



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**Centro de Investigación en Dinámica Celular
Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**

**Análisis comparativo de la comunidad de virus y su interacción
con la microbiota intestinal de Apis mellifera en distintos
períodos estacionales**

T E S I S

QUE PRESENTA:

Frida Gomez Jaimes

**Para obtener el Grado de
LICENCIADO EN
CIENCIAS CON AREA
TERMINAL EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

**Director de la Tesis
Dra. Sonia Dávila Ramos**

Comité Tutorial

Dra. Verónica Mercedes Narvaez Padilla (Presidente).

CIDC, UAEM

Dr. Agustín Pérez Reyes (Secretario).

CIDC, UAEM

Dra. Sonia Dávila Ramos (Vocal).

CIDC, UAEM

Dr. Hugo Gildardo Castelán Sánchez (Suplente).

CONACyT

Dra. Delia Vanessa López Guerrero (Suplente).

Facultad de nutrición, UAEM

Resumen

Las abejas melíferas se consideran en gran medida el principal polinizador de numerosos cultivos, su marcada pérdida tiene implicaciones considerables para la sostenibilidad agrícola. Más del 70 % de los principales cultivos alimentarios del mundo (incluidas frutas, verduras y nueces) se benefician de la polinización de las abejas, además, las abejas tienen una importancia económica con productos de colmena que incluyen miel, polen, cera, propóleo y jalea real.

Las poblaciones de abejas de todo el mundo sufren pérdidas debido a múltiples factores, la salud y el vigor de las colonias de abejas melíferas se ven amenazados por numerosos parásitos como *Varroa destructor*, *Nosema* spp. y patógenos, incluidos virus, bacterias y protozoos. Entre los patógenos de las abejas melíferas, los virus son una de las principales amenazas para la salud y el bienestar de las abejas melíferas ya que están muy extendidos en todas las comunidades de abejas, a pesar de que la mayoría de las infecciones virales presentan síntomas únicamente en el comportamiento de las abejas, por ello, la detección de las infecciones virales en abejas resulta más complicada creando una gran preocupación para los investigadores y apicultores.

Aunque la diversidad taxonómica del microbioma de las abejas es relativamente constante, su composición es bastante dinámica y responde a las influencias sociales y ambientales, como la búsqueda de alimento, la estacionalidad, y la exposición química. Las interacciones entre la nutrición y la infección viral pueden generar reacciones que afectan la salud de las abejas, ya que los virus afectan el comportamiento de las abejas reduciendo la recolección de polen y además existe la posibilidad de que los virus alteren la adquisición o digestión de nutrientes. Hasta el momento se han identificado más de 24

virus en las abejas melíferas occidentales (*Apis mellifera*). Para atenuar las amenazas que representan estos patógenos invasores, una mejor comprensión de las infecciones virales de las abejas será de vital importancia en el desarrollo de estrategias de control de enfermedades efectivas y ambientalmente benignas.

En este trabajo se realizará un análisis bioinformático con datos metagenómicos de comunidades globales de abejas reportados en diferentes épocas del año, con el objetivo de conocer mejor la diversidad de virus en las colmenas y su relación con factores ambientales estacionales.

Lista de figuras

Figura 1. La microbiota gastrointestinal de una abeja obrera adulta (*Apis mellifera*).

Figura 2. Estacionalidad de las poblaciones de crías y adultos de *Apis mellifera*.

Figura 3. Diagrama general de la metodología empleada.

Figura 4. Mapa con la ubicación de las colonias muestreadas y la temporada en la que fueron recolectadas.

Figura 5. Distribución viral de *Apis mellifera*.

Figura 6. Análisis de Alfa diversidad según el lugar de origen de la secuencia.

Figura 7. Análisis de Alfa diversidad según su estación climática.

Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCoA) en relación con la ubicación de la muestra.

Figura 9. Análisis de coordenadas principales (PCoA) en relación con la estación del año en la que se tomó la muestra.

Figura 10. Doble análisis de coordenadas principales (DPCoA).

Figura 11. Red basada en la puntuación de similitud de identidad.

Figura 12. Asignación taxonómica de orden jerárquico.

Figura 13. Gráfica de burbujas.

Figura 14. Composición relativa de la comunidad de la microbiota intestinal de *Apis mellifera*.

Índice General

	Paginas
1. Introducción	1
1.1 Abejas melíferas	1
1.1.1 Taxonomía y distribución	1
1.1.2 Características de las abejas melíferas	1
1.1.3 Ciclo anual de una colonia de abejas melíferas	4
1.2 Colapso de colmenas	6
1.2.1 Nutrición inadecuada	6
1.2.2 Pesticidas	7
1.2.3 Varroa Destructor	8
1.2.4 <i>Nosema apis</i> y <i>Nosema ceranae</i>	9
1.2.5 <i>Paenibacillus larvae</i>	10
1.2.6 Virus	10
1.3 Infecciones virales	11
1.4. Sistema inmune	12

1.5 Metagenómica	13
2. Antecedentes	13
3 Justificación	14
4 Hipótesis	15
5 Objetivos	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos	15
6 Metodología	16
6.1 Obtención de secuencias	16
6.2 Control de calidad	18
6.3 Ensamble y alineamiento de secuencias	19
6.4 Identificación de secuencias virales	19
6.5 Abundancia y diversidad viral	20
6.6 Asignación taxonómica	20
7 Resultados	21
7.1 Identificación de secuencias virales	21
7.2 Diversidad viral	23

7.3 El microbioma de las abejas melíferas	28
8 Discusiones	31
9 Conclusión	37
10 Referencias	38

1. Introducción

1.1 Abejas melíferas

Las abejas melíferas son los principales insectos polinizadores de cultivos y plantas silvestres, favoreciendo directamente la producción de alimentos, así como el mantenimiento de la biodiversidad vegetal (Deboutte et al., 2020). Muchas especies de cultivos, tales como los manzanos, guayabos, kiwi y melón, dependen exclusivamente de la polinización entomófila, y muchos otros se ven favorecidos en la calidad y cantidad de los frutos obtenidos.

Además de su imprescindible función polinizadora, las abejas elaboran una serie de productos como miel, jalea real, propóleos, apitoxina, polen y cera, que han sido utilizados tanto en la salud como en productos de consumo humano.

1.1.1 Taxonomía y distribución

La taxonomía de la abeja melífera *A. mellifera* debido a que se basa en las características específicas de su estructura de población, se han encontrado 33 subespecies distintas de abejas melíferas distribuidas en África (11 subespecies), Asia Occidental, Oriente medio (9 subespecies) y Europa (13 subespecies) (Ilyasov et al., 2020).

1.1.2 Características de las abejas melíferas

Las abejas *Apis mellifera* son insectos sociales que viven juntos en colonias de decenas de miles de individuos. Cada colonia posee tres castas: una única reina, la cual es más longeva, llegando a vivir varios años, está especializada en la reproducción y puede poner hasta 2.000 huevos por día; los zánganos, cuya única función es fecundar a la

reina, y las obreras estériles, encargadas de realizar el resto de las tareas de la colonia (limpieza, cuidado y alimentación de las crías, colecta de néctar y polen, entre otras). La esperanza de vida de las obreras varía estacionalmente desde 3 a 4 semanas en el verano a más de 6 meses en el invierno (Page & Peng, 2001).

El ciclo de vida de una abeja comienza cuando la reina coloca un huevo en una celda de cera. Las reinas almacenan más de cinco millones de espermatozoides dentro de su cuerpo en la espermateca, lo que les permite depositar los huevos en las celdas de la colmena durante toda su vida después de un único vuelo nupcial. Los huevos que son fertilizados van a dar lugar a obreras y los que no, darán lugar a zánganos.

El desarrollo de estos insectos consta de cuatro etapas: huevo, larva pupa y adultos. La etapa de huevo dura tres días y luego eclosionan dando lugar a larvas que son alimentadas con una mezcla de polen y miel por las nodrizas. Transcurridos unos 6 días, la celda se cubre con una fina capa de cera y la larva da lugar a una pupa. En esta etapa de 7 a 10 días, el individuo no se alimenta hasta emerger como un insecto adulto.

Durante las primeras dos a tres semanas de vida, dentro de la colmena, las abejas jóvenes se encargan de cuidar a las crías, entre otras tareas. Luego transitan a abejas forrajeras o pecoreadoras que salen a recolectar néctar o polen.

La determinación del nacimiento de una obrera o una abeja reina, se basa fundamentalmente en la nutrición. El huevo destinado a una futura reina recibe jalea real durante todo el ciclo de su desarrollo (16 días). Por el contrario, las larvas que darán lugar a obreras son alimentadas con jalea real durante sus primeros tres días y luego se las alimenta con polen y néctar por el resto de sus vidas (Page & Peng, 2001).

La microbiota intestinal característica de las abejas se establece a través de

interacciones sociales con otras abejas después de emerger. La comunidad de la microbiota intestinal está dominada por 5 a 9 taxones y cada taxón corresponde a una especie o a un grupo de especies estrechamente relacionado. Los miembros centrales de la microbiota intestinal en *Apis mellifera* son del género *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Lactobacillus* (Firm-4 y Firm-5), *Bifidobacterium*, *Frischella*, *Commensalibacter*, *Bombella*, *Apibacter* y *Bartonella* (Zheng et al., 2018). Cada especie tiene una amplia variedad de cepas. Durante los cambios estacionales la microbiota intestinal de las abejas se somete a fluctuaciones debido a la disponibilidad de alimentos (Zheng et al., 2018).

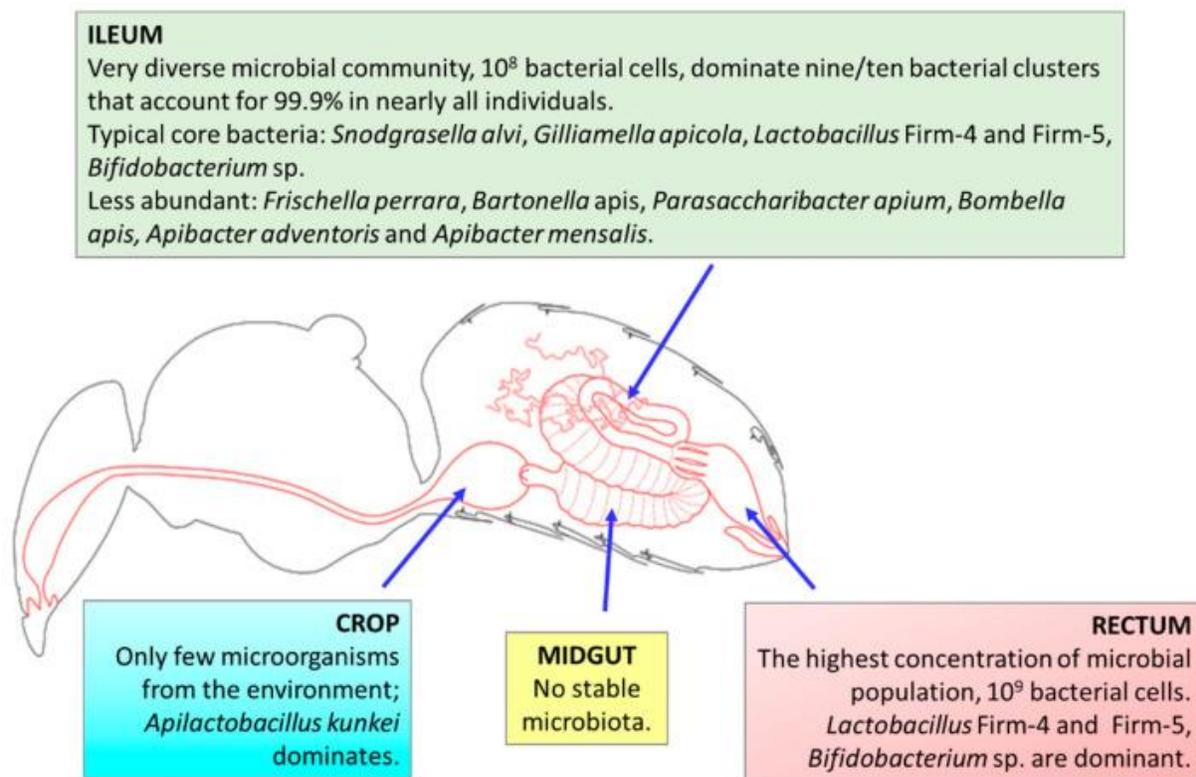


Figura 1. La microbiota gastrointestinal de una abeja obrera adulta (*Apis mellifera*). Tomada de (Zheng et al., 2018)

1.1.3 Ciclo anual de una colonia de abejas melíferas

La estación climática de otoño podría considerarse el comienzo de un nuevo año para una colonia de abejas melíferas. La condición de la colonia en esta época del año afecta en gran medida su prosperidad para el próximo año. En otoño, la cantidad de luz en el día comienza a disminuir, por lo que se ve afectada la floración lo que lleva a una reducción en la cantidad de néctar y polen que ingresan a la colmena, esto provoca una reducción de la cría y la disminución de la población. Las abejas jóvenes sobreviven el invierno, mientras que las viejas mueren gradualmente. La puesta de huevos de la abeja reina disminuye y puede detenerse por completo durante octubre o noviembre, incluso si el polen se almacena en los panales. Durante los inviernos más fríos, la colonia se somete a una dura prueba de resistencia. En condiciones subtropicales, tropicales y de invierno templado, la puesta de huevos y la cría de crías no suelen detenerse. Las colonias que están bien provistas de miel y polen en otoño comenzarán a estimular la alimentación de la reina, y ella comenzará a poner huevos al inicio del invierno, incluso en las áreas del norte de los Estados Unidos. Esta nueva cría ayuda a reemplazar las abejas que han muerto durante el invierno. El alcance de la cría temprana está determinado por las reservas de polen recolectadas durante el otoño anterior. En colonias con escasez de polen, la cría se retrasa hasta que se recolecta el polen fresco de las flores de primavera, y estas colonias suelen salir del invierno con poblaciones reducidas. La población de la colonia durante el invierno suele disminuir porque las abejas viejas siguen muriendo.

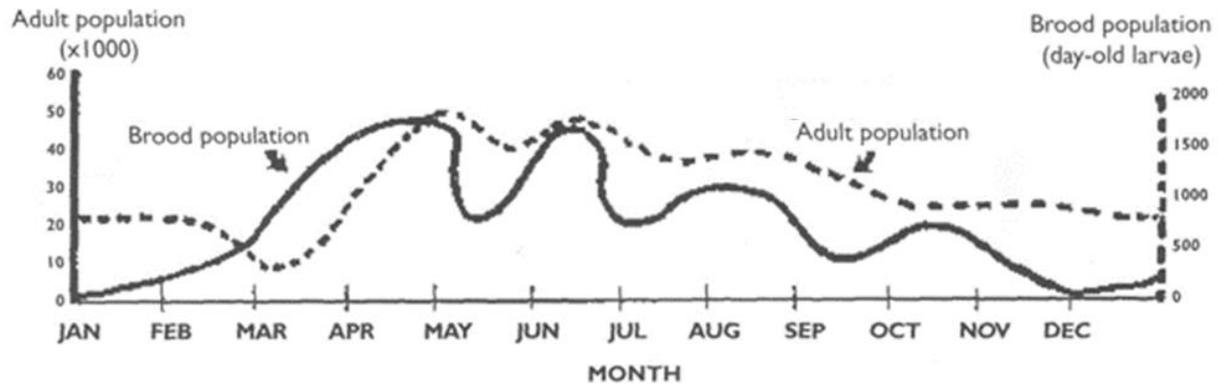


Figura 2. Estacionalidad de las poblaciones de crías y adultos de *Apis mellifera*. Tomada de (*Seasonality of Brood and Adult Populations (Basic Bee Biology for Beekeepers) – Bee Health*, n.d.)

Durante el comienzo de la primavera, los días más largos y las nuevas fuentes de polen y néctar estimulan la crianza de las crías.

Los zánganos están ausentes o escasean en esta época del año. Más avanzada la primavera, la población de la colonia se expande rápidamente y aumenta la proporción de abejas jóvenes. A medida que los días se alargan y la temperatura continúa aumentando, el grupo se expande aún más y se producen zánganos. Con un aumento en la crianza de las crías y el consiguiente aumento de abejas adultas, el área del nido de la colonia se abarrotará (*Seasonal Cycles of Activities in Colonies*, n.d.).

Durante el comienzo del verano, la colonia alcanza su máxima población y se concentra en la recolección de néctar, polen y el almacenamiento de miel para el próximo invierno. Después de la reproducción, toda la actividad de la colonia está orientada a la supervivencia invernal. El verano es la época de almacenamiento de los excedentes de alimentos. El período de luz del día es entonces más largo, lo que permite la máxima

búsqueda de alimento, aunque la lluvia o la sequía pueden reducir el vuelo y el suministro de néctar y polen disponible en las flores (*Seasonal Cycles of Activities in Colonies*, n.d.).

1.2 Colapso de colmenas

Las poblaciones de abejas de todo el mundo están sufriendo pérdidas debido a múltiples factores, la salud de las colonias se ve amenazada por la intoxicación con pesticidas aplicados a cultivos o para el control de ácaros en las colmenas; el aumento de parásitos como *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*/*Nosema apis*; enfermedades provocadas por patógenos virales (Runckel et al., 2011), además, de la mala nutrición provocada por la falta de fuentes de polen y néctar, acompañado del uso de las abejas para polinizar cultivos con poco valor nutricional. Todos estos factores estresantes no actúan de forma aislada y el colapso de las colmenas se considera provocado por la combinación de varios de estos. La nutrición y la infección viral son dos de los factores que se han considerado que presentan una mayor amenaza.

1.2.1 Nutrición inadecuada

El polen es una fuente principal de nutrientes que incluyen proteínas, aminoácidos, lípidos, esteroides, almidón, vitaminas y minerales en las abejas melíferas. A nivel individual proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo fisiológico y se cree que tiene un impacto considerable en la longevidad. Las dietas de polen mixto se consideran más saludables que las dietas de polen único. La proliferación de los monocultivos ha producido que muchas colmenas tengan una dieta pobre que puede tener un efecto negativo en la salud (Di Pasquale et al., 2013).

1.2.2 Pesticidas

Los productos químicos tales como los insecticidas, fungicidas y herbicidas son utilizados en la agricultura moderna para evitar plagas. Las abejas melíferas están expuestas a insecticidas a través de contacto directo por pesticidas en aerosol aéreo o con contacto indirecto al ingerir residuos de los plaguicidas ubicados dentro del tejido de la planta. Los peligros de los plaguicidas químicos se clasifican con toxicidad aguda y crónica. La intoxicación aguda provoca reacciones violentas e inesperadas, mientras que la intoxicación crónica es debido a la exposición crónica de los plaguicidas absorbidos en pequeñas dosis, la reacción es lenta y continua lo que puede llevar a la eliminación completa de la colonia. Los neonicotinoides y el fipronil suprimen el sistema inmunológico de las abejas volviéndose susceptibles a infecciones de *Nosema* y *V. destructor* (Manzoor et al., 2021). La mayoría de los pesticidas actúan como neurotoxinas y alteran la función neurológica normal. Se han realizado estudios acerca de los insecticidas neonicotinoides como imidacloprid, clotianida y tiametoxam que actúan como agentes neurotóxicos, estos han demostrado un mayor efecto sobre las colmenas. Los efectos más graves son parálisis, desorientación y cambios en el comportamiento (Lu et al., 2020).

Pesticida	Efectos
Deltametrina	Disfunciones cardíacas en las células del corazón y viajes de localización perturbados
Imidacloprid	Menor vida útil de la reina, reducción de la capacidad de puesta de huevos y el tamaño de la colonia, interrumpe el desarrollo y afecta la movilidad
Tiametoxam	La colonia se debilita, afecta el comportamiento de búsqueda de alimento, además, afecta las funciones cerebrales e intestinales
Fipronil	Reduce la capacidad de las abejas para detectar fuentes de alimento, aprendizaje olfativo y memoria
Diazon	Reduce la reproducción y supervivencia de la reina, el mantenimiento de la colonia y el comportamiento de búsqueda de alimento.

Tabla 1. Efecto de los pesticidas sobre las abejas. Tomada de (Manzoor et al., 2021).

1.2.3 *Varroa destructor*

Varroa destructor es un ectoparásito que se reproduce en las celdas de las abejas, ataca en diferentes etapas de desarrollo y castas de abejas. Toda la reproducción de *Varroa destructor* ocurre en las celdas de cría. Los ácaros de *V. destructor* usan kairomonas para invadir las células larvales, solo las hembras adultas emergen de la celda de cría junto con su abeja huésped y buscan otro huésped para repetir el ciclo de vida. El ectoparásito causa lesiones físicas en su huésped cuando succiona la hemolinfa del adulto y de las pupas en desarrollo de las abejas melíferas, lo que reduce el vigor del huésped y las respuestas inmunitarias, debilita a las abejas y acorta su vida útil (Traynor et al., 2020).

Las colonias de abejas melíferas infestadas por *V. destructor* desarrollan el síndrome del ácaro parásito de las abejas, una afección con síntomas complicados y muy variables.

Todas las colonias infestadas tienen una presencia inusual de crías enfermas, que a menudo están infectadas con uno o más virus de abejas. Al alimentarse del tejido de la abeja se ha confirmado que el ácaro *V. destructor* funciona como un vector que transmite virus, a través de tres fases principales. La adquisición de virus a través del consumo del tejido de la abeja es la primera fase, la segunda fase es la movilidad de varroa entre huéspedes, y por último la tercera fase implica la transmisión del virus en el momento en el que la varroa se alimenta de su nuevo huésped (Traynor et al., 2020). Está bien establecido que los virus transmitidos por *V. destructor*, entre ellos el virus del ala deformada (DWV) y el virus de la parálisis aguda de la abeja (ABPV), desempeñan un papel importante en el colapso de colonias inducido por este parásito. Estos descubrimientos llevaron a la especulación de que los virus y los ácaros que actuaban simultáneamente tenían un efecto negativo sinérgico en las colonias de abejas melíferas, lo que puede ser la base de la mortalidad de las abejas melíferas y el colapso de las colonias (Tantillo et al., 2015).

1.2. 4 *Nosema apis* y *Nosema ceranae*

La enfermedad de *Nosema* (nosemosis) causada por los microsporidios de las abejas melíferas es una de las enfermedades más importantes de las abejas melíferas y tiene una distribución mundial. El género *Nosema* es un hongo parásito que infecta insectos como abejas, abejorros y gusanos de seda. Invaden las células epiteliales del intestino medio de las abejas obreras, reinas y zánganos. *Nosema* tiene efectos negativos en la colonia de abejas. Puede afectar la productividad y la supervivencia de las colonias de abejas, incluida la longevidad de las abejas adultas y las abejas reinas, la cría, la

bioquímica de las abejas, la recolección de polen y otros comportamientos de las abejas (Tantillo et al., 2015). Aunque no se han determinado las causas específicas de la mayoría de las pérdidas, se ha reportado que la coinfección por virus y *Nosema* en abejas podría estar asociada con el colapso de colonias (Bromenshenk et al., 2010).

1.2.5 *Paenibacillus larvae*

La enfermedad altamente contagiosa de la Loque Americana es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*. *P. larvae* forma esporas con suficiente resistencia para sobrevivir en panales durante muchos años. Cuando las larvas ingieren alimento contaminado con esporas, estas dan lugar a células vegetativas en el intestino larval y rápidamente ocasionan la muerte de la larva (Ebeling et al., 2016).

1.2.6 Virus

Entre los patógenos, los virus son una de las principales amenazas para la salud y el bienestar de las abejas ya que están muy extendidos en todas las comunidades.

Hasta la fecha, se ha informado que 22 virus infectan a las abejas melíferas en todo el mundo. Estos virus son principalmente de ARN de cadena positiva de las familias *Dicistroviridae* e *Iflaviridae* (Tantillo et al., 2015); son capaces de infectar durante las 4 etapas de desarrollo de las abejas.

Aunque los virus de las abejas generalmente persisten como infecciones no aparentes, y no se asocian con síntomas clínicos, estos, pueden afectar dramáticamente la salud de las abejas y acortar la vida de las abejas infectadas bajo ciertas condiciones, causando enfermedades graves o letales de forma individual o incluso provocar el

colapso de colonias enteras (Berényi et al., 2006).

Las enfermedades de la abeja melífera pueden tener múltiples causas, tales como parámetros ambientales y apícolas que provocan estrés y agentes patógenos que suelen actuar simultáneamente. Los virus que se consideran causantes de enfermedades graves en las abejas melíferas son: el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV), el virus de la celdas reales negras (BQCV), virus de la parálisis crónica de las abejas (CBPV), virus del ala deformada (DWV), el virus de la parálisis aguda de las abejas de Israel (IAPV), el virus de las abejas de Cachemira (KBV) y el virus Sacbrood (SBV).

Con la excepción de CBPV, que sigue sin asignarse, los virus de las abejas melíferas más extendidos se han asignado al orden de *Picornavirales* (Baker & Schroeder, 2008).

En general, estos virus son partículas isométricas de 20 a 30 nm de diámetro que contienen un ARN monocatenario de sentido positivo. A excepción del virus filamentoso de las abejas y el virus iridiscente *Apis* (AIV).

1.3 Infecciones virales de *Apis mellifera*

La transmisión de virus puede ocurrir a través de dos vías, la vía de transmisión horizontal y la vía de transmisión vertical.

La vía de transmisión horizontal consiste en la transmisión de virus entre diferentes individuos de la misma generación y la transmisión vertical los virus se transmiten verticalmente de la madre a la descendencia como transmisión transovárica (Tantillo et al., 2015). Se ha demostrado que los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV y SBV se transmiten de forma horizontal, al ingerir polen contaminado con estos patógenos virales (Y. Chen et al., 2006). Los virus ABPV, KBV, IAPV, BQCV y DWV se transmiten de forma

vertical (Beaurepaire et al., 2020).

Los virus seleccionan una vía adecuada para su transmisión según las condiciones fisiológicas de la colonia. Cuando se encuentran en condiciones saludables, los virus persisten en infecciones latentes sin ocasionar una sintomatología evidente a través de la transmisión vertical. Por el contrario, cuando las abejas melíferas se encuentran en una condición de estrés, como la disminución de recursos o la coinfección de otros patógenos, los virus se transmiten por la vía de transmisión horizontal, debido a la alta carga viral el huésped muere y es posible el colapso de toda la colonia (Tantillo et al., 2015).

Debido a que los virus de abeja no tienen modelos de cultivo celular, se clasifican en términos de infecciones aparentes e infecciones encubiertas. La infección aparente es aquella que muestra síntomas evidentes de una enfermedad, como es el caso de DWV, los síntomas característicos de este virus son alas encogidas, disminución del tamaño corporal y decoloración en las abejas adultas (Tantillo et al., 2015). En cambio, las infecciones encubiertas se caracterizan porque son asintomáticas (Aubert et al., 2007).

1.4 Sistema inmune

El riesgo de brotes de enfermedades se reduce en las colonias de abejas melíferas debido a comportamientos de inmunidad social e inmunidad individual. Juntos, estos proporcionan múltiples niveles de prevención de enfermedades y respuestas a los desafíos de patógenos y parásitos.

La inmunidad social es la primera defensa que hay contra los patógenos. Ejemplos de

este tipo de inmunidad son el comportamiento necróforo (las obreras retiran a las abejas adultas que mueren en la colonia), comportamiento higiénico (remueven a las crías que están enfermas o parasitadas) o la fiebre social (grandes agrupaciones alcanzan temperaturas inhóspitas para el desarrollo de parásitos) (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015).

A nivel individual, las abejas melíferas tienen varias líneas de defensa inmunológica innata contra patógenos. Las barreras físicas incluyen la cutícula del insecto y las capas epiteliales que evitan que los patógenos se adhieran o entren al cuerpo, además cuentan con barreras químicas como el cambio de pH y otras condiciones químicas en el intestino del insecto (Evans & Spivak, 2010).

1.5 Metagenómica

Hay limitaciones para el diagnóstico de virus de abeja como: la ausencia de producción de anticuerpos, la imposibilidad de emplear cultivos celulares para su crecimiento, las infecciones mixtas y las limitaciones propias del diagnóstico molecular, que requiere del conocimiento previo de la secuencia del virus. La metagenómica se basa en la secuenciación masiva del genoma, en este caso del vírico, por lo que no se ve afectada por estas limitaciones y por tanto ofrece una alternativa y una oportunidad única para el estudio de los virus implicados en la pérdida de colonias.

2. Antecedentes

Un estudio realizado por Runckel y cols. en 2011, proporciona una caracterización

temporal integral de los patógenos de las abejas melíferas. Se supervisó la incidencia de todos los virus conocidos de las abejas melíferas, cuyos datos revelan una incidencia esporádica de los virus. Los virus más prevalentes y previamente caracterizados en el estudio fueron BQCV, ABPV y SBV.

Las larvas infectadas con BQCV tienen un aspecto amarillo y pálido, además de piel dura como saco, de forma similar a los síntomas causados por SBV. El virus SBV solo presenta síntomas en las larvas, en las abejas adultas persiste como una infección sin síntomas visibles que reduce su esperanza de vida. Las abejas adultas infectadas con ABPV tienen una muerte rápida, previamente presentan una parálisis, temblores y complicaciones para volar.

El análisis de las estrategias nuevas de secuenciación han revelado la presencia de cuatro virus nuevos (ALPV-Brookings, BSRV, LSV1 y LSV2), lo que ilustra el poder de la secuenciación y del ensamblaje *de novo* para el descubrimiento de virus, que, al igual que los virus prevalentes, estos también muestran una incidencia estacional.

En un estudio llevado a cabo en China analizaron la prevalencia estacional de virus comunes en *Apis mellifera*. Sus resultados demostraron que la estacionalidad afectaba la prevalencia de BQCV y DWV en *A. mellifera* (J. Li et al., 2012). Ambos virus presentan síntomas visibles en las abejas. Al igual que trabajos realizados en Francia mostraron que la tasa de infección de BQCV varía según la época del año (McMenamin & Flenniken, 2018).

3 Justificación

La preservación de las abejas melíferas es de interés mundial debido a su impacto económico y ambiental. Dentro de la gran variedad de agentes patógenos que afectan a las abejas los virus generan un mayor interés debido a su distribución, presencia en las colmenas y su asociación con la pérdida de colonias. Aunque se conocen especies virales asociadas con la disminución en la salud de la colmena, pocos estudios se han enfocado en conocer la dinámica del viroma en distintas etapas del desarrollo de la colmena relacionada con factores externos como las estaciones del año y los cambios fisicoquímicos que esto conlleva.

4. Hipótesis

El viroma y la microbiota de *Apis mellifera* tienen variaciones dependientes de la estación climática y la región geográfica en la que se encuentren.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Analizar la diversidad genómica viral y el microbioma presente en colonias de abejas durante diferentes periodos estacionales empleando herramientas bioinformáticas a partir de datos metagenómicos.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la microbiota y el viroma presentes en metagenomas obtenidos en distintos períodos estacionales.
- Analizar la presencia de virus implicados en el problema del colapso de colonias

mediante herramientas bioinformáticas.

- Obtener genomas virales a partir del ensamble de secuencias mediante estrategias bioinformáticas.

6 Metodología

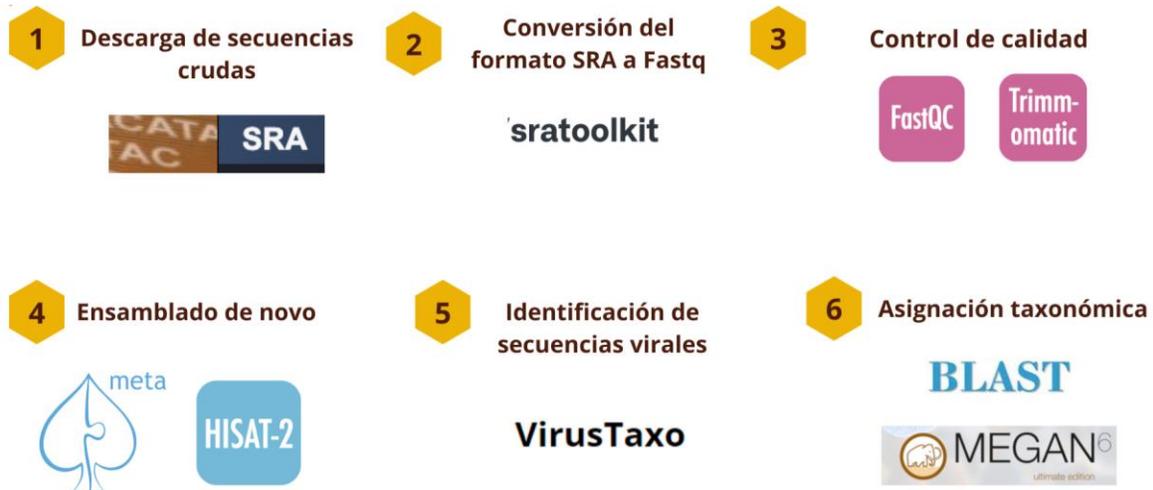


Figura 3. Diagrama general de la metodología empleada.

6.1 Obtención de secuencias

Se obtuvieron diecisiete secuencias crudas de *Apis mellifera* a través de datos de acceso público de la categoría Sequence Read Archive (SRA), con origen en Australia, África, Tonga, Amsterdam, Nueva Zelanda e India. La fecha de recolección de las muestras están detalladas en la Tabla 1. Los archivos correspondientes de SRA se descargaron utilizando la herramienta prefetch de SRA Toolkit v3.0.0, se convirtieron las secuencias crudas de formato .sra a formato .fastq para su posterior análisis de calidad, con la herramienta fastq-dump.

ÉPOCA	LUGAR	ID	Fecha	Latitud y longitud
VERANO	Kisii, Kenya	SRR6033659	2015-08-01	0.7423 S 34.8045 E
VERANO	Naivasha, Kenya	SRR6033661	2015-08-02	0.5713 S 36.3603 E
VERANO	Otago, New Zealand	SRR6033669	2015-08-03	44.8280 S 169.6345 E
VERANO	UAS-GKVK, Bangalore, India	SRR6033675	2015-08-04	13.0712 N 77.5805 E
VERANO	Netherlands: Amsterdam	SRR5109829	2014-07-10	52.371807 N 4.896029 E
VERANO	Australia: Western Australia	SRR5117449	2014-03-01	-25.042261 N 117.793221 E
PRIMAVERA	Australia: Tasmania	SRR5117448	2014-11-01	-41.640079 N 146.315918 E
PRIMAVERA	Australia: Western Australia	SRR5117444	2013-10-01	-25.042261 N 117.793221 E
PRIMAVERA	Australia: Queensland	SRR5117442	2014-10-01	-20.917574 N 142.702789 E
PRIMAVERA	Tonga: Tongatapu	SRR5109828	2015-10-31	-21.146597 N - 175.251548 E
PRIMAVERA	Tonga: Vava'u	SRR5109822	2015-10-31	-18.581196 N - 173.985008 E
OTOÑO	Australia: Northern Territory	SRR5117446	2014-06-01	-19.491411 N 132.550964 E
OTOÑO	Australia: Victoria and New South Wales	SRR5117443	2014-04-01	-37.020100 N 144.964600 E
INVIERNO	Australia: South Australia	SRR5117450	2014-08-01	-30.000233 N 136.209152 E
INVIERNO	Australia: Victoria and New South Wales	SRR5117447	2014-08-01	-37.020100 N 144.964600 E
INVIERNO	Australia: Victoria and New South Wales	SRR5117445	2013-08-01	-37.020100 N 144.964600 E
INVIERNO	South Africa: Robben Island	SRR5109833	2013-03-03	-33.8067 N 18.3662 E

Tabla 2. Tabla con las coordenadas geográficas.

Ubicación de las muestras recolectadas



Figura 4. Mapa con la ubicación de las colonias muestreadas y la temporada en la que fueron recolectadas. Los puntos rojos muestran la ubicación exacta de las colonias muestreadas según sus coordenadas geográficas. Los puntos de color verde, amarillo, naranja y azul representan la temporada en la que se realizaron los muestreos.

6.2 Control de calidad

El análisis de calidad de las secuencias crudas obtenidas se realizó utilizando la herramienta FastQC v1.11.4, el cual es un programa diseñado para detectar los problemas principales en conjuntos de datos de secuenciación de alta generación, este programa permite visualizar un análisis general de las cualidades que posee la lectura mediante representaciones en gráficas y tablas, indica la calidad de las secuencias, aportando información sobre parámetros como el contenido de G/C, la calidad de los K-mers o si hay secuencias que se encuentren muy representadas. Los parámetros que se muestran en el análisis sirven para realizar recortes y eliminar adaptadores presentes en las secuencias. Una vez que se filtran las secuencias en base a su calidad se removieron

los adaptadores con la herramienta Trimmomatic v0.39 con parámetros 'HEADCROP:10 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:75.' Eliminando así el número especificado de bases al inicio de la lectura y eliminando la lectura si está debajo de la longitud especificada.

6.3 Ensamble y alineamiento de secuencias

Una vez que los adaptadores han sido eliminados y las secuencias de baja calidad están filtradas, las lecturas se ensamblan. El ensamblado de genoma consiste en el solapamiento de distintos fragmentos de ADN que permitirán alinear los extremos similares y reconstruir secuencias lineales completas (contigs) (Aguilar-Bultetl Lisandra, n.d.). Las secuencias de origen metagenómico se ensamblaron de *novo* con el programa metaSPAdes, las secuencias de origen transcriptómico se alinearon con el genoma de referencia de *Apis mellifera* (es decir, GCA_003254395.2_Amel_HAv3.1_genomic.fna) con ayuda del programa de alineación HISAT2 v2.2.1. El posterior archivo de salida SAM (Sequences Alignment MAP) se convirtió en un archivo FASTA para los siguientes análisis usando Samtools v0.1.19.

6.4 Identificación de secuencias virales

Los contigs virales se clasificaron a nivel de género utilizando VirusTaxo v0.2.5, esta herramienta clasifica los rangos taxonómicos en 402 géneros de virus de ADN y 280 virus de ARN, tiene una precisión promedio del 93% en predicción de virus a nivel de género en virus de ADN y ARN (Raju et al., 2022), posteriormente el rango de huéspedes naturales de los virus identificados se buscó en la página web ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/>) que proporciona información general sobre todos los

géneros y familias virales, adicionalmente se consultaron los datos de NCBI.

6.5 Abundancia y diversidad viral

Según el género del virus identificado se filtraron y ordenaron los datos obtenidos con el paquete “tidyverse” en R Studio, después de filtrar los datos se creó una tabla de abundancia relativa de todos los virus a nivel de género con los paquetes “ggplot2” y “reshape” en R Studio.

Se estimó la diversidad alfa, que refleja la riqueza observada o la uniformidad de una muestra promedio con los índices de diversidad Shannon (abundancia relativa de taxa) y Simpson (la probabilidad de que observemos aleatoriamente dos virus en una comunidad y que pertenezcan a diferentes especies) a nivel de género. Se calculó la diversidad beta con análisis de coordenadas principales entre muestras con correlación entre época y lugar de recolección. Estos análisis se llevaron a cabo con el paquete “vegan” y los gráficos se realizaron con los paquetes “ggplot2” y “phyloseq” dentro de R Studio.

6.6 Asignación taxonómica

Usando el programa de alineamiento de secuencias BLASTn, los contigs se compararon con un conjunto de base de datos: HB_Bar_v2016.1 (<https://data.nal.usda.gov/dataset/holobee-database-v20161>), cuya base de datos es no redundante de loci de códigos de barras . La anotación taxonómica de los contigs se realizó importando los resultados de BLASTn a MEGAN v6.24.11. Los parámetros de MEGAN mantuvieron los valores predeterminados del programa, a excepción del

parámetro "Min Percent identity", el cual, se estableció con un valor de 60 en todas las muestras, para evitar que los resultados sean menos inexactos.

7. Resultados

7.1 Identificación de secuencias virales

Se analizaron 17 metagenomas, se hizo la distribución viral (Figura 5) con los 33 géneros más abundantes obtenidos de VirusTaxo, las secuencias se ordenaron según la época del año en la que fueron tomadas. La época de primavera muestra una mayor cantidad de virus de las familias *Iflaviridae* (Iflavirus), *Siphoviridae* (Chivirus) y *Dicistroviridae* (Triatovirus), la época de verano presenta una mayor cantidad de virus de la familias *Iflaviridae* (Iflavirus), *Dicistroviridae* (Triatovirus) y *Phenviviridae* (Phlebovirus), en la época de otoño las familias de virus mayormente predominantes son *Dicistroviridae* (Aparavirus) y *Virgaviridae* (Tobamovirus), al igual que en las otras épocas, en invierno se sigue con la tendencia de una mayor cantidad de virus en las familias *Dicistroviridae* (Aparavirus y Triatovirus), *Siphoviridae* (Chivirus) e *Iflaviridae* (Iflavirus).

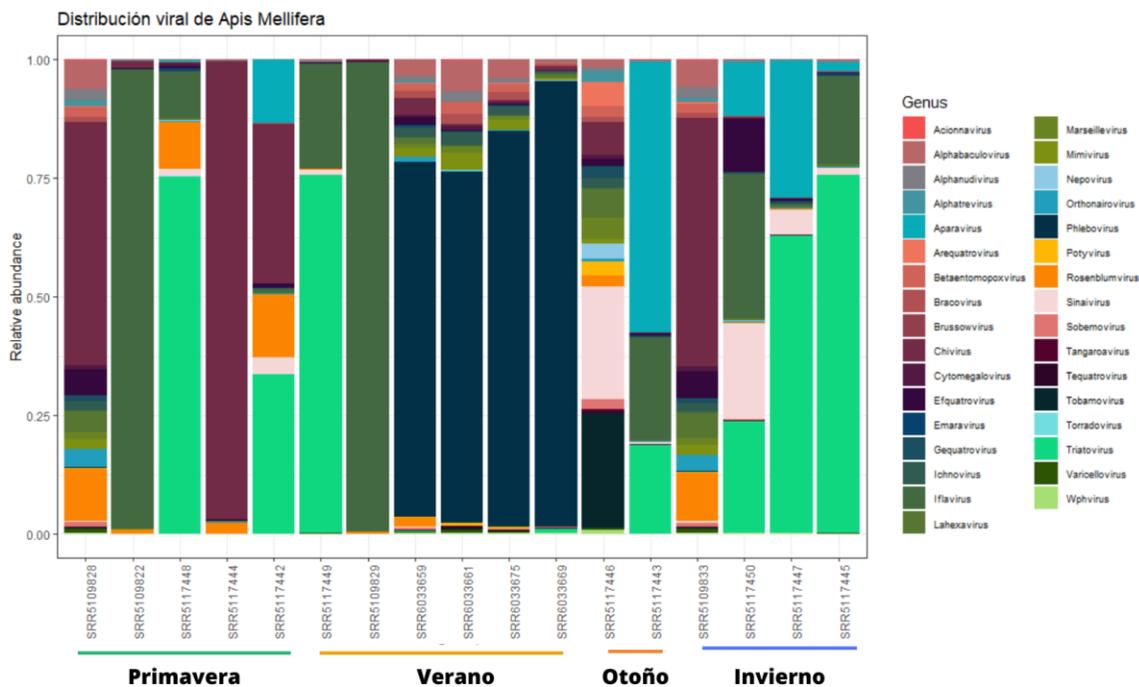


Figura 5. Distribución viral de *Apis mellifera*. Composición de las lecturas de secuenciación de las 17 muestras analizadas. Los porcentajes de lecturas de diferentes afiliaciones taxonómicas se indican según el código de colores en la parte vertical de la figura. En horizontal se dividen en secciones según la época de recolección de la muestra.

Se identificaron los huéspedes naturales de los 6 virus más prevalentes en las 4 estaciones climáticas del análisis de distribución viral (Tabla 3), como es de esperarse los virus de las familias *Iflaviridae* y *Dicistroviridae* tienen de huésped natural a insectos, en este caso específicamente a *Apis mellifera*, la familia *Phenuiviridae* normalmente es transmitida por el mosquito, la familia Siphoviridae infecta bacterias presentes en la microbiota de *A. mellifera*, por último, el género Tobamovirus tiene especies que se transmiten eficientemente entre plantas por contacto mecánico.

Genus	Group	Tipo	Order	Family	NATURAL HOSTS
Iflavirus	(+)ssRNA	RNA	Picornavirales	Iflaviridae	Insects
Chivirus	dsDNA	DNA	Caudovirales	Siphoviridae	Bacteria
Triatovirus	(+)ssRNA	RNA	Picornavirales	Dicistroviridae	Insects
Phlebovirus	(-)ssRNA	RNA	Bunyavirales	Phenuiviridae	RVFV: ruminants, camels and humans, Vector: Mosquitoes
Aparavirus	(+)ssRNA	RNA	Picornavirales	Dicistroviridae	Invertebrates, ABPV: honeybee, bumblebees
Tobamovirus	(+)ssRNA	RNA	Martellivirales	Virgaviridae	Plants

Tabla 3. Relación virus hospedero.

7.2 Diversidad viral

Para conocer la riqueza de las especies encontradas en cada muestra, se realizó un análisis de Alfa diversidad utilizando los índices de diversidad de Shannon y Simpson.

La muestra que presenta mayor diversidad según las gráficas de ambos índices de diversidad con relación a los 7 lugares (Figura 6) y con relación a la época del año (Figura 7) fue tomada en en la temporada de otoño en Australia, mientras que la muestra que presenta menor diversidad fue recolectada en Amsterdam durante el verano.

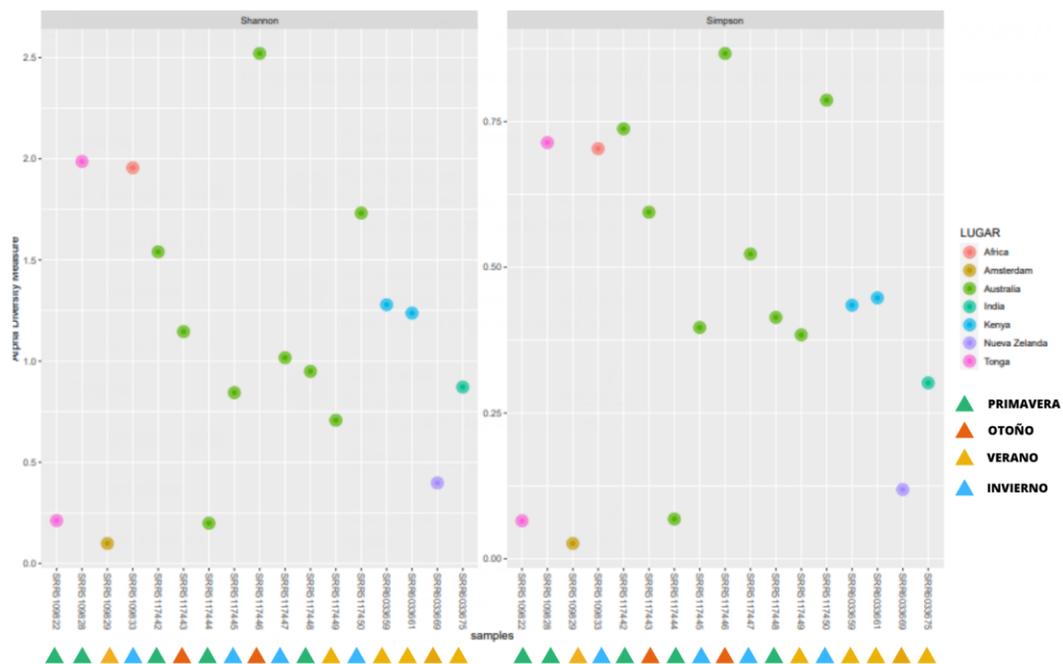


Figura 6. Análisis de Alfa diversidad según el lugar de origen de la secuencia. Diferencias en la diversidad alfa, es decir, el número efectivo de especies, en el viroma de las abejas recolectadas según su lugar de origen.

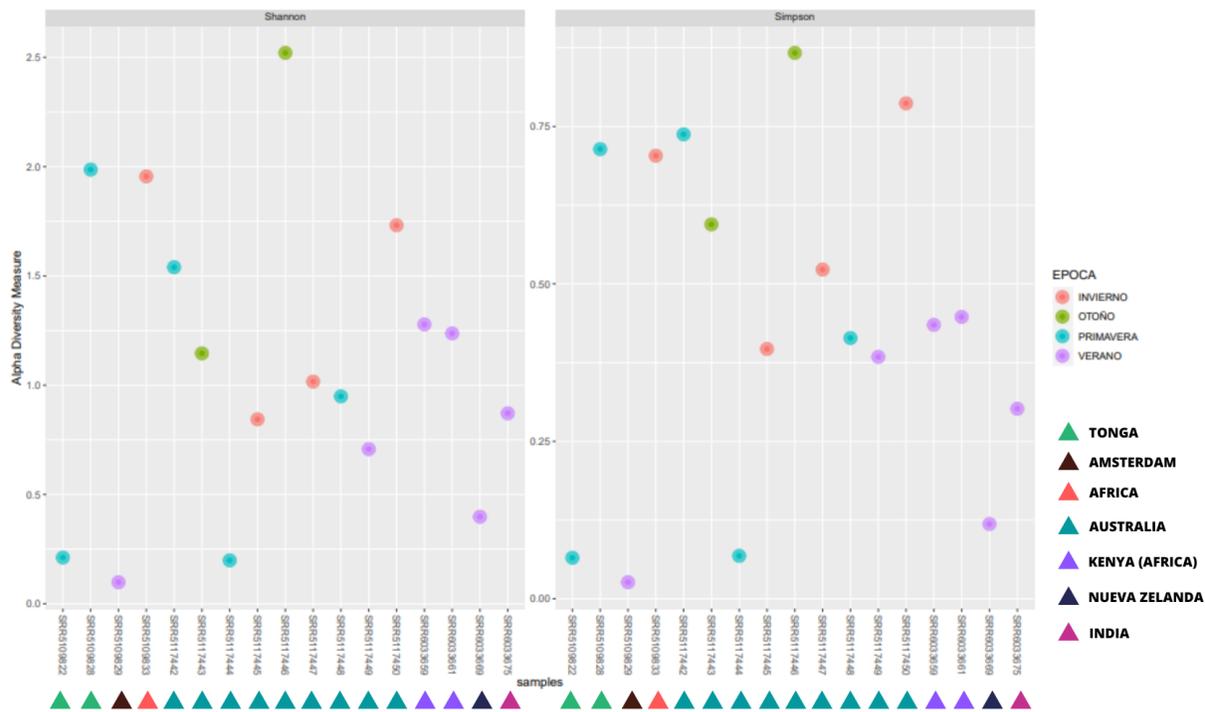


Figura 7. Análisis de Alfa diversidad según su estación climática. Diferencias en la diversidad alfa, es decir, el número efectivo de especies, en el viroma de las abejas recolectadas según la estación climática.

Para visualizar la relación entre los virus encontrados en las secuencias obtenidas con el lugar en el que fueron recolectadas (Figura 8), se hizo un análisis de coordenadas principales o PCoA por sus siglas en inglés. Las muestras sobre todo en Australia se agrupan en relación a su lugar de origen, adicionalmente en un análisis de PCoA en donde se analizan los virus en base a la estación climática en la que se recolectaron las muestras (Figura 9), no se agruparon en función de la época en la que se recolectaron, al contrario, se ve una diversidad aparente en todas las estaciones a excepción de verano, en el cual, 4 de las 6 muestras se encuentran más cercanas en el plano, teniendo un comportamiento similar al análisis de PCoA con relación a la zona geográfica (Figura 8).

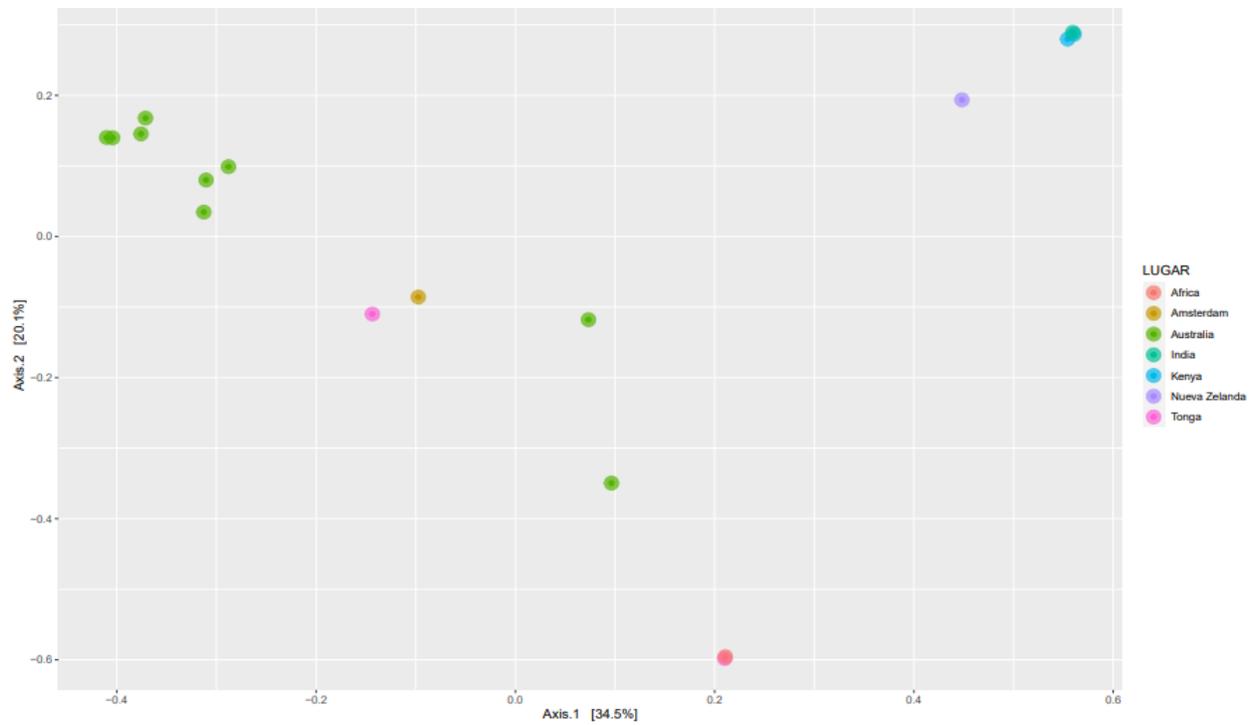


Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCoA) en relación con la ubicación de la muestra. Los colores indican los países de donde se recolectaron las muestras.

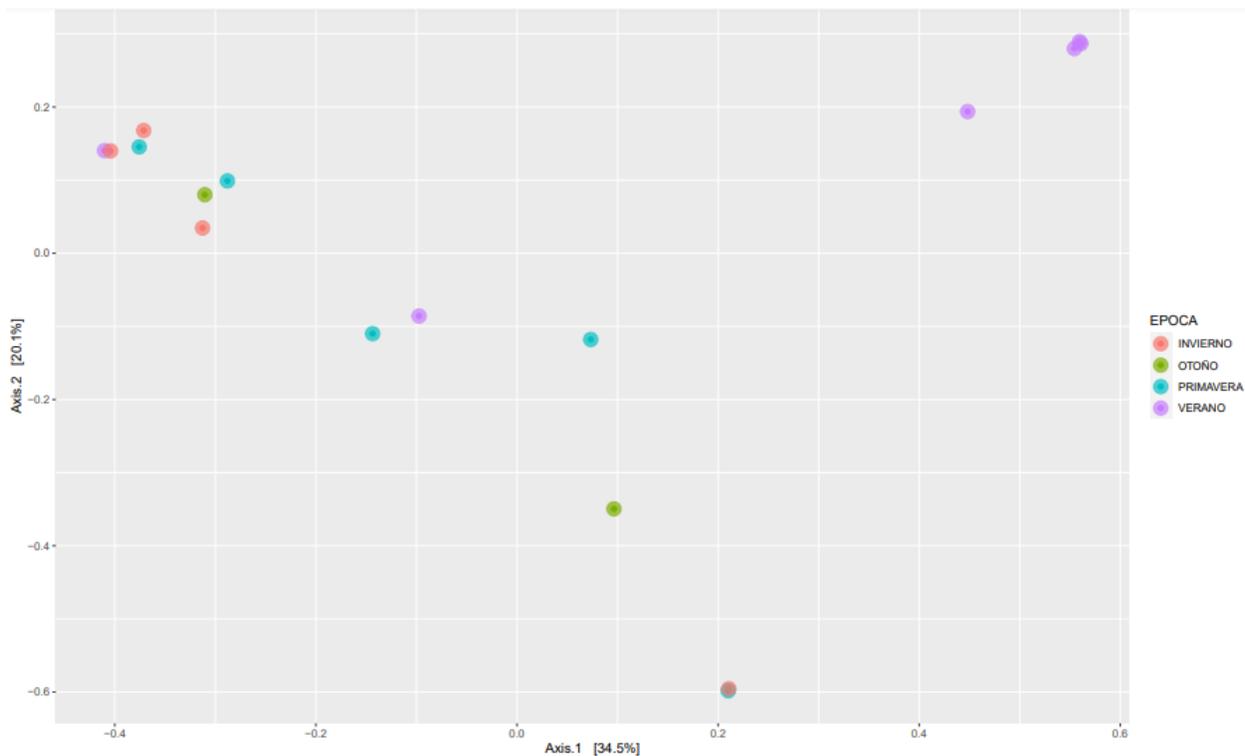


Figura 9. Análisis de coordenadas principales (PCoA) en relación a la estación del año en la que se tomó la muestra. Cada color indica la estación climática correspondiente a la fecha de la recolección de la muestra.

Con el método de un doble análisis de coordenadas (DPCoA) de un conjunto de las variables de época y ubicación (Figura 10), se observa que las muestras se agrupan en su mayoría en función al lugar en el que se recolectaron corroborando los análisis de PCoA anteriores. Las muestras de Tonga fueron discriminadas por el análisis, debido a los pocos datos que presentaban para este análisis.

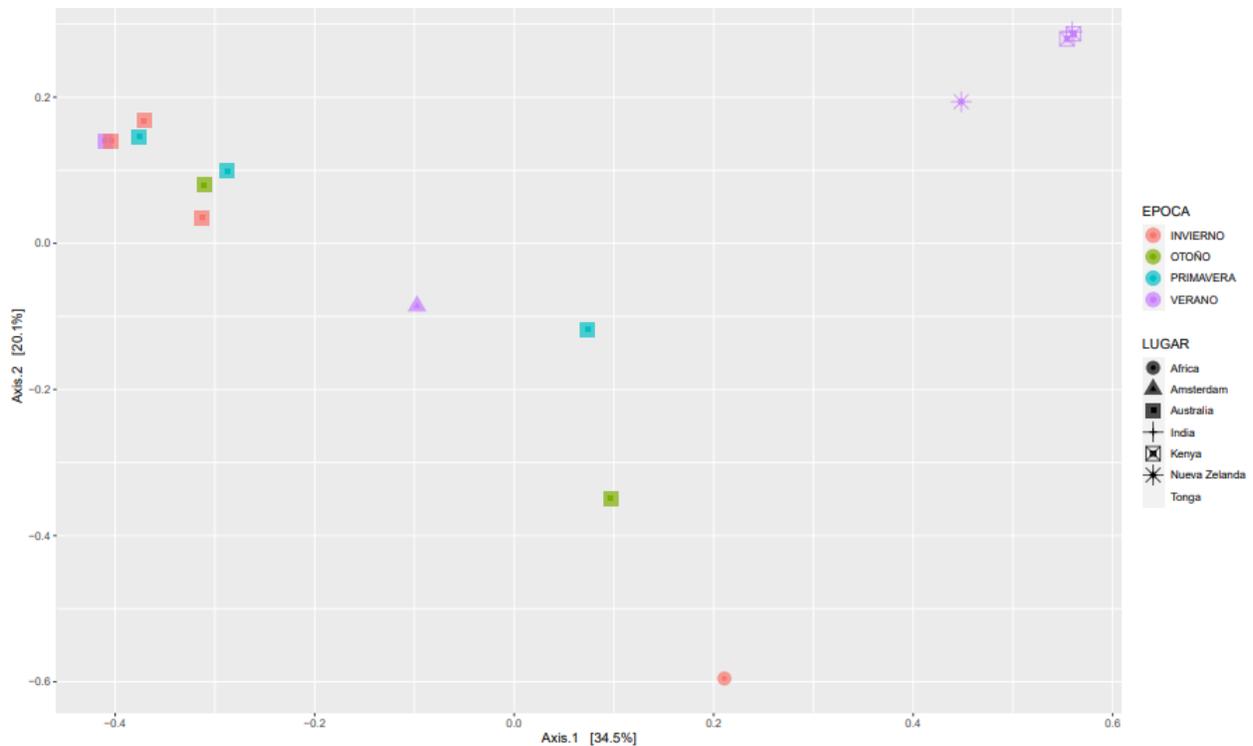


Figura 10. Doble análisis de coordenadas principales (DPCoA). Los colores indican la estación climática de la recolección de las muestras en diferentes lugares según la figura que se muestra en la gráfica.

En la Figura 11, se presenta una red que representa las relaciones de distancias entre muestras, en donde se observa que las muestras más cercanas entre sí son las muestras de Tonga y África tienen el enlace más fuerte, aunque no tienen relación ninguna con las otras muestras utilizadas en este análisis. Las demás muestras se relacionan entre sí pero con menor intensidad.

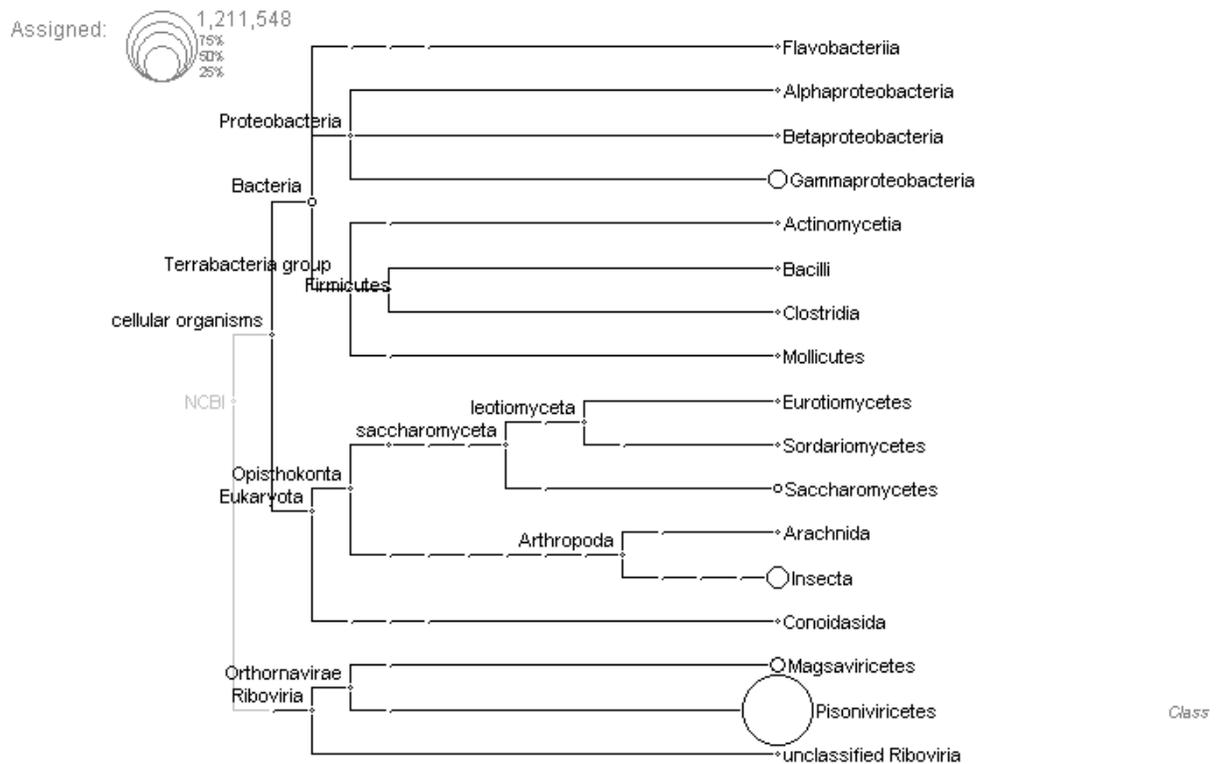


Figura 12. Asignación taxonómica de orden jerárquico. Clasificación a nivel de clase.

Para visualizar la cantidad de microorganismos en cada una de las muestras se realizó un gráfico de burbujas (Figura 13) con ayuda del programa R Studio. Además de encontrar bacterias, se encontraron parásitos y hongos relacionados con *Apis*.

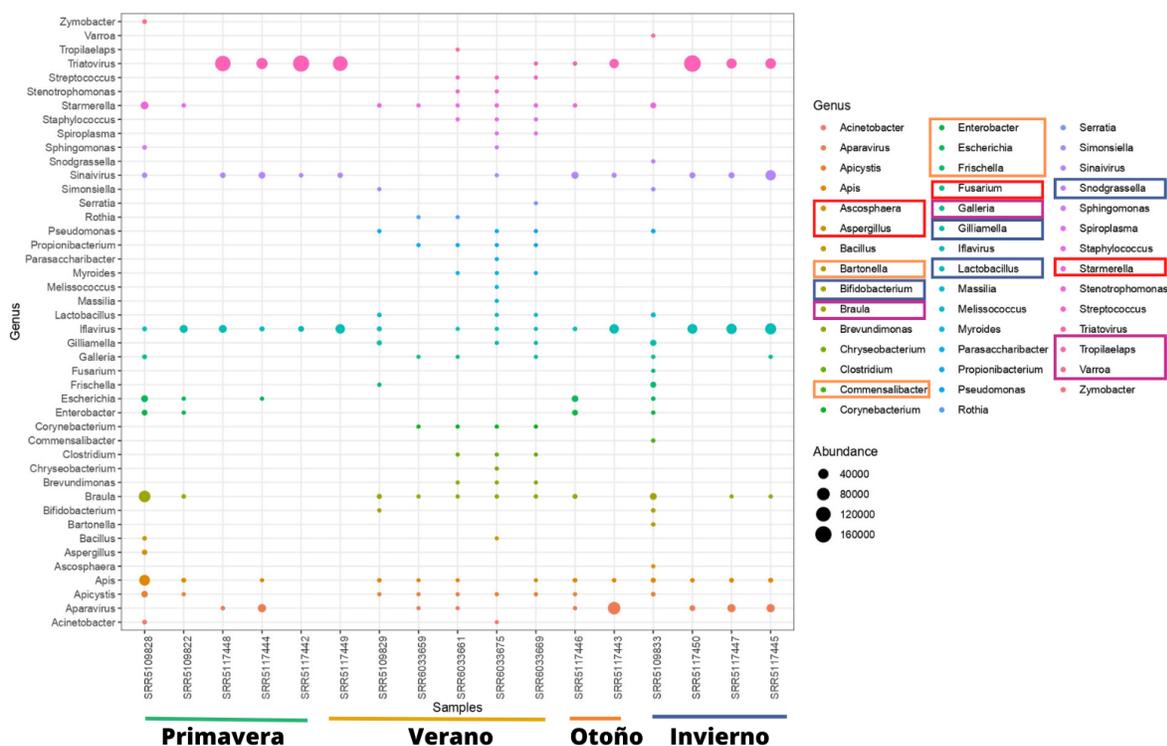


Figura 13. Gráfica de burbujas. Perfil taxonómico de las 17 muestras empleadas en este estudio. Los géneros principales de la microbiota intestinal de *Apis* están resaltados por un recuadro azul, los miembros secundarios en un recuadro naranja, los parásitos están resaltados en el recuadro rosa y los hongos en el recuadro rojo.

Para visualizar las diferencias entre la comunidad bacteriana, únicamente se tomaron en cuenta los géneros bacterianos principales y secundarios, que tenían mayor incidencia en todas las estaciones. Las cargas bacterianas difieren en cada estación climática, los géneros bacterianos principales de *Apis mellifera* encontrados son *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, los cuales solo se presentan en verano e invierno, además de los géneros secundarios *Bartonella*, *Frischella* y *Comensalinabacter* (Figura 14C y Figura 14D). En la temporada de primavera y otoño se observan los

géneros secundarios *Escherichia* y *Enterobacter* (Figura 14A y Figura 14B).

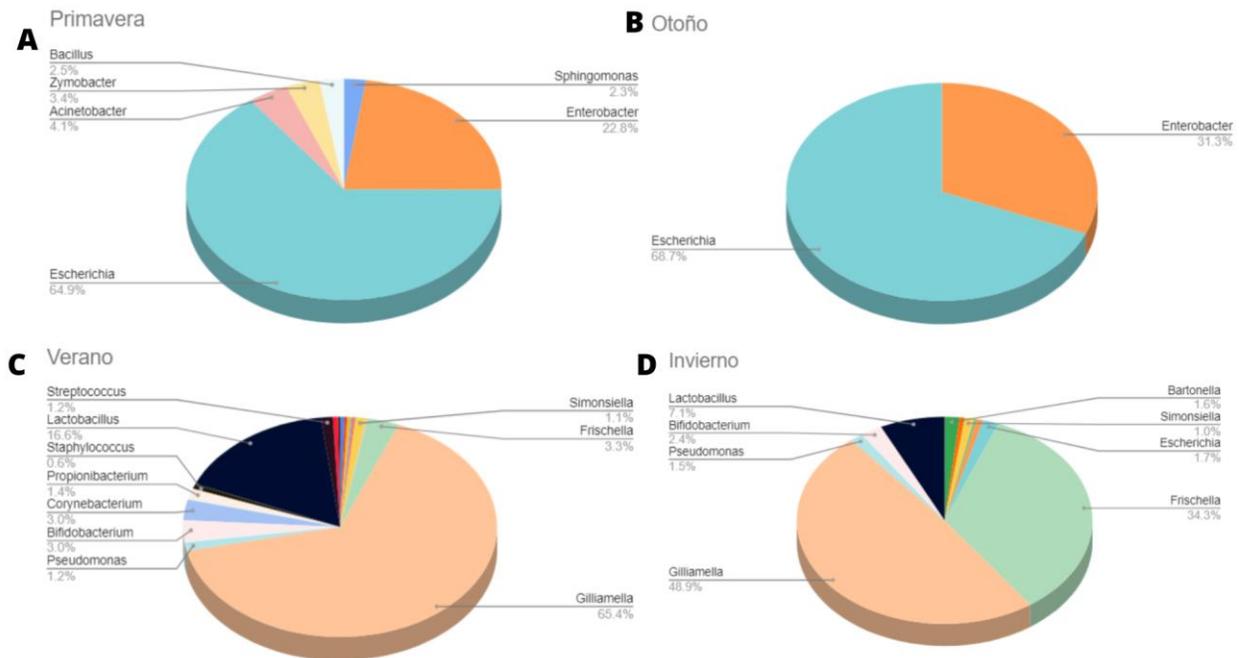


Figura 14. Composición relativa de la comunidad de la microbiota intestinal de *Apis mellifera*. Los gráficos circulares representan la abundancia relativa de los géneros bacterianos principales y secundarios en (A) primavera (B) otoño (C) verano (D) invierno. Se detectaron cambios estacionales en abundancia y prevalencia en los géneros bacterianos presentados.

8 Discusión

La disminución de abejas se ha asociado con varios factores interactivos. La nutrición y la infección viral son dos factores que plantean mayores peligros para la salud de las abejas. En este trabajo se investigó la prevalencia estacional de los virus, así como la microbiota bacteriana.

Lo primero que se evaluó fue la composición y la diversidad del viroma en muestras de

Apis mellifera provenientes de distintos puntos geográficos y tomadas en diferentes estaciones climáticas.

De forma general, se encontró las familias virales más abundantes del viroma en *Apis mellifera* son *Iflaviridae* y *Dicistroviridae*, estas son constantes en todas las muestras dado que estas familias de virus son capaces de infectar en las diferentes etapas de desarrollo de las abejas (Tantillo et al., 2015). Las cargas virales presentes en cada muestra tienen variaciones en cada una de las épocas en las que fueron tomadas, lo cual concuerda con otros estudios de variación estacional de virus entre *Apis mellifera* y *Apis cerana* (G. Chen et al., 2021), en donde se mostraron coinfecciones estacionales con variaciones en la carga viral en virus comunes de *Apis mellifera*.

Las muestras de primavera son de dos zonas geográficas cercanas Australia y Tonga, tres de las cinco muestras tienen una mayor cantidad del virus Chivirus perteneciente a la familia *Siphoviridae*, el cual es un virus cuyo principal hospedador son bacterias, según un estudio de fagos en *Apis mellifera* demostró que miembros de la familia *Siphoviridae* infectan a uno de los principales huéspedes de la microbiota intestinal de las abejas melíferas *Bifidobacterium asteroides* (Bonilla-Rosso et al., 2020).

En verano a pesar de que las muestras provienen de distintos puntos geográficos (África, India, Amsterdam), muestran una presencia mayoritaria de Phlebovirus, esto puede ser debido a que estos virus son pertenecientes a la familia *Phenuiviridae* y son transmitidos por dípteros de la familia *Psychodidae* en Europa, Asia y en el norte de África (Alkan et al., 2013).

A pesar de que las muestras presentan un viroma similar según la zona geográfica en la que se encuentran, su estructura del viroma no es igual incluso si se recolectan en la

misma estación climática.

El ejemplo más notable de esto, es en la estación de otoño en Australia, donde la primera muestra tiene mayor abundancia de virus de la familia *Dicistroviridae* la cual infecta invertebrados y en la segunda muestra se observa mayor abundancia del género *Sinaivirus* que infecta insectos de la familia *Apidae*, en estudios anteriores realizados en Australia se ha identificado la variante 8 del virus del Lago Sinai perteneciente al género de *Sinaivirus* (Roberts et al., 2017), en esta época se obtuvo mayor diversidad de virus y menor diversidad en los componentes de la microbiota, estos resultados concuerdan con estudios donde se ha revelado que la falta de abundancia de bacterias probióticas está implicado en las muertes de abejas por el trastorno de colapso de colonias (Nowak et al., 2021), donde los virus como el virus del Lago Sinaí encontrado en estas muestras juegan un papel importante, adicionalmente se encontró la presencia del virus Tobamovirus del cual se tiene evidencia que *Apis mellifera* es capaz de propagar a la especie *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) mientras se alimenta (Darzi et al., 2018).

En la época de invierno a diferencia de las otras estaciones climáticas se muestra una menor carga viral de las familias *Dicistroviridae* e *Iflaviridae* y una mayor carga por parte de virus del género *Sinaivirus*, los fagos *Efquatrovirus* y *Lahexavirus*. Los objetivos comunes de los fagos Podoviridae (*Lehexavirus*) son *Bifidobacterium*, *Gilliamella*, *Lactobacillus Firm5*, y *Bartonella* (Bonilla-Rosso et al., 2020).

Los análisis de comparación de alfa diversidad con los índices de Shannon y Simpson se realizaron entre la estación climática (primavera, verano, otoño e invierno) y los

lugares de recolección de las muestras. La mayoría de las muestras en ambos análisis mostraron un comportamiento similar, en ambos análisis las secuencias provenientes de Australia tienen mayor diversidad independientemente de la estación climática.

Los análisis de PCoA realizados para conocer el efecto de los factores de locación y clima en el viroma de *A. mellifera*, demostraron que el viroma en *Apis mellifera* varía según la zona geográfica en la que se encuentre, debido a las agrupaciones presentadas sobretodo en las muestras de Australia. Cada una de las zonas geográficas presenta una similitud en los virus que contienen las muestras en esa ubicación. Esto es de esperarse debido a las vías de transmisión vertical y horizontal de los virus en abejas, además existe la hipótesis que afirma que las flores sirven como puentes en la transmisión de virus entre las abejas (Alger et al., 2019).

Además de analizar la composición del viroma se analizó el microbioma presente en las mismas muestras. Los miembros principales de la comunidad de la microbiota intestinal encontrados son *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, (Nowak et al., 2021), además de otros géneros secundarios de bacterias. En el caso de las muestras de primavera prevalecieron bacterias de *Escherichia* un género secundario de la comunidad de bacterias en *Apis mellifera*, en verano *Gilliamella* y *Frischella*, en otoño la muestra que presentó mayor diversidad de virus tiene una cantidad menor de bacterias, a excepción de los géneros de bacterias secundarias *Enterobacter* y *Escherichia*. La reducción de bacterias del género *Lactobacillus*, *Gilliamella* y *Frischella* se ha visto en abejas infectadas con SBV (Yongsawas et al., 2020). En invierno las muestras presentaron una disminución en la carga bacteriana de los principales géneros

en comparación con las muestras de verano, además hubo un aumento en la presencia de *Frischella* y *Bartonella*. Este comportamiento en la microbiota intestinal, ya ha sido estudiado en abejas de invierno contra abejas de verano, en donde también se ha observado similitudes con el aumento de *Bartonella* en invierno (Kešnerová et al., 2019).

Los cambios observados en la composición de bacterias pueden ser debido a las diferencias dietéticas por la disponibilidad de recursos durante el cambio de la estación climática. Se han encontrado cambios estacionales en la composición de la microbiota intestinal en roedores salvajes (Maurice et al., 2015) y humanos (Davenport et al., 2014), lo que coincide con el argumento de que la dieta es uno de los principales impulsores de las diferencias comunitarias bacterianas.

Las abejas de invierno tienen una vida útil prolongada de 6 meses en comparación con las abejas de verano que solo tienen 4 semanas. En la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, el estado fisicoquímico del intestino cambia con la edad, lo que resulta en cambios en la composición de las comunidades microbianas, caracterizadas principalmente por la invasión de ciertos taxones bacterianos intestinales (H. Li et al., 2016). Por lo tanto, los cambios que sufren los principales géneros encontrados entre invierno y verano, como el aumento de *Frischella* en invierno, la disminución de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y la desaparición total de otros géneros de bacterias, puede estar relacionado con la edad. Sin embargo, a pesar de su vejez, las abejas de invierno no muestran signos de senescencia (Münch & Amdam, 2010) y es probable que estas diferencias no se deban a la descomposición funcional del tejido intestinal, como se informó en las moscas (H. Li et al., 2016).

Las abejas de invierno se alimentan del polen que se ha almacenado en la colmena durante varias semanas o meses. Anteriormente se ha demostrado que el consumo de una dieta de polen envejecido afecta la composición de la microbiota intestinal de las abejas obreras jóvenes (Maes et al., 2016).

Junto con las diferencias en la temperatura corporal de las abejas (en invierno es de ~21 °C y en verano de ~35 °C (Fahrenholz et al., 1989), esto puede influir en las tasas de crecimiento bacteriano. De hecho, en un estudio metagenómico, se demostró que las bacterias intestinales tienen una población de replicación promedio más baja en las abejas invernales viejas en comparación con las abejas nodrizas jóvenes (obreras en verano), lo que es indicativo de tasas de replicación reducidas (Ellegaard & Engel, 2019). Finalmente, las abejas invernales muestran una expresión reducida de genes inmunes (Gätschenberger et al., 2013) y tienen un metabolismo proteico alterado (Crailsheim, 1986) en comparación con las nodrizas y las recolectoras, otro factor que puede influir en las cargas bacterianas totales y la composición de la comunidad en el intestino.

Además, durante la temporada de alimentación, es más probable que las abejas obreras adultas recogen bacterias ambientales, por ejemplo, de las flores, lo que facilita su diseminación dentro del entorno de la colmena en verano, pero no en invierno.

Por otro lado también se encontraron parásitos como el díptero *Bruela* considerado una amenaza insignificante para sus huéspedes (Büscher et al., 2022), la larva *Galleria mellonella larvae*, la cual es una plaga que provoca un daño grave en regiones tropicales y subtropicales, además, se cree que contribuyen a la disminución de las poblaciones de abejas silvestres (Kwadha et al., 2017) y *Varroa destructor*, un parasito externo de las

abejas que puede atacar diferentes etapas de su desarrollo y sus castas (Tantillo et al., 2015).

En resumen, en este trabajo se obtuvo el viroma de *Apis mellifera* en diferentes estaciones climáticas y ubicadas en distintas partes del mundo. Además de obtener una aproximación de la composición de la microbiota de estas abejas y la variación estacional de ambos factores así como de otros patógenos encontrados.

9 Conclusiones

En este trabajo se describió el viroma en *Apis mellifera*, dónde al igual que en otros estudios predominan los virus de las familias *Dicistroviridae* en la que se incluyen especies que son consideradas letales para los insectos e *Iflaviridae*, también considerada una de las familias patógenas de abejas más importantes, los análisis de diversidad revelaron un comportamiento donde el viroma es dependiente de la zona geográfica y sufre cambios característicos en su composición viral según la estación climática e incluso presenta cambios en su carga viral si su región geográfica no es exactamente igual, a su vez se describió la composición de su microbiota intestinal, está al igual que el viroma tiene variaciones estacionales que pueden influir en la composición del mismo, esta muestra algunos grupos de bacterias patógenas que al igual que algunos virus podrían considerarse como de riesgo potencial para las colmenas.

10 Referencias

- Aguilar-Bultetl Lisandra, F. L. (n.d.). *Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos*. Retrieved June 14, 2022, from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2015000200008
- Alger, S. A., Burnham, P. A., & Brody, A. K. (2019). Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLOS ONE*, *14*(9), e0221800. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0221800>
- Alkan, C., Bichaud, L., De Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., & Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Research*, *100*(1), 54–74. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.07.005>
- Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R., Milani, N., & Bernardinelli, I. (2007). Natural History and Geographical Distribution of Honey Bee Viruses. In *Virology and the Honey Bee*. <http://ec.europa.eu/research/research-eu>
- Baker, A. C., & Schroeder, D. C. (2008). The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of Picorna-like viruses (order Picornavirales) infecting *Apis mellifera* L. populations. *Virology Journal*, *5*, 10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-10>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smaghe, G., Yañez, O., De Miranda, J. R., & Dalmon, A. (2020). Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, *11*(4).

<https://doi.org/10.3390/INSECTS11040239>

Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., & Nowotny, N. (2006).

Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2414. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2414-2420.2006>

Bonilla-Rosso, G., Steiner, T., Wichmann, F., Bexkens, E., & Engel, P. (2020). Honey bees harbor a diverse gut virome engaging in nested strain-level interactions with the microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(13), 7355–7362.

https://doi.org/10.1073/PNAS.2000228117/SUPPL_FILE/PNAS.2000228117.SD06.XLSX

Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A., Welch, P. M., Williams, T., Firth, D. R., Skowronski, E., Lehmann, M. M., Bilimoria, S. L., Gress, J., Wanner, K. W., & Cramer, R. A. (2010). Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE*, 5(10).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0013181>

Büscher, T. H., Petersen, D. S., Bijma, N. N., Bäumler, F., Pirk, C. W. W., Büsse, S., Heepe, L., & Gorb, S. N. (2022). The exceptional attachment ability of the ectoparasitic bee louse *Braula coeca* (Diptera, Braulidae) on the honeybee.

Physiological Entomology, 47(2), 83–95. <https://doi.org/10.1111/PHEN.12378>

Chen, G., Wu, Y., Deng, J., Wen, Z., Wang, S., Chen, Y., Hu, F., & Zheng, H. (2021).

Seasonal variation of viral infections between the eastern honey bee (*Apis cerana*)

and the western honey bee (*Apis mellifera*). *MicrobiologyOpen*, 10(1), e1162.

<https://doi.org/10.1002/MBO3.1162>

Chen, Y., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3), 152–159. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2006.03.010>

Crailsheim, K. (1986). Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm). *Journal of Insect Physiology*, 32(7), 629–634. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(86\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90092-2)

Darzi, E., Smith, E., Shargil, D., Lachman, O., Ganot, L., & Dombrovsky, A. (2018). The honeybee *Apis mellifera* contributes to Cucumber green mottle mosaic virus spread via pollination. *Plant Pathology*, 67(1), 244–251. <https://doi.org/10.1111/PPA.12702>

Davenport, E. R., Mizrahi-Man, O., Michelini, K., Barreiro, L. B., Ober, C., & Gilad, Y. (2014). Seasonal Variation in Human Gut Microbiome Composition. *PLOS ONE*, 9(3), e90731. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090731>

Deboutte, W., Beller, L., Yinda, C. K., Maes, P., de Graaf, D. C., & Matthijssens, J. (2020). Honey-bee-associated prokaryotic viral communities reveal wide viral diversity and a profound metabolic coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(19), 10511–10519. https://doi.org/10.1073/PNAS.1921859117/SUPPL_FILE/PNAS.1921859117.SAPP.PDF

DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170–176. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2015.05.007>

- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J. L., & Alaux, C. (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS ONE*, 8(8), e72016. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072016>
- Ebeling, J., Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2016). Biology of *Paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016 100:17, 100(17), 7387–7395. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7716-0>
- Ellegaard, K. M., & Engel, P. (2019). Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08303-0>
- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S62–S72. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.06.019>
- Fahrenholz, L., Lamprecht, I., & Schricker, B. (1989). Thermal investigations of a honey bee colony: thermoregulation of the hive during summer and winter and heat production of members of different bee castes. *Journal of Comparative Physiology B*, 159(5), 551–560. <https://doi.org/10.1007/BF00694379/METRICS>
- Gätschenberger, H., Azzami, K., Tautz, J., & Beier, H. (2013). Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *PLOS ONE*, 8(6), e66415. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0066415>
- Ilyasov, R. A., Lee, M. Iyeol, Takahashi, J. ichi, Kwon, H. W., & Nikolenko, A. G. (2020).

- A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3615–3621.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.08.001>
- Kešnerová, L., Emery, O., Troilo, M., Liberti, J., Erkosar, B., & Engel, P. (2019). Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal* 2019 14:3, 14(3), 801–814. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0568-8>
- Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., Fombong, A. T., Stout, M. J., Davis, J., Diaz, R., & Beuzelin, J. M. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 2017, Vol. 8, Page 61, 8(2), 61.
<https://doi.org/10.3390/INSECTS8020061>
- Li, H., Qi, Y., & Jasper, H. (2016). Preventing Age-Related Decline of Gut Compartmentalization Limits Microbiota Dysbiosis and Extends Lifespan. *Cell Host and Microbe*, 19(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.008>
- Li, J., Qin, H., Wu, J., Sadd, B. M., Wang, X., Evans, J. D., Peng, W., & Chen, Y. (2012). The Prevalence of Parasites and Pathogens in Asian Honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS ONE*, 7(11), 201203080–201203084.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047955>
- Lu, C., Hung, Y. T., & Cheng, Q. (2020). A Review of Sub-lethal Neonicotinoid Insecticides Exposure and Effects on Pollinators. *Current Pollution Reports* 2020 6:2, 6(2), 137–151. <https://doi.org/10.1007/S40726-020-00142-8>
- Maes, P. W., Rodrigues, P. A. P., Oliver, R., Mott, B. M., & Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*,

25(21), 5439–5450. <https://doi.org/10.1111/MEC.13862>

Manzoor, F., Pervez, M., Manzoor, F., & Pervez, M. (2021). Pesticide Impact on Honeybees Declines and Emerging Food Security Crisis. *Global Decline of Insects*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.98871>

Maurice, C. F., Cl Knowles, S., Ladau, J., Pollard, K. S., Fenton, A., Pedersen, A. B., & Turnbaugh, P. J. (2015). Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota. *The ISME Journal* 2015 9:11, 9(11), 2423–2434. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.53>

McMenamin, A. J., & Flenniken, M. L. (2018). Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 120–129. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.02.009>

Münch, D., & Amdam, G. V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters*, 584(12), 2496–2503. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.04.007>

Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I., & Kręgiel, D. (2021). Characterization of *Apis mellifera* Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection—A Review. *Cells*, 10(3), 1–29. <https://doi.org/10.3390/CELLS10030701>

Page, R. E., & Peng, C. Y. S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4–6), 695–711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)

Raju, R. S., Al Nahid, A., Chondrow Dev, P., & Islam, R. (2022). VirusTaxo: Taxonomic classification of viruses from the genome sequence using k-mer enrichment.

Genomics, 114(4). <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2022.110414>

Roberts, J. M. K., Anderson, D. L., & Durr, P. A. (2017). Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Scientific Reports*, 7(1).

<https://doi.org/10.1038/S41598-017-07290-W>

Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., & DeRisi, J. L. (2011). Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0020656>

Seasonal Cycles of Activities in Colonies. (n.d.). Mid-Atlantic Apiculture Research and Extension Consortium. Retrieved May 19, 2022, from

<https://canr.udel.edu/maarec/honey-bee-biology/seasonal-cycles-of-activities-in-colonies/>

Seasonality of Brood and Adult Populations (Basic Bee Biology for Beekeepers) – Bee

Health. (n.d.). Retrieved January 20, 2023, from [https://bee-](https://bee-health.extension.org/seasonality-of-brood-and-adult-populations-basic-bee-biology-for-beekeepers/)

[health.extension.org/seasonality-of-brood-and-adult-populations-basic-bee-biology-for-beekeepers/](https://bee-health.extension.org/seasonality-of-brood-and-adult-populations-basic-bee-biology-for-beekeepers/)

Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., & Terio, V. (2015). Virus Infections of Honeybees *Apis Mellifera*. *Italian Journal of Food Safety*, 4(3), 157–168. <https://doi.org/10.4081/IJFS.2015.5364>

Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7), 592–606.

<https://doi.org/10.1016/J.PT.2020.04.004/ATTACHMENT/BEA6A56F-8FEA-4DF3-A1EA-82D6C3547065/MMC1.DOCX>

Yongsawas, R., Chaimanee, V., Pettis, J. S., Boncristiani Junior, H. F., Lopez, D., In-On, A., Chantawannakul, P., & Disayathanoowat, T. (2020). Impact of Sacbrood Virus on Larval Microbiome of *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Insects 2020*, Vol. 11, Page 439, 11(7), 439. <https://doi.org/10.3390/INSECTS11070439>

Zheng, H., Steele, M. I., Leonard, S. P., Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47(11), 317. <https://doi.org/10.1038/S41684-018-0173-X>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaría Ejecutiva del
Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C.
GOMEZ JAIMES FRIDA con número de matrícula **10018626** cuyo título es:

**Análisis comparativo de la comunidad de virus y su interacción con la microbiota
intestinal de Apis mellifera en distintos períodos estacionales**

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

Cuernavaca, Mor a 19 de septiembre del 2023

Atentamente
Por una universidad culta
Una universidad de excelencia

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

DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA
DR. AGUSTÍN PÉREZ REYES
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS
DR. HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ
DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO

(PRESIDENTE).
(SECRETARIO).
(VOCAL).
(SUPLENTE).
(SUPLENTE).

MIE/VRRC/EAE

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-09-19 19:54:01 | Firmante

PoxIAMhEz5xvC+MKZUB9SB94HjWvNZFH8cHv4dYholdmly28LvHnjwRDAqQsJCx3DtJXbOPXV3Q65tDZD+PT+JjUEeXPG47E8LidNG30VJdzaw17Dt0Y0UuuemMzelBZNjk/m0yjcGkb29504RkEGrg5kNO24kRDjk8+F0pauD3buMyEEE/D2lhJ167Rwt8j+3o2sSZwrJ33shgkaGLzBE/rEg4jdlXz/zpuWZJspkKbXu8OhP62K48A9qlo8WVuEBP0go3JoWYQQ uVAcN0rFthFUIPUY7Tbw2+oZNTVnWPP3OgC4mkGQKaGdBwbUID3AbGsR6OWmwi+mpVA3A==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2023-09-25 10:50:54 | Firmante

k3rWBHu9SP9WxdC7zpVBo4iLE7ieqBRrHt+lk0k3BanSAuaMoQAKJYbuSSAur3ySj2VzrAjlWj8Vq1+tNVF6hF028PKjB4uL/4ZArVnD+Qq7hxMhBb4/rR3GVrjNMXn2ISFYA05wR6D23TQ3p9eiFC9Sh9EAc83AKu2el8xU5iqfqiZ0ZVUzkJD9nv5BUBP12yIWboJoRWI8LRtTnst9hXNXTNRDdTsvwsNmIH+50tNlc45pezKKPYy4HLQ15TDAV13d7TAG+hjtfWeJVLhGwuKohJsw3m84X6h0vbxQf3TLLbAcnH/2baP11gnJpwxXB7j4JaliOVplyLjr7E75otg==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-09-27 18:56:36 | Firmante

JbMW+N1POG26+F/QvOhaYjcn+vawnwg8+lzWsh8hyIPUin/azovHQ6PfeWZPW/7dubZ11F4Kmv9oTrOiw2QPN8g9xfZP1APcxO2xoV3UfyrmRjzZSRkzQd9G/thCYjBtitSWFdG5ONRAtiwptR38+hKzk+KvgO5e6MwWogh0nJ5nJaOQrjzXIUbeHY6iwm0bWo8/xi46os6TYi50QqjNkO7/9WHmhaw2JjWU9ss0cr2pu/y7yRKQsJTuldYfiNMSeyhyhYSf2Nc+Quy1qmiUwluo4TdNy6H3/GvMDVIYBwRtrJO34O9LXfyQinVu8ePJccuofmCFx6ffgwVosQ==

HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ | Fecha:2023-09-30 09:00:54 | Firmante

UwJT4t4jkGJty6joa6KHuhtNbjDe+7IXiiQr/71dp5xnq1m99BKVstU8lmgNCFglqUliitYU67iOcY41TfrYrESvWdcyszsBpPZxbh4H+4qOjPbJifMRSxv+FA3BVwilYcPIOZ7fmUgGeOssOG5yP+wqo38KzUZnZyCuWf6zR8ulkjhDwWpXJsdOPvsRj+RI6U0czPI3dNtkWuudualmObhGJBBCeccOwglY7+v+1Q5hQlveDHSKghuBcBWgcl9LQTQZ+m2Pv77HxPVpx51BNeEimxfQN6F16fn31NaTv9zV3rs/T6K5w/9k+dFUGFCdQDwAwphiTmCVCu++pfP7oQ==

AGUSTIN REYES PEREZ | Fecha:2023-10-03 12:03:17 | Firmante

hhJdoo8pwtOly/UwDZe+0o8GouzLNf5snl/LnQgFLD8TnrWnDvtZCHfNlWMyOF5NS9YwfojLtyaitIU+6oAXuWI8OG7+TaGNvntIWgw6E0wbl/0oFXn9RjhtjTF2ZrdSiu9C458K1CR8HpZJhNarYhxFDQb8onguJ/xD4yZmesJ6DH3jh2tvUvYk21yA2yBKSu97HCSKzHxPRHF4s1NZo5cMjZ3wPlsfclUMKnpVVK6glYqLJ8Vo7wfZ1GJ6+0n9SLqvGcHX6Pe+COM7U06xfZmgjwgK/D2hAiYJD9YRjyuUnmTWQZBnmOryLJfPblgMnEmBm1puCvbeOCW8s7A==

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



8F6KYcEOr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZBh4UavpLErCqMFHvgrVCKzfsPnlmRyq>

