal de nutrientes para todas las etapas de desarrollo de la colmena, dichos nutrientes pueden variar por los orígenes botánicos y por las características geográficas y ambientales de la región de donde sea recolectado. Las tonalidades que se pueden distinguir en algunos pólenes también están sujetos al origen botánico de donde las abejas pecoreen, pero también a la exposición solar, al contacto con el aire o al periodo de almacenamiento (Bogdanov, 2012; Thakur & Nanda, 2020; Cárdenas-Orrego et al., 2022; Almeida-Muradian et al., 2005).

El polen ha tenido un impacto económico significativo desde 1986, cuando el proceso de obtención del polen apícola para su comercialización en su forma natural o para su sometimiento a procesos de extracción comenzó a interesar a industrias farmacéuticas, alimentarias, cosmetológicas y terapéuticas debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. En diversos países se producen anualmente grandes cantidades de polen, no solo para productos destinados al consumo humano, sino también para animales. Además, es sabido que en varios países utilizan a las abejas como vectores polinizadores ya que son la especie más eficiente para asegurar conseguir cultivos de calidad (Khalifa et al., 2021).

Actualmente, las abejas enfrentan múltiples desafíos que afectan su capacidad de polinización, entre ellos la pérdida de hábitat debido a la contaminación y al cambio climático. Por ello, identificar las especies de mayor interés para las abejas es fundamental para promover el cuidado y la preservación de dichas especies y de los ecosistemas donde estas habitan. Tradicionalmente la identificación del origen botánico del polen se realiza mediante microscopía óptica, discriminando especies basándose en características morfológicas, sin embargo, las tecnologías para la identificación de especies están en

constante evolución y en las últimas décadas, numerosos estudios han empleado la técnica del código de barras de ADN debido a su eficacia y rapidez.

El código de barras de ADN es una técnica molecular práctica y estandarizada que permite identificar la especie a la que pertenece una muestra biológica, incluso si el material está degradado, dañado, antiguo, etc. Esta técnica se basa en el uso de fragmentos cortos de ADN provenientes de una región estandarizada del genoma, lo cuales se comparan con uno o varios genes de referencia, siendo aplicable a cualquier grupo de organismos. En estudios previos sobre el polen, se han empleado varios marcadores para la codificación de barras de ADN, tales como *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *trn* e *ITS2*, utilizándolos por separado o como locus combinados, sin embargo, aún no se ha determinado cuales son los marcadores más eficaces para discriminar especies vegetales a nivel de género y especie (Altamirano-Benavides & Yanez-Moreta, 2016; Yu et al., 2021; Vera M et al., 2012; Moritz & Cicero, 2004; Prudnikow et al., 2023).

II. JUSTIFICACIÓN

El polen apícola es un elemento de alto valor económico debido a que su composición nutricional es útil en múltiples industrias para el desarrollo de productos a beneficio del ser humano y de animales. Además, representa una herramienta valiosa en diversas áreas de investigación científica, ya que se considera un biomarcador ambiental omnipresente. El hecho de que su composición este determinada por su origen botánico permite la identificación o el seguimiento de especies invasoras, transgénicas y alergénicas. La utilización de la técnica molecular de Código de Barras de ADN permitirá identificar de manera fácil y rápida la composición botánica del polen, esta información facilitará promover el cuidado y la preservación de las especies de mayor interés para las abejas y de los ecosistemas en los que habitan.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la efectividad de la región ITS2 como código de barras de ADN para la identificación de especies botánicas en polen apícola.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la utilidad del ADN extraído para la identificación de especies ecológicamente relevantes en la alimentación de las abejas.
2. Determinar el poder discriminatorio de la región ITS2 en polen apícola.
3. Identificar las secuencias de las especies presentes en las muestras de polen apícola.
4. Detectar especies invasoras, transgénicas o tóxicas en las muestras de polen apícola.
5. Evaluar la efectividad del fragmento ITS2 para identificar especies por este método.

IV. HIPÓTESIS

La región ITS2 es efectiva para la identificación de especies botánicas en polen apícola mediante el uso de Código de Barras de ADN aún entre especies estrechamente relacionadas, proporcionando información confiable y detallada sobre la composición del polen recolectado por las abejas.

V. ANTECEDENTES

5.1 Polen apícola

5.1.1 ¿Qué es?

Se conoce como polen apícola o corbicular a la aglutinación de polen de la misma especie botánica o de diversos orígenes botánicos cuando no hay suficiente oferta en una planta en particular. Este proceso es llevado a cabo por abejas pecoreadoras, las cuales pueden combinar granos de polen de diferentes especies vegetales en la misma carga. Las abejas pecoreadoras añaden sus secreciones salivares en donde están contenidas enzimas como amilasas y catalasas al igual que un porcentaje de néctar para dar adherencia y poder formar conglomerados, cargas o pellets. Para que estas abejas sean un vector polinizador, tienen un bolsillo bordeado por pelos que les permite acopiar y acarrear el polen a la colmena, dicho bolsillo se encuentra situado en la tibia del tercer par de patas llamado corbícula de ahí que se conozca también como polen corbicular (**Figura 1**) (Bogdanov, 2012; Fernández et al., 2017; Montenegro et al., 2013; De Jesus Inacio et al., 2021).



Figura 1. Corbícula. (ubicada en el tercer par de patas). Fuente: (Keller et al., 2005).

En la transferencia planta-polinizador interviene un campo electrostático que posibilita el intercambio, en donde la flor está cargada negativamente y el cuerpo de la abeja cargado positivamente, esta interacción es primordialmente mutualista debido a que la supervivencia de las abejas melíferas se basa en parte o completamente de los recursos proporcionados por las flores como lo es el néctar, polen, partes florales, resinas, ceras, aceites o a veces fragancias. Estos recursos son almacenados dentro de los alvéolos para su posterior consumo, de esta manera, se les otorga a las plantas la capacidad de

reproducirse sexualmente, dando como resultado beneficios a ambas partes (Thakur & Nanda, 2020; Barrios Orozco, 2020; Trejo-Salazar et al., 2015). Cuando los conglomerados finales son frescos pueden ser cilíndricos, redondos, triangulares o en forma de campana (**Figura 2**); con un tamaño de 1.4 a 4 mm y un peso de 7.5 a 8.0 mg, mientras que cuando están secos adoptan una forma esferoidal o de huso con un diámetro de 0,01 a 0,05 mm (Cárdenas-Orrego et al., 2022; Thakur & Nanda, 2020).

Sus tonalidades son variables, desde colores muy claros como el blanco o crema hasta colores muy oscuros como el marrón, gris o verdoso, encontrándose también pólenes amarillos, naranjas y rojos. Esta variación se debe a muchos factores ya que influyen condiciones ambientales como la exposición a la luz solar, el contacto con el aire, el periodo de almacenamiento a temperatura ambiente, o bien por el origen botánico de donde sea recolectado debido a que en las anteras de las flores se encuentran colorantes lipídicos, sobre todo flavonoides, carotenoides y antocianinas (Almeida-Muradian et al., 2005; Gardana et al., 2018; Cárdenas-Orrego et al., 2022).

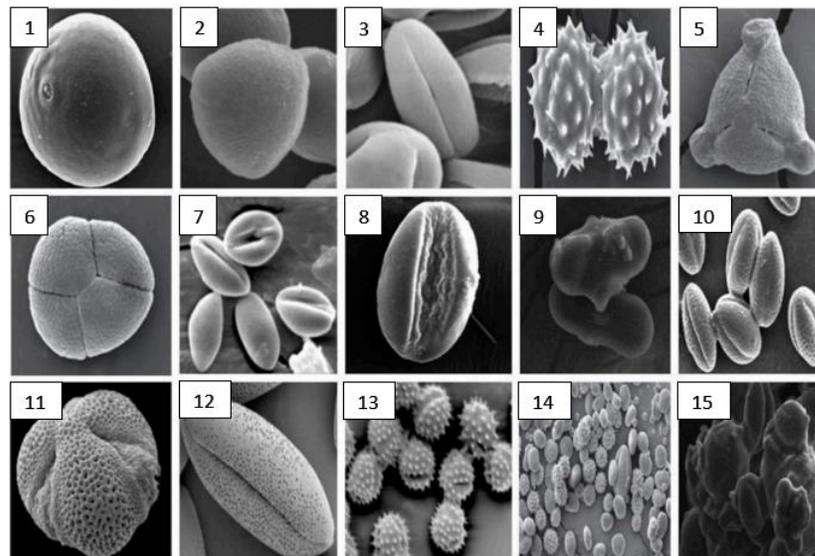


Figura 2. Morfología del polen de diversos orígenes botánicos. 1. *Zea mays*. 2. *Quercus* sp. 3. *Actinidia arguta*. 4. *Elaeis guineensis*. 5. *Camellia sinensis*. 6. *Mimosa diplotricha*. 7. *Arecaceae* sp. 8. *Cocos nucifera*. 9. *Coriandrum sativum*. 10. *Brassica napus*. 11. *Maytenus* sp. 12. *Aloe greatheadii*. 13. *Asteraceae eupatorium*. 14 y 15. Multifloral: muestras que contienen granos de polen individuales con diferentes formas y propiedades superficiales. Fuente: (Thakur & Nanda, 2020).

5.1.2 Obtención del polen apícola

Los conglomerados de polen tienen diversos orígenes, ya sea por plantas, aire (Prudnikow et al., 2023) o por medio de vectores polinizadores en donde se encuentran a múltiples insectos con algunas diferencias en los mecanismos de polinización (Barrios Orozco, 2020). Es por ello que, dependiendo de su origen, los conglomerados de polen pueden estar formados por pocos granos o por una muestra global que representa una o más especies de plantas (Prudnikow et al., 2023).

El proceso de recolección de polen apícola comienza mayormente durante la temporada primaveral cuando las abejas melíferas manipulan el polen de la flor con la lengua y las mandíbulas para lamer y mordisquear las anteras (**Figura 3**) de esta forma al entrar en contacto con las secreciones bucales el polen se humedece quedando fijo al área de la boca, mientras que, debido a la gran pilosidad en el cuerpo de las abejas una cantidad considerable de polen se adhiere a éste y a los pelos de las patas (Baldi et al., 2004; Blanco, 2020; Thakur & Nanda, 2020).

Posteriormente los conglomerados son transferidos a las canastas, bolsillos o corbículas de la tibia posterior, quedándose almacenados dentro de los alveolos (Thakur & Nanda, 2020) para luego ser consumido y cumplir con los requisitos proteicos y lipídicos de la abeja o para obtener y acarrear los nutrientes necesarios para la mantención de la colmena (Montenegro et al., 2013).

Cabe destacar que lo descrito anteriormente y otras características hacen que las abejas pertenezcan al grupo de insectos denominado himenópteros ya que como se mencionó cuentan con un aparato masticador que le facilita la acción de morder y lamer simultáneamente, gracias a esta acción una colonia de abejas es capaz de recolectar aproximadamente 50 y 250 g de polen por día o entre 15 y 40 kg por año (Thakur & Nanda, 2020).

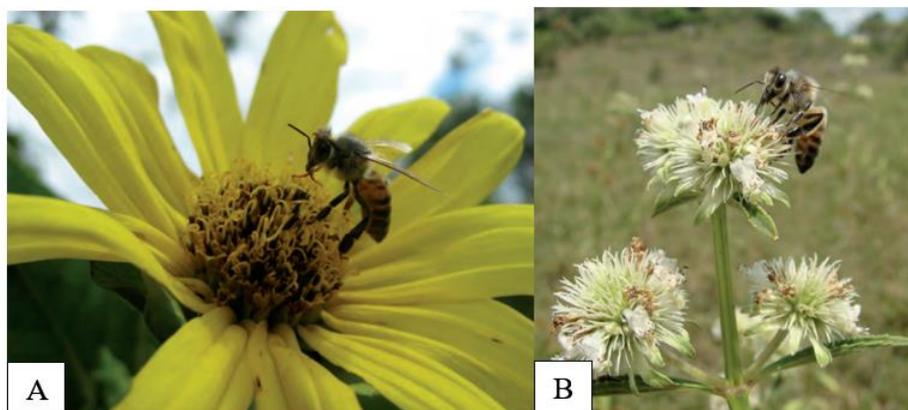


Figura 3. Polinización de la abeja melífera. A, B: Interacción de abeja melífera con distintas fuentes vegetales. Fuente: (Silva & Restrepo, 2012).

Después, para que los apicultores puedan industrializar el polen deben llevar a cabo etapas de cosecha o recolección, desinsectación, secado (Fernández et al., 2017), tamizado, desinfección, almacenamiento y envasado.

Para recolectar el polen deben situar en la entrada de la colmena conocida como piquera un cazapolen: un mecanismo diseñado como trampa que al estar compuesta por una rejilla (Baldi et al., 2004) con orificios de 5 mm de diámetro (Barajas- Ortiz et al., 2011) permite el paso del cuerpo de la abeja y bloquea el paso de las cargas de polen, de este modo, caen en un receptáculo inferior para su recolección que será destinado a usos comerciales (**Figura 4**).



Figura 4. Cazapolen (ubicado en la piquera de la colmena para cazar los granos de polen). Fuente: (Keller et al., 2005).

Una vez cazado y recolectado el polen fresco (**Figura 5**) pasa a la etapa de secado en donde se le debe dar las condiciones para deshumidificarlo (reducir su humedad) (Santamaría et al., 2022) estas etapas deben ser ejecutadas adecuadamente para cumplir con los estándares más altos que ayudarán a preservar la calidad del producto, ya que tanto la temperatura como la humedad relativa pueden influir en la longevidad del polen (Rodríguez-Rojas et al., 2015).

Cuando no se cumplen las etapas aumenta el riesgo de una fermentación provocando que se apelotonen los granos (Baldi et al., 2004) haciendo más difícil su aprovechamiento y dando paso a la proliferación de bacterias y hongos (Barajas- Ortiz et al., 2011), deteriorándose y perdiendo su valor nutritivo.



Figura 5. Recolección del polen cazado. Fuente: (Cornman et al., 2015).

Para evitar un mal proceso de secado se debe evitar la exposición directa a la luz solar y a temperaturas elevadas durante la manipulación o traslado ya que hay riesgo de perder sus propiedades terapéuticas. Otra de las variables que aumenta el riesgo de humedad son las impurezas presentes en el polen como: tierra, larvas muertas, insectos, abejas, hojas, por ello debe pasar por una limpieza que se puede realizar de manera manual o por medio de tamices de diferentes tamaños (Baldi et al., 2004; Barajas- Ortiz et al., 2011).

Existen dos métodos de secado de polen: uno manual y otro artificial, el primer método presenta varias desventajas debido a que es de acción lenta, poco higiénico y de

baja efectividad a causa de que el tiempo de exposición al sol (Barajas- Ortiz et al., 2011) y aire es demasiado largo. Este secado se debe realizar en capas no superiores a 1 cm ya que posibilita un endurecimiento en la superficie externa si la exposición es muy rápida, quedando encerrada la humedad en las capas inferiores, lo que conlleva a una desnaturalización, a un deterioro de los elementos fotosensibles, cambios de color y a una disminución en el valor nutricional y de calidad por la desintegración de vitaminas, oxidación de carotenoides y proteínas debido a los rayos ultravioleta.(Baldi et al., 2004).

En lo que concierne al secado artificial se emplea un mecanismo en donde el aire circula a través del polen a temperatura ambiente o a temperaturas de 35 °C y 45°C (Barajas- Ortiz et al., 2011), para no producir disgregaciones ni pérdidas nutritivas. Cabe mencionar que estudios recientes de Santamaría et al., (2022) proponen la construcción de hornos de secado automatizado que incluyen tecnologías como big data e inteligencia artificial garantizando una distribución más eficaz y uniforme del calor, posibilitando procesos de secado con mayor cantidad y calidad del producto, esto representaría un gran avance en la apicultura ya reduciría el gasto energético para la producción masiva de polen.

Cuando el polen llega a un contenido de humedad menor a 12% se da por concluida la etapa de secado y se procede a enfriar y tamizar para poder limpiarlo de impurezas que se hayan colado. En esta etapa los apicultores se ayudan de tamices de diferentes tamaños y en ocasiones de tamices vibratorios que separan el polen de los residuos mientras que simultáneamente van clasificando las bolitas de polen conforme su diámetro (Barajas- Ortiz et al., 2011; Yepes Giraldo & Cardona, 2005; Baldi et al., 2004).

Finalmente se hace una inspección de forma manual para asegurarse que no queden residuos vegetales, piedritas, insectos o sus fragmentos, secreciones, etc. Al terminar la etapa de tamizado y limpieza, se da inicio a una etapa de desinfección para eliminar el riesgo de que huevos de lepidópteros eclosionen y se desarrollen, para esto se puede emplear frío intenso (-18 a -20° C) o usar gases, líquidos o compuestos químicos como bromuro de metilo, anhídrido carbónico, óxido de etileno y sulfuro de carbono (Baldi et al., 2004).

Tras realizar cada una de estas etapas el polen podrá ser almacenado en bolsas de plástico que al sellarse pueden introducir en bidones de cartón piedra revestidas en su interior de papel de aluminio, mientras que, para envasado se recomienda utilizar frascos de vidrio caramelo para evitar el paso y el contacto con la luz. Estando en condiciones con poca luminosidad, en un ambiente seco y frío entre 2 y 6 °C se logran altos tiempos de vida útil del polen (Cobo Ochoa, 1980; Baldi et al., 2004; Yepes Giraldo et al., 2005).

5.1.3 Importancia económica

Los datos registrados del impacto del polen en la economía mundial inician aproximadamente en 1986; fecha en donde se produjeron de 60 a 130 toneladas de polen en Australia occidental, mientras que en el continente europeo se produjeron 1200 toneladas de las cuales se exportaron 943 únicamente en España, convirtiéndose en el país de mayor producción. Actualmente el valor económico mundial de la polinización está valuado en 153 millones de euros aumentando el requerimiento de polen apícola en países como Estados Unidos, Reino Unido y Alemania (Bogdanov, 2012; Khalifa et al., 2021; de Mattos et al., 2015).

El proceso de obtención del polen para comercializarlo no solo es de interés de apicultores, sino que también industrias farmacéuticas, alimentarias, cosmetológicas y terapéuticas (Yepes Giraldo & Cardona, 2005) se han interesado en estudiar las propiedades del polen para aprovechar cada uno de sus componentes y obtener diversos productos a beneficio del ser humano ya que cerca del 70% de las sustancias del polen de abeja son biológicamente activas (Xi et al., 2018).

Una causa que aumentó el interés en este producto es su valor nutricional ya que se encuentra constituido por altos niveles de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, oligoelementos, azúcares y aminoácidos esenciales. Es por ello que las toneladas que se producen de polen apícola en el mundo actualmente varían en cada país, por ejemplo: Taiwán es un lugar en donde 160,000 colonias de abejas melíferas producen 700 toneladas de polen por año, China es exportador y productor de 2500 toneladas por año, por su parte Reino Unido, Alemania y Estados Unidos generan más de 1500 toneladas anuales (Nogueira et al., 2012; Puig-Peña et al., 2012; Hsu et al., 2021; Bogdanov, 2012; de Mattos et al., 2015).

Respecto a México la presencia de las abejas melíferas tuvo lugar alrededor de 1760 y 1770 fechas en donde ya tenían gran impacto ecológico, social y comercial en culturas mesoamericanas debido a que eran un gran elemento en sus actividades tradicionales, sin embargo, no fue hasta el siglo XX que la apicultura comenzó como una actividad de relevancia económica (Baena-Díaz, Chévez, de la Merced, et al., 2022).

Tan solo entre 2008 y 2017 la apicultura era realizada por 41,000 y 45,000 productores respectivamente, de los cuales tenían alrededor de 2,000,000 de colmenas distribuidas por todo el país (Martínez-Pérez de Ayala et al., 2017). Se ha comprobado que para propósitos comerciales las abejas melíferas son polinizadores altamente eficientes ya que entre 2000 y 2009 los productos que derivaban de las abejas rebasaban las 60 mil toneladas (Lugo Melchor et al., 2017) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Valores promedio en 2000 y 2009 de productos derivados de las abejas en México. Fuente: (Lugo Melchor et al., 2017).

Producto	Valores promedio
Miel	57 mil toneladas
Cera	2,2 mil toneladas
Polen	25 toneladas
Colmenas para polinización de cultivos hortícolas y frutícolas	135,500 colmenas

Se sabe desde 1985 que entre las industrias que utilizan ampliamente el polen está la farmacéutica, para regular funciones intestinales, infecciones respiratorias, reacciones alérgicas, reparación de tejidos, eliminación de tóxicos y en la reducción de niveles altos de colesterol, favoreciendo de este modo a personas débiles, convalecientes, anémicas, hipertensas, con tendencia a neurosis y en términos generales, a aquellos que requieran aumentar su vitalidad (Huidobro et al., 1985; Nogueira et al., 2012; Cobo Ochoa, 1980).

Una de las ventajas al momento de trabajar con polen es que se puede comercializar en su forma natural o someterse a procesos de extracción con propiedades farmacológicas como suplemento nutricional en forma de cápsulas, tabletas, polvos,

barras de caramelo y líquidos orales. Por otra parte, gracias a los metabolitos secundarios obtenidos de las plantas de donde se colectan los conglomerados de polen, permiten su uso en la industria cosmética para la protección, blanqueamiento e hidratación de la piel, también se puede ofrecer en el mercado como champús anticaspa debido a que el polen de abeja previene el desarrollo de hongos (Kostić et al., 2020; Algethami et al., 2022; Xi et al., 2018).

En cuanto a la demanda comercial en la industria alimentaria se han desarrollado dulces, jugos, galletas, panes a base del polen apícola, otro ejemplo del uso de éste es en el yogurt ya que adicionándosele aumenta la vida útil, mejora su apariencia, sabor, olor y cohesividad. Darle uso como suplemento nutricional no se restringe únicamente al hombre, también es utilizado en alimentos de mascotas, equinos, ganado y aves de corral debido a que el polen tiene acción bioestimulante mejorando el crecimiento y el rendimiento reproductivo e inmunológico de los animales (Kostić et al., 2020; Algethami et al., 2022; Vit & Santiago, 2008; Yepes Giraldo et al., 2005).

Es evidente que el trabajo de las abejas polinizando es un pilar en la economía global, ya que son capaces de generar 153 mil millones de euros (Khalifa et al., 2021), cantidad que equivale al 9.5% del valor económico total de la producción agrícola (Khalifa et al., 2021) destinada al consumo humano. Diversos países emplean la polinización de las abejas melíferas para asegurarse de conseguir resultados óptimos en calidad y cantidad de cultivos (Khalifa et al., 2021) (**Tabla 2**). Por lo tanto, el polen se puede considerar como un elemento de alto valor económico ya que tiene gran potencial para contribuir al desarrollo económico mundial, a la investigación y a la creación de productos que complacerán las necesidades de la sociedad.

Tabla 2. Impacto de la polinización de abejas melíferas en cultivos de diversos países. Modificado de: (Khalifa et al., 2021).

Cultivo (especie)	Polinizador	Impacto en el rendimiento de los cultivos	País
Manzana (<i>Malus domestica L.</i>)		Aumento en el tamaño del fruto y número de semillas.	Pakistan
Almendro (<i>Prunus dulcis</i>)		Aumento de 60% del cuajado de frutos y 20% de rendimiento de	Estados Unidos

	Abeja melífera (<i>Apis mellifera</i>)	granos, comparándolo con la autopolinización.	
Arándanos (<i>Vaccinium oxycoccos</i> L.)		La producción aumentó de 3,7 millones en 1989 a 5,4 millones en 1998.	Estados Unidos
Pepinos (<i>Cucumis sativus</i> L.)		La producción aumentó un 10%.	Estados Unidos
Cítricos (<i>Citrus sinensis</i> L.)		Provocó la producción de frutos con más peso, menor acidez y menos semillas por cogollo.	Brasil
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)		El cuajado de frutos fue del 42,29% en comparación con la polinización abierta del 33,36%.	India
Anís (<i>Pimpinella anisum</i> L.)		Aumentó el rendimiento de semillas/feddan a 781,55 kg en comparación con 300,24 kg para el grupo de control.	Egipto
Colza (<i>Brassica napus</i> L.)		El rendimiento medio se incrementó hasta el 37.5%.	Francia

5.1.4 Importancia ecológica

La polinización y los polinizadores cumplen un papel crucial en la restauración ecológica y en la preservación de los ecosistemas debido a que mejoran la biodiversidad al aumentar la producción de alimentos sin amenazar el medio ambiente y en el sector agrícola, dado que numerosos cultivos en todo el mundo, incluidos productos alimenticios y de origen vegetal industrial dependen parcial o totalmente de vectores polinizadores para transferir su polen en la polinización cruzada (Meléndez Ramírez et al., 2020; Khalifa et al., 2021; Rodríguez-Pólit et al., 2023).

De hecho, la polinización es considerada como un servicio de los ecosistemas de suma importancia ya que de acuerdo a lo que Meléndez Ramírez (2020) menciona; todos los servicios de los ecosistemas son las condiciones y los procesos por medio de los cuales los ecosistemas, y las especies que los constituyen, sostienen y sustentan a la vida humana, clasificándose en servicios de apoyo, de aprovisionamiento, de regulación y culturales. De acuerdo a dicha clasificación la polinización se considera un servicio de regulación ya

que ayuda a mantener los procesos y las funciones naturales de los ecosistemas al controlar las condiciones del ambiente (Meléndez Ramírez et al., 2020).

El destino principal del polen es ayudar en la reproducción de las angiospermas sirviendo como vehículo para los gametos masculinos de la planta, por tanto se considera que la polinización entomófila de los cultivos por las abejas representa el 80% de la polinización total, esta actividad facilita la obtención de cosechas en mayor calidad y cantidad, lo que hace posible la producción de 87 cultivos a nivel mundial, entre los que se incluyen el cacao, kiwi, maracuyá y la sandía de 200 países (Rivest & Forrest, 2020; Román & Palma, 2007; Khalifa et al., 2021).

Expertos afirman que la supervivencia del ecosistema del planeta sería imposible sin polinizadores y polen, esto es evidente si se hace referencia a la demanda de servicios de polinización en el sector agrícola ya que sin polinización entomófila se perdería entre el 5% y 8% de producción. Para contribuir en dicha producción es necesario que apicultores y especialistas tengan en cuenta la relación de la flora con la apicultura ya que este conocimiento posibilita identificar especies nectarífera-poliníferas que permiten tener un mejor manejo de los apiarios y de la flora, ayudando a definir cuando mover los apiarios a zonas con mayor floración para adquirir néctar y polen suficiente con fin de alcanzar una mayor producción (Rodríguez-Pólit et al., 2023; Khalifa et al., 2021; Román & Palma, 2007).

En el tiempo actual las abejas enfrentan múltiples factores que pueden influir y afectar su función como polinizadores, tales como patógenos, escasez nutricional, pérdida de hábitat, contaminación y cambio climático abriendo la posibilidad a una enorme afección en la producción de frutos y semillas tanto en los ecosistemas como en los campos de cultivo (Khalifa et al., 2021; Meléndez Ramírez et al., 2020).

Algunos ejemplos de la flora utilizada por las abejas como fuente de polen son árboles, arbustos y palmas (Chamorro-García et al., 2013) originarios de bosques naturales y áreas forestales, debido a esto el polen apícola es considerado como producto forestal no maderable (PFNM) ya que procede de bosques y es distinto a la madera. Esto resulta relevante porque reconocer al polen apícola como PFNM, hace posible que se contemple

a la apicultura como una actividad destinada al cuidado y preservación de las especies forestales y de los ecosistemas donde éstas habitan (Chamorro-García et al., 2013).

Cabe resaltar que si la polinización con abejas se compara con la polinización de otros insectos, es evidente que las abejas son más eficaces (Khalifa et al., 2021) y que traen consigo muchos beneficios en comparación con otros insectos, por ejemplo: en África subsahariana hay un aumento del 62% en el rendimiento del algodón cuando se poliniza con abejas y cuando no, el rendimiento baja a 37% (Khalifa et al., 2021), en Darling Downs se evaluó la actividad de polinización durante el día y noche de polillas y abejas melíferas en cultivos de girasol, los resultados demostraron una visita más recurrente de las abejas estando activas 9 horas mientras que las polillas visitaron las flores menos de 2 horas por noche (Khalifa et al., 2021).

5.2 Códigos de barras de ADN

5.2.1 ¿Qué son?

El código de barras de ADN o “DNA barcoding” es una técnica que combina la taxonomía e informática a nivel molecular para identificar o descubrir a que especie pertenece una muestra biológica descrita o no previamente, dicho término fue acuñado por primera vez en 2003 por Hebert. Para esta técnica se utilizan fragmentos cortos de ADN de 400 a 800 pb conocidos como marcadores moleculares o “DNA barcodes” que provienen de una región estandarizada del genoma que se compara con uno o varios genes de referencia para etiquetar especímenes biológicos como animales, plantas y microbios (Yu et al., 2021; Selvaraj et al., 2013; Vera M et al., 2012; Moritz & Cicero, 2004).

Para dicho etiquetado se necesita de una biblioteca de referencia en donde se comparen los segmentos a partir de especímenes cuya identidad ya está firmemente establecida (Stoeckle & Hebert, 2008) además de que la información de tantos especímenes y sus secuencias deben ser reunidas y almacenadas para preservar el ADN (Stoeckle & Hebert, 2008). Para cumplir con tal objetivo existe la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD, en línea www.barcodinglife.org) sitio en donde se depositan registros de muestras y secuencias que forman la unidad de datos básicos de todos los estudios de códigos de barras (Ratnasingham & Hebert, 2007) y que ayuda a la gestión,

control de calidad y al análisis de datos de códigos de barras (Ratnasingham & Hebert, 2007) contando con más de 460,000 registros de más de 46,000 especies. En cada uno de estos registros se encuentra el nombre de la especie, la secuencia del código de barras, el sitio de recolección, entre otros datos biológicos (Stoeckle & Hebert, 2008).

El proceso para crear códigos de barras de ADN se basa en dos pasos principales; primero se crea una biblioteca de códigos de barras moleculares de especies de interés para después proseguir con la comparación de la secuencia nucleotídica de un espécimen desconocido contra la biblioteca de códigos de barras para su identificación (Kress et al., 2015). El segundo paso se lleva a cabo por medio de distintos algoritmos de comparación que son capaces de asignar a la muestra no conocida una especie identificada a través de la localización de secuencias cercanas de la biblioteca de códigos de barras de ADN, por ejemplo, la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Tool) disponible en el GenBank.

Ahora bien, para que alguna región del genoma pueda utilizarse como DNA barcode debe posibilitar la distinción entre dos tipos de variaciones: inter e intraespecífica, la primera hace referencia a la distinción entre especies cercanamente relacionadas mientras que la segunda a la distinción dentro de la misma especie (Paz et al., 2011), de modo que, cuando se comparen dos secuencias de ADN se podrá medir la distancia existente entre las variaciones interespecífica-intraespecífica; a lo cual se le conoce como “barcoding gap” (Paz et al., 2011).

De esta forma para que el DNA barcode sea idóneo debe poseer una alta divergencia de secuencia interespecífica y baja intraespecífica (Selvaraj et al., 2013) (**Figura 6**), además para que un “barcoding gap” sea catalogado como óptimo la distancia interespecífica debe ser 10 veces mayor (10X) que la distancia intraespecífica (Vera M et al., 2012).

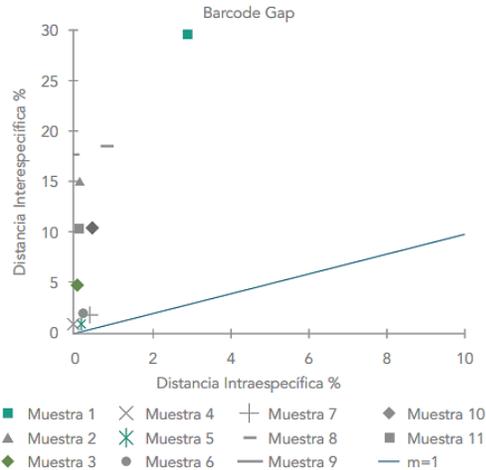


Figura 6. Ejemplo de “barcoding gap”. El gráfico indica que en todas las muestras la distancia interespecífica es mayor que la intraespecífica. Fuente: (Vera M et al., 2012).

Esta herramienta es práctica, estandarizada y rápida en comparación con la identificación morfológica que se considera como técnica tradicional. Su objetivo principal es ser de diagnóstico simple, basarse en datos taxonómicos sólidos y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas. Una cualidad de esta herramienta es que la identificación de especies se puede realizar inclusive si el material biológico está incompleto, dañado o en estado inmaduro (Kress et al., 2005; Selvaraj et al., 2013; Altamirano-Benavides & Yanez-Moretta, 2016).

5.2.2 Inicios del código de barras de ADN

En un principio el código de barras se utilizaba solo en animales, en donde el sistema se basaba en la amplificación de la región 5' del gen de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa (COI), con un tamaño de 648 a 700 pares de bases aproximadamente, localizada en el ADN mitocondrial. COI no presenta inserciones o deleciones, lo cual permite que los alineamientos sean más sencillos de realizar al no presentar “gaps” (brechas) (Rey Bentos & Capdevielle Sosa, 2020; Romero & Ramírez, 2011; Altamirano-Benavides & Yanez-Moretta, 2016; Rodríguez García, 2023).

Su uso fue eficaz debido a su presencia en todos los organismos, a su variabilidad y especificidad para cada especie como aves, mariposas, anfibios, peces, moscas y otros grupos de animales. Sin embargo, cuando se trata de especies vegetales COI resultada

ineficaz ya que tienen baja tasa de sustitución de ADN mitocondrial resultando invariante ya que evoluciona lentamente (Rey Bentos & Capdevielle Sosa, 2020; Altamirano-Benavides & Yanez-Moretta, 2016).

5.2.3 Códigos de barras de ADN para plantas

Para desarrollar códigos de barras de ADN aptos para especies vegetales el CBOL se enfocó en el genoma nuclear y plastídico (Paz et al., 2011), concluyendo en 2009 que un método multilocus sería necesario para este grupo de organismos (Paz et al., 2011), preferentemente con una combinación entre una región codificante conservadora y una región de evolución rápida (probablemente no codificante) (Ilahi, 2021).

Una combinación muy utilizada son dos regiones de genes en el cloroplasto: *matK* y *rbcL* (Altamirano-Benavides & Yanez-Moretta, 2016), estas regiones en combinación se consideran estándar/universales para plantas terrestres (Altamirano-Benavides & Yanez-Moretta, 2016). Además de la utilización combinada de estas regiones diversos autores han propuesto utilizar otros marcadores para mejorar la discriminación (Rodríguez García, 2023), entre los que se encuentra el marcador nuclear ITS, el espaciador intergénico *trnH-psbA* o el intrón *trnL* del cloroplasto (Rey Bentos & Capdevielle Sosa, 2020).

trnH-psbA fue considerada una de las regiones más adecuadas para el código de barras de ADN por su poder discriminatorio en diferentes grupos taxonómicos de plantas (Ilahi, 2021), además de su capacidad de amplificación en una gama amplia de plantas terrestres, sin embargo, una problemática son sus frecuentes inversiones intrapoblacionales, que pueden dar lugar a una sobrestimación de la diversidad de especies (Ilahi, 2021). Para superar este inconveniente se combinó con parte del gen *rbcL*, que permitieron la identificación de la mayoría de muestras a nivel de género en un 92%, sin embargo, a veces la discriminación de especies es insuficiente con solo el 17% (Ilahi, 2021).

Aún tras haber superado la limitante de la ineficiencia del citocromo oxidasa I y aunque ya se han estudiado y empleado diversas regiones genéticas como barcodes de plantas aún no existe uno universal (Selvaraj et al., 2013) (**Figura 7**), debido a que no todos cumplen con los factores necesarios para ser considerados de alta eficacia, estos

factores son: condición de PCR universal, amplitud de diversidad taxonómica, capacidad de distinción de especies, y análisis y aplicación en laboratorio seco (Selvaraj et al., 2013). Es importante desarrollar barcodes para especies vegetales debido a su papel dentro de la investigación, conservación y manejo de la flora silvestre (Altamirano-Benavides & Yanez-Moreta, 2016) o a su capacidad para evaluar puntos críticos de la biodiversidad.

Los estudios para desarrollar un código de barras de ADN en plantas tuvieron como enfoque principal el genoma del cloroplasto, debido a que estaba lo suficientemente conservado para un alineamiento sencillo que permitiría una comparación con diferentes muestras, también influía su tamaño, ya que al estar grande podía contener variaciones que posibilitaban la distinción de especies o subespecies (Brozynska et al., 2014), y al hecho de que se quería comprender la variación de sus regiones génicas codificantes: *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *psbA-trnH* (Selvaraj et al., 2013) y las no codificantes: ITS (ITS1 e ITS2) (Tabla 3).

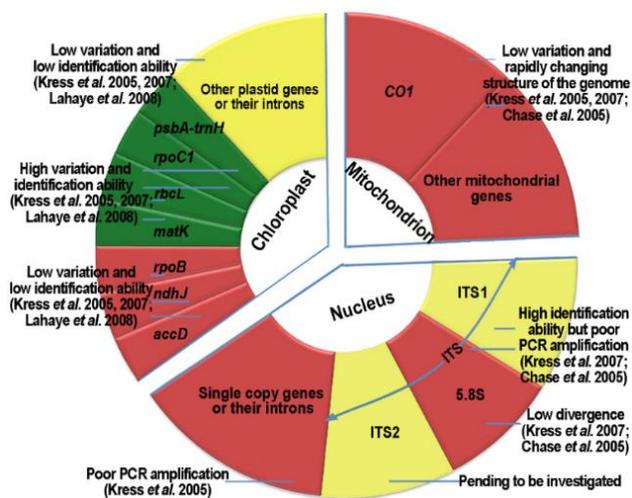


Figura 7. Regiones de tres genomas en plantas candidatas como códigos de barras (los marcadores verdes tienen gran potencial, los rojos son malos candidatos y los de color amarillo están siendo investigados). Fuente: (Yu et al., 2021).

Tabla 3. Nombre, ubicación y longitud aproximada de ADN barcodes utilizados en plantas con mayor frecuencia. Fuente: (Prudnikow et al., 2023).

ADN barcode	Ubicación	Longitud
ITS2	ADN genómico	250-400 pb

ITS1	ADN genómico	150-250 pb
matK	ADN plastídico	500-1500 pb
rbcL	ADN plastídico	1000-1500 pb
psbA- trnH	ADN plastídico	100-1000 pb
trnL	ADN plastídico	300-600 pb

5.2.4 ITS

La región espaciadora transcrita interna (ITS), es parte del genoma nuclear y consiste en una secuencia de ARN no codificante, se ubica entre las regiones codificantes de ARNr 18S y 25S, con una longitud de 700 pb. Esta región puede ser amplificada en dos fragmentos de menor tamaño, el primer fragmento es el ITS1 con una longitud de 150 a 250 pb, localizado entre el ARNr 18S y 5.8S, mientras que el segundo es conocido como ITS2 con una longitud de 250 a 400 pb, estando presente entre el ARNr 5.8S y 25S (Selvaraj et al., 2013; Prudnikow et al., 2023) (**Figura 8**).

El hecho de que ambos fragmentos se encuentren tan cerca del locus 5.8S les confiere ciertas ventajas debido a que resulta útil para muestras degradadas y provee bastante señal filogenética para la discriminación a nivel de órdenes y filos (Kress et al., 2005).

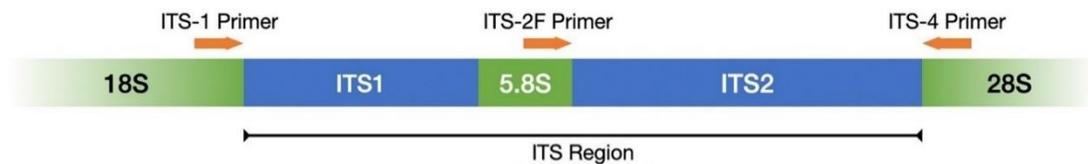


Figura 8. Región ITS con sus subregiones ITS1 e ITS2. Fuente: (Prudnikow et al., 2023).

La longitud de ambas regiones varía en todas las angiospermas debido a que pueden ocurrir mutaciones puntuales, en cuanto al porcentaje de mutaciones intraespecífico de ITS2 se tiene un nivel de 6.3%, mientras que en el nivel interespecífico es del 6.7% (Selvaraj et al., 2013), por otra parte, el poder discriminatorio y la tasa de éxito en la identificación de especies es mayor la de la región ITS1 que la región IT2, sin embargo, ITS2 tiene mayor popularidad (Prudnikow et al., 2023).

5.2.5 ITS2

ITS2 es locus muy poderoso como código de barras debido a la suficiente variación en las secuencias primarias y las estructuras secundarias (Yao et al., 2010), es de secuencia corta, por lo tanto, es muy fácil de amplificar, posee una alta divergencia interespecífica y está bien separada (Chen et al., 2010), también dispone de regiones conservadas para diseñar cebadores universales (Yao et al., 2010).

Además, provee una alta precisión a la hora de agrupar muestras en sus especies exactas, ya que su información estructural posibilita análisis a un nivel taxonómico superior, las tasas de éxito que presenta al momento de discriminar son del 78% a nivel de especie y 100% a nivel de género, ha sido utilizada con gran éxito en la identificación de diferentes plantas y también de especies animales (**Tabla 4**), especialmente para identificar muestras de polen mixto, sin embargo, una de sus problemáticas es que conduce a la coamplificación de hongos (Selvaraj et al., 2013; Yao et al., 2010; Ilahi, 2021).

Tabla 4. Tasas de éxito en la identificación de plantas y animales a nivel de especie utilizando ITS2. Fuente: (Yao et al., 2010).

Plantas y animales	Tasa de éxito
Dicotiledóneas	76.1%
Monocotiledóneas	74.2%
Gimnospermas	67.1%
Helechos	88.1%
Musgos	77.4%
Animales	91.7%

Yao et al., (2010) validó el potencial del uso de la región ITS2 para la identificación de especies en los reinos vegetal y animal que se encontraban estrechamente relacionadas, analizando 50.790 secuencias ITS2 de plantas y 12.221 animales que estaban disponibles en la base de datos pública Genbank, confirmando que la región ITS2 es eficaz como código de barras para la identificación de especies vegetales y como un locus complementario del COI para identificar especies animales.

5.2.6 Procedimiento experimental

El procedimiento experimental para la identificación de especies por medio de la técnica de código de barras se realiza bajo cinco pasos (Yu et al., 2021).

- **Recolección de muestras:** pueden ser muestras frescas, secas o mixtas, en el caso del polen suelen ser muestras mixtas debido a que los polinizadores visitan diferentes flores (Prudnikow et al., 2023), de ahí que se distingan dos tipos de polen dependiendo de su origen, conociéndose como monofloral cuando su origen botánico tiene una frecuencia mayor al 90% o cuando no cuenta con polen accesorio en una frecuencia mayor al 60% (Thakur & Nanda, 2020), por otra parte se denomina multifloral cuando ningún polen predomina.
- **Extracción de ADN:** se pueden utilizar diferentes métodos como CTAB, SDS, PVP, fenol-cloroformo, etc. En el caso del polen se necesita de un método eficaz de alteración celular para liberar el ADN (Prudnikow et al., 2023) debido a que además de variar en tamaño morfológico su estructura se basa en una pared llamada esporodermo la cual se compone de dos capas: intina y exina. La exina tiene la cualidad de ser muy resistente a la acetólisis y a la descomposición por las propiedades que le da el polímero esporopolenina del cual se compone (Prudnikow et al., 2023), dicho polímero es uno de los materiales más inalterables de la naturaleza debido a que es muy resistente a ácidos, bases y a variaciones térmicas habituales en la naturaleza (Guidos & Almeida, 2005) de ahí que su extracción sea compleja.
- **Amplificación por PCR:** se requieren amplicones adecuados para que la región del código de barras específica del ADN de la muestra se replique millones de veces para prepararla para la secuenciación. Es importante recalcar que, para garantizar una resolución taxonómica alta, es importante hacer uso de códigos de barras de plantas con alto grado de universalidad o hacer uso de multilocus con más de un código de barras para aumentar el poder discriminatorio (Prudnikow et al., 2023).

Antiguamente para el polen se utilizaban códigos de barras plásticos como *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *trnL* sin embargo su uso ya no es recomendado debido a que el ADN plástico no está presente en todos los granos de polen

(Prudnikow et al., 2023) ahora el código de barras más utilizado para polen es la región ITS.

- **Secuenciación de ADN:** la muestra de ADN amplificada se introduce en una plataforma de secuenciación de ADN, traduciendo la muestra de tejido desconocido en la secuencia de ácido nucleico que representa su código de barras de ADN.
- **Búsqueda en bases de datos basada en similitudes:** Una vez obtenidos los datos de las secuencias o lecturas estos requieren procesarse (Alquicira et al., 2022), las lecturas de las secuencias del polen se comparan con los códigos de barras de las plantas (Prudnikow et al., 2023) para encontrar una coincidencia por medio de una alineación en programas como BLAST.

5.3 Importancia de las características moleculares del polen apícola

Las abejas melíferas también son conocidas como “súper generalistas” (De Vere et al., 2017), debido a que se benefician de una amplia gama de plantas con flores, sin embargo, dicho beneficio está representado por un número pequeño de especies principales (De Vere et al., 2017), de ahí la importancia del vínculo entre las flores con la nutrición, la salud de las abejas melíferas y el apicultor.

Este vínculo es una cadena de intereses en donde la flora apícola es el conjunto de plantas que se encontrarán en una determinada región y ayudarán a la supervivencia de las abejas (Ferreira Demartelaere et al., 2010) proveyéndoles de los recursos, sustancias o elementos necesarios para su alimentación y posteriormente para la elaboración de productos secundarios que podrán ser utilizados a beneficio del apicultor (Silva & Restrepo, 2012).

Para evaluar las visitas florales se utilizan métodos de identificación del polen que se lleva a la colmena ya sea recolectándolo por medio del cazapolen o examinando el polen que se encuentra dentro de la miel. Identificar las especies que regularmente son visitadas por abejas resulta de interés ya que de esta forma se puede promover la conservación y multiplicación de las plantas melíferas con potencial para el establecimiento de una apicultura sostenible. Diligencia necesaria dado que a nivel mundial únicamente el 16% de las plantas son melíferas porcentaje en el cual la familia

Fabaceae predomina por ser una de las fuentes entomófilas principales de néctar y de polen para las abejas (De Vere et al., 2017; Ferreira Demartelaere et al., 2010; Martínez-Pérez de Ayala et al., 2017; Velázquez-Sámano et al., 2021).

Antiguamente el origen botánico del polen se analizaba mediante microscopía precedido de métodos de tratamiento químico (Prudnikow et al., 2023) sin embargo el tiempo requerido y el conocimiento que debe tener el personal técnico sobre las características morfológicas son muy demandantes, además las características reconocibles microscópicamente presentan un bajo nivel de especie, eventos por los que se puede considerar a este método poco eficiente.

Como alternativa a la identificación morfológica del polen se ha demostrado que la secuenciación del ADN apícola proporciona una mayor resolución taxonómica, este método es empleado para la caracterización genética de especies de forma aislada (Nuñez Hernández, 2019) y recientemente para el análisis de ADN ambiental o ADN_e. Las técnicas de ADN_e se pueden dirigir hacia la identificación de biodiversidad mediante el uso de pequeñas secuencias de ADN estandarizadas, técnica conocida como metacódigo de barras de ADN_e la cual está estrechamente relacionada con las técnicas del código de barras de ADN previamente descrita y el metacódigo de barras de ADN (**Figura 9**).

El metacódigo de barras de ADN_e analiza muestras medioambientales (de suelo, agua o aire) en las cuales se tiende a identificar varios especímenes simultáneamente, pero cuya identificación suele llegar hasta niveles taxonómicos de género (Huerta Vela & Centeno-Cuadros, 2020). Estudios comparativos entre el método de identificación tradicional con el metacódigo de barras de ADN_e en la interacción planta-polinizador demuestra que el ADN_e contribuye al considerar los taxones con menor representación relativa encontrando especies que el método tradicional no logra identificar (Huerta Vela & Centeno-Cuadros, 2020).

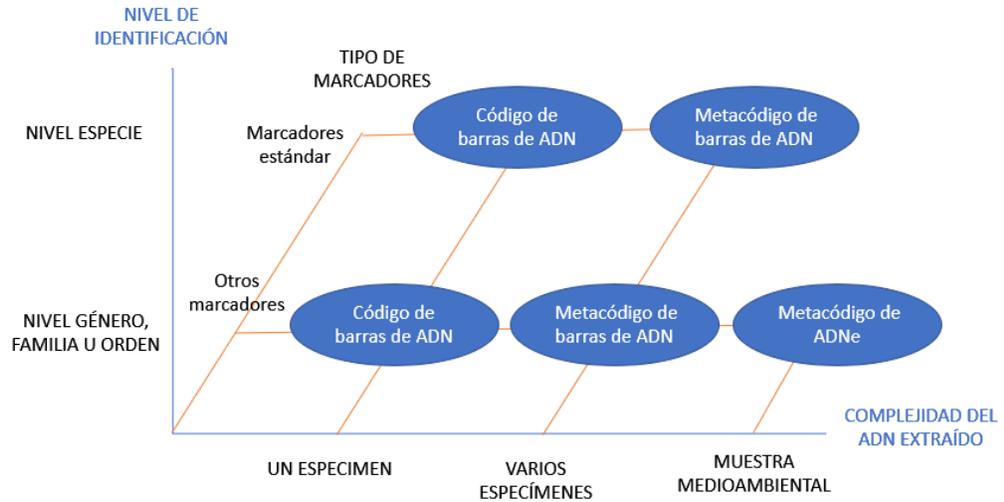


Figura 9. Métodos moleculares para la identificación de especies. Fuente: (Huerta Vela & Centeno-Cuadros, 2020).

Por su parte, el metacódigo de barras de ADN, es una técnica que consiste en la identificación de muestras taxonómicas de especies mixtas de ADN mediante secuenciación de ADN de alto rendimiento (Ilahi, 2021) detectando un mayor número de taxones, no solo de manera individual sino también muestras mixtas a granel (Prudnikow et al., 2023). Esta técnica se compone de cinco pasos: recolección de polen, aislamiento de ADN, amplificación de códigos de barras, secuenciación y análisis de datos bioinformáticos posteriores (**Figura 10**).

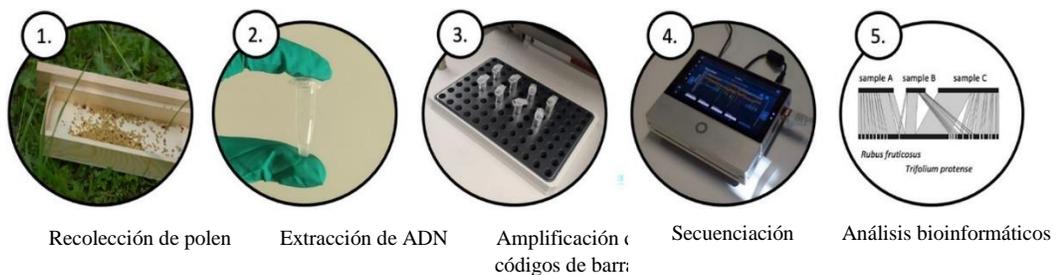


Figura 10. Pasos en la metacodificación de ADN de polen. Fuente: (Prudnikow et al., 2023).

Si se compara el metacódigo de barras de ADN con el código de barras de ADN, es evidente que hasta cierto punto el procedimiento es el mismo, sin embargo, en

metacódigos de barras el procedimiento se aplica para una muestra mixta que se analiza mediante secuenciación de alto rendimiento (Prudnikow et al., 2023) o de nueva generación (NGS). Esta secuenciación incrementa la cantidad de fragmentos de ADN que pueden ser secuenciados con una longitud de 50 a 300 pb y en paralelo (varias muestras simultáneamente) en un tiempo corto y cada vez a un menor costo (Alquicira et al., 2022).

Un método NGS popular en el mercado es el secuenciador Illumina el cual utiliza nucleótidos de terminación de cadena extraíbles marcados con fluorescencia (Alquicira et al., 2022), sin embargo, un inconveniente es que produce lecturas relativamente cortas de 100 a 1000 pb, que puede causar espacios o ensamblajes incorrectos (Prudnikow et al., 2023), además aún se desconoce si las lecturas relativamente pequeñas (<250 pb) son suficientes para distinguir entre especies (Prudnikow et al., 2023).

Al ejecutar dichas metodologías, es posible identificar el comportamiento de búsqueda de alimento de los polinizadores así como la autenticación de productos apícolas en la miel, en México las especies botánicas más relevantes para *A. mellifera* ya han sido reconocidas en la mayoría de los ecosistemas del país (**Figura 11**) distinguiéndose cinco regiones apícolas de acuerdo al clima y al tipo de vegetación, distinguiéndose: el Norte, Centro y Altiplano, Pacífico, Golfo y la Península de Yucatán (**Figura 12**) (Ilahi, 2021; Baena-Díaz, Chévez, Ruiz de la Merced, et al., 2022; Martínez-Pérez de Ayala et al., 2017).

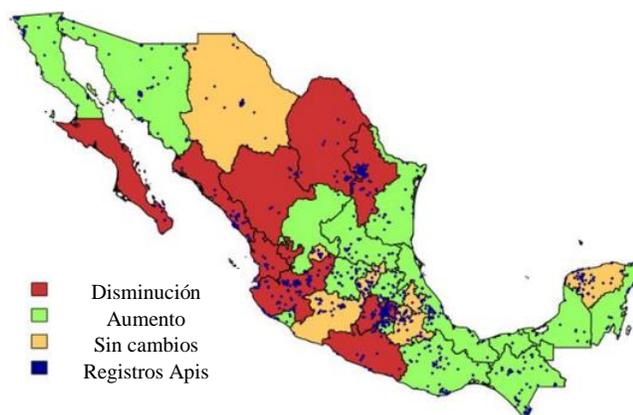


Figura 11. Presencia de *Apis mellifera* en México y cambios en número de colmenas por estado. Fuente:(Baena-Díaz, Chévez, Ruiz de la Merced, et al., 2022).



Figura 12. Regiones apícolas en México. Fuente: (Martínez-Pérez de Ayala et al., 2017).

A través de análisis palinológicos se sabe que en la región del Altiplano hay numerosas especies de la familia Asteraceae que son de interés nectarífero y nectaro-polinífero (Ramírez-Arriaga et al., 2016) al igual que especies de la familia Fabaceae. Cabe resaltar que *Zea mays* es un gran representante de la familia Poaceae que, aunque normalmente es ignorada, las abejas recurren a estos cultivos cuando no disponen de más especies florales por la gran cantidad de polen que producen (Ramírez-Arriaga et al., 2016).

Por otra parte, la diversidad vegetal de interés apícola de la región del golfo tan solo en el estado de Tamaulipas se encuentra representada por 215 especies con 1 subespecie y 1 variedad, pertenecientes a 173 géneros y 60 familias de plantas vasculares (González-Suárez et al., 2020) (**Tabla 5**), de las cuales 97 especies son productoras de néctar, 86 son plantas nectaro-poliníferas y 32 son productoras de polen (González-Suárez et al., 2020), dentro de las cuales las más abundantes son los mezquites (*Prosopis spp.*) y los cítricos (*Citrus spp.*) (González-Suárez et al., 2020).

Tabla 5. Familias y géneros representativos de la flora apícola en Tamaulipas. Fuente: (González-Suárez et al., 2020).

Familias	Géneros	%	Especies	%
Fabaceae	22	12.72	35	16.28
Asteraceae	21	12.14	26	12.09
Convolvulaceae	5	2.89	9	4.19
Euphorbiaceae	5	2.89	9	4.19

Malvaceae	6	3.47	9	4.19
Lamiaceae	6	3.47	8	3.72
Rutaceae	6	3.47	7	3.26
Boraginaceae	3	1.73	5	2.33
Sapindaceae	5	2.89	5	2.33
Scrophulariaceae	3	1.73	5	2.33
Verbenaceae	5	2.89	5	2.33
Subtotal	87	50.29	123	57.21
Restantes (49)	86	49.71	92	42.79
Total	173	100.00	215	100.00

En cuanto a la región de la península de Yucatán se tienen registros de 849 especies melíferas agrupadas en 81 familias y 332 géneros (Briceño-Santiago et al., 2022) (**Figura 13**) con distintas formas de crecimiento (árboles, arbustos, trepadoras, lianas, plantas anuales, palmas y hierbas) (Martínez-Pérez de Ayala et al., 2017) pertenecientes en su mayoría a la familia Fabaceae, seguida de familias como Rubiaceae, Asteraceae, Convolvulaceae. También se han identificado especies endémicas como *Nopalea gaumeri* y *Bourreria pulchra* (Briceño-Santiago et al., 2022) pertenecientes a las familias Cactaceae y Boraginaceae respectivamente.

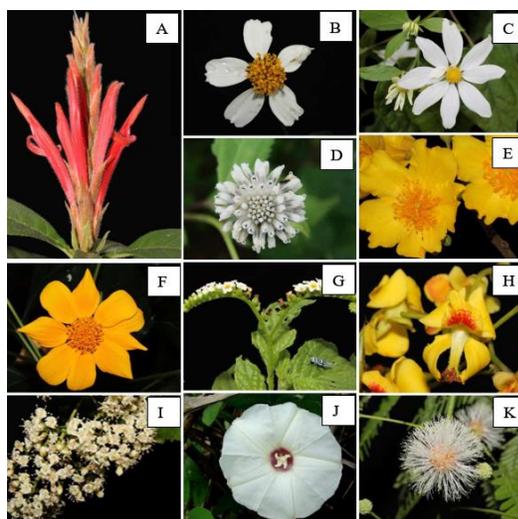


Figura 13. Ejemplos de especies melíferas en la Península de Yucatán. A: Acanthaceae, B, C, D, F: Asteraceae, E: Bixaceae, G, I: Boraginaceae, H, K: Fabaceae, J: Convolvulaceae. Modificado de: (Martínez-Pérez de Ayala et al., 2017).

5.3.1 Detección de plantas alergénicas por medio del polen

El polen procedente de las plantas con flores y las esporas producidas por diversos hongos saprófitos son las partículas atmosféricas más investigadas en la actualidad debido a su relevancia como aeroalérgenos. En general los aeroalérgenos del polen se encuentran constituidos por glucoproteínas con un peso molecular por arriba de los 10 mil daltons, algunos de los cuales son resistentes a los cambios de Ph y a temperaturas por arriba de los 100 °C. Es importante destacar que no hay una “alergia genérica al polen”, sino que las alergias a los pólenes son específicas de cada planta (Gutiérrez-Bustillo et al., 2016; Terán et al., 2009; Guidos & Almeida, 2005).

Para que los aeroalérgenos de los pólenes desencadenen alergias deben cumplir con un conjunto de características: ser livianos, liberarse en cantidad suficiente y que la planta productora tenga una amplia difusión local (Guidos & Almeida, 2005). Datos recopilados tras investigaciones de la carga atmosférica revelan que en la República Mexicana uno de los pólenes de mayor importancia alergológica es proveniente del Mezquite (*Prosopis juliflora*), debido a que en sus diferentes genotipos se han distinguido 18 proteínas alergénicas, con un peso molecular de 14 a 97 kDa y con un alto porcentaje de aminas biógenas como histamina y tiamina (Velázquez-Sámano et al., 2021) eficaces para manifestar síntomas de alergia en las personas.

P. juliflora es una planta entomófila perteneciente a la familia Fabacea, que comprende 44 especies. La relevancia alergológica de plantas entomófilas es menor comparada con plantas anemófilas debido a que su polen se dispersa con mayor facilidad y se encuentra suspendido en mayor cantidad. Sin embargo, el rango de hectáreas en donde se ha establecido *P. juliflora* es de más de 3.5 millones de hectáreas en algunos estados de la República Mexicana sumándose a la fecha 5,774 registros de mezquites mexicanos (**Figura 14**) (Velázquez-Sámano et al., 2021; Guidos & Almeida, 2005; Batista-Roche & Huerta-Ocampo, 2021).

Dichos registros hacen evidente de donde proviene su impacto en las reacciones alérgicas como polinosis, rinitis, conjuntivitis y asma (Batista-Roche & Huerta-Ocampo, 2021), ya que en donde se encuentre el árbol *P. juliflora* estarán presentes los granos de polen en el aire. Algunas de sus especies autóctonas son: *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P.*

velutina, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri*, *P. laevigata* y *P. laevigata* (Velázquez-Sámano et al., 2021).

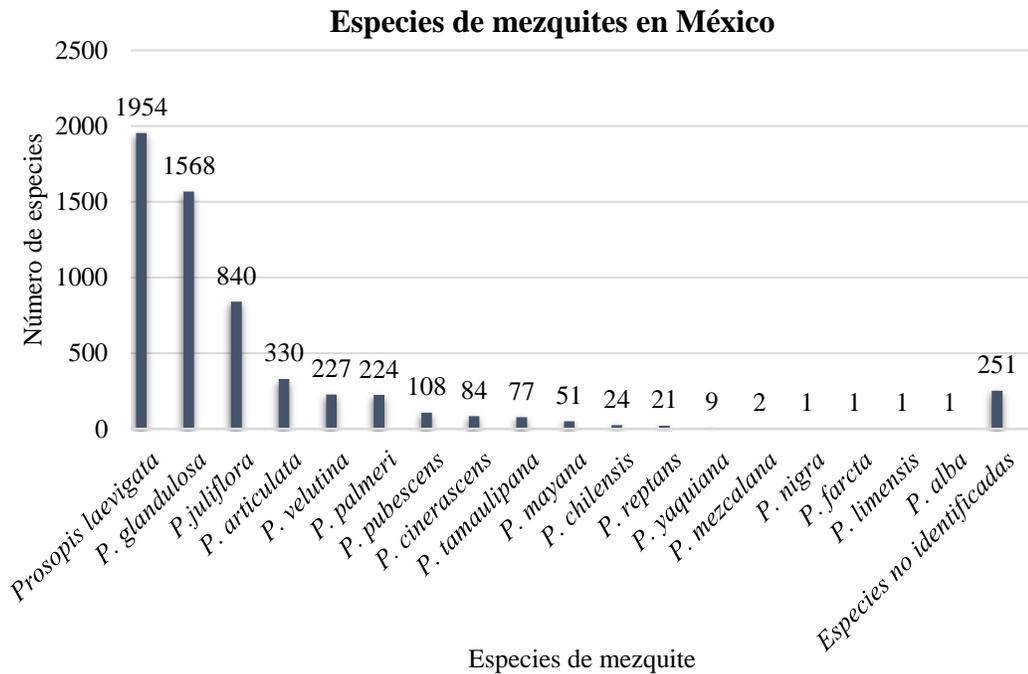


Figura 14. Registros de especies de mezquite en México 2021. Modificado de: (Briceño-Santiago et al., 2022).

5.3.2 Detección de plantas transgénicas por medio del polen

De acuerdo a la Ley de Bioseguridad De Organismos Genéticamente Modificados (2005) un organismo genéticamente modificado (OGM) se refiere a “cualquier organismo vivo, con excepción de los humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de biotecnología moderna”. En México se han sembrado algunos OGM como tomate, papa, calabaza, trigo, maíz y soya (Narváez Torres & Ortiz García, 2013) desde finales de los ochenta.

Estas zonas de cultivo pueden ser áreas de alimentación para las abejas melíferas ya que habitualmente abarcan varios kilómetros en busca de polen (Villanueva-Gutiérrez et al., 2014), por lo que existe una posibilidad de que algunas de las plantas en donde pecorean las abejas provengan de cultivos genéticamente modificados (Narváez Torres & Ortiz García, 2013).

Algunas de las metodologías utilizadas para la detección, cuantificación e identificación de eventos transgénicos específicos es la PCR de Punto Final (PCR-PF) y PCR en Tiempo Real (RT-PCR) (Narváez Torres & Ortiz García, 2013). En algunos casos las muestras pueden resultar negativas a la presencia de polen por lo que se analizan mediante PCR-PF para la detección de ADN vegetal (Narváez Torres & Ortiz García, 2013), lo que las convierte en metodologías capaces de detectar polen convencional o genéticamente modificado.

En 2011 la Península de Yucatán presenció polen transgénico en la miel que producían varios apiarios, al mismo tiempo ocurría floración de cultivos de Soya SF producida a través de transformación por biobalística (Narváez Torres & Ortiz García, 2013). Cabe mencionar que, a pesar de tener poco aroma, la flor de soya es un sitio al cual las abejas pueden llegar a pecorear (Peña Montes et al., 2013).

En consecuencia, Narváez Torres & Ortiz García (2013) realizaron estudios para identificar el origen botánico del polen transgénico. Llevaron a cabo varios análisis moleculares cualitativos para indicar la presencia o ausencia de un gen. Sus resultados demostraron concentraciones de soya tanto convencional como transgénica en la miel en niveles muy bajos, por lo que probaron que para las abejas el polen de esta planta no era considerada una fuente importante de alimentación.

5.3.3 Detección de plantas invasoras por medio del polen

Se entiende por “especies invasoras” aquellas plantas que se encuentran fuera de su área de distribución natural siendo introducidas a otro lugar que no es de su origen, con la capacidad de naturalizarse y dispersarse, alterando los ecosistemas y la biodiversidad (Huerta Vela & Centeno-Cuadros, 2020). Pueden afectar de forma indirecta a las plantas nativas, o alterar la estabilidad del suelo, promover la erosión, afectar la acumulación de basura, sal, u otros recursos del suelo (Palma-Ordaz & Delgadillo-Rodríguez, 2014).

La interacción mutualista planta-polinizador puede jugar un papel importante en los procesos invasivos al permitir que el polen de ciertas especies se disperse tornándose invasivas. Además, previamente se mencionó que las plantas no solo pueden ser polinizadas por polinizadores, sino que también por aire, transportándose fácilmente a largas distancias por ser pequeños y por producirse en cantidades considerables (van der

Knaap et al., 2012), encontrándose ocasionalmente granos de polen de muchos taxones diferentes de las plantas nativas.

Por esta razón la detección temprana y el monitoreo de las especies invasoras debe realizarse utilizando herramientas que sean rápidamente implementables, rentables, accesibles, precisas y aplicables a una amplia gama de taxones (Darling & Blum, 2007). El código de barras de ADN es una herramienta que cumple con todos estos criterios, en contraste con otros métodos, como los inmunológicos o basados en proteínas, que son difíciles de adaptar, vulnerables a factores ambientales y dependientes de tejido fresco (Armstrong & Ball, 2005).

Un ejemplo de su aplicación es el utilizar la región ITS2 como marcador molecular, ya que permitió identificar especies invasoras en México a través de polen apícola, una de ellas fue *Alnus cordata*, que naturalmente está limitado a una pequeña área en el sur de Italia considerándose desde 1998 como endémica (Loewe Muñoz & Delard, 1998), otra especie identificada fue *Juglans regia* proveniente de la región oriental de Europa, y parte del sur de Rusia desde donde se ha difundido a demás países como México (Loewe Muñoz. & González O., 2001).

5.4 Sistemas de clonación con el pGEM®-T Easy Vector

Un vector es una molécula de ADN de doble cadena con la capacidad de albergar un fragmento de ADN exógeno (Salazar Montes et al., 2016), dentro de su clasificación se encuentran los vectores de clonación como pGEM®-T Easy, los cuales tienen como finalidad almacenar secuencias y obtener grandes cantidades del ADN insertado o de la molécula recombinante (Salazar Montes et al., 2016).

Su estructura se basa en un origen de replicación (ORI), un marcador de selección el cual confiere resistencia a un antibiótico o que genera un fenotipo distintivo que permite seleccionar las células que se incorporaron en el vector (Salazar Montes et al., 2016) y un sitio de clonación múltiple (MCS) que confiere la posibilidad de insertar cualquier fragmento de ADN de interés a través de una serie de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (**Figura 15**).

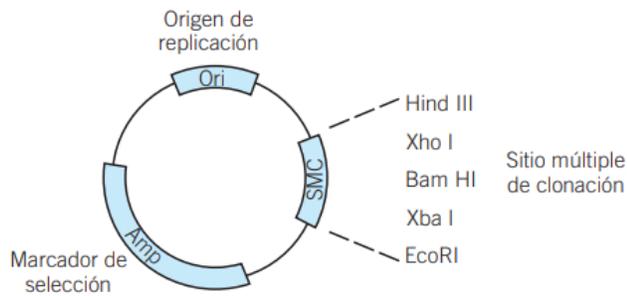


Figura 15. Elementos del vector de clonación. Fuente: (Salazar Montes et al., 2016).

Los sistemas pGEM®-T Easy son vectores prelinealizados que contienen extremos 3'-T (timina) en el sitio de inserción (*Promega*, 2024) (**Figura 16**) cualidad que proporciona homología con productos de PCR ya que al ser generados por algunas polimerasas termoestables incluida la de la bacteria *Thermus aquaticus*; Taq polimerasa agrega nucleótidos simples de A (adenina) a los extremos 3' de productos de PCR (Romero Mastranzo, 2020).

Este método es conocido como clonación T-A, clonación rápida o clonación T, el cual es uno de los más eficaces y simples por la complementariedad entre T-A resultando en una reacción de ligación simple ya que no requiere enzimas de restricción ni el diseño de cebadores que los contengan (Romero Mastranzo, 2020).

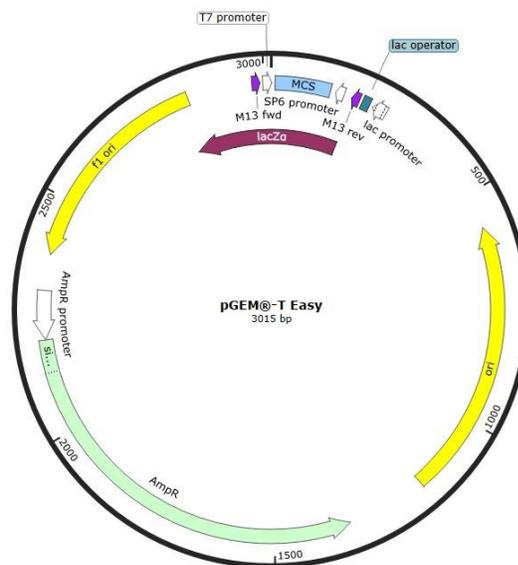


Figura 16. Componentes del vector pGEM®-T Easy.

5.5 BLAST

El NCBI define BLAST (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local) como una herramienta de investigación bioinformática que se puede utilizar a través de una interfaz web o de forma independiente para comparar secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias, el algoritmo compara la secuencia del usuario (Query) contra las secuencias de su base de datos (Subject) para indicar al usuario la secuencia más cercana (Jáuregui González, 2015). Se divide en cinco subprogramas por su capacidad de búsqueda: BLASTn, BLASTp, BLASTx, TBLASTn y TBLASTx.

El espacio de búsqueda entre las dos secuencias se puede graficar con una secuencia en el eje X y otra en el eje Y, donde se verán representados los alineamientos (una secuencia de letras emparejadas que pueden contener gaps) (Barrios Valencia et al., 2011) (**Figura 17**). Para reducir el espacio de búsqueda BLAST hace uso de tres procedimientos de refinamiento gradual: seeding, extension y evaluation (Barrios Valencia et al., 2011).



Figura 17. Espacio de búsqueda completo de BLAST. Fuente: (Barrios Valencia et al., 2011).

5.5.1 BLASTn

BLASTn es un subprograma que compara secuencias nucleotídicas con una base de datos de secuencias de nucleótidos, dicho sistema consta de tres etapas, la primera conocida como “word-matching”, la segunda “ungapped extension”, y por último la etapa de “gapped extension stages” (Gyang, 2005) (**Figura 18**).

En la etapa “word-matching” la secuencia query se divide en subcadenas de menor tamaño superpuestas (Gyang, 2005), la segunda etapa determina si existe una fuerte alineación de secuencia sin espacios, o HSP (par de segmentos de alta puntuación), entre la secuencia query y la base de datos (Buhler et al., 2007).

Por último, la tercera etapa determina si existe una alineación con espacios de alta puntuación en las proximidades de cada HSP (Buhler et al., 2007), de este modo las secuencias de entrada van filtrándose por cada una de las etapas y disminuye el volumen de datos que se procesa (Gyang, 2005).

Este método de búsqueda resulta útil para determinar la idoneidad en la identificación de especies de cada código de barras de ADN, para ello cada secuencia de consulta de ADN de una muestra biológica debe ser comparada en las bases de datos del NCBI (Parra Valdes, 2022). Analizar los resultados que arroje BLASTn permitirá determinar con precisión la especie a la que pertenece una muestra, esto implica evaluar el porcentaje identidad, el E-value y otros parámetros. Una alta similitud se indica con un porcentaje de identidad superior al 98%.

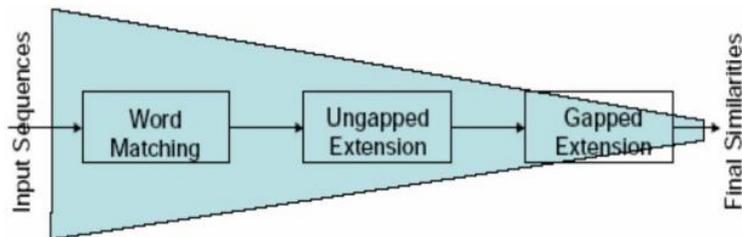


Figura 18. Etapas del proceso de BLASTn. Fuente: (Gyang, 2005).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción de ADN del polen apícola se basó en el protocolo optimizado previamente documentado de Wei et al., (2023), en donde se adaptó el método tradicional basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y se desarrolló un nuevo protocolo más sencillo y eficiente que permitió extraer ADN genómico de polen apícola de alta calidad y en concentraciones adecuadas.

6.1 Amplificación

El ADN obtenido en cada tratamiento se utilizó para la amplificación por PCR del fragmento ITS2 usando cebadores específicos (**Tabla 6**). Para la PCR se utilizó el estuche comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega Corporation, Madison, WI, USA), con reacciones de 25 µl de mezcla según las indicaciones del fabricante que se describen en la **Tabla 7**. Dichos tratamientos se procesaron bajo un programa de amplificación (**Tabla 6**) en un termociclador (Axygen® MaxyGene™ Thermal Cycler II), de cada tratamiento se establecieron reacciones por triplicado.

Tabla 6. Cebadores y programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN.

Fragmento	Cebadores (5'-3')	Programa de PCR	Referencia
ITS2	ITS2-F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT ITS2-R: GACGCTTCTCCAGACTACAAT	95°C, 4min; 35x (94°C, 45 s; 56°C, 1 min; 72°C, 1 min); 72°C, ∞ min.	(Chen et al., 2010)

Tabla 7. Mezcla para realizar PCR (GoTaq MasterMix de Promega TM).

Componentes	Volumen	Concentración
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 µl	1X
Cebador directo	0.25-2.5 µl	0.1-1.0 µM
Cebador reverso	0.25-2.5 µl	0.1-1.0 µM
AND templado	1.5 µl	<250 ng
Agua libre de nucleasas	25 µl	N.A.

Los productos de PCR se visualizaron utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con un voltaje de 90V. Para cargar las muestras en gel se realizó una

mezcla con 3 μ l de ADN + 1.5 μ l de buffer de carga (2X Green GoTaq buffer de Promega), a la vez en un carril exclusivo se cargó de 1.5-2 μ l del marcador de peso molecular (1Kb, Axygen, USA), para la visualización del gel se utilizó el Sistema de Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA).

Por otra parte, la banda putativa correspondiente al fragmento ITS2, fue purificada por el método de centrifugación utilizando el estuche comercial Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante (**Figura 19**).

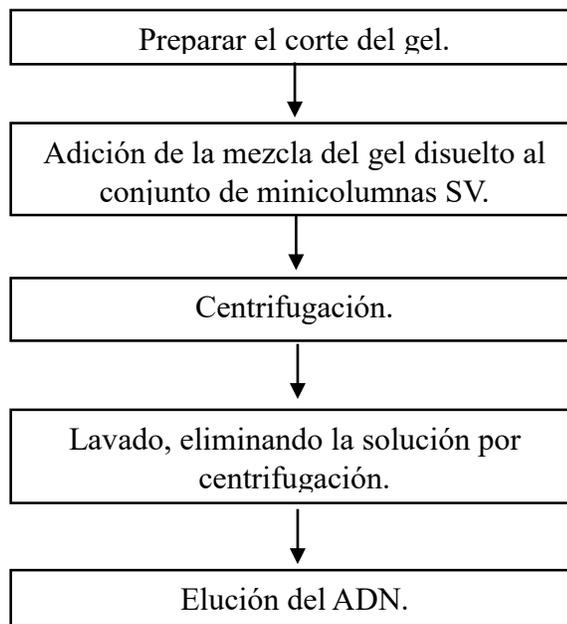


Figura 19. Procedimiento para la purificación por centrifugación. (Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System de Promega TM).

Conforme al protocolo primero se extrajo la banda de ADN del gel y se colocó la porción en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se agregaron 10 μ l de solución de unión a membrana por cada 10 mg de porción de gel. Se llevó al vortéx y se incubó de 50 a 65 °C hasta su disolución.

Posteriormente se insertó la minicolumna SV en el tubo colector, se transfirió la mezcla de gel disuelta al conjunto de minicolumnas para ser incubado a temperatura ambiente por 1 min. Enseguida se llevó a centrifugar a 16.000 x g durante 1 min, se desechó el flujo y se reinsertó la minicolumna en el tubo colector. Se continuó con una

serie de lavados con alcohol en donde después de añadir 700 μ l y 500 μ l a la minicolumna se centrifugó a 16.000 x durante 1 y 5 min respectivamente, se centrifugó por última vez durante 1 min con la tapa de la microcentrífuga abierta para que el etanol residual se evaporara.

Se concluyó transfiriendo la minicolumna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml y se añadió 50 μ l de agua libre de nucleasas a la minicolumna para ser incubada a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifugó a 16.000 x g durante 1 min y se finalmente se desechó la minicolumna y se almacenó el ADN de 4 a 20 °C.

6.2 Clonación

Los amplicones purificados fueron clonados usando el kit comercial pGEM-T Easy Vector System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) por el método de choque térmico, de acuerdo con las especificaciones del fabricante la ligación se realizó con el buffer de ligación rápida 2X. Este procedimiento dio inicio con una centrifugación previa del tubo de pGEM-T Easy Vector y el inserto de ADN control para recoger el contenido del fondo del tubo.

Las reacciones de ligación se prepararon como lo especifica la **Tabla 8**, para ello se requirieron microtubos de 1.5 ml. Durante el procedimiento se agitó enérgicamente el buffer de ligación rápida 2X antes de cada uso y las reacciones fueron mezcladas mediante pipeteo, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tabla 8. Mezcla para preparar reacciones de ligación. (pGEM-T Easy Vector System de Promega TM).

Reactivos	Reacción estándar
Buffer de ligación rápida 2X, T4 ADN ligasa	5 μ l
pGEM-T Easy Vector (50ng)	1 μ l
Producto de PCR	X μ l
Inserto de ADN control	-
T4 ADN ligasa (3 unidades Weiss/ μ l)	1 μ l
Agua desionizada hasta un volumen final de	10 μ l

6.3 Transformación en cepas de *E.coli*

El resultado de la ligación se utilizó para transformar cepas de *E. coli* DH5 α calcio competentes. Las cepas transformantes resultantes fueron cultivadas en placas que contenían medio agar LB con 50 mg mL⁻¹ de ampicilina. Para ello primero se centrifugaron las reacciones de ligación, después se añadieron 2 μ l de cada de reacción de ligación a un microtubo estéril de 1.5 ml en hielo, a la vez se preparó un tubo de control con 0.1 ng de plásmido sin cortar.

Posteriormente las células competentes de Alta eficacia JM109 fueron descongeladas durante 5 min en un baño de hielo y se mezclaron agitando suavemente el microtubo, se transfirieron 50 μ l de células a cada uno de los microtubos con las reacciones previamente depositadas, a su vez para el microtubo de control se utilizaron 100 μ l de células. Al terminar los microtubos se agitaron suavemente y fueron incubados en hielo durante 20 min.

Enseguida las células fueron sometidas a un choque térmico de 45 a 50 segundos en baño de agua con una temperatura de 42 °C, al finalizar el tiempo los microtubos fueron puestos inmediatamente en hielo durante 2 min. El siguiente paso fue agregar 950 μ l y 900 μ l de medio SOC a temperatura ambiente a los microtubos con las reacciones de ligación y al microtubo de control respectivamente para llevarse a incubar durante 1.5 horas a 37°C con agitación a 150 rpm. Posterior a la incubación, se procedió a sembrar 100 μ l de las células transformadas en cajas Petri con medio agar-LB con 50 mg mL⁻¹ de ampicilina y se llevaron a incubación toda una noche a 37°C, para su posterior selección.

Las colonias que resultaron resistentes a la ampicilina fueron cultivadas en medio LB liquido con 50 mg mL⁻¹ de ampicilina con la finalidad de realizar la extracción de los vectores recombinantes utilizando el estuche comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Corporation, Madison, WI, USA), siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante primero se llevó a centrifugar de 1-10 ml de pellet durante 5 min, se resuspendió con 250 μ l de solución de resuspensión celular, enseguida se añadieron 250 μ l de solución de lisis celular, 10 μ l de solución de proteasa alcalina, invirtiendo 4 veces después de cada reactivo para una mezcla homogénea.

Posterior a la adición de la proteasa alcalina se llevó a incubar 5 min a temperatura ambiente, después se añadieron 350 µl de solución de Neutralización invirtiéndose 4 veces para ser mezclado. Después, se llevó a centrifugar a velocidad máxima por 10 min a temperatura ambiente. Por último, se insertó la columna de centrifugado en el tubo colector, se decantó el lisado y se llevó nuevamente a centrifugar a velocidad máxima durante 1 min a temperatura ambiente, se desechó el flujo y se volvió a insertar la columna en el tubo colector.

Para la serie de lavados se añadieron primero 750 µl de etanol, se centrifugó a velocidad máxima durante 1 min, se desechó el flujo y se reinserto la columna en el tubo colector, el segundo lavado se llevó a cabo añadiendo 250 µl de etanol, se centrifugó a velocidad máxima durante 2 min a temperatura ambiente.

Para eludir el ADN plasmídico se transfirió la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml meticulosamente para no transferir nada de la solución de lavado de la columna con la columna de centrifugación, después se añadieron 100 µl de agua libre de nucleasas a la columna de centrifugación para centrifugar a velocidad máxima durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente se desechó la columna y se guardó el ADN a -20 °C. El ADN plásmidico fue verificado por medio de electroforesis en gel de agarosa con las mismas condiciones descritas anteriormente y utilizado como sustrato para realizar la PCR utilizando cebadores universales M13 como se especifica en las **Tablas 9 y 10**.

Tabla 9. Cebadores utilizados para la amplificación de ADN plasmídico

Fragmento	Cebadores (5'-3')	Tm °C	Referencias
M13	M13-F: CAGGAAACAGCTATGACC M13-R: TGTA AACGACGGCCAGT	52	(Williams-Woods et al., 2011)

Tabla 10. Programa de PCR utilizado para la amplificación de ADN plasmídico.

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo

Desnaturalización	94	30 s	30 ciclos
Alineamiento	52	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

6.4 Secuenciación

Un total de 15 vectores presentaron un amplicon del tamaño esperado los cuales fueron secuenciados de forma unidireccional con el cebador M13F en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Irapuato, México según las especificaciones del servicio.

6.5 Análisis BLAST

En las secuencias resultantes se delimitó el inserto por medio de la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia del pGEM-T Easy Vector. Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en línea <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de manera específica se empleó el subprograma BLASTn presente en la plataforma bioinformática NCBI (National Center Biotechnology Information).

BLASTn es un subprograma que busca similitudes en nucleótidos, de acuerdo a las secuencias de consulta de ADN devuelve las secuencias de ADN más similares de la base de datos que especifique el usuario. En este trabajo se consideró como parámetro un valor de $E < 1 \times 10^{-5}$ y aciertos máximos de 98 a 100% para considerarse pertenecientes a una especie en particular.

VII. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN genómico

En los 12 tratamientos realizados se logró la extracción de ADN de alto peso molecular, con la finalidad de verificar que la integridad del material genético fuera óptima para la amplificación mediante PCR se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa (**Figura 20**).

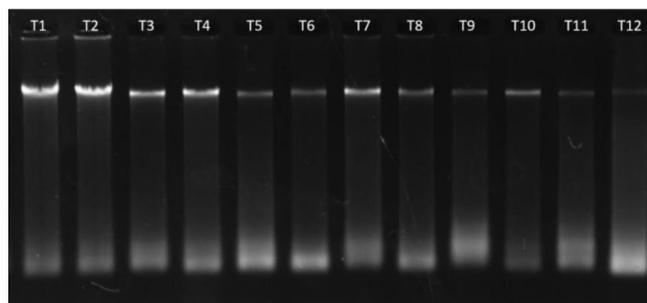


Figura 20. Gel de electroforesis de los ADN genómicos obtenidos en cada tratamiento. (T1 a T12).

7.2 Amplificación del fragmento ITS2

La **Figura 21** muestra los resultados obtenidos en la amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos para ITS2. En los resultados se puede observar un elevado porcentaje de amplificación, indicando que las muestras lograron amplificarse de manera eficiente con este marcador.

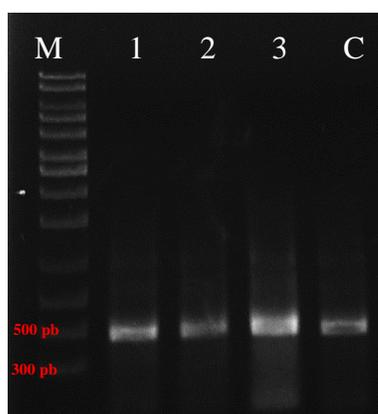


Figura 21. Productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS2. Carril M: Marcador de peso molecular Axigen 1kb. Carriles 1-3: Productos obtenidos. Carril C: Control negativo.

7.3 Transformación en cepas de *E.coli*

Los amplicones clonados con el pGEM-T Easy Vector System y un control negativo fueron empleados para transformar la cepa *E.coli* DH5 α calcio competentes por choque térmico, posteriormente, se sembraron en cajas Petri con medio selectivo con el fin de detectar las colonias que probablemente contenían los vectores recombinantes (**Figura 22**). En cada una de las placas se obtuvo un número abundante de colonias.

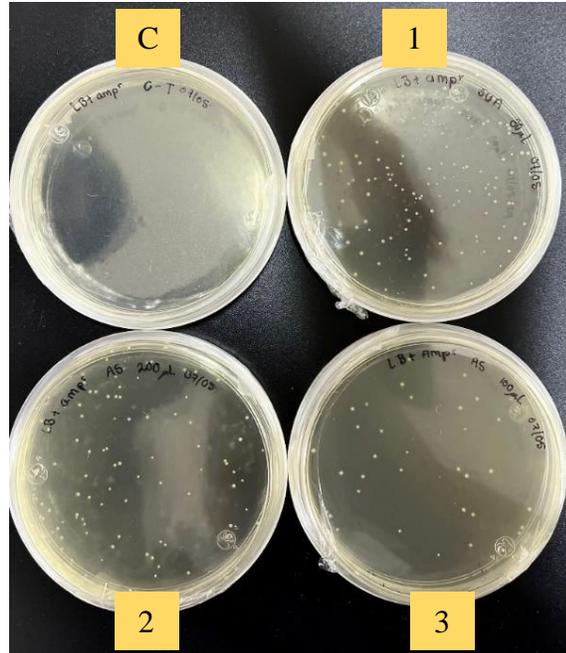


Figura 22. Colonias resultantes de la transformación de los productos de ligación. C: Control negativo. 1,2,3: Tratamientos de ligación.

7.4 PCR de verificación

De las colonias generadas a partir de la transformación de los productos de ligación, se eligieron 23 para verificar mediante PCR en colonia si contenían el producto de ligación. Para ello se utilizó el estuche comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y los cebadores específicos para ITS2 (ITS2-F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT, ITS2-R: GACGCTTCTCCAGACTACAAT). Dichos tratamientos se procesaron bajo un programa de amplificación (95°C, 4min; 35x (94°C, 45 s; 56°C, 1 min; 72°C, 1 min); 72°C, ∞ min) en un termociclador (Axygen®

MaxyGene™ Thermal Cycler II) (Chen et al., 2010). La **Figura 23** presenta los resultados obtenidos, mostrando que, de las 23 colonias analizadas solo en 22 hubo amplificación positiva para el producto de ligación.

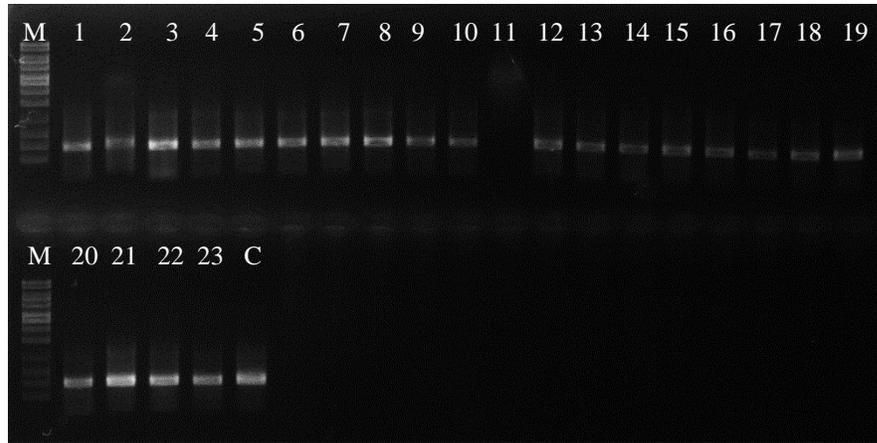


Figura 23. Gel de electroforesis de los productos de la PCR en colonia. Carril M: Marcador de peso molecular Axigen 1kb. **Carriles 1-23:** Colonias analizadas. **Carril C:** Control negativo.

7.5 Purificación

Para mayor certeza de la presencia del producto de ligación en las colonias analizadas, se seleccionaron algunas clonas que mostraron resultados positivos en la PCR en colonia y se les llevó a cabo una extracción plasmídica, que se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa, una vez purificadas se procedió a realizar una PCR en donde un total de 15 vectores presentaron un amplicón del tamaño esperado (**Figura 24**) y adecuado para secuenciación.

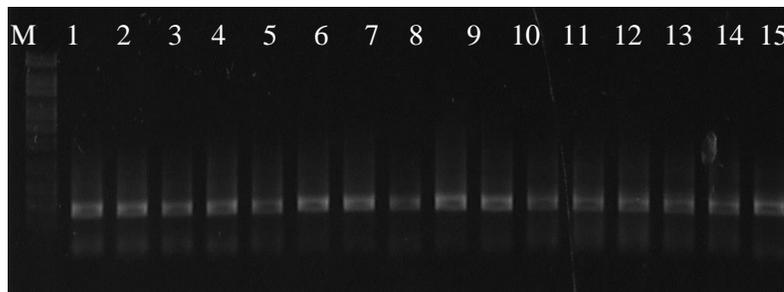


Figura 24. Gel de electroforesis del ADN plasmídico purificado. Carril M: Marcador de peso molecular Axigen 1kb. **Carriles 1-15:** Muestras para secuenciación.

7.6 Secuenciación

Las 15 muestras elegidas para secuenciación presentaron tamaños que oscilaron entre 365 y 482 pares de bases, de las cuales fue posible determinar la especie en 11 secuencias. Para verificar la calidad de las secuencias se revisaron cada uno de los cromatogramas obtenidos, como ejemplo se muestra la **Figura 25 y 26** de *Alnus cordata* y *Brassica Juncea* respectivamente, esto para confirmar que cada base nucleotídica estuviera claramente identificada por un pico cromatográfico (representando el verde/adenina, rojo/timina, negro/guanina y azul/citosina).

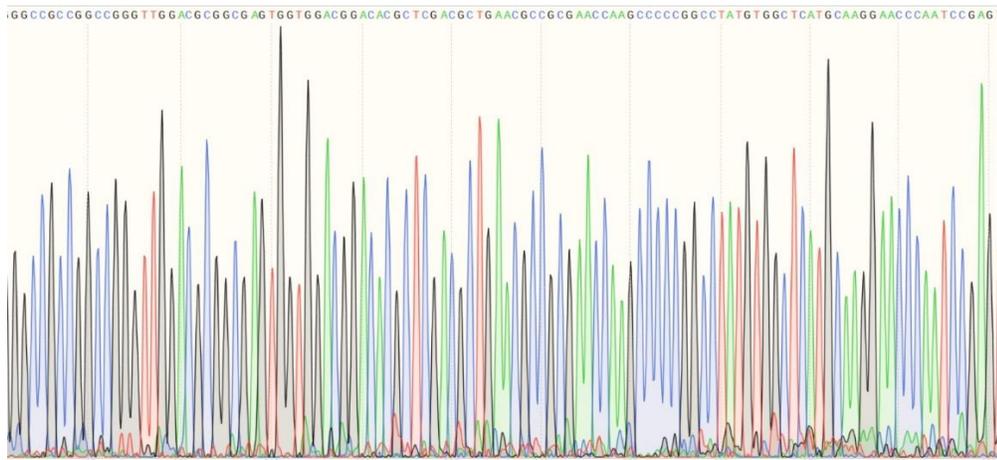


Figura 25. Cromatograma de *Alnus cordata*, marcador ITS2. Se observa un cromatograma de buena calidad por los picos bien definidos, separados y uniformes.

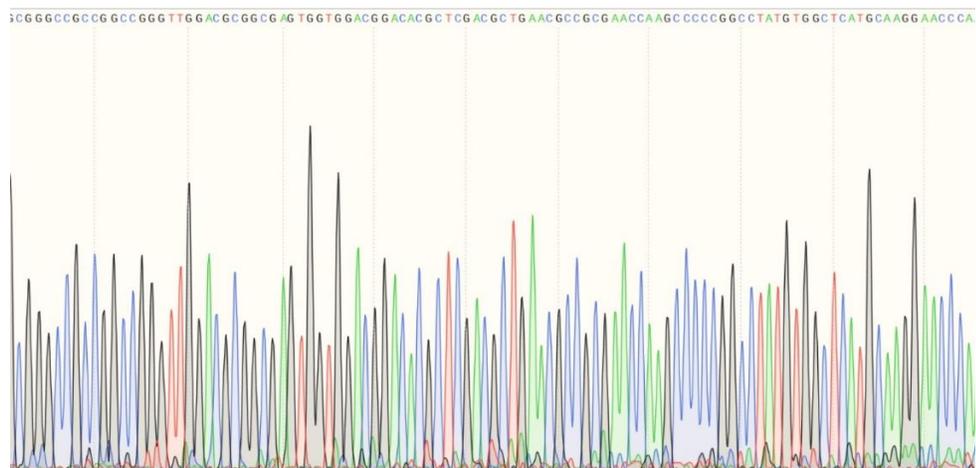


Figura 26. Cromatograma de *Brassica Juncea*, marcador ITS2. Se observa un cromatograma de buena calidad por los picos bien definidos, separados y uniformes.

7.7 Análisis BLAST

El análisis por medio de BLASTn mostró altos porcentajes de identificación a nivel de género y de especie en siete secuencias generadas con el marcador ITS2, las cuatro muestras restantes presentaron un porcentaje de identificación menor al 98%, lo cual permitió determinar únicamente el género, en la **Tabla 9** se indica la especie más probable. De las 11 muestras secuenciadas únicamente tres presentaron dos especies probables pudiendo considerarse como ambiguas y, en cuatro muestras se identificó una misma especie (*Melampodium divaricatum*).

Tabla 11. Especies identificadas por medio de BLASTn.

Género	Especie	Nucleótidos idénticos	Porcentaje de identidad
<i>Helianthus</i>	<i>annus/maximilani</i>	479/495	96.77
<i>Bidens</i>	<i>alba/pilosa</i>	487/492	98.98
<i>Juglans</i>	<i>regia</i>	437/453	96.47
<i>Brassica</i>	<i>juncea</i>	441/445	99.1
<i>Alnus</i>	<i>cordata</i>	482/498	96.79
<i>Melampodium</i>	<i>divaricatum</i>	365/365	100
<i>Sigesbeckia</i>	<i>orientalis</i>	423/468	90.4
<i>Melampodium</i>	<i>divaricatum</i>	368/368	100
<i>Melampodium</i>	<i>divaricatum</i>	383/383	100
<i>Melampodium</i>	<i>divaricatum</i>	368/369	99.7
<i>Ageratum</i>	<i>conyzoides/houstonianum</i>	378/378	100

VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio destaca la importancia de la identificación de especies de origen de polen apícola a través de códigos de barra de ADN, ya que, comparándolo con los medios convencionales de identificación como el análisis microscópico o las comparaciones con claves morfológicas (Galimberti et al., 2014), las técnicas de base molecular superan la considerable inversión de tiempo, el amplio conocimiento botánico y los resultados infructuosos de un análisis morfológico (Galimberti et al., 2014), permitiendo que la información palinológica pueda ser utilizada para una mayor variedad de investigaciones (Bell et al., 2016).

Durante el proceso de este trabajo, se evidenció que, si se compara el tiempo 100% práctico en la identificación microscópica con el tiempo sin intervención en los códigos de barras de ADN (Bell et al., 2017), resulta más beneficiosa la técnica molecular debido a que los tiempos de espera durante la PCR, la secuenciación y el procesamiento bioinformático permitió eficientizar el tiempo en el laboratorio al realizar otras tareas. También ofrece la ventaja de que los métodos moleculares como el aislamiento de ADN o PCR necesarios para desarrollar esta técnica, son estándar en cualquier laboratorio de biología molecular, siendo realizable por varias personas con experiencia previa, a diferencia de la técnica tradicional de identificación morfológica que demanda de un alto nivel de experiencia y de conocimiento para un examen prolongado de los caracteres morfológicos de la exina del polen (Bell et al., 2016).

El diferenciar polen de especies congénicas, o que algunos pólenes presenten rasgos morfológicos peculiares (Galimberti et al., 2014), haciéndolos irreconocibles se podría superar con el análisis a través de micrografías digitales de polen (Bell et al., 2016), sin embargo, la limitante seguirá siendo que muchos grupos de plantas no presentan los caracteres morfológicos suficientes para una resolución taxonómica a nivel de especie (Bell et al., 2016), aunque en estudios en donde se requiera identificar una pequeña cantidad de granos de polen, la identificación visual podría ser más apropiada (Bell et al., 2017), para evitar los altos costos de estudios con códigos de barras de ADN.

En general, el usar pequeñas regiones de ADN genera una discriminación de especies relativamente alta (Bell et al., 2017), la información taxonómica que se genera a

través de los granos de polen brinda muchas aplicaciones dentro de diversas disciplinas biológicas (Prudnikow et al., 2023), incluyendo la evaluación de redes de plantas y polinizadores, la reconstrucción de comunidades de plantas antiguas, la autenticación de productos, el monitoreo de alérgenos y la ciencia forense (Bell et al., 2016).

Un hecho que marca la tasa de éxito en la codificación de barras de ADN es la elección correcta del código de barras de ADN y de los cebadores para amplificarlos (Omelchenko et al., 2022); dado que serán los que dicten la recuperación taxonómica, el poder discriminatorio y las consideraciones de secuenciación (Bell et al., 2016). En estudios anteriores sobre el polen ya se han empleado varios marcadores para la metacodificación del ADN del polen proveniente del aire o de productos alimenticios: *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *trnL* (Prudnikow et al., 2023); sin embargo, estudios demuestran que tanto los marcadores de códigos de barras nucleares como de los cloroplastos pueden amplificarse a partir del polen (Bell et al., 2016).

Es por ello que en otras investigaciones se ha indagado la eficiencia del uso de las regiones espaciadoras transcritas internas ribosomales nucleares: ITS1 e ITS2. Omelchenko et al., (2022) menciona que ITS1 e ITS2 demostraron ser las más eficaces comparado con 5'-ETS y *trnL-F* tanto cualitativa como cuantitativamente para el análisis del polen, concretamente para la familia Poaceae. Por otro lado, Prudnikow et al., (2023) hace referencia a que, aunque ITS1 presenta un poder discriminatorio y una tasa de éxito en la identificación de especies muy alta, la popularidad de ITS2 es la que la ha hecho ser mayormente utilizada en diversas investigaciones.

Por su parte, Han et al., (2013) no solo se basan en la popularidad de ITS2, sino en su capacidad de amplificación y secuenciación, dichas características las comprobaron al poner a prueba a ITS e ITS2, evidenciando que ITS era una región demasiado variable para garantizar alineamientos confiables; en contraste, las ventajas que presenta la evolución de ITS2 son que puede considerarse un locus único en todo el genoma de varios organismos, que es valiosa para la identificación de muestras antiguas, incluso en especímenes que contengan ADN degradado, convirtiendo a ITS2 en un código de barras más apropiado que ITS.

En este trabajo se optó por la región nuclear ITS2 no solo por las características antes mencionadas, sino también porque en los resultados de diversas investigaciones se ha garantizado que es capaz de distinguir taxones de plantas a nivel de género y, en ciertos casos, a nivel de especie al utilizarla como un locus de código de barras. Por ejemplo, Bell et al., (2016) mostraron que ITS2 poseía capacidades discriminativas con un 92.7% de identificaciones exitosas en 6600 muestras, por otro lado Rodney T et al., (2015) intentaron analizar plantas de las familias Rosaceae y Brassicaceae, sin embargo, sus similitudes morfológicas dificultaron su identificación más allá del nivel de familia, esta limitante se superó al utilizar ITS2 como marcador. Sus hallazgos evidenciaron que el metacódigo de barras ITS2 es el más adecuado para un análisis cualitativo, debido a que proporciona mayor sensibilidad y resolución a nivel de género. Además, mencionan que cuando el objetivo sea el análisis cuantitativo del polen la combinación del metacódigo de barras con la identificación microscópica es más efectiva que el usarlos por separado.

En otras investigaciones como la de Pang et al., (2013) respaldan que ITS2 no solo es útil para identificar especies en polen, sino que también para diferenciar entre materiales herbarios, aunque sus especies estén estrechamente relacionadas o adulterantes convirtiendo a ITS2 en una herramienta valiosa para la investigación botánica. Además Bell et al., (2017) hicieron mención que en sus estudios el porcentaje de taxones identificados a nivel de especie con ITS2 fue mayor en comparación con rbcL, debido a que el 16% de especies de plantas distinguidas están representadas en la base de datos ITS2 siendo casi el doble de información existente comparándolo con el 9% en la base de datos rbcL.

En este estudio la amplificación mediante PCR de la región ITS2 mostró resultados consistentes con altas tasas de éxito y productos de amplificación del tamaño esperado, señal de que el ADN que se obtuvo fue de alta calidad gracias al protocolo de Wei et al., (2023) que se aplicó y al utilizar los cebadores diseñados y validados por Chen et al., (2010). Resultados similares fueron reportados por Rodney T et al., (2015) al utilizar los mismos cebadores que en este estudio, pero con condiciones de PCR alternativas para que se adaptaran al kit de PCR que emplearon, reafirmando de esta manera que el uso de la

región ITS2 como código de barras de ADN global tiene gran potencial para la identificación rápida de materiales, muestras medicinales o antiguas (Han et al., 2013).

En relación con la secuenciación de los productos amplificados, los cromatogramas confirmaron que los resultados obtenidos correspondieron a secuencias de alta calidad, lo que corrobora que es posible lograr una amplificación y secuenciación efectiva bajo condiciones óptimas utilizando los marcadores ITS2 previamente reportados y empleados en este estudio (Chen et al., 2010).

Cabe mencionar que las muestras fueron secuenciadas mediante el método clásico Sanger, reconocido por su alta precisión en la secuenciación de fragmentos de ADN relativamente cortos (Monzó et al., 2017). Sin embargo, este método resulta impráctico para el análisis simultáneo de múltiples fragmentos de ADN. Una técnica que supera significativamente a la secuenciación Sanger en términos de rapidez, costo y volumen de datos, es la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS). Diversos autores han empleado la secuenciación molecular para la identificación de polen, por ejemplo, Iorizzo et al., (2023) confirmaron a través de sus resultados que NGS es una técnica eficiente para la identificación de polen a nivel de género. Además Galimberti et al., (2014) afirman que el código de barras de ADN puede combinarse con técnicas NGS para obtener un mayor número de fragmentos de ADN, permitiendo a los investigadores procesar una mayor cantidad de muestras de polen o productos basados en polen con mayor profundidad analítica, incluso cuando algunos pólenes estén presentes en bajas cantidades.

Por otra parte, BLASTn evidenció que las secuencias analizadas presentan una identificación a nivel de género del 100%, sin embargo, la identificación a nivel de especie no fue igualmente exitosa, ya que solamente se logró un 73% de identificación, en siete de las 11 secuencias generadas con el marcador ITS2. Posiblemente debido a que la base de datos de secuencias utilizada carecía de una alta cobertura de información taxonómica a nivel de especie. Cabe mencionar que, independientemente de la base de datos que se emplee, todas muestran una notable incompletitud, además de estar sujetas a identificaciones erróneas, variaciones intraespecíficas, errores de secuenciación y otros desafíos que no son fáciles de detectar (Bell et al., 2016).

Resultados parecidos fueron registrados por Han et al., (2013), quienes estudiaban la eficiencia de identificación de ITS2. En su investigación, de 12861 muestras analizadas ITS2 logró identificar el 93.8% de los géneros mediante BLAST y aproximadamente el 79.2% de las especies. En este estudio el porcentaje de identificación en las cuatro muestras restantes fue inferior al 98% por lo que únicamente se pudo establecer su género, sin embargo, el nivel de identificación de ITS2 sigue siendo superior a la combinación propuesta por el CBOL de los marcadores matK y rbcL (70%) (Han et al., 2013), además de que estos códigos de barras plásticos ya han sido desaprobados en algunas investigaciones (Prudnikow et al., 2023) dado que el ADN plástico no se encuentra en todos los granos de polen.

Además, de las 11 muestras secuenciadas únicamente tres presentaron dos especies probables, esta situación no resultó inesperada, dada la información actual sobre la capacidad de identificación de ITS2 a nivel de especie. Una solución a ello podría ser utilizar múltiples locus como en otras investigaciones de diversos autores para ampliar el alcance de detección. Galimberti et al., (2014) utilizó rbcL y trnH-psbA para la caracterización de la composición de especies de mezclas de polen, estudios en donde rbcL mostró una capacidad limitada para discriminar especies congénicas particularmente, sin embargo, el análisis múltiple con trnH-psbA resolvió las indecisiones o ambigüedades taxonómicas en la mayoría de los casos. De ahí que la elección del o los marcadores siempre resultará fundamental para cumplir con los lineamientos del CBOL: mantener cierto grado de estandarización y compatibilidad con los repositorios genéticos (Galimberti et al., 2014).

Es importante mencionar que el uso del proceso metodológico de este estudio no se limita a aplicaciones en apicultura, sino que también puede ser una herramienta valiosa en diversas áreas de investigación científica debido a que el polen es considerado un biomarcador ambiental omnipresente (Bell et al., 2016), por ejemplo, puede ser útil para el monitoreo de contaminación industrial, las bacterias y virus transmitidos por el aire, la evaluación de la biodiversidad (Rodney T et al., 2015), la autenticación e identificación de plantas medicinales y venenosas, la composición de especies de plantas de la miel

(Omelchenko et al., 2022), la identificación o el seguimiento de especies invasoras, transgénicas y alergénicas.

En este estudio se identificaron especies arbóreas y herbáceas no perennes, de las cuales *Alnus cordata* fue la única especie endémica proveniente de Italia que se ha establecido en México, considerándose también una especie invasora. Otra especie identificada fue *Ageratum conyzoides*, clasificada como tóxica debido a la presencia de HCN y cumarina (Okunade, 2002), y como invasora, ya que desde 2002 se ha expandido rápidamente convirtiéndose en un problema significativo para ambientalistas, ecologistas y agricultores. La identificación de plantas invasoras es fundamental, ya que pueden causar daños ecológicos, económicos y a la salud humana. Sin embargo, las evaluaciones de los loci candidatos para identificar de forma rápida y precisa plantas invasoras aún son insuficientes. Por ello Xu et al., (2018) evaluaron cinco marcadores: ITS, ITS2, matK, rbcL y trnH-psbA, con el objetivo de determinar cuál de ellos era el más ideal para identificar especies invasoras. Sus resultados revelaron que ITS2, por sí solo, exhibió una mayor divergencia intra e interespecífica. Sin embargo, la combinación de ITS+ matK mostró un rendimiento superior y un mayor poder discriminatorio, seguido de la combinación ITS2+matK. En consecuencia, los autores recomiendan ITS/ITS2+matK como el código de barras de ADN más apropiado para la identificación de especies invasoras, además demostraron que los códigos de barras de ADN son una herramienta sumamente eficaz para cumplir con dicho propósito.

Es claro que los resultados indican que la región ITS2 es un candidato potencial para la identificación de especies en polen apícola sin la necesidad de la combinación con otras regiones intergénicas, sin embargo, el emplear dos o más marcadores para una mayor resolución taxonómica siempre será una decisión de criterio por parte del investigador debido a que en algunos ecosistemas pueden encontrarse especies de plantas altamente relacionadas o también a la falta de representación de especies en las bases de datos (Bell et al., 2017).

IX. CONCLUSIONES

La amplificación y secuenciación de ADN fue exitosa en las muestras de polen apícola analizadas, lo cual resalta la buena calidad del ADN genómico extraído.

Se caracterizaron molecularmente 11 especies mediante la región ITS2. El análisis por BLAST mostró 100% de identificación a nivel de género, y 73% de identificación a nivel de especie. En cuatro muestras, la identificación fue ambigua debido a un porcentaje de identificación inferior al 98%, de las cuales, además, tres presentaron dos especies probables.

Este estudio facilitó la detección de especies clasificadas como invasoras, entre las que destaca *Alnus cordata* y *Juglans regia*. Asimismo, se detectó la presencia de *Ageratum conyzoides*, una especie considerada tóxica, comprobando que el utilizar la región ITS2 como Código de barras de ADN es útil para la detección y el monitoreo de especies botánicas invasoras, transgénicas, tóxicas, entre otras a través del polen apícola.

Con base en los resultados obtenidos, los altos porcentajes de amplificación y la alta recuperabilidad de secuencias, se concluye que el uso de la región ITS2 como código de Barras de ADN es razonablemente eficaz y práctico comparado con otros métodos convencionales para la identificación de especies botánicas en polen apícola a nivel de género, sin embargo, para la discriminación a nivel de especie se sugiere el uso de múltiples locus para lograr la máxima universalidad y aumentar el poder de resolución taxonómica en grupos de plantas estrechamente relacionadas o para superar la falta de información de especies en las bases de datos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Algethami, J. S., El-Wahed, A. A. A., Elashal, M. H., Ahmed, H. R., Elshafiey, E. H., Omar, E. M., Al Naggari, Y., Algethami, A. F., Shou, Q., Alsharif, S. M., Xu, B., Shehata, A. A., Guo, Z., Khalifa, S. A. M., Wang, K., & El-Seedi, H. R. (2022). Bee Pollen: Clinical Trials and Patent Applications. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 14, p. 2858). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu14142858>
- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
- Alquicira, J. P., Rodríguez-Gómez, F., Vargas-Ponce, O., Muñoz-González, Z. A. G., Alcalá-Gómez, G., & Zamora-Tavares, P. (2022). Principios básicos de la genómica y sus aplicaciones: Fundamentals of genomics and its applications. *E-CUCBA*, 18, 123–131.
- Altamirano-Benavides, M., & Yanez-Moreta, P. (2016). El código de barras de ADN (barcoding): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en Ecuador. *La Granja*, 23(1). <https://doi.org/10.17163/lgr.n23.2016.01>
- Armstrong, K. F., & Ball, S. L. (2005). DNA barcodes for biosecurity: Invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1813–1823. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1713>
- Baena-Díaz, F., Chévez, E., de la Merced, F. R., & Porter-Bolland, L. (2022). Apis mellifera in Mexico: honey production, melliferous flora and pollination aspects. Review. In *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* (Vol. 13, Issue 2, pp. 525–548). INIFAP-CENID Parasitología Veterinaria. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V13I2.5960>
- Baena-Díaz, F., Chévez, E., Ruiz de la Merced, F., & Porter-Bolland, L. (2022). Apis mellifera in Mexico: honey production, melliferous flora and pollination aspects.

- Buhler, J. D., Lancaster, J. M., Jacob, A. C., & Chamberlain, R. D. (2007). Mercury BLASTN: Faster DNA Sequence Comparison Using a Streaming Hardware Architecture. *Proc. of Reconfigurable Systems Summer Institute*.
- Cárdenas-Orrego, A., Calvo, S., Salazar Forero, C. P., & Valencia-Muñoz, C. (2022). Caracterización Físicoquímica y Antimicrobiana del Polen de Abejas Producido en el Departamento de Caldas. *Con-Ciencia Y Tecnica*, 6(1), 45–48.
- Chamorro-García, F. J., León-Bonilla, D., & Nates-Parra, G. (2013). El polen apícola como producto forestal no maderable en la cordillera oriental de Colombia. *Colombia Forestal*, 16(1), 53–66.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Cobo Ochoa, A. (1980). Recogida, manejo y aplicaciones. *Hojas Divulgadoras-Ministerio de Agricultura*, 8–80.
- Cornman, R. S., Otto, C. R. V., Iwanowicz, D., & Pettis, J. S. (2015). Taxonomic characterization of honey bee (*Apis mellifera*) pollen foraging based on non-overlapping paired-end sequencing of nuclear ribosomal loci. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145365>
- Darling, J. A., & Blum, M. J. (2007). DNA-based methods for monitoring invasive species: A review and prospectus. In *Biological Invasions* (Vol. 9, Issue 7, pp. 751–765). <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9079-4>
- De Jesus Inacio, L., Merlanti, R., Lucatello, L., Bisutti, V., Carraro, L., Larini, I., Vitulo, N., Cardazzo, B., & Capolongo, F. (2021). Natural contaminants in bee pollen: DNA metabarcoding as a tool to identify floral sources of pyrrolizidine alkaloids and fungal diversity. *Food Research International*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110438>

- de Mattos, I. M., de Souza, J., & E E Soares, A. (2015). Análisis de los efectos en la producción de polen de abeja del tamaño poblacional de la colonia y los suplementos alimentarios. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 411–419. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1159892>
- De Vere, N., Jones, L. E., Gilmore, T., Moscrop, J., Lowe, A., Smith, D., Hegarty, M. J., Creer, S., & Ford, C. R. (2017). Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep42838>
- Fernández, L. A., Gallez, L. M., Mónica, ;, Pérez, B., Alippi, A. M., Fernando López, ;, & Iaconis, D. (2017). Microbiología apícola: valorización del polen en la industria alimentaria. *Campo & Abejas*, 20(115), 3–6. www.anmat.
- Ferreira Demartelaere, A. C., de Oliveira, A. K., de Góes, G. B., de Lima, G. K. L., & Soares Pereira, M. F. (2010). A flora apícola no semi - árido brasileiro. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 6. <http://revista.gvaa.com.br>
- Galimberti, A., De Mattia, F., Bruni, I., Scaccabarozzi, D., Sandionigi, A., Barbuto, M., Casiraghi, M., & Labra, M. (2014). A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109363>
- González-Suárez, M., Mora-Olivo, A., Villanueva-Gutiérrez, R., Lara-Villalón, M., Vanoye-Eligio, V., & Guerra-Pérez, A. (2020). Diversity of melliferous flora in the State of Tamaulipas, Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11(3), 914–932. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V11I3.4717>
- Guidos, G. A., & Almeida, V. M. (2005). Polinosis y aeroalergenos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 14(2), 52–55.
- Gyang, K. (2005). *NCBI BLASTN Stage 1 in Reconfigurable Hardware*.
- Han, J., Zhu, Y., Chen, X., Liao, B., Yao, H., Song, J., Chen, S., & Meng, F. (2013). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison

- with the full-length ITS. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/741476>
- Huerta Vela, A., & Centeno-Cuadros, A. (2020). Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales. *MoleQla: Revista de Ciencias de La Universidad Pablo de Olavide*, 2(40).
- Ilahi, W. (2021). Metabarcoding Identification of Botanical Origin of Bee-collected Pollen Samples: Comparison of ITS2 Reference Database Performance Before and After Enrichment with Sequences of Bee Plant Species. In *Instituto Politecnico de Braganca*. Instituto Politecnico de Braganca.
- Iorizzo, M., Letizia, F., & Aturki, Z. (2023). *Diversity of Plant Pollen Sources, Microbial communities and Phenolic compounds present in Bee pollen and Bee bread*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3621253/v1>
- Jáuregui González, M. de J. (2015). *Código de barras de la vida y análisis filogenético en *Dasyllirion cedrosanum* y *D. berlandieri* con base en secuencias de DNA citoplasmático*.
- Keller, I., Fluri, P., & Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees - Part II. *Bee World*, 86(2), 27–34. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099650>
- Khalifa, S. A. M., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., Alajmi, M. F., Zhao, C., Masry, S. H. D., Abdel-Daim, M. M., Halabi, M. F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M. A. M., & El-Seedi, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/insects12080688>
- Kostić, A. Z., Milinčić, D. D., Barać, M. B., Shariati, M. A., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2020). The application of pollen as a functional food and feed ingredient—the present and perspectives. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10010084>

- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 30, Issue 1, pp. 25–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(23), 8369–8374. www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0503123102
- Loewe Muñoz, V., & Delard, C. (1998). *Aliso italiano. Alnus cordata*.
- Loewe Muñoz., V., & González O., Marta. (2001). *Nogal común : (Juglans regia) : una alternativa para producir madera de alto valor*. INFOR.
- Lugo Melchor, O. Y., Alvarado Osuna, C., & Ramírez Cerda, E. L. (2017). *Inocuidad y trazabilidad en los alimentos mexicanos*. www.pixabay.com
- Martínez-Pérez de Ayala, L. R., Martínez-Puc, J. F., & Cetzal-Ix, W. R. (2017). Apicultura: Manejo, Nutrición, Sanidad y Flora Apícola. *Universidad Autónoma de Campeche*, 112.
- Meléndez Ramírez, V., Chablé Santos, J., & Selém Salas, C. (2020). Polinización y polinizadores amenazados en desaparecer. *Bioagrociencias*, *13*(2), 109. <https://www.deforestacion.net/>
- Montenegro, G., Pizarro, R., Mejías, E., & Rodríguez, S. (2013). Biological evaluation of bee pollen from native Chilean plants. *Phyton*, *82*, 7–14.
- Monzó, C., Juanes, J., Marín-García, P., Chaves, F., Llombart, V. A., & García-García, A. B. (2017). Secuenciación Masiva: Del ADN a los datos. , 25.
- Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biology*, *2*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>
- Narváez Torres, P., & Ortiz García, S. A. (2013). *Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soya, Glycine max L., en la miel de abeja, Apis mellifera, de los estados de Campeche y Yucatán*.

- Nuñez Hernández, A. (2019). Bioinformática aplicada en Aerobiología: análisis e identificación de polen por secuenciación del ADN. *Revista de Salud Ambiental*, 19, 128–129.
- Okunade, A. L. (2002). *Ageratum conyzoides* L. Asteraceae. *Fitoterapia*, 73(1), 1–116.
- Omelchenko, D. O., Krinitsina, A. A., Kasianov, A. S., Speranskaya, A. S., Chesnokova, O. V., Polevova, S. V., & Severova, E. E. (2022). Assessment of ITS1, ITS2, 5'-ETS, and trnL-F DNA Barcodes for Metabarcoding of Poaceae Pollen. *Diversity*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/d14030191>
- Palma-Ordaz, S., & Delgadillo-Rodríguez, J. (2014). Distribución potencial de ocho especies exóticas de carácter invasor en el estado de Baja California, México. *Botanical Sciences*, 92(4), 587–597.
- Pang, X., Shi, L., Song, J., Chen, X., & Chen, S. (2013). Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials. *Journal of Natural Medicines*, 67(3), 571–575. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0715-2>
- Parra Valdes, D. A. (2022). *Caracterización Molecular de Especies de la Familia Cactaceae Utilizando el Fragmento rbcL Como Marcador*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/48624>
- Paz, A., Maily González, B., & Crawford, A. J. (2011). Barcode of Life: An Introduction and Perspective. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 16, Issue 3).
- Peña Montes, C., Quirasco Baruch, M., Estrada Hernández, C. A., & Gálvez Mariscal, A. (2013). *Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I*. www.conabio.gob.mx
- Promega. (2024). PGEM®-T Easy Vector Systems.
- Prudnikow, L., Pannicke, B., & Wünschiers, R. (2023). A primer on pollen assignment by nanopore-based DNA sequencing. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1112929>

- Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Bernal, A., Ramírez Maldonado, N., & Martínez-Hernández, E. (2016). Palynological analysis of honeys and pollen loads of *Apis mellifera* (Apidae) from the central and northern regions of the state of Guerrero, Mexico. *Botanical Sciences*, 94(1), 141–156. <https://doi.org/10.17129/botsci.217>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Rey Bentos, F., & Capdevielle Sosa, F. (2020). Aplicación del Código de Barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *Innotec*, 20, 117–138. <https://doi.org/10.12461/20.06>
- Rodney T, R., Chia-Hua, L., Douglas B, S., Quijia, J. O., Goodell, K., & Reed M, J. (2015). Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3(1). <https://doi.org/10.3732/apps.1400066>
- Rodríguez García, G. de J. (2023). *Caracterización Molecular de Quercus spp. Utilizando los fragmentos rbcL e ITS2 como marcadores* [Tesina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/49236>
- Rodríguez-Pólit, C., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Carrera-Pacheco, S. E., Castillo-Solis, F., Vallejo-Imbaquingo, R., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2023). Chemical Properties and Biological Activity of Bee Pollen. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules28237768>
- Rodríguez-Rojas, T. J., Andrade-Rodríguez, M., Canul-Ku, J., Castillo-Gutiérrez, A., Martínez-Fernández, E., & Guillén-Sánchez, D. (2015). Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies *Echeveria* en condiciones de invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 6(1), 111–123.
- Romero Mastranzo, E. (2020). *Diseño y construcción de vectores de expresión genética para plantas*.

- Romero, P., & Ramírez, R. (2011). Intraspecific divergence and DNA barcodes in *Systrophia helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). *Rev. Peru. Biol*, 18(2), 201–208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
- Salazar Montes, Adriana., Sandoval Rodríguez, Ana., & Armendáriz Borunda, Juan. (2016). *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana Editores, SA de CVs.
- Santamaría, E. M., Espitia-Lopez, J. V., Marriaga-Barroso, A. P., & Paez-Logreira, H. D. (2022). Sistema de control y monitoreo para el proceso de secado de alimentos: caso polen apícola. *Información Tecnológica*, 33(3), 137–148. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642022000300137>
- Selvaraj, D., Park, J.-I., Chung, M.-Y., Cho, Y.-G., Ramalingam, S., & Nou, I.-S. (2013). Utility of DNA Barcoding for Plant Biodiversity Conservation. *Plant Breeding and Biotechnology*, 1(4), 320–332. <https://doi.org/10.9787/pbb.2013.1.4.320>
- Silva, L. M., & Restrepo, S. (2012). Flora apícola: determinación de la oferta floral apícola como mecanismo para optimizar producción, diferenciar productos de la colmena y mejorar la competitividad. *Instituto Humboldt*, 28.
- Stoeckle, M. Y., & Hebert, P. D. N. (2008). Barcode of life. *Scientific American*, 299(4), 82–89. <https://doi.org/10.2307/26000849>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 98, 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>
- van der Knaap, W. O., van Leeuwen, J. F. N., Froyd, C. A., & Willis, K. J. (2012). Detecting the provenance of Galápagos non-native pollen: The role of humans and air currents as transport mechanisms. *Holocene*, 22(12), 1373–1383. <https://doi.org/10.1177/0959683612449763>
- Velázquez-Sámamo, G., de Lourdes Mendoza-Gertrudis, M., Velasco-Medina, A. A., & Rosas-Alvarado, A. (2021). *Prosopis* spp. in allergic diseases. *Revista Alergia Mexico*, 68(4), 242–250. <https://doi.org/10.29262/ram.v68i4.842>

- Vera M, S. P., Jiménez M, P., & Franco-Lara, L. (2012). Uso de herramientas bioinformáticas en la evaluación de secuencias “DNA BARCODE” para la identificación a nivel de especie. *FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS*, 8(2), 196–209. <http://www.barcoding.si.edu>
- Villanueva-Gutiérrez, R., Echazarreta-González, C., Roubik, D. W., & Moguel-Ordóñez, Y. B. (2014). Transgenic soybean pollen (*Glycine max* L.) in honey from the Yucatán peninsula, Mexico. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep04022>
- Wei, L., Mendoza-Villareal, R., Solano-Sánchez, J., Ibarra-Rivera, A. S., Pacheco-Reyes, F. C., & Ángel Pérez-Rodríguez, M. (2023). Optimización de extracción de ADN de polen apícola para caracterización molecular. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(10). <https://doi.org/10.19136/era.a10nIII.3656>
- Williams-Woods, J., González-Escalona, N., & Burkhardt, W. (2011). Direct sequencing of hepatitis A virus and norovirus RT-PCR products from environmentally contaminated oyster using M13-tailed primers. *Journal of Virological Methods*, 178(1–2), 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.014>
- Xi, X., Li, J., Guo, S., Li, Y., Xu, F., Zheng, M., Cao, H., Cui, X., Guo, H., & Han, C. (2018). The potential of using bee pollen in cosmetics: A review. In *Journal of Oleo Science* (Vol. 67, Issue 9, pp. 1071–1082). Japan Oil Chemists Society. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18048>
- Xu, S. Z., Li, Z. Y., & Jin, X. H. (2018). DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), 128–136. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12715>
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., & Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>
- Yepes Giraldo, H. F., & Cardona, J. E. (2005). Evaluación y elaboración de un protocolo para el secado de polen. *Investigaciones Andina*, 7(11), 48–57. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=239017502006>

Yu, J., Wu, X., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, S., & Kress, W. J. (2021). Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111691>