UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Determinantes moleculares do polietismo sequencial em *Apis mellifera*

Carlos Henrique Lobo

Ribeirão Preto - SP
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Genética

Determinantes moleculares do polietismo sequencial em *Apis mellifera*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de DOUTOR em CIÊNCIAS – Área de concentração: GENÉTICA

Aluno: Carlos Henrique Lobo

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto - SP
2009

Lobo, Carlos Henrique

Determinantes moleculares do polietismo sequencial de *Apis mellifera* / Carlos Henrique Lobo; orientadora Zilá Luz Paulino Simões – Ribeirão Preto, 2009.

130 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado (Área de Concentração: Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Apis mellifera* 2. Glândula Hipofaríngea 3. Expressão Diferencial

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ___ de _____ de 2009.

DEDICATÓRIA

"O que eu sou?
O que fiz
Absorvi e usei tudo que vi e observei.
Meu trabalho foi alimentado por milhares de indivíduos diferentes –
Ignorantes e sábios, gênios e tolos, crianças e velhos.
Todos eles me passaram suas habilidades e sua maneira de ser.
Colhi inúmeras vezes, o que outros semearam.
Meu trabalho é um trabalho coletivo..."

Johann Wolfgang von Goethe

Aos meus pais, **Messias e Zilá**,
aos meus irmãos, **Juliana e Patrick**,
que sempre me apoiaram e me incentivaram.
Vocês sempre foram e serão o incentivo, a força
e a alegria em todos os momentos da minha vida**.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Com certeza esse tópico foi um dos mais complicados a ser escrito. É difícil expressar em palavras todo o sentimento de gratidão por um amigo, um colega de trabalho, à namorada, e à pessoa que tornou esse trabalho possível, minha estimada orientadora. Espero conseguir expressar em palavras um pouco do que sinto e peço desculpas antecipadas as possíveis pessoas, não menos importantes, que por ventura esqueci de citar.

À minha professora e orientadora Zilá Luz Paulino Simões, pelo inigualável exemplo de profissionalismo, dedicação, responsabilidade e competência. Agradeço também pela amizade, pela confiança, pelo carinho e principalmente pela paciência.

Aos Profs. Dr. Klaus Hartfelder, Dra. Márcia M. Gentile Bitondi, Dra. Ana Maria Bonetti, pelo convívio, apoio e sugestões dispensadas durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jürgen Heinze por me receber em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, pelo apoio e supervisão durante o desenvolvimento de parte de minha tese na Alemanha.

Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, pelos estímulos recebidos nesses anos e presteza em que me atendeu em momentos de urgência.

Ao Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk e ao Dr. Alexandre dos Santos Cristino, pelas idéias animadoras e discussões, mas, sobretudo pela companhia e grande amizade durante todos esses anos.

À Dra. Nínive A. C. Frattini, pela amizade e toda ajuda realizada nos experimentos de biblioteca subtrativa.

À Dra. Adriana M. do Nascimento e ao Dr. Francis de Moraes F. Nunes, pela amizade e por toda paciência dispensadas nas correções deste trabalho.

À Ana D. Bontorim, Liliane M. F. de Macedo, pela amizade, carinho, otimismo e toda ajuda realizada neste trabalho.

Aos Dr. Rogério A. Pereira, a Dra. Michelle M. Moraes e a Vanessa A. Bugalho, pela ajuda na montagem da colônia experimental *single-cohort.*

À Vera L. C. Figueiredo, pelas conversas alegres, conselhos e ajuda em tudo que tivesse ao seu alcance.

À Marcela A. F. Bezerra Laure, pela ajuda nas dissecações das glândulas hipofaríngeas.

Ao Luiz Roberto Aguiar por todo o auxílio no apiário e pelos ensinamentos da biologia das abelhas.

À minha namorada Letícia Y. T. dos Santos, pelo carinho e companheirismo, conselhos e incentivos, estando perto ou longe sempre disposta a me ouvir e a me ajudar, me fazendo entender que a felicidade é uma decisão diária.

Aos eternos amigos da 36ª, Tiago M. Francoy, Fernando F. Franco, Daniele A. Magalhães, Caroline A. G. da Cunha, Andréa C. C. Barbosa e Maíra P. de Sousa.

Aos amigos e colegas de apartamento, Lucas Albrechet e Daniel Rossano, pela amizade e por todos os momentos de descontração que pudemos compartilhar esses anos.

Aos amigos Aline Aleixo, Aline Mackert, Amanda Assis, Anete Lourenço, Ana Rita, André Micas, Camila Dias, Camila Maia, Daiana Miranda, David Marco, Érica Tanaka, Fernanda Torres, Flávia Cristina, Gesline de Almeida, Gisele Cabral, Ivan Akatsu, Juliana Martins, Karina Guidugli, Paulo Emílio, Marina Grassi, Michelle Prioli, Mônica Florecki, Moysés Elias, Rodrigo D'allaqua, Sergio Azevedo, Tathyana Mello, Omar Martinez, Weyder Santana por toda a disposição em ajudar sempre que fosse necessário e pelas conversas incentivadoras e alegres.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa e acima de tudo pela credibilidade investida em meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa *sandwich* do projeto PROBAL.

Ao curso de Pós-Graduação em Genética - FMRP/USP, em especial às funcionárias Maria A. O. S. Elias e Susie A. P. Nalon, pela amizade e solicitude em todas as situações.

A Deus, por ter me dado as condições físicas e espirituais para que eu chegasse até aqui.

E a todas as outras pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado...

...Muito Obrigado!

Lobo, C.H. **Determinantes moleculares do polietismo seqüencial em *Apis mellifera*.** 2009. XX p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A mudança de função idade-dependente é um dos traços mais característicos da sociedade da abelha melífera, *Apis mellifera* L. A expectativa de vida de uma abelha operária é de aproximadamente 30-40 dias. Uma das mudanças fisiológicas relacionadas ao envelhecimento das operárias é a atrofia da glândula hipofaríngea (GH). O ciclo secretor da~~s~~ GH está intimamente relacionado à função de nutridora, desempenhada pelas operárias entre 5 e 20 dias de vida adulta; em operárias forrageiras, estas glândulas regridem e aparentemente passam para um estado pós-secretor. Desta maneira, esta glândula representa um modelo experimental para o estudo de divisão de trabalho e envelhecimento. Objetivou-se neste trabalho ampliar o conhecimento sobre genes diferencialmente expressos na GH nestas duas fases distintas da vida adulta. Uma vez descobertos, estes candidatos foram utilizados para se tentar esclarecer a relação idade-comportamento em operárias mantidas em uma colônia *single-cohort*. Para tais fins, diferentes técnicas foram utilizadas, dentre elas destacam-se: Biblioteca Subtrativa Supressiva (BSS), Real Time PCR e Cromatografia Gasosa por Espectometria de Massa . Nas BSS das GHs de operárias nutrizes e forrageiras foram identificados quatro genes diferencialmente expressos: *buffy, alfa-glicosidase, amilase proximal* e *major royal jelly-4.* As análises de expressão nas amostras da *single-cohort* evidenciaram o gene *buffy* mais expresso em operárias nutrizes e os demais em forrageiras. Inclui-se também os genes *superóxido dismutase,*relacionado ao *stress*, sendo mais expresso em forrageiras e o gene para a vitelogenina, expresso sem diferença entre as fases. Os resultados até aqui obtidos ampliam os conhecimentos sobre a expressão gênica diferencial, especialmente nas glândulas hipofaríngeas, trazendo novos candidatos a marcadores de envelhecimento. A composição de hidrocarbonetos cuticulares cefálicos, investivada por cromatografia gasosa, consistiu em alcanos, alquenos, alcadienos e alcanos ramificados, variando entre 21 e 35 átomos de carbono. O perfil de operárias forrageiras foi identificado principalmente por alcanos, enquanto o de nutrizes por alquenos. Mostra-se aqui que em operárias de *A. mellifera* os perfis de hidrocarbonetos cefálicos cuticulares está dinamicamente ligado ao comportamento em detrimento da idade. Esses resultados suportam a idéia de que a interação operária-operária pode influenciar a taxa de desenvolvimento comportamental, influenciada por comunicação química.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, regulação social, expressão gênica, cromatografia gasosa.

Lobo, C.H. **Molecular determinants of sequential polyethism in *Apis mellifera*.** 2009. XX p. Doctoral Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Age-dependent change in functions in division of labor is a characteristic trait in colonies of the honey bees, *Apis mellifera* L. Life expectancy of a worker bee is about 30-40 days. One of the physiological changes related to aging in workers is the atrophy of the hypopharyngeal gland (HG). The secretory cycle of the HG is closely related to the role as a nurse, played by workers when they are between 5 to 20 days old. In foragers, these glands regress and apparently pass to a post-secretory state. Thus, this gland is an experimental model for the study of division of labor and aging. This study aimed to study differential gene expression in HGs in two distinct phases of adult life. Candidate genes coming out of these screens were then used to investigate the link between gland function and behavior in worker kept as *single-cohort* colony. For this purpose, different techniques were used, such as: Suppression Substractive Hybridization (RDA), Real Time PCR, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). In the RDA analyses of HGs from nurses and foragers workers we identified four differentially expressed genes: *buffy, alpha-glucosidase, amylase proximal* and *major royal jelly-4*. The analysis of their expression in samples of *single-cohort* workers showed that *buffy* is higher expressed in nurses, whereas the others had higher transcript levels in foragers. We also studied the expression of the stress-related *superoxide dismutase* gene, which turned out to be more expressed in foragers, and of the gene coding for vitellogenin, for which we found no difference in expression between the two life stages. These results extend our knowledge on differential gene expression in honey bees, especially for the HGs, adding new candidates to the list of markers of aging. The composition of cephalic cuticular hydrocarbons was investigated by GC/MS. It consisted of alkanes, alkenes, alkadienes and branched alkanes, ranging between 21 and 35 carbon atoms. The profile of foragers was mainly represented by alkanes, while the nurses had more alkenes, showing that the cephalic cuticular hydrocarbon profile in *A. mellifera* workers is dynamically linked to behavior rather than age. These results lend support to the idea that worker-worker interaction can influence the rate of behavioral development through chemical communication.

Keywords: *Apis mellifera*, social regulation, gene expression, gas chromatography.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **01**

1.1 *Apis mellifera*: considerações gerais 02

1.2 Glândulas hipofaríngeas e as proteínas da geleia real 03

1.3 Glândula hipofaríngea e a proteína Vitelogenina 06

1.4 Glândulas exócrinas e hidrocarbonetos cuticulares 07

1.5 Colônia *single-cohort* 10

2 OBJETIVOS **11**

2.1 Objetivo geral 12

2.2 Objetivos específicos 12

3 MATERIAL e MÉTODOS **13**

3.1 Material biológico para genes diferencialmente expressos 14

3.1.1 Extração do RNA total 14

3.1.2 Tratamento com DNase 15

3.1.3 Quantificação do RNA total 15

3.1.4 Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR) 15

3.1.5 Síntese da dupla fita de cDNA por LD-PCR 16

3.1.6 Purificação do cDNA dupla fita amplificado 17

3.1.7 Digestão do cDNA dupla fita com Mbo1 17

3.1.8 Ligação do cDNA-aos adaptadores R 18

3.1.9 Amplificação do cDNAs dupla fita 18

3.1.9.1 Padronização da PCR 18

3.1.9.2 Geração das representações em larga escala 19

3.1.10 Preparo do cDNA *driver* e *tester* a partir das representações 19

3.1.10.1 Geração do cDNA *driver* 19

3.1.10.2 Geração do cDNA *tester* 20

3.1.11 Primeira hibridação subtrativa 20

3.1.12 Geração do primeiro produto diferencial (PD1) 21

3.1.13 Troca de adaptadores no produto diferencial (PD1) 21

3.1.14 Segunda hibridação subtrativa e geração do segundo produto diferencial (PD2) 22

3.1.15 Preparo das células eletrocompetentes de *E. coli* 23

3.1.16 Clonagem 24

3.1.17 Extração de DNA plasmidial 25

3.1.18 Sequenciamento 25
3.1.19 Análise das sequências 25
3.1.20 Desenho dos *primers* 26
3.1.21 Teste do *primers* 26
3.1.22 Quantificação das bibliotecas subtrativas 27
3.2 Estudos de cromatografia gasosa 27
3.2.1 Material biológico 28
3.2.2 Observação de comportamento 28
3.2.3 Preparação as amostras 29
3.2.4 Confirmação da Condição Fisiológica 29
3.2.5 Análises cromatográficas (GC e GC-MS) 29
3.2.6 Radioimunoensaio (RIA) para HJ 30
3.2.7 Metodologia para análise de proteínas da hemolinfa 31
3.2.7.1 Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) 31
3.2.8 Análise da expressão dos genes de interesse 33

4 RESULTADOS 35
4.1 Síntese da dupla fita de cDNA por LD-PCR 36
4.1.1 Geração das Representações 36
4.1.2 Padronização da PCR 36
4.1.3 Geração do cDNA J (tester) 39
4.1.4 Geração do primeiro produto diferencial (PD1) 39
4.1.5 Geração do cDNA N (tester) 40
4.1.6 Geração do segundo produto diferencial (PD2) 40
4.1.7 Sequenciamento 42
4.1.7.1 Biblioteca de glândulas hipofaríngeas 42
4.1.7.2 RT-PCR semi-quantitativa 42
4.1.7.3 Validação das bibliotecas subtrativas por PCR quantitativa 43
4.2 Colônia *single-cohort* 46
4.2.1 Análises Cromatográficas 46
4.2.2 Diferenciação de nutriz 46
4.2.3 Diferenciação de forrageira 49
4.2.4 Diferenciação idade-comportamento 49
4.2.5 Quantificação do hormônio juvenil 53
4.2.6 Perfil de proteínas na hemolinfa 54
4.2.7 Expressão dos genes possivelmente relacionados ao envelhecimento 54

5 DISCUSSÃO 61
5.1 Expressão gênica diferencial entre operárias nutrizes e forrageiras 61
5.2 *α-glicosidase* 62
5.3 *Mrjp-4* 64
5.4 *Amilase proximal* 65
5.5 *Buffy* 66
5.6 CuZn superoxido dismutase (*sod)* 68
5.7 Vitelogenina 69
5.8 Hidrocarbonetos cefálicos 70
5.9 Hidrocarbonetos das nutrizes 72
5.10 Hidrocarbonetos das forrageiras 72
5.11 Diferenciação idade-comportamento 73

6 CONCLUSÕES **74**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **77**

8. ANEXO **91**

1. INTRODUÇÃO

Alguns insetos exibem morfologias alternativas (polifenismo) acompanhadas por diferenças fisiológicas e comportamentais. Nos insetos sociais, tipos morfo-fisiológicos distintos dentro de uma mesma espécie desempenham funções diferentes no grupo e se beneficiam mutuamente. Além de serem sociais (eussociais) e apresentarem indivíduos com morfologias alternativas (rainha, operária e zangão), as abelhas *Apis mellifera* (Apidae, Apinae, Apini) também apresentam cuidado com a prole e sobreposição de gerações (Wilson, 1971; Michener, 1974; Nijhout, 1982).

1.1 *Apis mellifera*: considerações gerais

Em uma colônia de *A. mellifera* pode-se encontrar até 100 mil indivíduos, observando-se uma clara divisão de trabalho (Robinson *et al.*, 1991). Podemos considerar como uma primeira manifestação desta divisão, a determinação dos indivíduos que serão destinados à reprodução (rainhas e zangões) e aqueles destinados à manutenção da colônia (operárias). Deste modo, observa-se numa colônia de *A. mellifera*, uma rainha capaz de produzir 500-2000 ovócitos por dia que junto com os zangões, garantem a reprodução na colônia (Engels, 1974). Já as operárias realizam o trabalho de manutenção da colméia, incluindo alimentação da cria e da rainha, construção de favos, coleta e processamento do alimento, defesa e limpeza da colônia, entre outras. Estas tarefas são cumpridas de acordo com a maturidade fisiológica das operárias (fenômeno conhecido como poliestismo etário), sendo que muitas delas estão relacionadas ao estado funcional das glândulas exócrinas (Cruz-Landim, 1992, 1994).

As abelhas *A. mellifera* apresentam não apenas polifenismo, mas também um curioso difenismo no qual as fêmeas são geneticamente equivalentes, porém expressam nítidas variações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, que diferenciam as castas, rainha e operária. Em *A. mellifera*, a diferenciação de castas está associada ao tipo de

alimentação que a larva recebe. Assim, as rainhas desenvolvem-se a partir de larvas alimentadas com geleia real durante todo o período larval enquanto as operárias resultam de larvas alimentadas com néctar, pólen e secreções glandulares a partir do terceiro dia de vida. A alimentação diferencial oferecida às larvas que originarão rainhas e as que originarão operárias gera perfis hormonais casta-específicos, reguladores da expressão gênica diferencial entre rainhas e operárias de *A. mellifera* (para revisão veja: Hartfelder e Engels, 1998; Evans e Wheeler, 2000). Em outras palavras, a alimentação diferencial culmina na expressão diferencial de grupos de genes ao longo do desenvolvimento, especialmente durante a fase larval (Barchuk *et al*, 2007).

1.2 Glândulas hipofaríngeas e as proteínas da geleia real

As glândulas hipofaríngeas (GH) são exclusivas dos himenópteros e é nas abelhas eussociais que elas atingem a sua maior complexidade. Em *A. mellifera* ela é encontrada apenas nas operárias.

A GH está situada na porção anterior da cabeça de operárias das abelhas melíferas e quando bem desenvolvida, ou seja, nas nutrizes, forma cachos com ácinos pluricelulares se estendendo por mais de 1cm de comprimento, se enrolando sobre o cérebro . Os ácinos são ligados a um ducto central, o qual sintetiza e secreta uma substância protéica (geleia real) usada na alimentação das larvas (Painter e Biesele, 1966; Huang *et al*., 1989). Conforme as operárias envelhecem, as glândulas hipofaríngeas sofrem alterações funcionais e modificam o seu espectro protéico sintetizando agora enzimas que participam na maturação do néctar e a sua transformação em mel. Uma vez que as operárias iniciam a função de forrageamento a GH passa por um processo de degeneração. A glândula, portanto, exibe ciclos de atividade bem relacionados às tarefas comportamentais associadas à idade, o polietismo etário das operárias de *A. mellifera*.

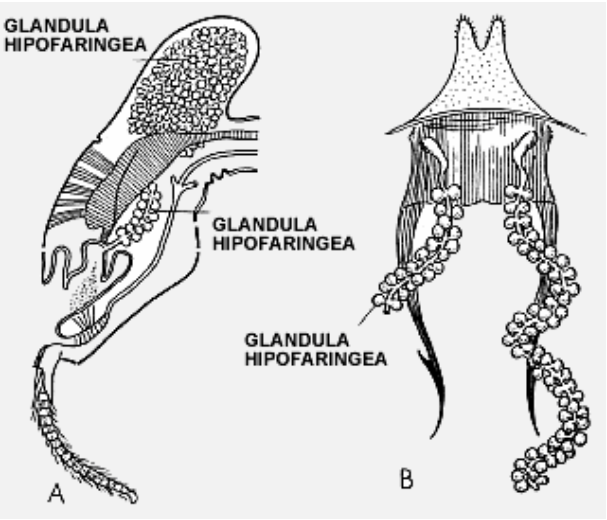
À medida que as tarefas idade-dependentes variam, são observadas mudanças na morfologia da GH das operárias. O tamanho dos ácinos muda radicalmente com a idade (Deseyn e Billien, 2005). É em operárias nutrizes que se observa o maior volume dos ácinos, regredindo e diminuindo drasticamente seu volume e secreção, à medida que envelhecem.

Assim, o ciclo secretor da GH de *A. mellifera* está intimamente relacionado à função de nutriz, realizada pelas operárias entre 5 e 20 dias de vida adulta (Rösch, 1925; Sakagami, 1953; Simões e Bego, 1979; Silva-de-Moraes *et al*., 1985), fase na qual a glândula é totalmente funcional (Snodgrass, 1956); em seguida, em operárias forrageiras, esta glândula regride e aparentemente passa para um estado pós-secretor - Figura 1 - (Heselhaus, 1922; Soudek, 1927; Kratky, 1931; Halberstadt, 1980; Cruz-Landim *et al*., 2000). As GHs podem ser um excelente indicador do momento fisiológico das abelhas como também de seu envelhecimento, sendo, portanto, um importante modelo experimental.

Estudos da expressão gênica da GH de operárias culminaram na purificação de quatro grandes proteínas, as quais apresentam perfis variáveis ao longo da sua vida adulta.

Com as informações publicadas sobre o sequenciamento do genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) criou-se novas perspectivas, desde a origem dessas abelhas à identificação de notáveis traços sociais ao nível genético-molecular. O genoma revelou, por exemplo, modificações de genes ancestrais, como é o caso daqueles que codificam as proteínas *Yellow*, tipicamente encontrada nos Diptera. O que se observa nos Hymenoptera é a evolução de uma família de genes codificadores de geleia real. (Wilson, 2006).

A geleia real, oferecida para as larvas de operárias, rainha e zangões, é secretada pela GH, situada na cabeça (Halberstadt, 1980; Hanes e Simuth, 1992). Sua estrutura foi



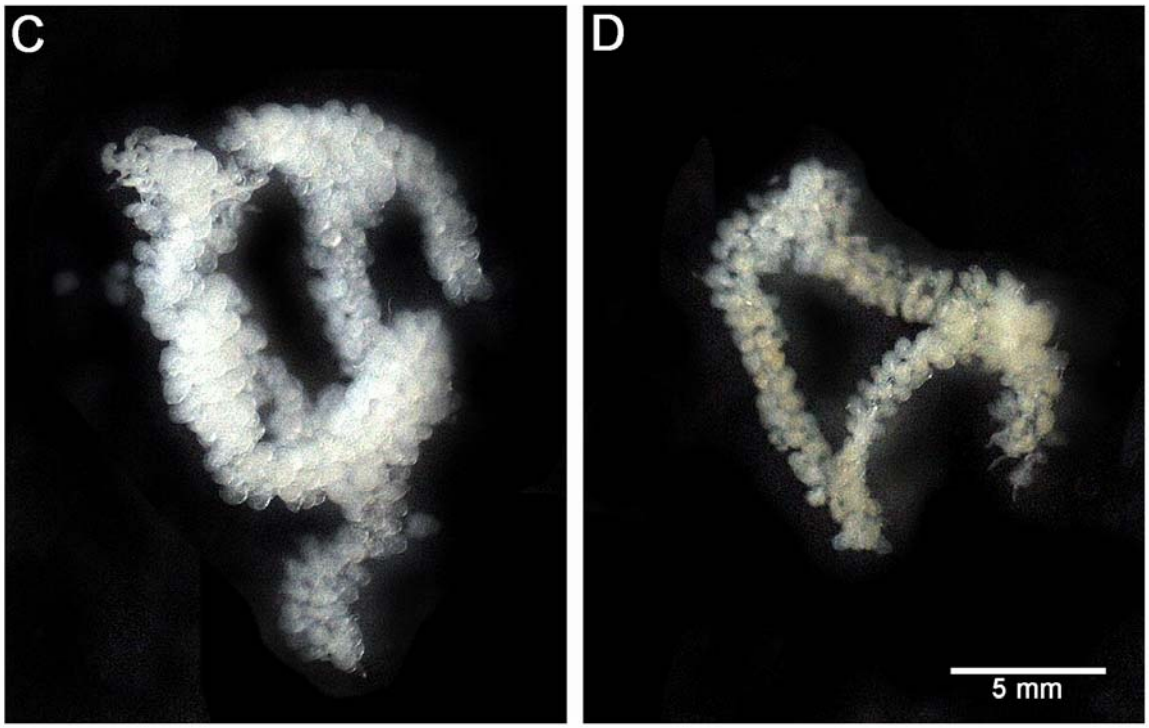


Figura 1. Morfologia da glândula hipofaríngea de *Apis mellifera*. Esquema da cabeça com destaque para a glândula hipofaríngea (A e B). Imagem da glândula hipofaríngea atroficada (C) e ativa (D), obtida por estereomicroscópio (Axioplan 2 Zeiss) equipado com Axiovision Zeiss digital software. Esquema retirado de: http://www.dipualba.es/municipios/molinicosorg/agricultura/La%20abeja%20V.htm em 19/01/2009.

descrita por vários autores, incluindo Shiemenz (1883), Heselhaus (1922) e Soudek (1927).

A GH das abelhas melíferas produz todas as principais proteínas da geleia real (*major royal jelly proteins*, MRJPs). Estas proteínas foram sequênciadas (Albert e Klaudiny 2004) e também anotadas no contexto do projeto de genoma de *A. mellifera* (http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee). As MRJPs pertencem à família das proteínas *Yellow* de *Drosophila*, mas o número de membros nesta família aumentou significativamente em *A. mellifera* e ganhou funções aparentemente novas no contexto de evolução social.

1.3 Glândula hipofaríngea e a proteína Vitelogenina

A glândula hipofaríngea capta vitelogenina (Vg) e a usa como fonte de aminoácidos para garantir as altas taxas de produção de MRJPs (Amdam *et al*., 2003). Um fenômeno interessante, denominado de "exploração social de vitelogenina" (Amdam *et al*. 2003a) foi recentemente descrito em operárias de abelhas melíferas que alimentam as larvas. Mesmo sendo funcionalmente estéreis e não produzindo ovos, estas operárias jovens apresentam na sua hemolinfa altos títulos de vitelogenina, uma proteína precursora da principal proteína do ovo, a vitelina.

Na maioria dos insetos a Vg, que pertence à família de proteínas ligantes de lipídios e a principal proteína do vitelo. Seus resíduos de aminoácidos e estrutura são conservados entre insetos e outros ovíparos, o que indica uma ancestralidade comum (Sappington *et al*., 2002; Ziegler e Van-Antwerpen, 2006). Em operárias adultas, a taxa de síntese de vitelogenina pelo corpo gorduroso está negativamente correlacionada com seus níveis na hemolinfa, em outras palavras, a incorporação nos ovócitos em desenvolvimento é muito rápida e, mesmo sendo produzida em grande quantidade, não há tempo para acúmulo na hemolinfa (Engels, 1974; Engels *et al*., 1990). Operárias nutrizes apresentam alta produção

de Vg sob baixos títulos de hormônio juvenil (Rutz *et al.*, 1976). Trabalhos recentes mostram que a Vg desempenha diversas funções no controle de características associadas à organização social por meio de efeitos pleiotróficos na divisão de trabalho e longevidade, principalmente em operárias (Amdam e Omholt, 2002; Amdam e Omholt, 2003; Amdam e Page, 2005; Nelson *et al*., 2007). Juntos, a Vg e o hormônio juvenil constituem parte de um sistema regulatório de retro-alimentação (*feedback*), no qual um suprime o outro (Figura 2) segundo a hipótese do duplo repressor, proposta por Amdam e Omholt (2003).

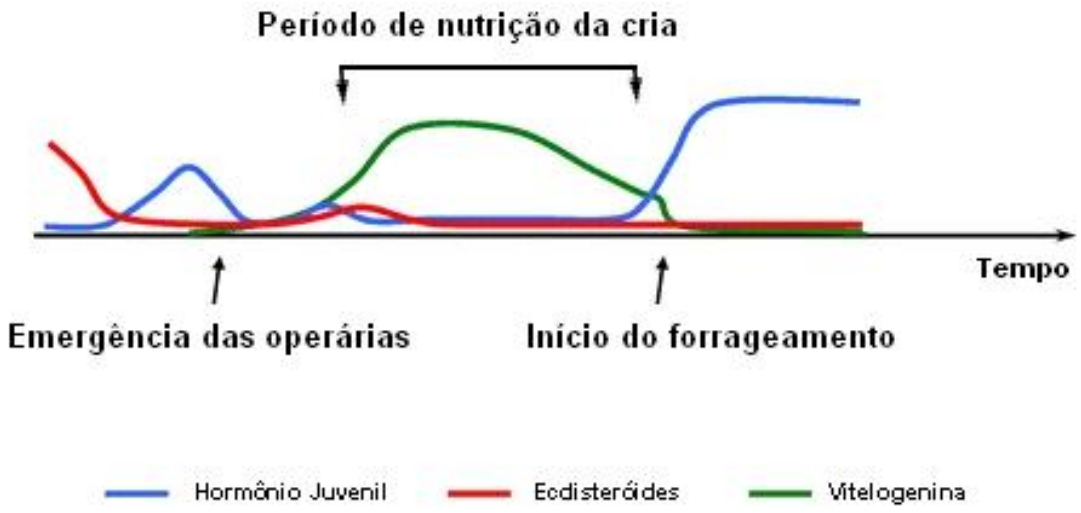


Figura 2. Sistema de retro-alimentação entre os títulos de hormônio juvenil e de vitelogenina circulantes na hemolinfa de operárias, regulando a divisão de trabalho. Adaptado de Page e Amdam (2007).

1.4 Glândulas exócrinas e hidrocarbonetos cuticulares

As glândulas exócrinas exercem papel fundamental na organização de sociedades em insetos e servem para controlar interações sociais em muitos contextos, desde a regulação da reprodução e divisão de trabalho até defesa e manutenção da colônia (Wilson, 1971). O feromônio da glândula mandibular das abelhas melíferas - frequentemente

referido como feromônio da rainha - constitui um exemplo de primeira linha para especificidade e pleiotropia em comunicação de curto e longo prazo entre membros da colônia e sexos (Slessor *et al*., 2005) e muitas outras glândulas em abelhas, vespas e formigas tem funções complexas similares.

Segundo Howard e Blomquist (2005), hidrocarbonetos cuticulares em artrópodes servem como sinais de reconhecimento entre dois ou mais indivíduos e permitem discriminar a espécie, sexo e, até mesmo, a colônia. Extrapolando para *A. mellifera*, os hidrocarbonetos cuticulares podem ser úteis na identificação da casta, da idade ou função de uma fêmea da colônia.

Em sistemas complexos, como colônias de insetos sociais, é essencial a comunicação entre indivíduos para garantir uma maior eficiência na divisão de trabalhos, e neste contexto, a comunicação olfativa por feromônios e substâncias voláteis em geral constitui um elemento fundamental da coesão. Hidrocarbonetos compõem a maior parte das substancias voláteis. Estes podem ser encontrados na cutícula de praticamente todos os insetos. Além de sua função primária, como uma barreira a perda de água (Nelson e Blomquist, 1995; Gibbs, 1998), hidrocarbonetos cuticulares também estão envolvidos em comunicação semioquímica em insetos (Howard, 1993; Blomquist *et al*., 1993, 1998; Howard e Blomquist, 2005). Em insetos sociais, os hidrocarbonetos cuticulares contribuem para reconhecimento de espécie, casta e ninho (Blomquist *et al*., 1998), e pode facilitar a orientação na colméia (Steinmetz *et al*., 2003). Além do mais, hidrocarbonetos cuticulares estão envolvidos em processos de comunicação sexual de insetos, possibilitando o reconhecimento sexual de parceiros, causando agregação, ou agindo como um inibidor de corte para reduzir a atração de fêmeas já inseminadas (Blomquist *et al*., 1993; Ferveur, 2005).

Além dos hidrocarbonetos cuticulares, secreções de glândulas cefálicas exercem papel fundamental na comunicação entre os indivíduos da colméia. Essas glândulas produzem o chamado feromônio da rainha (Slessor *et al*., 2005) que atua sobre a fisiologia e comportamento das operárias. As glândulas cefálicas também secretam compostos específicos de operárias que refletem mudanças comportamentais durante o ciclo de vida adulta das mesmas (Katzav-Gozansky *et al*., 2001).

Muitos estudos atuais tem como foco as glândulas exócrinas que produzem e secretam hidrocarbonetos e/ou alcalóides. Glândulas que produzem secreções protéicas ou uma mistura de compostos protéicos junto com outros componentes bio-ativos tem recebido menos atenção embora possam ter importância similar na comunicação entre os membros das colônias e, portanto na integridade de sociedades de insetos como todo. As duas glândulas que predominantemente produzem secreções protéicas em abelhas são as grandes glândulas acessórias do trato genital dos machos e as glândulas hipofaríngeas. A análise das secreções das glândulas acessórias dos zangões de abelhas melíferas constitui uma linha de pesquisa ativa em nosso laboratório (Colonello e Hartfelder, 2005) e forma uma ponte com as pesquisas do grupo do Prof. Jürgen Heinze (Univ. Regensburg, Alemanha) sobre as glândulas acessórias dos machos de formiga. Os produtos destas glândulas em formigas ainda tem sido pouco estudados, mas experimentos de acasalamento de rainhas com machos estéreis sugerem que as secreções das glândulas acessórias de uma forma ou outra aumentam a longevidade das rainhas (Schrempf *et al*., 2005).

A utilização da técnica de cromatografia gasosa por espectometria de massa (GC-MS) permite a identificação de diferentes substâncias voláteis, podendo fornecer informações acerca de quais mecanismos controlam ou direcionam o comportamento de forrageamento, marcando o início do envelhecimento das abelhas melíferas.

1.5 Colônia *single-cohort*

A plasticidade do polietismo temporal é o que permite uma colônia crescer, se desenvolver e se reproduzir apesar de alterações ambientais.

Colônias *single-cohort* construídas apenas com abelhas recém emergidas direcionam a plasticidade do comportamento de operárias para as diferentes tarefas (Robinson *et al*., 1989; Huang e Robinson, 1992). A ausência de operárias mais velhas na colméia leva cerca de 10% de abelhas de uma colônia *single-cohort* a forragear precocemente, o que deveria ocorrer entre 7 a 10 dias de idade (Huang e Robinson, 1992, 1996; Schulz *et al*., 1998). Em uma colônia típica, operárias jovens, de 0 a 15 dias de vida adulta, executam tarefas dentro da colméia; e a mudança para forrageamento, coleta de néctar e pólen ocorre após esses 15 dias de vida adulta (Winston, 1987).

As operárias de abelhas apresentam uma grande plasticidade para divisão de trabalho (Robinson, 1992), elas respondem às mudanças das condições sociais acelerando, atrasando ou revertendo seu padrão típico de maturação comportamental. Por exemplo, se houver uma grande quantidade de larvas na colméia algumas abelhas podem atrasar sua transição para forrageira, ou até mesmo regredindo de forrageira à nutriz (Robinson *et al*., 1989; Remolina *et al*., 2007). Colônias *single-cohort* permitem a observação e coleta de abelhas da mesma idade desempenhando diferentes tarefas, com isso pode-se testar o peso da idade na fisiologia e no comportamento em operárias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo geral o transcriptoma da glândula hipofaríngea de operárias nas fases de alimentadora e forrageira bem como traçar um perfil da expressão gênica da glândula hipofaríngea em duas fases primordiais da vida de operárias, relacionadas à secreção de geleia real. Neste sentido, objetivou-se esclarecer alguns aspectos atualmente estudados, como por exemplo, a regulação da anatomia de sistemas socias (Robinson *et al*, 1997; Pankiw e Page, 2000) e regulação do envelhecimento (Amdam et al., 2004; Amdam e Omholt, 2002) e de qual maneira modificações nas funções da glândula hipofaríngea se refletem nos perfis de hidrocarbonetos cefálicos das operárias.

2.2 Objetivos Específicos

1) Identificar quais genes são expressos diferencialmente pela glândula hipofaríngea em duas tarefas distintas, gerando possíveis marcadores genéticos para idade;

2) Com o auxílio de tais marcadores genético, traçar um perfil de genes relacionados à idade e comportamento;

3) Comparar a expressão gênica diferencial para cada idade e comportamento com os títulos de hormônio juvenil e vitelogenina;

4) Analisar a plasticidade de comportamento em uma colônia *single-cohort*;

5) Utilizando-se da metodologia de GC-MS, verificar quais são os hidrocarbonetos cefálicos de abelhas, em diferentes fases e funções.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico para genes diferencialmente expressos

Foram usadas abelhas (*Apis mellifera* africanizadas) do Apiário Experimental do departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, São Paulo.

Para coleta de abelhas com idade controlada, operárias recém-nascidas foram marcadas no tórax com tinta especial e introduzidas em uma colônia com rainha. Abelhas marcadas foram coletadas 7 e 29 dias depois. Foram coletados 21 pares de glândulas hipofaríngeas (GH) de nutriz (7 dias após a marcação) e 28 das abelhas forrageiras (29 dias após a marcação).

As abelhas foram anestesiadas em gelo e as GHs foram dissecadas em Ringer diluído 10x (Ringer Concentrado: NaCl 5,0 g , KCl 0,42g , CaCl 2H2O 0,25g completando com água destilada para 100ml) com auxílio de um estereomicroscópio.

3.1.1 Extração do RNA total

Imediatamente após a dissecção, foi adicionado 1 ml de TRIzol (Invitrogen) às glândulas coletadas e armazenadas a -80°C até o início da extração do RNA total. Após o TRIzol ter descongelado, adicionou-se 200 µl de clorofórmio. As amostras foram agitadas por 15 segundos e incubadas de 2-3 min em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12000 *g* por 15 min a 2-8°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para tubos novos e incubada por 10 min em temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições anteriores, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 1 ml de etanol 75%, que foi mantido a -80°C.

3.1.2 Tratamento com DNase

Para evitar contaminação com DNA genômico, o que poderia comprometer o procedimento de RDA (*Representational Difference Analysis*), as amostras foram tratadas com DNase I. Este passo é crítico quando se utiliza RNA total para a construção da biblioteca de cDNA. Para o tratamento, adicionou-se de 1U desta enzima diluída 10 vezes diretamente em 2 µg de RNA total. Esta reação ficou incubada a 37°C por 15 min e a 65°C por 10 min para inativar a DNase, seguindo-se a síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR).

3.1.3 Quantificação do RNA total

O RNA isolado foi quantificado em espectrofotômetro, utilizando-se 260 nm como comprimento de onda para leitura. Considerou-se que uma unidade de absorbância neste comprimento de onda correspondia a 40µg/ml de RNA. O grau de pureza foi estimado pela razão da leitura 260/280 nm.

3.1.4 Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR)

A reação RT-PCR a longa distância está baseada no protocolo do kit PCR cDNA Synthesis SMART (Clontech), no qual se utiliza um *primer* ancorador oligodT (CDS *Primer*– Sau 3A1) com sequência de reconhecimento de enzima de restrição (Sau3/Mbo1) e uma sequência curta adaptadora (A1), e um *primer* (SMART II A Oligo – Sau 3A1) que apresenta um oligo-dG seguida pela sequência de reconhecimento de enzima de restrição (Sau3/Mbo1) e a mesma sequência curta adaptadora (A1). Este último *primer* se pareia ao local onde foi realizado a adição de oligo-dC pela transcriptase reversa possibilitando a realização do “template switching" e a extensão da transcrição reversa. Em seguida, o

molde gerado na reação da primeira fita é utilizado em reação PCR com um único *primer* (SMART-PCR) que reconhece a sequência adaptadora (A1) nos dois terminais.

Sequência dos *primers* utilizados na síntese da primeira fita de cDNA:

SMART II A: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGATCGCGGG-3'
3' SMART CDS *Primer* IIA: 5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAGATCNT$_{(30)}$-3'

Em detalhe, a cada 2 µg de RNA total, adicionou-se 1µl SMART II A Oligo – Sau 3A1 20µM (Forward), 1µl de *Primer* 3' SMART CDS *Primer* IIA – Sau 3A1 20µM (Reverse), 1µl de dNTPs 10 mM (completando-se a reação para 12µl com água de DEPC). As amostras foram gentilmente agitadas, incubadas a 65°C por 5 min e colocadas imediatamente no gelo por 2 min.

Uma mistura de 4 µl de 5X First Strand Buffer (15mM $MgCl_2$), 2 µl de DTT (0,1M) e 1 µl de Inibidor de RNAse, foi adicionada em cada uma das reações. A reação foi gentilmente homogenizada.

Em termociclador, as amostras foram incubadas a 42°C por 2 min e adicionou-se 1 µl de Super Script (Invitrogen). As amostras foram incubadas a 42ºC por 50 min e a 70ºC por 15 min. Os produtos de dessa reação (20µl) foram diluídos com a adição de 20 µl de tampão TE (EDTA -1 mM; Tris-HCl -10mM, ambos em pH - 8,0), incubados a 72°C por 7 min e mantidos a -20°C.

3.1.5 Síntese da dupla fita de cDNA por LD-PCR

A primeira fita produzida foi utilizada para a síntese da dupla fita de cDNA, seguindo o protocolo do kit PCR cDNA Synthesis SMART (Clontech) para *Long distance - Polymerase Chain Reaction* (LD-PCR).

Aos 4µl do produto da primeira reação, cDNA de fita simples adicionou-se 5 µl de tampão Hi-Fi (10X), 2 µl de $MgSO_4$ (50 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de *primer*

Smart-PCR (10µM) e 0,3 µl de Taq Polimerase Hi-Fi (Invitrogen - 5U/µl). As reações foram completadas com água destilada estéril, para 50 µl. Inicialmente, os ciclos foram padronizados para evitar o efeito "overcycling" e o após o número de ciclos ser estabelecido, foram realizadas 5 reações por biblioteca (operárias nutriz e forrageiras), para atingir a massa mínima necessária de cDNA para os próximos passos. Na padronização, alíquotas de 6 µl foram coletadas nos ciclos 16, 18, 20, 22, 24 e 26; sendo escolhido para o cDNA da operária jovem, 22 ciclos e para a forrageira, 24 ciclos. O programa de PCR utilizado foi de 94°C – 2 min; 28 ciclos de 94°C – 5 sec, 65 °C –5 sec e 68°C – 8 min. O resultado foi analisado em de gel de agarose 1% com tampão TBE 1X, no qual foi adicionado brometo de etídeo como corante para a visualização da amplificação.

Sequência do *primer* utilizado na síntese da segunda fita de cDNA:

5' PCR *Primer* II A: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

3.1.6 Purificação do cDNA dupla fita amplificado

O cDNA dupla fita foi purificado pelo kit GFX (Amersham), segundo instruções do fabricante e, em seguida, armazenado a -20°C.

3.1.7 Digestão do cDNA dupla fita com MboI

Após purificação, os DNAs de fita dupla foram dosados por espectrometria (260 nm). Considerou-se que uma unidade de absorbância neste comprimento de onda correspondia a 50µg/ml de DNA. Posteriormente, os DNAs foram submetidos à digestão com a enzima de restrição MboI. Para a digestão, usou-se de 1µg de cDNA dupla fita.

Reação de digestão: 1µg do cDNA de fita dupla, 10µl tampão de reação R, 10X (Fermentas), 8µl MboI (5U/µl, Fermentas) e água deionizada autoclavada para um volume final de 100µl. A reação foi incubada a 37°C por aproximadamente 15 horas. A eficiência

da digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% com 5µl das amostras digeridas e não digeridas, como controle da reação enzimática. Posteriormente, as amostras foram purificadas por kit GFX (Amersham) conforme as especificações do fabricante e novamente quantificadas por espectrometria.

3.1.8 Ligação do cDNA-aos adaptadores R

Na reação de ligação dos adaptadores, há inicialmente uma etapa de pareamento dos oligonucleotídeos e, em seguida, ocorre a ligação dos mesmos ao DNA de fita dupla. As amostras foram aquecidas a 50°C por 1 minuto e resfriadas até 10°C, havendo decréscimo de 1°C por minuto durante 40 ciclos (nesta etapa ocorreu o pareamento dos oligos R12 e R24). Para completar um volume final de 100µl, adicionou-se 1,0µg de cDNA molde, a 10µl tampão T4 DNA ligase 10X, 2µl *primer* R12 (500 µM), 2µl *primer* R24 (500 µM) e água deionizada estéril. O resfriamento foi interrompido ao atingir 10 ^{o}C, para adição de 2µl da enzima T4 DNA ligase. Homogeneizou-se gentilmente as amostras para não prejudicar o pareamento dos oligonucleotídeos a reação foi mantida a 14°C por aproximadamente 15 horas.

Sequência dos adaptadores R12 e R24 utilizados:

R12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'
R24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

3.1.9 Amplificação do cDNAs dupla fita

3.1.9.1 Padronização da PCR

A geração das representações corresponde à amplificação do cDNA dupla fita a ser empregada nas hibridações subrativas. A reação de amplificação é padronizada a fim de se evitar o efeito "overcycling". Para tal, foi realizada uma reação piloto e o produto da amplificação em diferentes ciclos foi analisado em gel de agarose 1%. Após a

padronização, o ciclo para a geração das representações em larga escala foi escolhido levando-se em consideração a saturação da síntese de DNA e a fase exponencial de amplificação.

Reação piloto: 10ng de cDNA molde para ambas bibliotecas (ligadas aos adaptadores R), 50µl de Master mix 2.0X (Promega), 0,3µl Oligo R24 (500µM) e água deionizada autoclavada para completar volume final de 100µl. O programa de amplificação foi iniciado com 72°C por 8 min, 95°C por 1min, seguido de 8 a 24 ciclos de 95°C por 30seg e 72°C por 3 min. Alíquotas de 8µl foram retiradas nos ciclos: 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18 e 20 e analisadas em gel de agarose 1%.

3.1.9.2 Geração das representações em larga escala

Após a padronização do número de ciclos de PCR, as reações para gerar as representações foram feitas novamente em larga escala, ou seja, para cada uma das bibliotecas foram preparadas 15 reações de amplificação para que fosse possível obter uma massa mínima de 21µg de cDNA. As reações seguiram o mesmo protocolo que a reação piloto descrita acima.

3.1.10 Preparo do cDNA *driver* e *tester* a partir das representações

3.1.10.1 Geração do cDNA *driver*

Para o preparo do cDNA *driver*, as amostras de ambas bibliotecas foram digeridas com MboI para a remoção dos adaptadores R, seguindo a reação: 45µg cDNA ligado covalentemente ao adaptador R24, 10µl de MboI (5U/µl), 70µl de tampão 10X e água deionizada autoclavada para completar volume final de 700µl. A digestão ocorreu a 37°C por aproximadamente 15 horas. Após digestão, as amostras (*driver*s) foram purificadas

através do kit GFX (Amersham), conforme as especificações do fabricante, quantificadas por espectrometria e armazenadas a -20°C.

3.1.10.2 Geração do cDNA *tester*

O preparo do cDNA *tester* foi feito através da ligação de novos adaptadores, J12 e J24. Uma alíquota do *driver* correspondente a 1,0µg foi empregada na ligação. Os passos a serem seguidos foram os mesmos da ligação dos adaptadores R, usando-se agora os oligonucleotídeos J12 e J24. Para um volume final de 30µg na reação de ligação. Para as duas bibliotecas, adicionou-se: 3µl tampão T4 DNA ligase 10X, 1µl *primer* J12 (500 µM), 1µl *primer* J24 (500 µM) e 1µl de T4 ligase. Ao final da ligação, completaram-se as reações para 100µl com a adição de tampão TE.

A eficiência da ligação aos adaptadores J foi testada através de PCR: 10ng do produto de ligação ao adaptador J24 (1µl da reação), Master mix 2,0X (50µl), 1µl oligo J24 (10µM) e água autoclavada para completar volume final de 100µl. As reações foram incubadas no termociclador a 72°C por 8min e a 95º C por 1min, seguido de 17 ciclos a 95°C por 1min e 70°C por 3 min e extensão final a 72ºC por 10 min. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%.

Sequência dos adaptadores J12 e J24 utilizados:

J12: 5'-GATCTGTTCATG-3'
J24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

3.1.11 Primeira hibridação subtrativa

Para a primeira hibridação subtrativa 10µg do *driver* foi adicionado a 0,1µg de *tester* J. A mistura *driver* e *tester* foi concentrada (por centrifugação a vácuo) para um volume final de 1,0µl. Posteriormente, a mistura foi ressuspendida em 4,0µl de tampão Ee3X (60µl de EPPS 0,5M; 6µl de EDTA 0,5M; 934µl de água) e incubada a 37°C por 5min. Uma gota de óleo mineral estéril foi adicionada à reação a fim de se evitar

evaporação. As amostras foram desnaturadas a 98°C por 5min e colocadas a 67°C, quando se adicionou 1,0µl de NaCl 5M (para evitar formação de precipitados). A hibridação seguiu por 20hs a 67°C. Ao final da hibridação, o material foi diluído em 200µl de TE.

3.1.12 Geração do primeiro produto diferencial (PD1)

A geração de PD1 ocorreu em três etapas. Em uma primeira PCR, houve o preenchimento inicial das extremidades dos cDNAs da primeira hibridação subrativa (item 3.1.12), o que gerou o sítio de ligação para o *primer* J24 e permitiu que somente híbridos *tester*/*tester* fossem amplificados exponencialmente. As reações da primeira PCR constituíram de: 5µl da solução de hibridação diluída, 25µl de Master mix 2,0X (Promega), 0,3µl oligo J24 (2µg/µl) e água deionizada autoclavada para volume final de 50µl. As reações foram incubadas no termociclador por 72°C por 8 min (reação de preenchimento das extremidades 5'). O programa de PCR utilizado foi de 11 ciclos a 95°C por 1min, 70°C por 3min e extensão final a 72°C por 10 min.

A partir do produto da primeira PCR foi feita uma diluição de 1:10, com água destilada e autoclavada. Desta diluição foram usados 20µl como molde para a segunda amplificação com volume final de 100µl. Em seguida, uma segunda PCR amplificou os híbridos *tester*/*tester*. O programa de PCR utilizado foi o de: 95°C por 1min, 18 ciclos a 95°C por 1min e 70°C por 3min com extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram purificados pelo kit GFX (Amersham), dosados por espectrometria e analisados em gel de agarose 1%.

3.1.13 Troca de adaptadores no produto diferencial (PD1)

Para a remoção do adaptador J24, 2µg do primeiro produto diferencial foram submetidos à digestão por MboI. Nesta reação, adicionou-se 8 µl de MboI (5U/µl), 10 µl

de tampão 10X, água deionizada autoclavada para completar o volume final de 100µl. A reação foi incubada a 37°C por aproximadamente 15 horas. As reações foram purificadas pelo kit GFX e quantificadas por espectrometria.

Em seguida, foi realizada a ligação de novos adaptadores (N) a 200ng de PD1 digerido. PD1 foi ligado aos oligos N12 e N24 em uma reação semelhante às demais ligações de adaptadores descritas. Para um volume final de 30 µl, adicionou-se: 3µl tampão T4 DNA ligase 10X, 1µl *primer* N12 (500 µM), 1µl *primer* N24 (500 µM) e 1 µl de T4 ligase. Ao final da ligação, completaram-se as reações para 160µl com a adição de tampão TE.

A eficiência da ligação aos adaptadores N foi testada através de PCR: 10ng do produto de ligação ao adaptador N24 (8 µl da reação de ligação), Master mix 2,0X (50µl), 0,65µl oligo N24 (20µM) e água deionizada autoclavada para completar volume final de 100µl. As reações foram incubadas no termociclador a 72°C por 8min e a 95º C por 1min, seguido de 17 ciclos a 95°C por 1min e 72°C por 3 min e extensão final a 72ºC por 10 min. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% .

Sequência dos adaptadores N12 e N24 utilizados:

N12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'
N24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

3.1.14 Segunda hibridação subtrativa e geração do segundo produto diferencial (PD2)

Na segunda hibridação subtrativa 10µg do *driver* foi adicionado a 12,5ng do *tester* N. As reações seguiram o mesmo protocolo da primeira hibridação subtrativa, exceto que o produto de hibridação foi diluído em 130 µl de TE. Após a subtração foram feitos os experimentos para a geração de PD2. Na reação da PCR inicial aos 5µl da solução de hibridação diluída, foram adicionados 25µl de Master mix 2,0X (Amersham), 0,65µl oligo

N24 (100µM) e água deionizada autoclavada para volume final de 50µl. A reação foi incubada no termociclador por 72°C por 8 min, seguido de 11 ciclos a 95°C por 1min, 72°C por 3min e extensão final a 72°C por 10min.

O produto da primeira PCR foi diluído 10 vezes. Desta diluição foram utilizados 10µl como molde para a segunda amplificação com volume final de 100µl (mantendo a proporção de 1:10). Foram realizadas 2 reações para cada biblioteca. O programa utilizado foi o de: 95°C por 1min, 18 ciclos a 95°C por 1min e 72°C por 3min com extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. O segundo produto diferencial obtido foi purificado pelo kit GFX e mantido a -20ºC.

3.1.15 Preparo das células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada de *E. coli* da linhagem DH10β foi inoculada em 10 ml de meio LB e incubada a 37ºC, sob agitação de 180 rpm, por aproximadamente 16 horas. Uma alíquota de 100µl deste pré-inóculo foi adicionada a 1L de meio LB e cultivada sob agitação vigorosa até que a cultura atingisse a densidade óptica (A_{600}) de 0,5 a 0,8. O frasco de cultura foi resfriado em recipiente com gelo por 30 min e as células recuperadas por centrifugação a 4000*g* por 15 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado, as células foram cuidadosamente ressuspendidas em 1 L de água destilada estéril e centrifugadas sob as mesmas condições. O precipitado de células foi ressuspendido em 0,5 L de água destilada estéril e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 10 ml de glicerol 10% a 4ºC e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O precipitado de células foi ressuspendido em 3 ml de glicerol 10% a 4ºC. A suspensão de células eletrocompetentes foi aliquotada e estocada a -80ºC.

3.1.16 Clonagem

O segundo produto diferencial obtido, após a segunda hibridação subtrativa, foi ligado ao vetor pGEM-T-easy pela ação da enzima T4 DNA ligase (Promega). Os produtos diferenciais foram fracionados em gel de agarose 1%, recortados na faixa de aproximadamente 150 a 300 bp e de 300 a 600 bp, para ambas as bibliotecas e purificados pelo kit GFX, como citado anteriormente. As reações de ligação foram incubadas a 4ºC por períodos de aproximadamente 14 horas, utilizando-se 1µl de vetor, 3µl de inserto, 5µl de tampão de ligação e 1µl de T4 DNA ligase. Após a incubação, as misturas de ligação foram mantidas a -20ºC por até 48 horas antes de serem usadas em experimentos de eletro-transformação. Tubos contendo alíquotas de 70 µl de células eletrocompetentes foram descongelados e mantidos em gelo. Volumes de 3µl de reação de ligação foram adicionados às suspensões de células, misturados gentilmente e mantidos em gelo. O aparelho Gene Pulser (Biorad) foi ajustado a 1,8kV, 200Ω, 25µF. A suspensão de células contendo o DNA foi transferida para cubetas de eletroporação geladas, que foram encaixadas ao aparelho Gene Pulser e submetidas à corrente elétrica. As cubetas foram imediatamente removidas, as células ressuspendidas em 0,5 ml de meio LB e transferidas para tubos eppendorf estéreis. As culturas foram mantidas a 37ºC por 1 hora, sob agitação de 180 rpm.

Decorrido este período, alíquotas das culturas foram plaqueadas com meio LB-ágar (1,5%), contendo 100µg/ml de ampicilina, na presença de X-Gal (4µg/ml) e IPTG (4µg/ml), para a seleção dos transformantes e incubadas em estufa a 37ºC por aproximadamente 15 horas. Estas alíquotas foram diluídas para a obtenção de colônias isoladas para posterior extração do DNA plasmidial e sequenciamento.

3.1.17 Extração de DNA plasmidial

Dois protocolos de extração foram utilizados nesta fase. Inicialmente, O DNA plasmidial com o inserto foi purificado através de mini preparações utilizando-se do *FastPlasmid Mini kit* (Eppendorf), seguindo as instruções que acompanham o produto. O outro protocolo foi o de extração por micro-placa, que segue o mesmo princípio do primeiro protocolo, realizado para obtermos um maior número de clones por preparação.

3.1.18 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger e colaboradores (1977), com moléculas de DNA dupla fita marcadas fluorescentemente, utilizando-se o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Nesta reação, foram usados os *primers* universais M13 direto ou M13 reverso. Para análise fluorescente das sequências, utilizaram-se os aparelhos ABI-PRISM 377 ou ABI-PRISM 310. As sequências geradas foram diretamente enviadas na forma de cromatograma, para um computador PowerMac (Macintosh), conectado ao seqüenciador, para serem analisados e transformados em sequências de nucleotídeos, pelo pacote ABI Prism DNA Sequencing Analysis Software v3.4 (PE Biosystems).

3.1.19 Análise das sequências

Os contigs foram obtidos a partir de cromatogramas que foram analisados por um *pipeline* construído com o programa Egene (Durham et al. 2005). Os programas e parâmetros utilizados neste *pipeline* foram: pacote Phrep-Phrap (qualidade mínima = 15), Cross Match (qualidade mínima = 35), BLAST contra sequências contaminantes (rRNA, mtDNA), Assemble CAP3.

3.1.20 Desenho dos *primers*

Das sequências anotadas, quatro foram selecionadas para validação das bibliotecas subtrativas das glândulas hipofaríngeas. Os *primers* foram desenhados com auxílio dos programas Gene Runner (versão 3.05) e *Primer* 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/*primer*3/*primer*3_www.cgi), através dos genes preditos de *Apis mellifera*.

Segue abaixo a lista de *primers* desenhados e os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação esperados para os genes diferencialmente expressos encontrados pela biblioteca subtrativa.

Gene *buffy*

buffy-F: 5´ GAA GTG CCA TGT TGC TTC CT 3´
buffy-R: 5´ ACA TCC AAT TTG TCG TGC AA 3´
Fragmento esperado de 128 nt

Gene *amy*

amy-F: 5´ AAA GCG GGT GTA CGG ATC TA 3´
amy-R: 5´ TAG GGC ACT TGC GGA TAG TC 3´
Fragmento esperado de 125 nt

Gene *α-glico*

α-glico-F: 5’ TGC TTA TCG AGG CAT ACA CG 3’
α-glico-R: 5’ CGT CAT CCA ATT ATC GAC CA 3’
Fragmento esperado de 149 nt

Gene *mrjp4*

mrjp-4-F: 5’ GAC GAC AGA GGT GAC GCT TT 3’
mrjp-4-R: 5’ TTC CAT CAT GCA CTG TGA AAC 3’
Fragmento esperado de 139 nt

3.1.21 Teste do*s primers*

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 μg de RNA total de operárias nutriz e forrageiras, utilizando-se o sistema de síntese SuperScriptTM (InvitrogenTM, Life

Technologies). Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através da transcrição reversa (RT) utilizando-se oligo(dT)12-18 (0,5µg/µl). As reações seguiram as especificações do fabricante. Utilizando-se do cDNA de fita simples, realizou-se uma amplificação por PCR, utilizando os *primers* desenhados para testar o funcionamento dos mesmos. A cada reação de PCR, foi adicionado: 10 µl de Master Mix (Eppendorf), 1 µl de cada *primer* (10µM), 2,0 µl de cDNA diluído 10x e 11 µl de água deionizada estéril. A PCR teve as seguintes condições: 3 minutos a 94ºC, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 60ºC, 30 segundos a 72ºC e extensão final a 72ºC por 7 minutos.

3.1.22 Quantificação das bibliotecas subtrativas

A fim de quantificar a expressão os genes alvos, realizou-se real time RT-PCR com os genes selecionados. Os *primers* utilizados estão descritos no mesmo item. Para cada gene foi estabelecida uma curva padrão com diferentes diluições de cDNA e a curva de dissociação para controle de contaminações, tais como dímeros de *primer*. GH foram novamente dissecadas, o RNA total extraído foi submetido a tratamento com DNase. 1 µg de RNA total foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR convencional), diluído 20 vezes para a realização da real-time RT-PCR. Utilizou-se *pools* contendo 3 glândulas por grupo (triplicata técnica). A abundância dos transcritos foi calculada com base na diferença do valor de Ct (limiar do ciclo de PCR) em relação aos transcritos de *RP49* de *A. mellifera*, gene endógeno, usado como controle interno, de acordo com as instruções do boletim do usuário #2 da Applied Biosystem (Relative Quantification of Gene Expression; ABI Prism 7700 Sequence Detection System). Os *primers* utilizados do gene endógeno *RP49* foram:

RP49-F: 5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3' e
RP49-R: 5'- TTGAGCACGTTCAACAATGG-3',
seu *amplicon* estimado é de 150 pb.

3.2 Estudos de cromatografia gasosa

3.2.1 Material biológico

No apiário da USP de Ribeirão Preto foi montada uma colônia *single-cohort* (composta de 4000 operárias de mesma idade). Todas as abelhas desta colônia foram previamente marcadas com tinta, no tórax, e foram introduzidas juntamente com uma rainha formando assim, uma colônia. 300 operárias recém-emergidas de uma colônia normal (controle) foram marcadas da mesma forma e reintroduzidas na colônia original. Em ambos os casos as abelhas com idades controladas foram obtidas da seguinte maneira: quadros contendo pupas em fases adiantadas do desenvolvimento foram colocados em estufas a 34ºC e aproximadamente 80% de umidade relativa e após a emersão, marcadas e reintroduzidas na colônia de origem.

3.2.2 Observação de comportamento

O comportamento das abelhas foi regularmente observado e a coleta das abelhas foi realizada em duas idades distintas: a primeira coleta com 14 dias e a segunda com 30 dias, o que corresponderia às fases de nutriz e forrageira, respectivamente. Como controle marcou-se operárias recém-emergidas e estas foram introduzidas em uma colônia padrão. Após cinco dias à introdução dessas abelhas, as operárias que estavam alimentando as larvas foram consideradas nutrizes e coletadas como controle desse comportamento. Abelhas, com aproximadamente 25 dias, marcadas e voltando com pólen na corbíbula, foram consideradas forrageiras e utilizadas como controle dessa função.

3.2.3 Preparação da amostra

Logo após a coleta, um *pool* de 5 cabeças (do item 3.2.2) foi coletado para construção das bibliotecas, para se proceder o estudo de genes marcadores de envelhecimendo. Essa análise foi feita por PCR em tempo real.

Para obtenção dos perfis de hidrocarboneto, as cabeças das abelhas foram separadas e colocadas em pentano por 10 minutos, para obtenção dos extratos e posterior análise em GC e GC-MS.

3.2.4 Confirmação da Condição Fisiológica

As operárias foram anestesiadas em gelo antes da coleta de hemolinfa. De cada abelha, 1 µl de hemolinfa foi coletado para posterior análise do perfil das proteínas, por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 7,5%.

Também foi coletado 1µl de hemolinfa e adicionado a 500 µl de acetonitrila para dosagem de HJ por radioimunoensaio.

3.2.5 Análises cromatográficas (GC e GC-MS)

As amostras provenientes da colônia *single-cohort*. coletadas em Ribeirão Preto foram analisadas por, por GC-MS, em cooperação com o grupo da Universidade de Regensburg, Alemanha. Os principais componentes dos perfís de hidrocarbonetos cefálicos já são bem estabelecidos para *A. mellifera* (Katzav-Gozansky et al., 2001) e podem caracterizar as diversas fases do desenvolvimento das abelhas adultas, constituindo, portanto, em uma abordagem adequada para análise das amostras das abelhas descritas acima.

Os testes incluíram um total de 60 amostras coletadas em pentano. As análises foram feitas com a técnica de cromatografia gasosa em um aparelho Agilent Technologies

6890-N com uma coluna HP5, sistema de injeção split/splitless, detector FID e um gradiente de temperatura de 60°C – 300°C (5°C/min).

As áreas correspondentes aos picos dos cromatogramas, em diferentes posições devido aos diferentes *retention time* (RT) de cada composto diretamente relacionado ao maior número de carbonos de cada composto foram utilizadas para quantificação. Comparou-se os grupos por análise estatistica multivariada. A análise dos componentes principais (PCA) foi utilizada para se optar pelos principais picos a serem comparados uma análise de discriminância foi utilizada para se confirmar o perfil químicos dos grupos testados. Os compostos que não fossem encontrados em um grupo com pelo menos 60% de seus integrantes com mais de 1% seriam desconsiderados.

3.2.6 Radioimunoensaio (RIA) para HJ

O método de extração de HJ a partir de hemolinfa foi baseado no protocolo descrito por Huang et al (1994). As amostras (1ul de hemolinfa) diluídas em 500 µl de acetonitrila foram transferidas para tubos de 5 ml, onde foi adicionado 1 ml de NaCl 0,9% e 1 ml de hexano para extração da fase líquida, com HJ acumulado na fase orgânica. Esta mistura foi cuidadosamente agitada antes de ser centrifugada. A fase orgânica foi transferida para um tubo novo e a extração da fase aquosa repetida mais duas vezes, com adição de 1 ml de hexano por vez. Perfazendo assim, um volume de 3 ml de hexano contendo o HJ presente na amostra. O hexano foi evaporado utilizando-se centrifugação a vácuo (SpeedVac), e o HJ foi redissolvido em 75 µl de tolueno e transferido para tubo RIA

Para preparação da curva padrão, foram adicionados 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, e 100 µl de solução de HJ3 (100ng/ml de metanol) em tubos de 1 ml com auxílio de seringa Hamilton (1-50 µl).

Os tubos contendo as amostras e os da curva padrão foram centrifugados a vácuo (SpeedVac) para a remoção dos respectivos solventes, antes de serem acrescentados 50 µl de solução *tracer* (solução de ^{3}H-HJ3 com atividade de 6500 com) e de, 200 µl de soro anti-HJ3. Todos os tubos foram agitados vigorosamente e mantidos a 4ºC por 16 horas. Após este período, foram adicionados 250 µl de solução saturada de sulfato de amônia (para precipitação das proteínas), seguido de centrifugação a 7500 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados com 500 µl de solução de sulfato de amônia 50%. Após agitação e permanência a 4ªC por mais 30 minutos, os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 7500 rpm.

Os precipitados foram ressuspendidos em 40 µl de água destilada. Após agitação, estas amostras foram transferidas para frascos de cintilação líquida, onde foram também acrescentados 5 ml de líquido de cintilação HiSafe3® (Wallac-Packard). A quantificação da emissão beta ocorreu em espectrômetro de cintilação líquida (Multi-Purpose Scintillation Counter/LS 6500 Beckman – USA).

Os valores das leituras das amostras da curva padrão foram transformados em log/logit para regressão linear, permitindo assim o cálculo das concentrações de HJ3, em pg de HJ3/µL de hemolinfa, usando-se o programa Sigma Stat

3.2.7 Metodologia para análise de proteínas da hemolinfa

3.2.7.1 Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise eletroforética de proteínas presentes na hemolinfa, foram utilizados géis de poliacrilamida descontínuos, compostos de duas partes, empacotamento (4,26%) e separação (7,5%) com modificações a partir de Laemmli (1970).

Diluiu-se 1 µl de cada amostra de hemolinfa em água UPA q.s.p. 10 µl (10x diluída). Deste total, 1 µl, por amostra, fui utilizado para eletroforese. Essas alíquotas

foram homogeneizadas em 19 µl de tampão da amostra (1,25 ml Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, 0,5 ml de sacarose 70% (m/v), 0,1 g de SDS, 0,25 ml de β-mercaptoetanol, 10 µl de azul de bromofenol 1%, 3 ml de água UPA); em seguida desnaturadas por ebulição por 3 minutos, resfriadas em gelo e centrifugadas a 7000x g por 30 segundos à temperatura ambiente e os volumes de 20 µl aplicados em géis (100 x120 x0,9 mm). A eletroforese vertical das proteínas foi processada a uma corrente constante de 15 mA e a 4ºC, até que a migração do corante atingisse a extremidade inferior da placa de vidro. Foram utilizados marcadores de massa molecular (Sigma-Aldrich) constituídos das seguintes proteínas: miosina (205 KDa), β-galactosidase (116 KDa), fosforilase-B (97 KDa), albumina sérica (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa) e anidrase carbônica (29 KDa). Dois tipos de coloração foram testados, com *Comassie Brillant Blue* e Nitrato de prata.

Para a coloração 1g de *Comassie Brillant Blue* R-250 (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em uma solução de etanol, água UPA e ácido acético, na proporção de 5:5:1 (v/v) os géis foram corados por no mínimo 30 minutos. Posteriormente, os géis foram lavados em solução etanol, água UPA e ácido acético, na proporção de 3:6:1 (v/v), por 12 horas. Os impregnados com nitrato de prata seguiram o método proposto por Caetano-Anollés e Gresshoff (1994).

Após a lavagem os géis foram digitalizados e as imagens resultantes foram analisadas pelo software Kodak® 1D – Scientific Imaging Systems (versão 3.6.2) para quantificar a intensidade da coloração e a espessura das bandas referentes à vitelogenina e apoLp–1. A proteína apoLp–1 não apresenta variações durante o desenvolvimento das abelhas *A. mellifera* (Guidugli *et al*., 2005), por isto, esta proteína foi utilizada para normalização dos níveis de vitelogenina.

3.2.8 Análise da expressão dos genes de interesse

As análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real. Alíquotas de reações para produção de cDNA foram utilizadas para amplificação por PCR visando a quantificação relativa dos genes de interesse em diferentes condições. Para a normalização das reações de RT-PCR foi utilizado a expressão do gene da proteína ribossomal RP49, cuja expressão é considerada constitutiva.

Para a metodologia utilizada para análise de expressão gênica foram utilizados *primers* específicos desenhados baseados sobre as sequências já descritas dos genes (ver Tabela I).

Tabela I. Sequência dos *primers* utilizados para análises de expressão dos genes candidatos a participar do envelhecimento das operárias. O gene *RP49* foi usado como controle endógeno**.**

Gene	***Sequências dos primers utilizados***
Alfa-glicosidase	*Forward* ? 5' – TGC TTA TCG AGG CAT ACA CG – 3' *Reverse* ? 5' – CGT CAT CCA ATT ATC GAC CA – 3'
Buffy	*Forward* ? 5' – GAA GTG CCA TGT TGC TTC CT – 3' *Reverse* ? 5' – ACA TCC AAT TTG TCG TGC AA – 3'
Amilase proximal	*Forward* ? 5' – AAA GCG GGT GTA CGG ATC TA – 3' *Reverse* ? 5' – TAG GGC ACT TGC GGA TAG TC – 3'
Major Royal Jelly-4	*Forward* ? 5' – GAC GAC AGA GGT GAC GCT TT – 3' *Reverse* ? 5' – TTC CAT CAT GCA CTG TGA AAC – 3'
Superoxido dismutase	*Forward* ? 5' – AGC AGA TGC AAG TGG TGT TG– 3' *Reverse* ? 5' – GAG CAC CAG CAT TTC CTG TAG –3'
Vitelogenina	*Forward* ? 5' – GCAGAATACATGGACGGTGT– 3' *Reverse* ? 5' – GAA CAG TCT TCG GAA GCT TG– 3'
RP49	*Forward* ? 5' – CGTCATATGTTGCCAACTGGT– 3' *Reverse* ? 5' – TTGAGCACGTTCAACAATGG–3'

A reação de amplificação foi feita utilizando-se 12,5µl de *SYBR Green PCR Master Mix* (2x), Applied Biosystems; 1µl de cada *primer* (10ρmol), 9,5 µl de água esterilizada e uma alíquota de 1µl do cDNA pré-sintetizado. Para esta metodologia, os *primers* utilizados

foram testados quanto a sua eficiência na reação. Os resultados foram analisados pelo *software* do aparelho, módulo – Relative quantification. O *threshold* (ciclos limítrofes) e a linha de base foram ajustados automaticamente pelo sistema. Para análise dos dados extraídos, os valores ciclo-a-ciclo da densidade relativa de fluorescência (DRn) emitida por cada triplicata de uma mesma amostra, organizados em planilhas individuais de *Excel for Windows* (Microsoft), para cada gene e fase do desenvolvimento estudados. A quantificação dos transcritos do gene alvo foi calculada a partir da diferença dos valores de Ct (*threshold PCR cycle*) em relação aos transcritos do gene endógeno, *rp49*, de acordo com instruções do *User Bulletin #2* (Applied Biosystem). Primeiramente são feitas as médias dos Ct das três leituras de cada amostra, tanto do gene alvo quanto do gene endógeno. De cada amostra, subtrai-se o valor da média de $Ct_{\text{gene alvo}}$ do $Ct_{\textit{gene endógeno}}$, obtendo-se o ΔCt. Posteriormente escolhe-se um ΔCt que corresponda a um calibrador e normalizam-se todos os valores subtraindo pelo ΔCt escolhido. Obtemos então, o ΔΔCt. Finalmente, o valor final de quantificação relativa é dado pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o calibrador ou amostra padrão escolhida é igual a um grupo com menor expressão do gene codificador alvo e as demais tomadas proporcionais a essa.

4. RESULTADOS

–

4.1 Síntese da dupla fita de cDNA por LD-PCR

Após a síntese da primeira fita de cDNA com *primer* oligo dT (*primer* CDS), a segunda fita foi sintetizada para as duas bibliotecas (operárias nutrizes e forrageiras). Observamos que obtivemos uma amplificação sem artefatos e com um padrão de bandeamento de cDNA de aproximadamente 0,4 a 2,0 kb (Figura 3). Para evitar o efeito de "overcycling", foi escolhido o 22º ciclo para as operárias nutrizes e o 24º ciclo para as forrageiras obtendo-se cDNA fita dupla em grande quantidade, preparando-se 5 reações para cada biblioteca (Figura 4).

4.1.1 Geração das Representações

A geração das representações corresponde à amplificação do cDNA dupla fita a ser empregadas nas hibridações subtrativas. A reação de amplificação é padronizada a fim de se evitar o efeito "overcycling".

4.1.2 Padronização da PCR

Após a ligação dos adaptadores R foram feitos dois testes de PCR para padronização das reações que deram origem às representações. Nas reações pilotos, alíquotas de produtos de PCR foram retiradas nos ciclos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 para as populações de cDNA, permitindo a escolha do número de ciclos adequado para as etapas posteriores. Foi selecionado o ciclo 16º, o qual correspondeu àquele que produziu produtos amplificados na faixa de 0.3-1.0kb, durante a fase exponencial. Neste ciclo, observa-se aumento da amplificação em relação aos ciclos anteriores, porém não apresentam a saturação observada nos respectivos ciclos posteriores (Figura 5).

–

Padronizada a PCR para gerar as representações, novas reações foram feitas com o objetivo de produzir a massa mínima de cDNA para cada biblioteca (ON e OF). As PCRs produziram cerca de 40 μg de produto, que foi empregado em nova digestão por MboI.

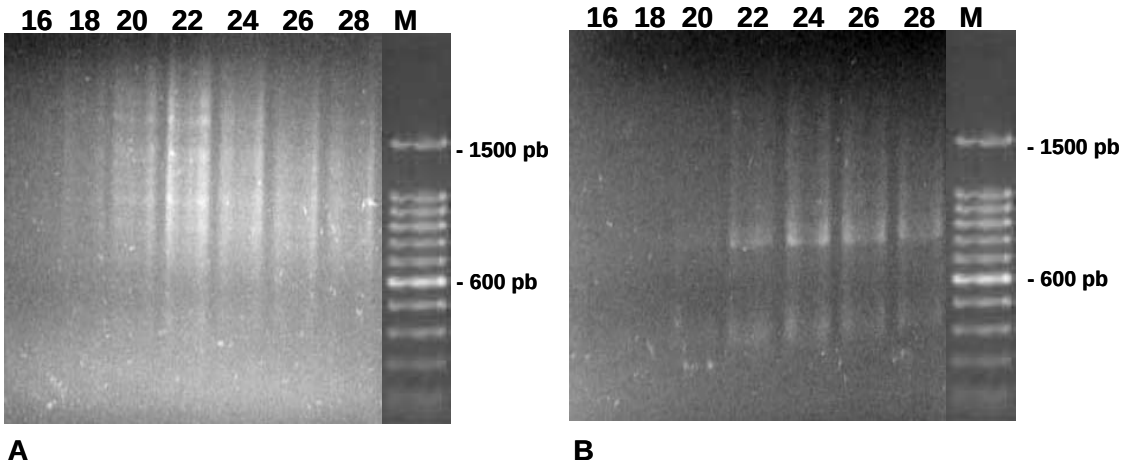


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à LD-PCR das bibliotecas de cDNA das glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (A) e forrageiras (B). Alíquotas foram coletadas nos ciclos 16-28. Os marcadores de peso molecular (M) são dados em pares de base (pb).

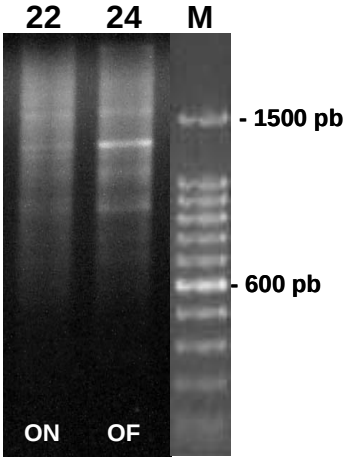


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de cDNA de glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (ON) e de operárias forrageiras (OF) após amplificação por LD-PCR de 22 ciclos e 24 ciclos respectivamente. O marcador de peso molecular (M) é dado em pares de base (pb).

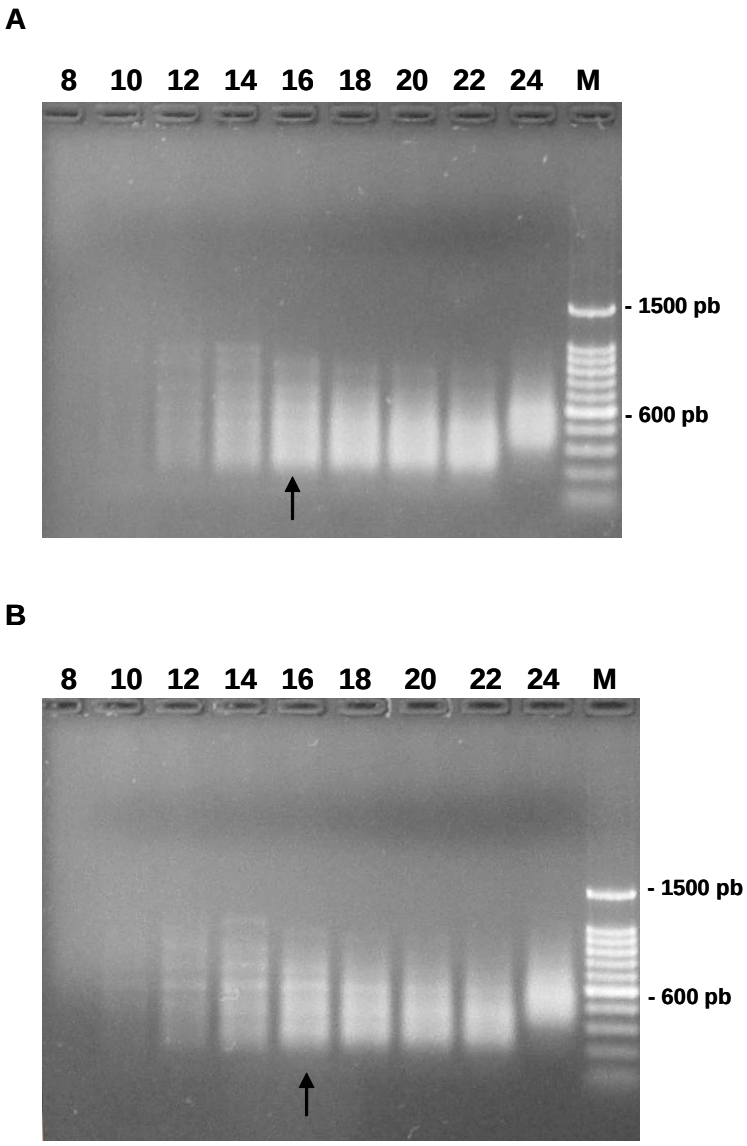


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à padronização da PCR, para geração das representações das bibliotecas de cDNA das glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (A) e operárias forrageiras (B). Alíquotas foram coletadas nos ciclos 8-24. O marcador de peso molecular (M) é dado em pares de base (pb). As setas indicam o ciclo escolhido para a síntese de cDNA em larga escala.

4.1.3 Geração do cDNA J (tester)

Para as duas bibliotecas mencionadas acima, foram realizadas as reações de ligação com dois oligonucleotídeos J12 e J24. Após a ligação dos adaptadores J, uma PCR foi realizada para verificar a eficiência da ligação, mostrando que o adaptador J24 estava ligado através da presença de amplificados. Na análise do gel de agarose, observamos um "rastro" na amplificação dos fragmentos, demonstrando que a ligação de J24 foi satisfatória para os passos posteriores da metodologia de RDA (Figura 6).

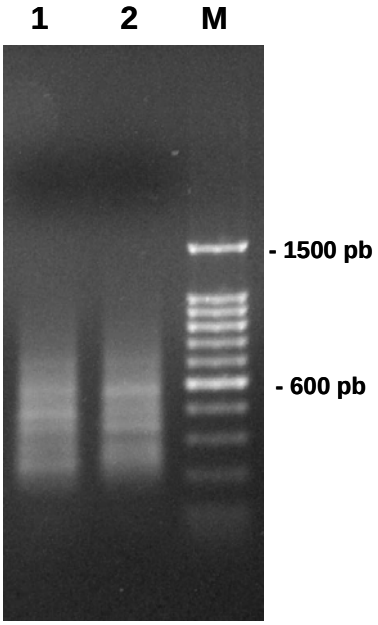


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de ligação do adaptador J24 aos produtos das amplificações por PCR. Populações de cDNA de glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (1) e operárias forrageiras (2). O marcador de peso molecular (M) é dado em pares de base (pb).

4.1.4 Geração do primeiro produto diferencial (PD1)

Na primeira hibridação subtrativa, as duas populações de DNA, *tester* e *driver*, foram misturadas em uma proporção 1:100. Apenas os híbridos *tester*/*tester* puderam ser amplificados exponencialmente, pela presença de dois adaptadores J24 ligados covalentemente aos fragmentos, e foram analisados em gel de agarose. Os fragmentos resultantes desta amplificação estão predominantemente entre 1.0-0.3 kb. Podemos observar no padrão obtido, algumas bandas diferentes entre as duas bibliotecas já nesta fase da construção da biblioteca subtrativa (Figura 7).

4.1.5 Geração do cDNA N (tester)

Após a ligação dos adaptadores N, uma PCR de verificação da eficiência da ligação foi novamente realizada. Utilizando o oligonucleotídeo N24 como *primer*, obtivemos clara presença de amplificados, o que demonstra a ligação deste adaptador (Figura 8).

4.1.6 Geração do segundo produto diferencial (PD2)

Devido à possibilidade de eventos aleatórios na primeira hibridação subtrativa, as diferenças observadas poderiam ser aparentes. Por esta razão, foi realizada a segunda hibridação com uma proporção *tester*/*driver* de 1:800, aumentando a seleção contra fragmentos presentes em ambas as bibliotecas (Figura 9). Podemos observar que os cDNAs do primeiro produto diferencial foram enriquecidos pelo segundo passo de subtração (compare figuras 7 e 9). As bandas diferencialmente expressas ficaram mais evidentes no gel de agarose após a segunda subtração.

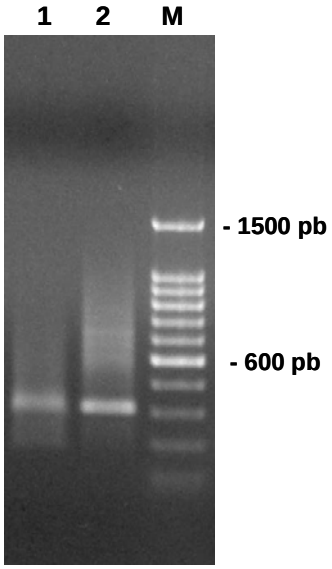


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos resultantes da primeira hibridação subtrativa das representações de glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (1) e forrageiras (2). O marcador de massa molecular (M) é dado em pares de base (pb).

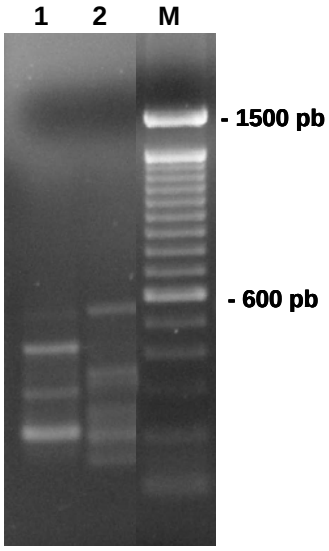


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de ligação do adaptador N24 aos produtos das amplificações por PCR. Amostra de cDNA de glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (1) e forrageiras (2). O marcador de peso molecular (M) é dado em pares de base (pb).

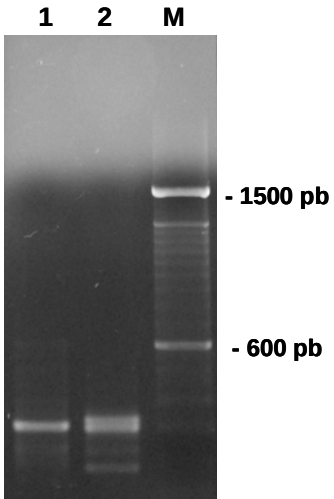


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos resultantes da segunda hibridação subtrativa das representações de glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes (1) e forrageiras (2). O marcador de peso molecular (M) é dado em pares de base (pb).

4.1.7 Sequenciamento

4.1.7.1 Biblioteca de glândulas hipofaríngeas

Nesta biblioteca, genes mais expressos em operárias nutrizes foram os genes-alvo das amplificações por PCR. Foi seqüenciado e submetido ao *pipeline* um total de 96 clones, sendo que na metade dessa biblioteca o *tester* foi operária nutriz e na outra metade operária forrageira. Dentre as sequências analisadas um total de 63 sequências passaram pelos parâmetros do *pipeline,* filtro de qualidade 1e-10 (em Anexo). Para identificação dos *contigs* ou *singlets* resultantes das bibliotecas subtrativas sobre a versão 4 do genoma de *A. mellifera* utilizou-se BLAST-N (disponível na Internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Para cada uma das sequências foi encontrada uma região genômica (também chamada *Group*) que equivale a sua localização cromossômica. Utilizando-se BLAST-X, se confrontou essas sequências ao *Official Gene Set*, um banco de dados de proteínas preditas a partir do genoma. O número de acesso das proteínas no *Official Gene Set* inicia-se pelas letras 'GB'. Extraiu-se então, no formato FASTA, cada uma dessas sequências preditas. Finalmente essas sequências preditas foram utilizadas como entrada em análises de BLAST-P para identificação de ortólogos em *D. melanogaster.* Essas informações estão organizadas na Tabela II.

4.1.7.2 RT-PCR semi-quantitativo

Um dos genes encontrado diferencialmente expresso em operárias nutrizes foi o *buffy*, possivelmente ligado à prevenção da atrofia precoce das glândulas hipofaríngeas nas operárias nutrizes e atrofia nas operárias forrageiras. (Figura 10).

–

Também expresso diferencialmente em operárias nutrizes foi o gene da enzima amilase proximal - *amy* ligado ao metabolismo de carboidratos (Figura 10).

Tabela II. Caracterização *in silico* das sequências diferencialmente expressas em glândulas hipofaríngeas de operárias nutrizes e forrageiras.

Tarefa	Contig*	Localização Genômica	Proteína Predita em *Apis mellifera*	Ortólogo em *D. melanogaster*	Processo Biológico**
Nutriz	01, 02 e 06	Cromossomo 3 (Group3.29)	GB18455-PA (e-value=7e-36)	*buffy* (CG8238, e-value=1e-49)	apoptose, anti-apoptose
Forrageira	3	Cromossomo 13 (Group13.14)	GB18312-PA (e-value=4e-11)	*amy* (CG1830, e-value=e-158)	metabolismo de carboidratos
	4	Cromossomo 6 (Group6.16)	GB19017-PA (e-value=5e-21)	*a-glico* (CG14934, e-value=2e-21)	metabolismo de carboidratos
	5	Cromossomo 11 (Group11.9)	GB11768-PA (e-value=5e-10)	*mrjp-4* (CG9891, e-value=1e-69)	-
	Singlets	Cromossomo 4 (Group4.15)	-	-	-

* Contig: as sequências consenso do pipeline estão descritas no Apêndice

** termos de acordo com o Gene Ontology (*www.geneontology.org/*)

Para os genes diferencialmente expressos em biblioteca de operárias forrageiras encontrou-se o gene *mrjp-4*, pertence à família de proteínas codificadoras da geleia real - MRJP.

Outro gene diferencialmente encontrado na biblioteca de forrageira foi o *α-glico*, codificador da enzima α-glicosidase (Figura 11).

4.1.7.3 Validação das bibliotecas subtrativas por PCR quantitativa

Para validar genes específicos de operárias nutrizes e forrageiras, detectados seletivamente pela metodologia RDA, as novas bibliotecas foram submetidas a Real Time PCR, com seus respectivos *primers*.

–

Pode-se verificar pelos gráficos de quantificação relativa, o gene *buffy*, que possivelmente está ligado à prevenção da atrofia precoce da glândula hipofaríngea. Nossos resultados demonstram que há uma expressão levemente maior nas bibliotecas nas quais os encontramos inicialmente, validando as bibliotecas subtrativas. Enquanto que os genes *mrjp-4, amy* e *α-glico*, ligado ao metabolismo de carboidratos tiveram uma maior expressão na biblioteca onde o cDNA testado foi o de operárias forrageiras (Figura 12).

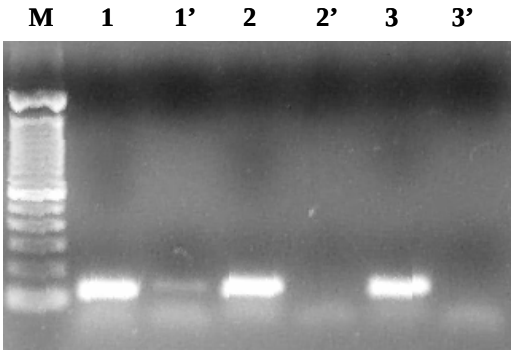


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de RT-PCR semi-quantitativa das bibliotecas de operárias nutrizes. As amostras 1 e 3 referem-se ao gene *buffy* com seus respectivos controles negativos (1' e 3'). A amostra 2 corresponde ao gene *amy* com seu respectivo controle negativo (2'). Os fragmentos amplificados têm aproximadamente 150 pb. M corresponde ao marcador de peso molecular.

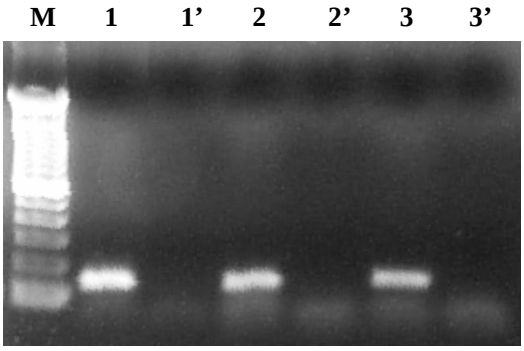


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de RT-PCR semi-quantitativa das bibliotecas de operárias forrageiras. As amostras 1 e 3 referem-se ao gene *mrjp-4* com seus respectivos controles negativos (1' e 3'). A amostra 2 corresponde ao gene *α-*

glico com seu respectivo controle negativo (2'). Os fragmentos amplificados têm aproximadamente 150 pb. M corresponde ao marcador de peso molecular.

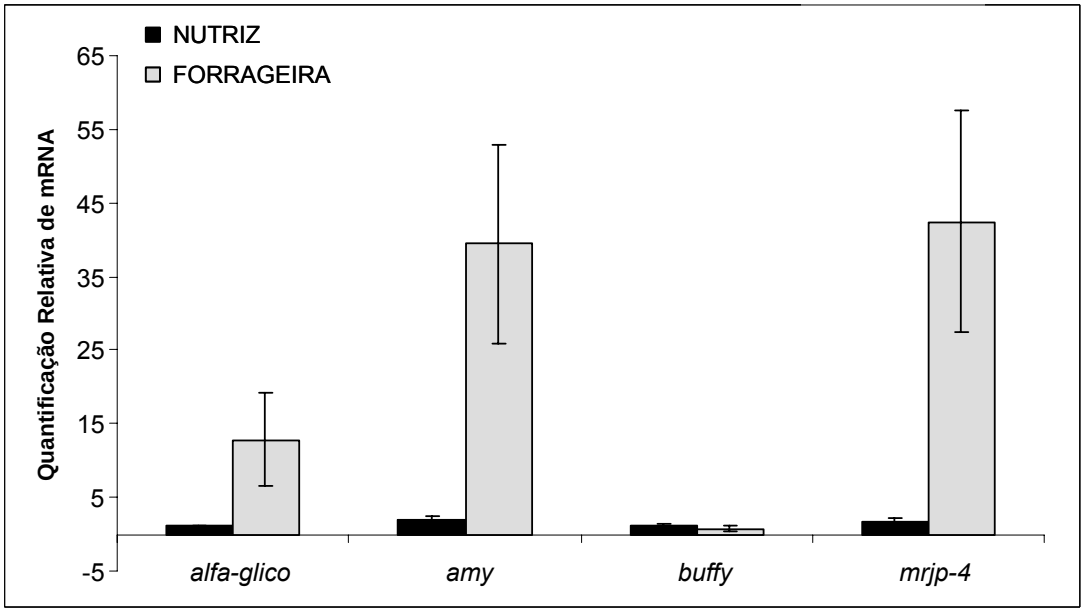


Figura 12. Níveis de expressão do mRNA dos genes *alfa-glico, amy, buffy* e *mrjp-4* em operárias nutrizes e forrageiras. A expressão do mRNA foi detectada por PCR quantitativa em tempo real, usando-se o gene *rp49* como controle para as normalizações e análises em triplicata (réplicas técnicas). Os gráficos das quantidades relativas de mRNA foram gerados à partir da quantificação de um *pool* de 3 cabeças por grupo.

Foram conduzidos testes *t de student*, utilizando-se o programa Sigma Stat 3.1, para se tentar achar uma significância dos dados. Para o gene da α-glicosidase embora cerca de 10 vezes mais expresso em forrageiras, o teste estatístico não se mostrou significativo, (p=0,04), fato atribuído a pequena diferença entre os valores médios, não se podendo excluir a possibilidade dessa diferença ser devida a variedade randômica entre as amostras. Mas observando-se o gráfico nota-se uma grande expressão entre forrageira e nutriz para esse gene; o teste pode ter falhado devido ao baixo número de amostras utilizado. O

mesmo ocorreu para o gene *amy*, o teste não se mostrou estatisticamente diferente (p=0,20), mesmo esse gene estando aproximadamente 40 vezes mais expressos em operárias forrageiras. Para o gene *buffy*, embora os valores tenham passado no teste de Normalidade (p=0,179) e no teste de Variância (p=0,489), a diferença entre as medias não foi grande o suficiente para dar significância aos valores. O gene *mrj-p4* em forrageira, mostrou uma expressão de aproximadamente 40 vezes em relação às nutrizes, mas da mesma forma que os anteriores, não houve significância no teste (p=0,01).

4.2 Colônia *single-cohort*

4.2.1 Análises Cromatográficas

Utilizando-se da técnica de GC-MS um total de 24 picos (hidrocarbonetos) foi encontrado, destes, 20 foram escolhidos conforme os métodos estatísticos adotados (Tabela III). Todos os picos foram padronizados adicionando-se 0,1 ao seu valor. As áreas foram transformadas de acordo com a fórmula: $Z_{i,j} = log[X_{i,j}/g(X_j)+1]$, onde $X_{i,j}$ representa a área de cada pico *i* para a abelha *j*, $g(X_j)$ a média geométrica da área de todos os picos para a abelha *j*, e $Z_{i,j}$ a área transformada do pico *i* para a abelha *j*. Para a análise estatística foram incluídos somente os picos com área relativa maior que 1% ocorrendo em 60% dos membros de cada grupo. As transformações absolutas de *log* dos feromônios entre idade-função foram comparadas pelo teste MANOVA pelo programa SPSS 1.3.

O número de variáveis descritas foi reduzido por análise de componentes principais (PCA). Os fatores de PCAs foram usados para análise de discriminantes (DAs) para se testar se nurse e forrageiras poderiam ser separadas com base em seu perfil de feromônios. Para PCA e DAs o software Statistica 6.0 foi utilizado.

4.2.2 Diferenciação de nutriz

–

Analizando-se as operárias nutrizes para as duas idades estudadas pode-se diferenciá-las por alguns hidrocarbonetos (C24, C27:1, C28, C31:1, C33, C35:1, C35:1) quando analisados por MANOVA (Tabelas IVa e IVb) e análise de discriminantes (Figura 13).

A classificação por DA revela que os grupos de nutrizes, controle de 5 dias e experimentais de 14 e 30 dias, separam-se claramente apesar de haver um *overlap*, encontrado em N30 e NC, conforme demonstrado pelas distâncias generalizadas de Mahalanobis (Squared Mahalanobis Distances from Group Centroids, Anexo).

Tabela III. Hidrocarbonetos cuticulares da cabeça encontrados pelas análises de GC-MS das amostras de operárias nutrizes e forrageiras. Δ significa uma posição identificada de uma dupla ligação.

C21:1	Δx-heneicoseno
C21	heneicosano
C23	tricosano
C24	tetracosano
C25	pentacosano
C26	hexacosano
C27:1	Δx-heptacoseno
C27	heptacosano
9, 11, 13 Met C27	9,11,13 Trimetilheptacosano
C28	octacosano
C29:1	Δx-nonacoseno
C29	nonacosano
9,11,13,15 Met C29	9,11,13,15 Tetrametilnonacosa
C31:1	Δx-hentriaconteno
C31:1	Δy-hentriaconteno
C31	hentriacontano
C32:2	Δx-dotriancontadieno
C33:1	Δx-tritriaconteno
C33:1	Δy-tritriaconteno
C33	tritriacontano
C35:2	Δx-pentatriacontadieno
C35:2	Δy-pentatriacontadiene
C35:1	Δx-pentatriacontano
C35:1	Δy-pentatriacontano

Tabela IVa. Variação nos hidrocarbonetos cuticulares extraídos da cabeça de operárias de *A. mellifera* presentes em nutrizes. O teste pos-hoc Tukey (Tabela Vb) mostra onde se encontram essas diferenças. ** estatisticamente diferente.

C21:1	
C23	
C24	**
C25	
C27:1	**
C27	
C28	**
C29:1	
C29	
9,11,13,15 Met C29	
C31:1	**
C31:1	
C31	
C32:2	
C33:1	
C33:1	
C33	**
C35:2	
C35:1	**
C35:1	**

Tabela IVb. Resultados ANOVA comparando quantitdades relativas dos hidocarbonetos encontrados na cabeça de nutrizes. N14, nutriz de 14 dias; N30, nutriz de 30 dias; NC, nutriz controle. Teste pos-hoc Tukey; ** estatísticamente significante $p<0.05$**.**

	N14 - N30	**N14 - NC**	**N30 - NC**
C21:1			
C23			
C24		**	
C25			
C27:1	**		
C27			
C28	**	**	
C29:1			
C29			
9,11,13,15 Met C29			
C31:1		**	**
C31:1			
C31			
C32:2			
C33:1			
C33:1			

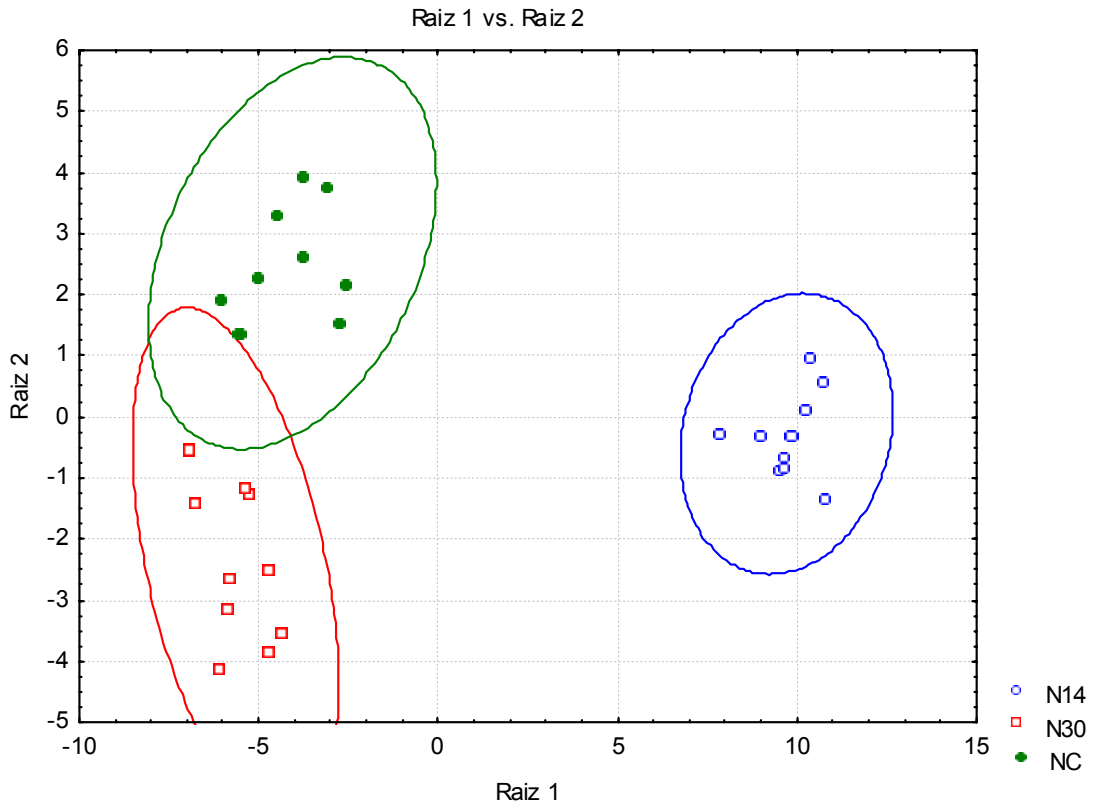


Figura 13. Análise de discriminantes da variação de hidrocarbonetos cuticulares de operárias nutrizes. As elipses estão marcadas no centróide de cada grupo.

4.2.3 Diferenciação de forrageiras

Os três grupos de forrageiras puderam ser significativamente separados por análise de discrimantes (Figura 14). O teste pos-hoc de Tukey mostra dois componentes a mais, estatisticamente diferentes para esse comportamento (Tabelas Va e Vb). As forrageiras novas podem ser distintamente separadas das forrageiras velhas, e estes dois grupos separados do grupo controle. O quadrado da distância de Mahalanobis não mostra erro de classificação nesta análise (Anexo).

4.2.4 Diferenciação idade-comportamento

A DAs em todos os grupos testados identifica uma separação em três grupos: nutrizes, forrageiras precoces e forrageiras velhas (Figura 15). Uma DA de todos os grupos estudados, operárias *single-cohort* e operárias normais, separa forrageiras e operárias independente da idade, mas não é possível separar tão claramente o grupo de nutrizes (Figura 16).

Forrageiras mais novas na *single-cohort* parecem apresentar um padrão de hidrocarbonetos cuticulares mais semelhante ao de forrageiras de uma colônia padrão. Para nutrizes essa relação se inverte, nutrizes mais velhas se assemelham a nutrizes controle, pelo menos com relação ao perfil de hidrocarbonetos encontrado.

Nutrizes, independente da idade, apresentam hidrocarbonetos cuticulares de cadeia mais longa, em relação às forrageiras (Tabela VI).

Esses dados foram úteis para o teste de genes possivelmente ligados ao envelhecimento nos experimentos com a colônia *single-cohort.*

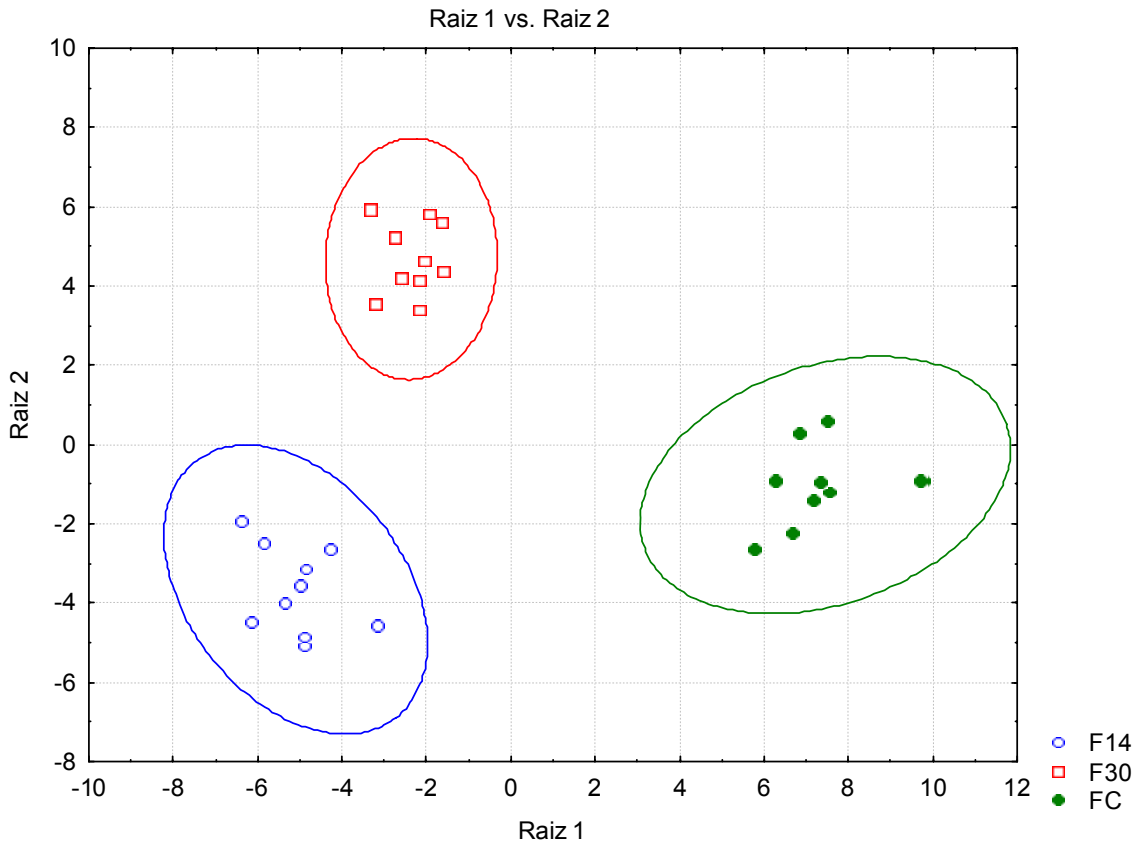


Figura 14. Análise de discriminantes da variação de hidrocarbonetos cuticulares de operárias forrageiras. As elipses estão marcadas no centróide de cada grupo.

Tabela Va. Variação nos hidrocarbonetos cuticulares extraídos da cabeça de operárias de *A. mellifera* presentes em forrageiras. O teste pos-hoc Tukey (Tabela VIb) mostra onde se encontram essas diferenças. ** estatisticamente diferente.

C21:1	
C23	
C24	**
C25	
C27:1	
C27	
C28	**
C29:1	
C29	
9,11,13,15 Met C29	**
C31:1	**
C31:1	**
C31	
C32:2	
C33:1	**
C33:1	**
C33	
C35:2	
C35:1	**
C35:1	

Tabela Vb. Resultados ANOVA comparando quantitdades relativas dos hidocarbonetos encontrados na cabeça de forragerias. F14, forrageira de 14 dias; F30, forrageira de 30 dias; FC, forrageira controle. Teste pos-hoc Tukey; ** estatísticamente significante $p<0.05$.

	F14 - F30	**F14 - FC**	**F30 - FC**
C21:1			
C23		**	
C24			**
C25			
C27:1			
C27			
C28	**		
C29:1			
C29			
9,11,13,15 Met C29		**	
C31:1	**	**	
C31:1	**		**
C31			
C32:2			
C33:1		**	
C33:1		**	
C33			

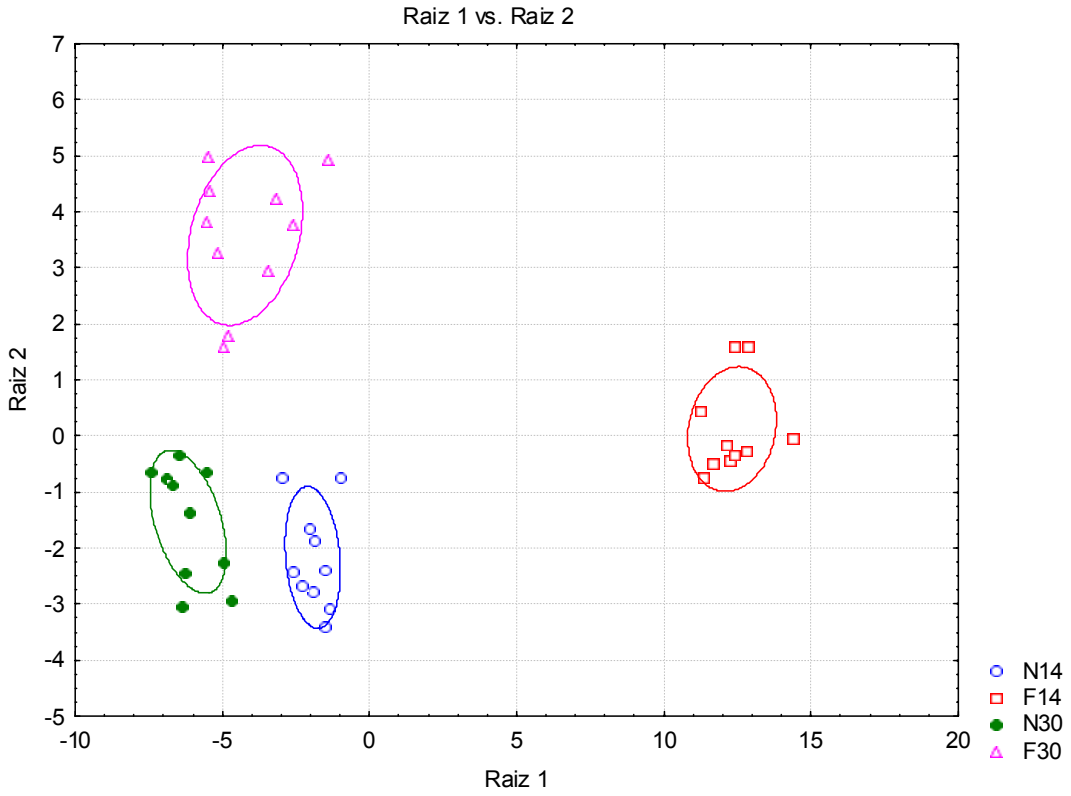
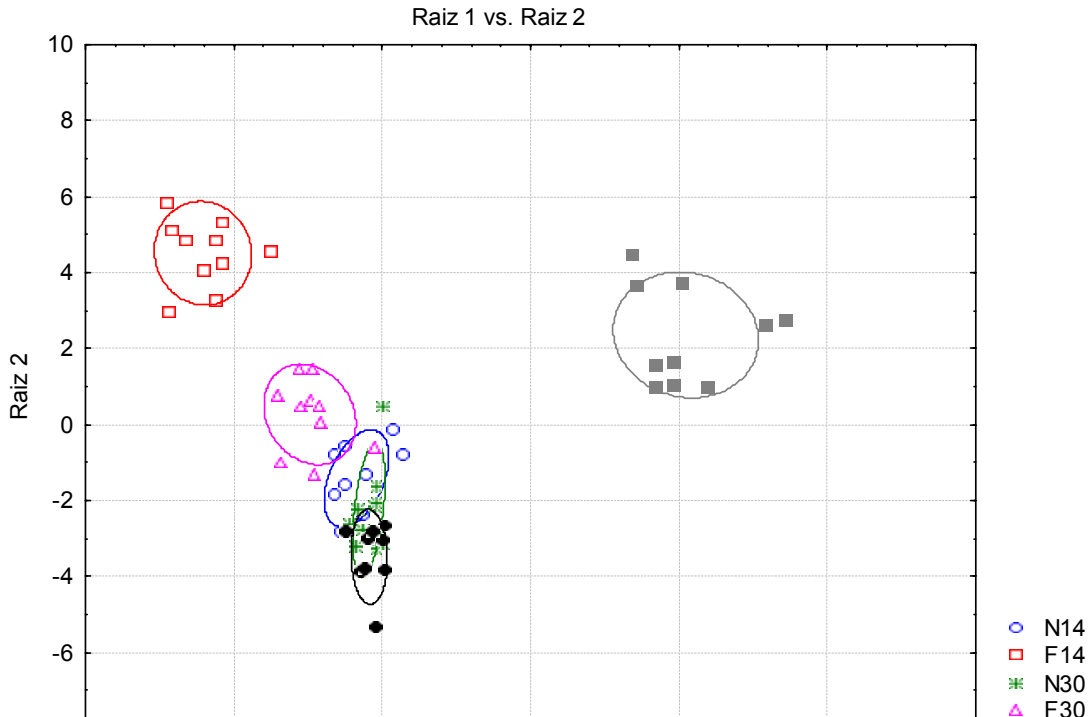


Figura 15. Análise de discriminantes da variação de hidrocarbonetos cuticulares de operárias forrageiras e nutrizes. As elipses estão marcadas no centróide de cada grupo.



–

Figura 16. Análise de discriminantes da variação de hidrocarbonetos cuticulares de todos os grupos estudados. As elipses estão marcadas no centróide de cada grupo.

Tabela VI. Valores absolutos dos hidrocarbonetos cefálicos mais representativos nas cromatografias. * menor valor, ** valor intermediário e *** maior valor de log, para cada hidrocarboneto entre as classes estudadas.

	N14	F14	N30	F30
C21:1	*	***	*	***
C23	*	***	*	***
C24	*	***	*	**
C25	*	***	*	***
C27:1	*	***	*	***
C27	*	***	*	***
C28	**	***	*	*
C29:1	*	***	*	***
C29	*	***	*	***
9,11,13,15 Met C29	*	**	***	*
C31:1	*	***	*	*
C31:1	***	*	***	**
C31	***	*	*	*
C32:2	***	**	**	*
C33:1	***	**	***	*
C33:1	***	*	***	*
C33	***	*	*	**
C35:2	***	*	***	*
C35:1	***	**	***	*
C35:1	***	*	***	*

4.2.5 Quantificação do hormônio juvenil

Os títulos de hormônio juvenil circulantes na hemolinfa de amostras individuais de operárias provindas da colônia *single-cohort* e de uma colônia controle foram

quantificados (em pg/µl). Os dados analisados pelo teste estatístico ANOVA, programa Sigma Stat, mostraram-se estatisticamente diferentes ($p<0,05$) para alguns grupos (Tabela VII). Para ambos os grupos, as abelhas forrageiras apresentaram título de hormônio juvenil mais alto em relação às operárias nutrizes, confirmando a diferença de castas entre cada grupo analisado (Figura 17). Separadamente, o grupo de forrageiras controle (FC) mostrou-se diferente ($p<0,05$) dos grupos das nutrizes testadas e controle, mas não do grupo das forrageiras. Por essa análise pode-se separar as operárias por função, nutriz ou forrageira, mas não por idade.

4.2.6 Perfil das proteínas da hemolinfa

A análise dos géis SDS-PAGE submetidos às diferentes colorações não foi informativa a respeito do padrão da proteína vitelogenina para as diferentes tarefas e idades. Não foi possível se observar a formação de um padrão distinguível.

4.2.7 Expressão dos genes possivelmente relacionados ao envelhecimento

Os genes codificadores de vitelogenina (*vg*), amilase proximal, CuZn superóxido dismutase (*sod*) e buffy (*buffy*) não apresentaram diferença estatística (Figura 18).

A regulação de *amy* está possivelmente relacionada com o fitness da produtividade e no ciclo de vida do indivíduo (Matsuo e Yamazaki 1984). Embora não apresente diferença estatística nas amostras analisadas, ele se encontra mais expresso em forrageiras (Figura 19). A alta expressão do gene *amy* nas bibliotecas de forrageiras, pode ser atribuída a necessidade de converter amido originário de plantas, o qual é encontrado no néctar coletado durante os vôos de forrageamento, em glicose.

Amdam *et al*. (2003) propôs que a vitelogenina em nutrizes é incorporada à glândula hipofaríngea e usada como uma fonte de proteína para a produção de proteínas da

geleia real. Analisando-se o padrão de expressão desse gene nas amostras testadas não é possível se identificar uma tendência de maior expressão em nutrizes em relação a forrageiras, com exceção dos valores para nutrizes de 30 dias. (Figura 20).

Enzimas antioxidantes estão envolvidas em várias funções vitais incluindo a redução dos danos oxidativos encurtadores da vida. A enzima antioxidante SOD é um dos exemplos de genes relacionados ao envelhecimento. Embora não estatisticamente diferente, esse gene encontrou-se mais expresso em abelhas velhas, forrageiras (Figura 21).

O gene *buffy* é necessário para a sobrevivência celular e pode prevenir a morte celular por radiação; a inibição de *buffy* por RNAi leva a apoptose ectópica, enquanto que a super-expressão desse gene resulta em inibição do desenvolvimento por morte celular programada (O'Reilly *et al*., 1996, Quinn *et al*., 2003). Analisando os dados apenas por tarefa desempenhada (Figura 18), encontra-se, ainda que não estatisticamente diferente, uma maior expressão para esse gene em nutrizes, corroborando os dados da literatura. Entretando, quando se separa todos os grupos (Figura 22) não é possível se distinguir uma expressão predominante em nutrizes.

O gene *mrjp-4*, um dos genes da família de proteínas da geleia real, juntamente com o gene *α-glico,* apresentaram diferença estatística entre nutrizes e forrageiras.

A alta expressão de *mrjp-4* em forrageiras (Figura 23) pode acrescentar uma nova função à família MRJP, primariamente relacionado à produção de geleia real, uma vez que não se espera produção de geleia real em forrageiras. Novas funções tem sido atribuídas a genes dessa família, p. ex. *mrjp-9* descoberto como sendo um novo componente de veneno (Peiren *et al*., 2005).

Uma vez que nutrizes se alimentam preferencialmente de pólen, e as forrageiras de mel e néctar, há a necessidade, nesse último caso, da presença de enzimas que façam a metabolização de carboidratos (glicose e frutose) ausentes no pólen (rico em proteínas). A

maior expressão de *α-glico* em forrageiras em detrimento às nutrizes (Figura 24) corrobora a função desse gene em produzir enzimas necessárias às operárias desempenhando essa tarefa, de alto gasto calórico, necessitando, portanto de uma alimentação rica em energia.

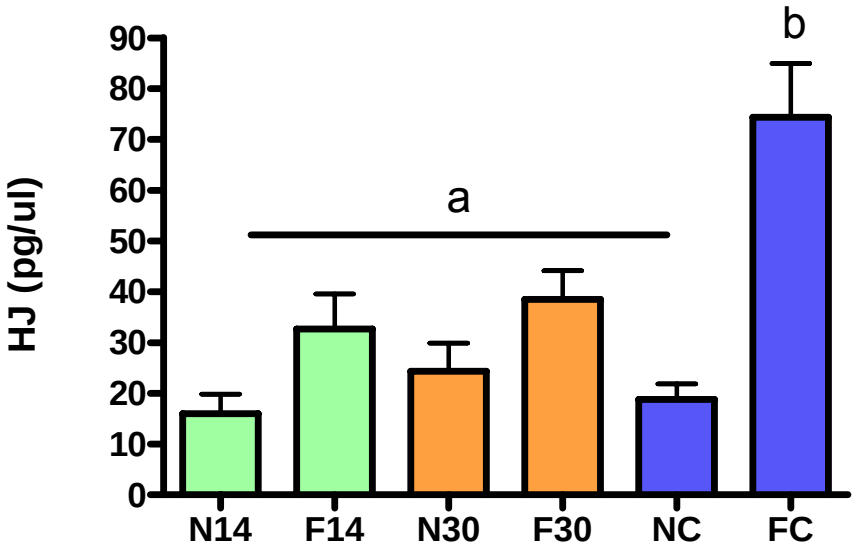


Figura 17. Análise de ANOVA, seguido de pos-hoc Tukey, p<0,05. para os dados de radioimunoensaio dos títulos de hormônio juvenil. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significantes.

Tabela VII. Comparação par-a-par entre os grupos testados quanto ao título de hormônio juvenil. Foram considerados estatisticamente diferentes os valores com p<0,05 (Método Dunn).

Comparação	Diferença de classificação	Q	p<0,05
FC vs N14	30,95	4,098	Sim
FC vs NC	25,00	3,121	Sim
FC vs N30	22,80	3,019	Sim
FC vs F14	17,75	2,350	Não
FC vs F30	12,90	1,708	Não testado

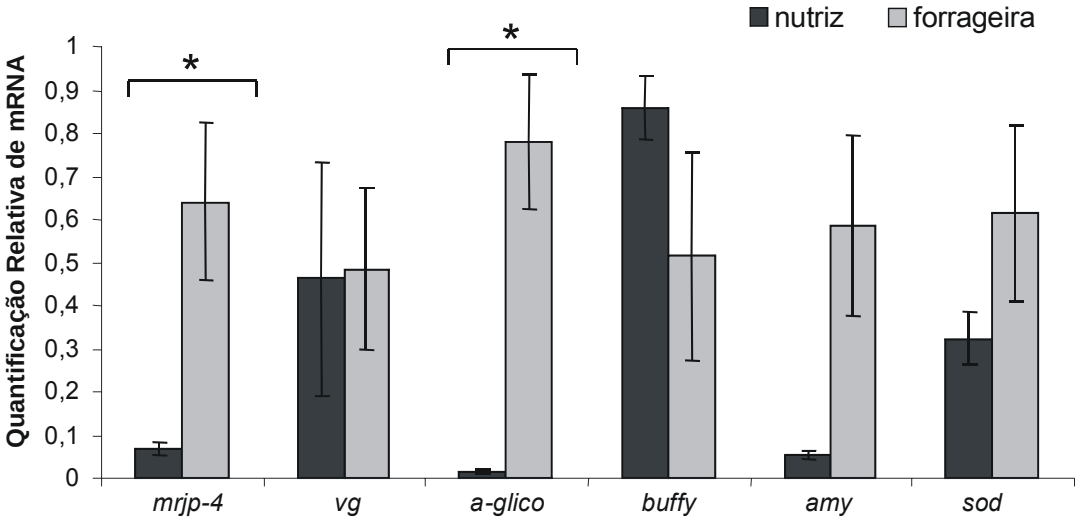


Figura 18. Níveis de expressão do mRNA dos genes *mrjp-4, vg, α-glico, buffy, amy* e *sod* em operárias nutrizes e forrageiras. A expressão do mRNA foi detectada por PCR quantitativa em tempo real, usando-se o gene *rp49* como controle para as normalizações e análises em triplicata (réplicas técnicas). Os gráficos das quantidades relativas de mRNA foram gerados à partir da quantificação de um *pool* de 3 cabeças por grupo. Diferença estatística é indicada pelo asterisco, One-way ANOVA, $p<0,05$.

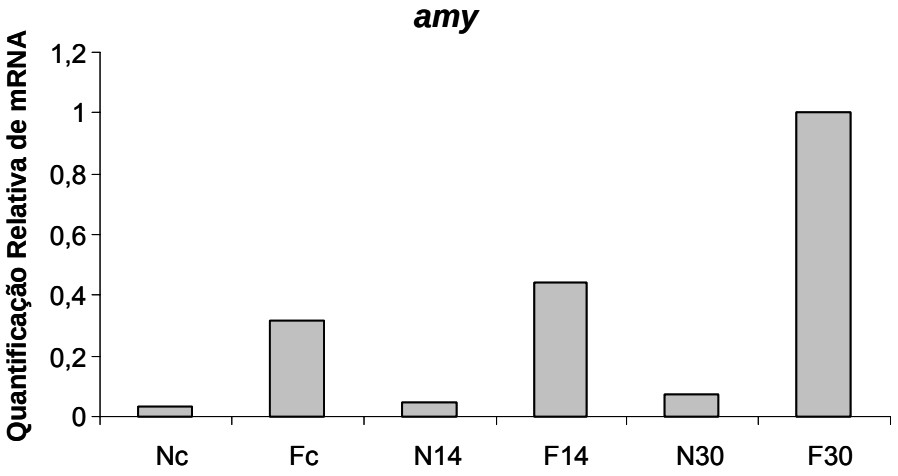


Figura 19. Quantificação relativa de *amy* nas diferentes idades e tarefas das operárias estudadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Alíquotas de cDNA foram empregadas para amplificação utilizando-se metodologia SYBR Green. Os valores para construção dos gráficos são os valores relativos de quantificação obtidos utilizando-se metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

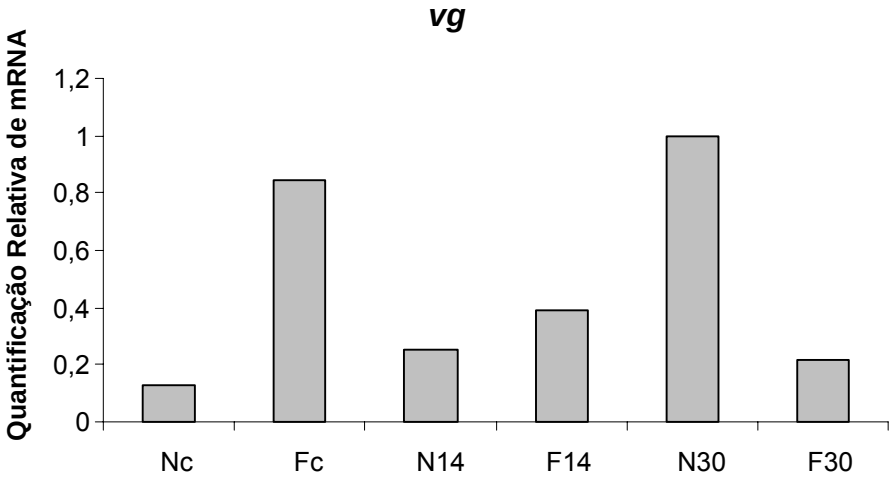


Figura 20. Quantificação relativa de *vg* nas diferentes idades e tarefas das operárias estudadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Alíquotas de cDNA foram empregadas para amplificação utilizando-se metodologia SYBR Green. Os valores para construção dos gráficos são os valores relativos de quantificação obtidos utilizando-se metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct.}$

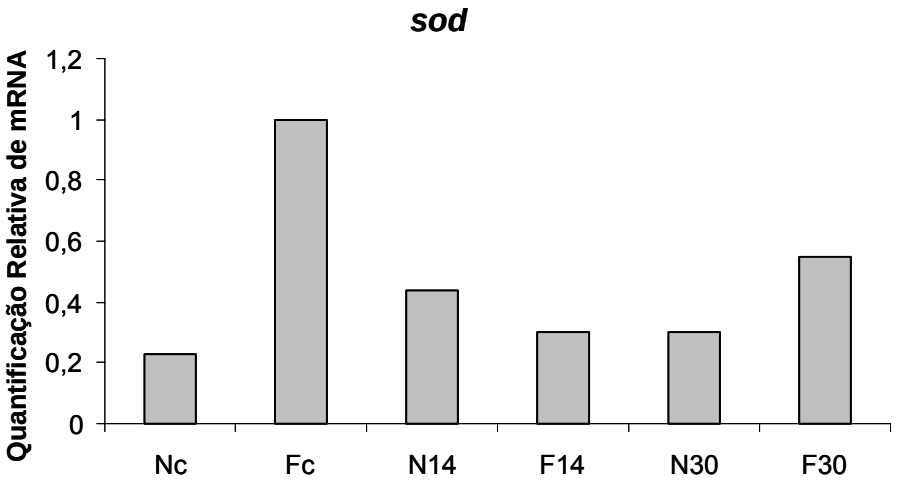


Figura 21. Quantificação relativa de *sod* nas diferentes idades e tarefas das operárias estudadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Alíquotas de cDNA foram empregadas para amplificação utilizando-se metodologia SYBR Green. Os valores para construção dos gráficos são os valores relativos de quantificação obtidos utilizando-se metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

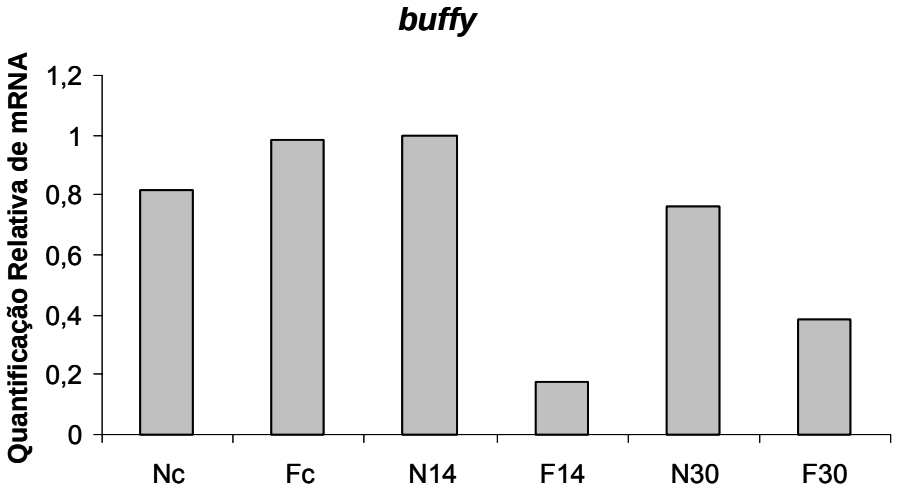


Figura 22. Quantificação relativa de *buffy* nas diferentes idades e tarefas das operárias estudadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Alíquotas de cDNA foram empregadas para amplificação utilizando-se metodologia SYBR Green. Os valores para construção dos gráficos são os valores relativos de quantificação obtidos utilizando-se metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

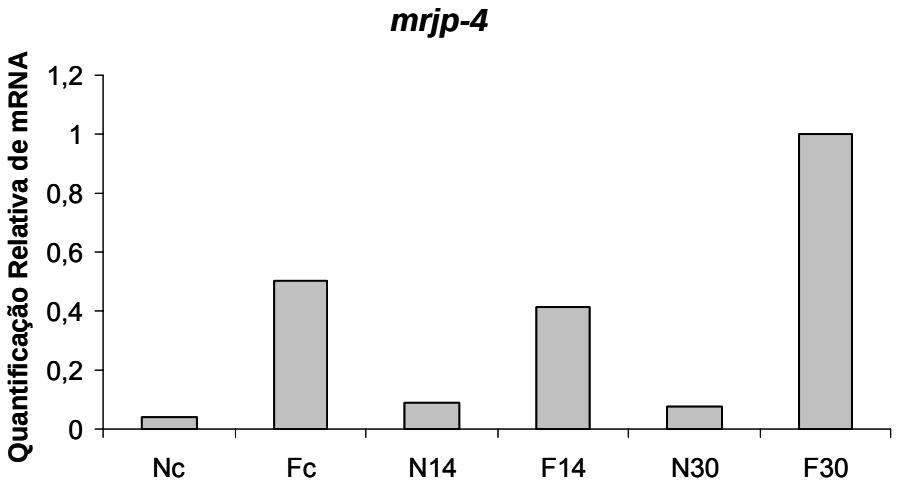
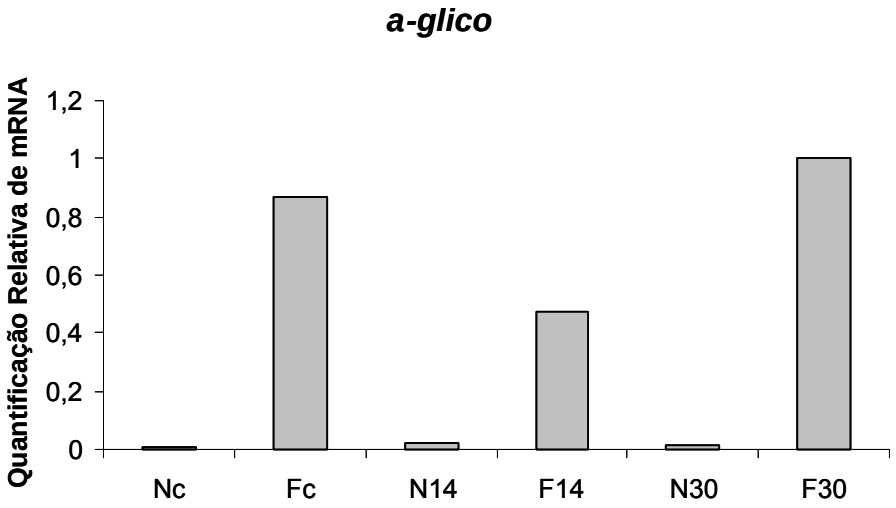


Figura 23. Quantificação relativa de *mrjp4* nas diferentes idades e tarefas das operárias estudadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Alíquotas de cDNA foram empregadas para amplificação utilizando-se metodologia SYBR Green. Os valores para construção dos gráficos são os valores relativos de quantificação obtidos utilizando-se metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



–

Figura 24. Quantificação relativa de *α-glico* nas diferentes idades e tarefas das operárias estudadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Alíquotas de cDNA foram empregadas para amplificação utilizando-se metodologia SYBR Green. Os valores para construção dos gráficos são os valores relativos de quantificação obtidos utilizando-se metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5. DISCUSSÃO

5.1 Expressão gênica diferencial entre operárias nutrizes e forrageiras

A transição de tarefas intranidais para atividades de vôo e forrageamento é um dos exemplos comportamentais característicos, entre uma mesma casta, de função idade-dependente (revisado por Robinson *et al*., 2005).

Há muito se discute sobre a relação da expressão comportamento-dependente e nesse contexto a GH mostrou-se ser um excelente modelo para tal estudo. Os primeiros trabalhos investigaram as proteínas presentes na GH de operárias nutrizes e forrageiras e mostraram que a expressão muda drasticamente com a idade (Halberstadt, 1980; Sasagawa *et al*., 1989); mas não se mostrou se essa alteração fisiológica era idade ou comportamento-dependente. Trabalhos de proteômica tem apontado diferenças significativas entre nutrizes e forrageiras (Wolschin e Amdam, 2007).

Transferindo essa duvida ao escopo gênico, Kubo e colaboradores (1996) encontraram um gene preferencialmente expresso em operárias forrageiras, o gene para a enzima α-glicosidase. A busca por genes expressos diferencialmente levou à descoberta de um novo gene, *amilase*, por Ohashi e colaboradores (1999), em forrageiras.

De maneira geral a busca por respostas sobre quando, onde e como os genes se expressão pode ser de duas maneiras: estudos do corpo inteiro e focando em algum tecido específico. O primeiro é de grande valia, pois fornece um panorama geral, mas análises tecido específicas são mais precisas e podem mostrar diferenças que muitas vezes são perdidas, ou passam despercebidas na primeira.

As análises por biblioteca subtrativa revelaram alguns genes já descritos pela literatura, mas mostraram novos genes, alguns já bem descritos, como é o caso do gene *buffy* e outros ainda com funções questionáveis, *mrjp-4*.

Buscando-se respostas ao mecanismo de envelhecimento, optou-se por incluir um novo candidato, mesmo que não encontrado nas análises subrativas, o gene *sod* codificador da enzima, CuZn superoxido dismutase .

5.2 *α-glicosidase*

A síntese de proteínas pela glândula hipofaríngea (expressão gênica diferencial) muda de acordo com função das operárias na colônia. Essa mudança de expressão pode estar relacionada à mudança de alimentação da operária, uma vez que nutrizes se alimentam preferencialmente de pólen, e as forrageiras de mel e néctar. Neste último caso, há a necessidade, da presença de enzimas que façam a metabolização de carboidratos (glicose e frutose) ausentes no pólen (rico em proteínas). A validação do gene α-glicosidase permite traçar um perfil mais claro para essa fase de desenvolvimento.

Os primeiros resultados para o entendimento dessa enzima, foram dados por Simpson *et al*. (1968) e Sasagawa *et al*. (1989) e confirmados por Kubo e colaboradores (1996). Eles descreveram a alta atividade dessa enzima em glândulas hipofaríngeas de operárias forrageiras, postulando sua função em converter sacarose do néctar em glicose e frutose.

Ohashi *et al*. (1996) isolaram e caracterizaram o gene da α-glicosidase em GH de forragerias, mas não puderam excluir a possibilidade de que a expressão é devida a idade e não ao comportamento.

Nas amostras aqui estudadas, pela técnica de biblioteca subtrativa esse gene não foi encontrado em operárias nutrizes novas, corroborando os dados de RT-PCR, na qual esse gene foi encontrado preferencialmente expresso em forrageiras (Figura 24). As análises das amostras da colônia *single-cohort*, indicam a expressão desse gene como ligado preferencialmente ao comportamento, uma vez que uma alta expressão é sempre observada

em forrageiras independentemente da idade e uma baixa expressão observada tanto em nutrizes controle como nas testadas.

Tanto as análises utilizando-se *pool* de GH (Figura 12) como nas amostras com *pool* de cabeça mostraram o mesmo resultado (Figura 24), embora na primeira os resultados não tenham sido estatisticamente corroborados.

Algumas vezes os dados estatísticos não esclarecem, a primeira vista, o momento fisiológico estudado. Estudar organismos vivos tão complexos, como os insetos sociais é intrigante e desafiador e muitas vezes nos coloca em alguns labirintos, p. ex.: um dado interessante foi visto por Santos *et al*., 2005, estudando a secreção da GH de operárias nutrizes, esses pesquisadores encontraram por gel de eletroforese 2D, algumas proteínas componentes da geleia real, dentre elas α-glicosidase. Como isso seria possível se os dados aqui encontrados, juntamente com os trabalhos citados, mostram a presença tanto da proteína como do gene em operárias forrageiras? Provavelmente exista uma baixa transcrição, ainda que quem níveis muito baixos, desse gene. Tais resultados poderiam ser explicados pela própria fisiologia e na manifestação da mesma, podendo ser esperado pequenas ou até grandes diferenças entre indivíduos de mesma idade, os níveis de Vg, por exemplo, são diferentes em operárias de mesma idade, mesmo sem interferência experimental (Lourenço, c.p.)

Comprova-se com os dados obtidos, a expressão diferencial em operárias forrageiras e relacionando-se a expressão desse gene com o comportamento. Sugere-se a utilização desse gene como um marcador de comportamento, mas não de idade, pelo menos em *Apis mellifera*.

5.3 *Mrjp-4*

Quando as operárias mudam suas atividades de nutrizes para forrageiras a GH altera sua função de produção das proteínas da geleia real para síntese de α-glicosidase (Ohashi *et al*., 1997).

A maior parte das proteínas constituintes da geleia real pertence a uma família protéica, MRJP (Schmitzová *et al*., 1998). Atualmente se conhece 9 *loci* que codificam as MRJPs (MRJP-1 – MRJP-9) (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Drapeau *et al*., 2006).

Encontrou-se diferencialmente expresso em operárias forrageiras o gene *mrjp-4*. Esse gene é descrito como expresso em glândulas hipofaríngeas de operárias forrageiras (Santos *et al*., 2005; Klaudiny *et al*., 1994b a,b; Whitfield *et al*., 2002; Sano *et al*., 2004; Drapeau *et al*., 2006). No entanto, como as glândulas estão atrofiadas em forrageias não era de se esperar que tal expressão aparecesse nessa fase de desenvolvimento.

Nem todas as MRJPs parecem estar relacionadas a funções nutricionais das proteínas da geleia real. A MRJP-8 e a MRJP-9 foram encontradas na glândula de veneno (Peiren *et al*., 2008). Discute-se até uma possível relação dessas proteínas como um fator de sensibilidade imunológica contra alergia da geleia real (Albert e Klaudiny, 2007). Relaciona-se a expressão do gene *mrjp-1* nos corpos pedunculados (*corpora pedunculata*) do cérebro de abelhas melíferas, implicando esse gene no comportamento (Kucharski *et al*., 1998).

A expressão de *mrjp-4* aqui encontrada, em uma fase na qual de não secreção para a GH, faz pensar sobre qual função que ele poderia estar exercendo e/ou se mesmo atrofiada a GH mantém uma função basal, ligada à própria capacidade de reversão. Scharlaken *et al*., 2008, submetendo operárias de *A. mellifera* a *stress* por contaminação bacteriana, encontraram uma menor expressão gênica para o *mrjp-4* nas amostras testadas, ainda que

não estatisticamente diferente. Eles sugerem uma possível redução da síntese de MRJP-4 para economia de energia em uma estratégia de conservação. Nossos dados podem apontar para outra direção, uma vez que diferenças estatísticas mostram sua expressão em forrageiras independente da idade; como é nessa fase que se necessita de um maior gasto calórico, para a tarefa de forrageamento, a hipótese de diminuição de expressão para redução de energia poderia estar em desacordo com os resultados aqui obtidos.

Embora já identificadas, pouco se sabe sobre a função desses genes ou sobre seus produtos protéicos; as MRJPs podem ser multifuncionais, indo além de um papel nutricional, com funções ainda não bem estabelecidas.

A descoberta desse gene diferencialmente expresso vem corroborar a idéia de que as MRJPs exibem uma função contexto-dependente; o papel nutricional das MRJPs tem implicações fenotípicas diferentes na GH quando comparada a outros processos do desenvolvimento.

5.4 *Amilase Proximal*

Um outro gene diferencialmente encontrado em forrageiras foi o *amy* (codificador da enzima α-amilase). O gene *amy* descrito em *Drosophila melanogaster,* é composto de um éxon de 1482 bp (Boer e Hickey, 1986) e é inversamente duplicado no segundo cromossomo (Bahn, 1967 e Levy *et al*., 1985). Os genes duplicados são conhecidos como distal e proximal, sendo este ultimo encontrado diferencialmente expresso nas bibliotecas subtrativas de *A. mellifera*, tendo como teste o cDNA de forrageira. Devido ao fato da enzima α-amilase interagir diretamente com a comida, a*my* é um gene alvo potencial de evolução adaptativa. Já é sabido que fatores, tais como, resposta à dieta de carboidratos (Benkel e Hickey, 1986; Inomata *et al.,* 1995; Inomata e Yamazaki, 2000), especificidade a tecido (Abraham e Doane, 1978; Powell *et al.,* 1980; Klarenberg *et al.* 1986), e padrões

de expressão fase-específica (Yamazaki, 1986; Inomata e Yamazaki, 2000) estão todos envolvidos na regulação deste gene. Yamazaki e Matsuo (1984) mostraram que a regulação de *amy* está possivelmente relacionada com o *fitness* da produtividade e no ciclo de vida do indivíduo. Deste modo a alta expressão do gene *amy* nas bibliotecas de forrageiras, pode ser atribuída a necessidade de converter amido originário de plantas, o qual é encontrado no néctar coletado durante os vôos de forragemento, em glicose.

Apenas dois trabalhos mencionam a expressão desse gene em forrageiras (Ohashi *et al*., 1999 e Santos *et al*., 2005). A diferença de expressão aqui encontrada, embora não estatisticamente diferente, vem corroborar os dados sobre esse gene e adicionar novas informações, uma vez que o gene aqui encontrado equivale ao *amilase proximal* restando saber se há uma porção distal desse gene em abelhas, do mesmo modo que em *D. melanogaster*.

5.5 *Buffy*

A sequência estudada mostra-se como sendo realmente integrante da família BCL, mais especificamente da família Bcl-2, que codifica uma proteína regulatória relacionada com apoptose (para revisão Igaki e Miura, 2004). Até onde se sabe a expressão desse gene em *A. mellifera* foi descrita pela primeira vez nesse trabalho. O gene *buffy* é necessário para a sobrevivência celular e pode prevenir a morte celular por indução; a inibição de *buffy* por RNA de interferência leva a apoptose ectópica, enquanto que a super-expressão desse gene resulta em inibição do desenvolvimento por morte celular programada (O'Reilly *et al*., 1996, Quinn *et al*., 2003). Em contraposição a isto, Sevrioukov *et al*. (2007), verificaram que BUFFY apresenta distintos mecanismos de ação do processo de apoptose, mas não é um dos principais reguladores deste processo no desenvolvimento de embriões mutantes em *Drosophila*.

A inibição de morte celular por *buffy* se dá através de interação física com outro membro da família bcl-2 de *Drosophila melanogaster*, o produto do gene *debcl* (Quinn *et al*., 2003), um ativador de morte celular. Entretanto, no genoma de *A. mellifera* não há sequência identificada como correspondente ao gene *debcl*, indicando que a função inibitória da proteína BUFFY seja independente da interação com *debcl*.

Na biblioteca onde se empregou operárias nutrizes como cDNA tester, foi preferencialmente clonado o gene *buffy*. Obteve-se uma maior expressão deste gene, segundo verificado na validação por PCR quantitativa.

Quando testado nas amostras provindas da colônia *single-cohort* não se obteve uma expressão diferencial significativa em nenhum dos estados – idade ou comportamento (Figura 22). A alta expressão do gene *buffy* nesta fase pode estar ligada a inibição de apoptose da glândula hipofaríngea, prevenindo-a de atrofia precoce em operárias nutrizes e atrofia nas operárias forrageiras.

Com este resultado pode-se inferir uma proteção à morte celular em um momento no qual se espera atrofia da GH; o *buffy* pode prevenir morte celular induzida por *stress* e a transição de atividade de forrageira para nutriz pode representar esta condição, sobretudo se considerarmos a mudança de alimentação que ocorre. Além disso, muitas células já morreram durante o processo de atrofia da glândula e as ainda "sobreviventes" provavelmente estão nesta condição justamente por expressarem um fator que as preserva, senão ela já teria sido completamente reabsorvida. Essa proteção pode indicar uma atividade basal da GH em operárias forrageiras, trazendo explicações de como uma glândula atrofiada pode reativar suas funções para produção de geleia real, na ausência de abelhas mais novas (Ohashi, 1997). A expressão contínua desse gene, em dois momentos hormonais bem distintos - altos níveis de vitelogenina e baixos níveis de hormônio juvenil

em nutrizes, e o contrário em forrageiras - pode revelar uma regulação gênica mais complexa do que apenas a regulação por esses dois principais hormônios.

Corroborando os dados aqui encontrados realizou-se um trabalho em conjunto com a aluna de mestrado Liliane M. F. de Macedo revelando a expressão desse gene em ovários ativos após teste de inativação por CO_2. O *buffy* é inibidor de morte celular programada e a maior expressão deste gene é esperada nos tecidos que não entraram em processo de morte celular.

5.6 CuZn superoxido dismutase (*sod*)

Modificações oxidativas de proteínas intracelulares é a maior evidência de senescência (Amdam *et al*., 2003a), e a perda resistência ao stress oxidativo é um marcador de envelhecimento em nematóides, dípteros e camundongos (Tatar *et al*., 2003). Escolheu-se adicionar mais este gene à lista de genes aqui encontrados, tentando-se esclarecer o processo de envelhecimento.

Pelas análises de PCR em tempo real, encontrou-se uma expressão contínua nas operárias com diferentes comportamentos e idades da colônia *single-cohort*. Essa expressão pode indicar a importância durante todas as fases das operárias de abelhas melíferas. Em um panorama geral, o gene *sod* encontra maior expressão em forrageiras, embora não estatisticamente diferente, indicando uma possível maior importância nessa última tarefa desempenhada pelas operárias, indo ao encontro de trabalhos que enfatizam o fato de que uma superexpressão do gene *sod* aumenta a longevidade (Sun *et al*. 2002). Ainda restam dúvidas quanto aos seus níveis de expressão e sua interferência na extensão do tempo de vida (Tatar, 1999; Muller *et al*., 2007), mas o perfil que começa a ser traçado pelos dados aqui obtidos, sobre o gene da enzima SOD, pode contribuir ao entendimento de como a oxidação está ligada ao envelhecimento/comportamento nas abelhas melíferas.

5.7 *Vitelogenina*

Os níveis de *vg* aqui encontrados para forrageiras e nutrizes controle diferem do esperado. Robinson e Vargo (1997) encontraram em nutrizes altos níveis de *vg* e baixos níveis em forrageiras. Experimentos com RNAi (Nelson *et al*., 2007) encontraram uma ligação entre os níveis de *vg* e o comportamento de forrageamento, sugerindo uma regra na qual altos níveis de *vg* manteria as abelhas na fase de nutriz. Nossos dados, no entanto, levantam algumas dúvidas quanto a isso, uma vez que altos níveis de *vg* foram encontrados tanto em forrageiras controle e nutrizes de 30 dias, e por sua vez baixos níveis nutrizes controle. Pelos experimentos de RNAi era de se esperar que em hipótese alguma forrageiras apresentassem altos títulos para esse gene e que nutrizes sempre os tivesse em altos níveis. O fato de se encontrar transcritos, não significa que estes tão sendo traduzidos. Piulachs *et al.* (2003) encontraram, por exemplo, que o nível de mRNA da Vg diminui com a idade, embora estivesse presente em todas as idades estudadas.

Em outro experimento de silencimento gênico (Amdam *et al*., 2006b), foi mostrado que a inibição de *vg* diminui a resposta a sacarose em operárias de 7 dias - a resposta a sacarose é um indicador de forrageamento, mais especificamente por pólen (Page e Erber 2002). Tais dados vão de encontro aos de Nelson *et al*., 2007, o qual também por *knockdown* da *vg*, encontrou aumento por coleta de néctar em forrageiras.

As forrageiras controle aqui estudadas, não sofreram outro tipo de manipulação a não ser a coleta e direta imersão em gelo, portanto os dados de PCR em tempo real do *pool* de cabeças reflete um momento natural das condições fisiológicas das operárias. Como encontramos altos níves de *vg* em forrageiras coletoras de pólen, aparentemente a tarefa de forrageamento seria mais bem caracterizada quando se considera a coleta por pólen. As diferenças encontradas ao se utilizar de métodos invasivos poderiam ser atribuídas a um

stress derivado da técnica em si, acarretando mudanças fisiológicas muitas vezes inesperadas. E também ao fato do teste não ter sido feito no corpo e sim na cabeça, pois no cérebro, 60% dos genes estão se expressando, ainda que não se encontre as proteínas correspondentes.

5.8 Hidrocarbonetos cefálicos

As comparações dos hidrocarbonetos cefálicos entre as diferentes idades e tarefas das operárias de *A. mellifera* estudadas, revelam diferenças tarefa-específicas.

Em formigas, os diferentes comportamentos casta-específicos diferem quanto a proporção relativa entre *n*-alcanos, alcanos monometil e alquenos (Wagner *et al*., 1998), tal característica também foi observada com nossos resultados em *A. mellifera.* Analisando-se um perfil geral dos hidrocarbonetos em todas as fases estudadas (Tabela VI), seria possível dizer que há uma tendência entre as forrageiras de apresentar um maior número de alcanos de cadeia mais curta e um menor número de alquenos, quando comparadas às nutrizes.

Discute-se que alcanos não seriam percebidos pelo sistema nervoso central das abelhas, uma vez que estes apresentam apenas uma característica distinguível no comprimento de sua cadeia de carbono, enquanto os alquenos tem pelo menos três características diferentes – o ângulo da dupla ligação, o comprimento da cadeia curta entre uma ponta e a dupla ligação, e o comprimento da dupla ligação e a outra ponta (Châline *et al*., 2005). Os resultados obtidos por Sachse *et al*. (1999) sugerem que, ao menos na superfície dos lóbulos antenais, nenhum glomérulo é especificamente sensível a alcanos, e nenhum responde a alquenos de cadeia longa; trabalho feito com operárias adultas sem se especificar as tarefas.

Relacionando-se a característica hidrofóbica dos alcanos, outro aspecto que poderia explicar a maior quantidade de alcanos em forrageiras é o fato destas passarem mais tempo

fora da colméia estando mais expostas a aquecimento, ressecamento quando comparadas as abelhas que permanecem realizando tarefas intranidais, tal característica também pode ser observada em formigas, como descrito por Wagner *et al*. (2001).

Outro aspecto importante de se ter perfis distintos para essas duas tarefas se observa no controle da proporção de operárias desempenhando cada tarefa, podendo ser feito pela quantidade dos hidrocarbonetos dentro da colméia, um exemplo de *quorum sensing.* Green e Gordon (2003), em experimentos com formigas realizando forrageamento e outras executando diferentes tarefas intranidais, sugeriram que uma formiga pode acessar a função de outra da mesma colônia pelo perfil de seus hidrocarbonetos cuticulares e pode ajustar seu próprio comportamento de acordo com a necessidade.

Como as forrageiras controle, provindas de uma colônia normal, constitui um grupo à parte das demais, poder-se-ia inferir uma maior distância também de um fenótipo reprodutivo, ocupando um platô fisiológico irreversível, ou seja, na ausência de nutrizes elas não teriam mais a capacidade de regenerar a GH. É sabido que dentro do grupo de forrageiras existe uma subdivisão de trabalho, com abelhas especializadas em coletar pólen e outras na coleta de néctar (Pankiw e Page, 2003). Alguns autores pregam que a subespecialização por néctar estaria mais afastada do fenótipo reprodutivo, estando as coletoras de pólen mais próximas de tal e desse modo sujeitas a uma reversibilidade mais favorável de sua fisiologia (Amdam *et al*., 2006a; Page e Amdam, 2007). Como as amostras de forrageiras aqui analisadas foram sempre coletadas quando voltavam do forrageamento trazendo pólen na corbícula, não seria de se esperar que formassem um grupo distinto das demais, mas o que se observa é justamente o oposto, as forragerias coletoras de pólen provindas de uma colônia padrão, quanto ao padrão de hidrocarbonetos, pode ser distinguido das outras operárias independente da idade ou função.

A idéia de robustez da característica de forrageamento como uma fase bem fixada, distinguível das demais, é corroborada por perfis protéicos encontrados por Wolschin e Amdam (2007). Para as forragerias da colônia *single-cohort*, aparentemente por mais velhas que sejam, a característica de forrageamento não se fixaria, mostrando uma vantagem adaptativa, uma vez que colônias *single-cohort* são muito sensíveis, por possuírem um número reduzido de integrantes. O não fixar definitivamente o comportamento conferiria tanto às nutrizes quanto as forrageiras a possibilidade de troca de tarefas mais facilmente se necessário.

Este estudo representa somente um de muitos passos necessários para se entender a ontogenia comportamental de operárias adultas em termos dos seus hidrocarbonetos, uma vez que eles são formados por muitos compostos e aparentemente poderiam ser responsáveis por diferentes respostas comportamentais.

5.9 Hidrocarbonetos das nutrizes

A análise da função de nutrizes e sua relação com a idade mostram diferenças estatísticas de alguns componentes quando analisados por MANOVA e análise de discriminantes (AD).

A classificação por AD revela que os grupos de nutrizes, controle de 5 dias e experimentais de 14 e 30 dias, separam-se claramente apesar de haver uma sobreposição encontrada em N30 e NC, conforme demonstrado pelas distâncias generalizadas de Mahalanobis (*Squared Mahalanobis Distances from Group Centroids*, Anexo).

5.10 Hidrocarbonetos das forrageiras

Os três grupos de forrageiras puderam ser significativamente separados por AD. As forrageiras novas podem ser distintamente separadas das forrageiras velhas, e estes dois

grupos separados do grupo controle. O quadrado da distância de Mahalanobis não mostra erro de classificação nesta análise (Anexo).

5.11 Diferenciação idade-comportamento

As ADs em todos os grupos testados identificam uma separação em três grupos: nutrizes, forrageiras precoces e forrageiras velhas. Uma AD de todos os grupos estudados, operárias *single-cohort* e operárias normais, separa forrageiras e operárias independente da idade, mas não foi possível separar tão claramente o grupo de nutrizes.

Forrageiras mais novas na *single-cohort* parecem apresentar um padrão de hidrocarbonetos cuticulares mais semelhantes ao de forrageiras de uma colônia padrão. Para nutrizes essa relação se inverte, nutrizes mais velhas se assemelham a nutrizes controle, pelo menos com relação ao perfil de hidrocarbonetos encontrado.

Os resultados até aqui obtidos ampliam os conhecimentos sobre a expressão gênica diferencial, especialmente nas glândulas hipofaríngeas, trazendo novos candidatos a marcadores de envelhecimento. Esses resultados suportam a idéia de que a interação operária-operária pode influenciar a taxa de desenvolvimento comportamental, influenciada por comunicação química.

6. CONCLUSÕES

Os dados, sobre a expressão gênica diferencial na glândula hipofaríngea e os hidrocarbonetos cuticulares cefálicos, do presente trabalho, permitem-nos concluir que:

1- Existem genes diferencialmente expressos na glândula hipofaríngea de operárias nutrizes e forrageiras de *Apis mellifera,* destes, *buffy* é expresso em operárias nutrizes, *α-glicosidase, amilase proximal* e *major royal jelly-4* são expressos em forrageiras.

2. *Buffy,* pela primeira vez relatado em abelhas, se expressa em todas as idades e tarefas estudadas na colônia *single-cohort* e ainda que o teste de ANOVA tenha sugerido uma maior expressão em operárias nutrizes, as diferenças não foram estatisticamente significantes.

3. *α-glicosidase* está diferencialmente expresso em operárias forrageiras, independente da idade. É, portanto, um gene ligado ao comportamento. Pode-se sugerir a utilização desse gene como um marcador de comportamento, mas não de idade, pelo menos em *Apis mellifera*.

4. O gene *mrjp-4* é um outro gene que mostra-se estritamente ligado ao comportamento. Diferencialmente expresso em forrageiras, é um gene com funções ainda desconhecidas, mas por se expressar nesta tarefa, possivelmente não estaria ligado à produção de geléia real e à alimentação das larvas.

5. O gene codificador da *amilase proximal* é também um exemplo de gene ligado ao comportamento. Aqui comprovadamente, ligado à tarefa de forrageamento.

6. O gene *sod* encontra-se expresso nas duas fases, mas com maior expressão em forrageiras, uma vez que são operárias expostas a um maior *stress* em relação às nutrizes, fato coerente com a função descrita para este gene.

7. O perfil de hidrocarbonetos cuticulares cefálicos, em operárias de *Apis mellifera* consiste em alcanos, alquenos, alcadienos e alcanos ramificados.

8. Forrageiras e nutrizes podem ser diferenciadas por possuírem um perfil característico no qual, o perfil de forrageiras é formado principalmente por alcanos, enquanto o das nutrizes, por alquenos.

9. Os hidrocarbonetos cefálicos entre as diferentes idades e tarefas das operárias de *A. mellifera* aqui estudadas, mostram haver diferenças tarefa-específicas, servindo possivelmente para reconhecimento da composição geral de operárias de uma colméia, decidindo a cerca do comportamento das demais (*quorum sensing*).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, I. e Doane, W. W. *Genetic regulation of tissue- specific expression of amylase structural genes in Drosophila melanogaster.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 75, 4446–4450, 1978.

Albert, S. e Klaudiny, J. *The MRJP/YELLOW protein family of Apis mellifera: Identification of new members in the EST library.* Journal of Insect Physiology, v. 50, 51–59. 2004.

Albert, S. e Klaudiny, J. *MRJP9, an ancient protein of the honeybee MRJP family with non-nutritional function.* J. Apic. Res., v. 46(2), 99–104, 2007.

Amdam, G. V. e Omholt, S. W. *The regulatory anatomy of honey bee lifespan.* J. Theor. Biol., v. 216, 209-228, 2002.

Amdam, G. V.; Norberg, K.; Hagen, A. e Omholt, S. W. *Social exploitation of vitellogenin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, the United States of America, v. 100, 1799-1802, 2003.

Amdam, G. V. e Omholt, S. W. *The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis.* J. Theor. Biol., v. 223:4, 451-464, 2003b.

Amdam, G. V.; Simões, Z. L. P.; Hagen, A.; Norberg, K.; Schroeder, K.; Mikkelsen, O.; Kirkwood, B. L. e Omholt, S. *Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybee*. Experimental Gerontology, v. 39, 767-773, 2004.

Amdam, G. V.; Simões, Z. L. P.; Guidugli, K. R. Norberg, K. e Omholt, S. W. *Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA.* BMC Biotechnology, v. 3, 1-8, 2003a.

Amdam, G. V. e Page, R. E. *Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect*. Aging Research Reviews, v. 4(3), 398-408, 2005.

Amdam, G. V.; Csondes, A.; Fondrk, M. K. e Page, R. E. *Complex social behavior derived from maternal reproductive traits*. Nature, v. 439, 76-78, 2006a.

Amdam, G. V.; Norberg, K.; Page, R. E.; Erber, J. e Scheiner, R. *Dowregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (Apis mellifera).* Behav. Brain. Res., v. 169, 201-205, 2006b.

Bahn, E. *Crossing over in the chromosomal region determining amylase isozymes in Drosophila melanogaster.* Hereditas, v. 58, 1–12, 1967.

Barchuk, A. R.; Cristino, A. L.; Kucharski, R.; Costa, L. F.; Simões, Z. L. P. e Maleszka, R. *Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee Apis mellifera*. BMC Developmental Biology, v. 7, 2007.

Benkel, B. F. e Hickey, D. A. Glucose repression of amylase gene expression in Drosophila melanogaster. Genetics, v. 114, 137–144, 1986.

Blomquist, G. J.; Tillman-wall, J.A.; Guo, L.; Quillici, D. R.; Gu, P. e Chal, C. *Hydrocarbons and hydrocarbon-derived sex pheromones in insects: biochemistry and endocrine regulation*, pp. 317–351, in D. W. Stanley-Samuelson and D. R. Nelson (eds.). *Insect Lipids. Chemistry, Biochemistry and Biology*. University of Nebraska Press, Lincoln, 1993.

Blomquist, G. J.; Tillman, J. A.; Mpuru, S. e Seybold, S. J. *The cuticle and cuticular hydrocarbons: structure, function, and biochemistry*, pp. 34–54, in R. K. Vander Meer, M. D. Breed, M. L. Winston, and K. E. Espelie (eds.). *Pheromone Communication in Social Insects.* Westview Press, Boulder, 1998.

Boer, P. M., e Hickey, D. A. *The alpha-amylase gene in Drosophila melanogaster: nucleotide sequence, gene structure and expression motifs.* Nucleic Acids Res., v. 14, 8399–8411, 1986.

Caetano-Anollés, G. e Gresshoff, P. M. *Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling.* Promega Notes v. 45, 13–21, 1994.

Châline, N.; Sandoz, J. C.; Martin, S. J.; Ratnieks, F. L. e Jones, G. R. *Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (Apis mellifera).* Chem. Senses., v. 30(4), 327-35, 2005.

Colonello, N. A. e Hartfelder, K. *She's my girl - male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees.* Apidologie, v. 36, 231-244, 2005.

Cruz-Landim, C. *Glândulas exócrinas presentes nos adultos das abelhas sociais. Naturalia*, São Paulo, n. esp., 79-84, 1992.

Cruz-Landim, C. *Polimorfismo na ocorrência de glândulas exócrinas nas abelhas (Hymenoptera, Apoidae).* In: Anais do Encontro de Abelhas, 1, Ribeirão Preto, 118, 1994.

Cruz-Landim, C.; Costa, R. A. C. e Silva-de-Moraes, R. L. M. *Hypopharyngeal gland function, glandular cell senescence and gland reactivation in bees*. In: Austin, A. D. Dowton, M. (Eds). Hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control. Melbourne: Csiro Publishing, 50-55, 2000.

Deseyn, J. e Billen, J. *Age-dependent morphology and ultrastruture of the hypopharyngeal gland of Apis mellifera workers (Hymenoptera, Apidae).* Apidologie, v. 36, 49-57, 2005.

Drapeau, M. D.; Albert, S.; Kucharski, R.; Prusko, C. e Maleszka, R. *Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees.* Genome Research, v. 16, 1385-1394, 2006.

Durham, A. M.; Kashiwabara, A. Y.; Matsunaga, F. T.; Ahagon, P.H.; Rainone, F.; Varuzza, L. e Gruber, A. *EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis.* Bioinformatics, v. 21(12), 2812-3, 2005.

Engels, W. *Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera*. American Zoologist, v. 14(4), 1229-1237, 1974.

Engels, W.; Kaatz, H.; Zillikens, A.; Simões, Z. L. P.; Trube, A.; Braun, R. e Dittrich, F. *Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility*. In: Advances in Invertebrate Reproduction. Elsevier, Amsterdam 5, 495-502, 1990.

Evans, J. D. e Wheeler, D. E. *Expression profiles during hooneybee caste determination*. Genome Biology, v. 2, 1-6, 2000.

Ferveur, J. F. *Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in Drosophila pheromonal communication*. Behav. Genet. v. 35, 279–295, 2005.

Gibbs, A. G. *Water-proofing properties of cuticular lipids*. Am. Zool. v. 38, 471–482, 1998.

Green, M. J. e Gordon, D. M. *Cuticular hydrocarbons inform task decisions.* Nature, v. 423, 32, 2003.

Guidugli, K. R.; Nascimento, A. M.; Amdam, G. V.; Barchuk, A. R.; Omholt, S.; Simões, Z. L. P. e Hartfelder, K. *Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a social insect.* FEBS Lett, v. 579, 4961–4965, 2005.

Halberstadt, K. *Elektrophoretischer untersuchungen zur sekretionstätigkeit der hypopharynxdrüse der honigbiene (Apis mellifera L.).* Insects Sociaux, Paris, v. 27:1, 61-77, 1980.

Hanes, J. e Simuth, J. *Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (Apis mellifera* L). J. Apic. Res., v. 31, 22-26, 1992.

Hartfelder, K. e Engels, W. *Social insect polymorphis: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee.* Current Topics in Developmental Biology. v. 40, 45-77, 1998.

Hesenhaus, F. *Die hautdrüsen der apiden und verwandter formen*. Zoologische Jahrbucher Abteilung für Systematik, Oekologie und Geographie der Tiere, Jena, v. 43, 369-375, 1922.

Honey Bee Genome Sequencing Consortium. *Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera*. Nature. v. 443:26. 931-949. 2006.

Howard, R. W. *Cuticular hydrocarbons and chemical communication*, pp. 179–226, in D. W. Stanley-Samuelson and D. R. Nelson (eds.). *Insect Lipids. Chemistry, Biochemistry and Biology*. University of Nebraska Press, Lincoln, 1993.

Howard, R. W. e Blomquist, G. J. *Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons.* Annu. Rev. Entomol. v. 50, 371–393, 2005.

Huang, Z. Y.; Otis, G. M. Teal, P. E. A. *Nature of brood signal activating of protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, Apis mellifera (Apidae: Hymenoptera).* Apidologie, v. 20, 455-464, 1989.

Huang Z. Y. e Robinson, G. *Honey bee colony integration: Worker-worker interactions mediate plasticity in endocrine and behavioral development.* Proc. Natl. Acad. Sci. v. 89, 11726-11729, 1992.

Huang, Z. Y.; Robinson, G. E. e Borst, D. W. *Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees*. J. Comp. Physiol. A., v. 174, 731–739, 1994.

Huang, Z. Y. e Robinson, G. E. *Regulation of honey bee division of labor by colony age demography.* Behav. Ecol. Sociobiol. v. 39, 147-158, 1996.

Igaki, T. e Miura, M. *Role of Bcl-2 family members in invertebrates*. Biochimica et Biophysica Acta, 1644, 73-81, 2004

Inomata, N.; Kanda, K.; Cariou, M. L.; Tachida, H. e Yamazaki, T. *Evolution of the response pattern to dietary carbohydrates and the developmental differentiation of gene expression of a-amylase in Drosophila.* J. Mol. Evol. v. 41, 1076–1084, 1995.

Inomata, N. e Yamazaki, T. *Evolution of nucleotide substitutions and gene regulation in the amylase multigenes in Drosophila kikkawai and its sibling species.* Mol. Biol. Evol., v. 17, 601–615, 2000.

Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Ionescu, A. e Robinson, G. E. *Task-related chemical analysis of labial gland volatile secretion in worker honeybees (Apis mellifera ligustica).* J. Chem. Ecol., v. 27, 919-926, 2001.

Klarenberg, A. J.; Visser, A. J. S.; Willemse, M. F. M. e Scharloo, W. *Genetic localization and action of regulatory genes and elements for tissue-specific expression of a-amylase in Drosophila melanogaster.* Genetics, v. 114, 1131–1145, 1986.

Klaudiny, J.; Kulifajova, J.; Crailsheim, K. e Simuth, J. *New approach to the study of division of labour in the honeybee colony (Apis mellifera L.).* Apidologie (Celle), v. 25, 96–600, 1994a

Kratky, E. *Morphologie und physiolgie der drüsen in kopf und thorax der honigbiene (Apis mellifera L.).* Zeitcchrift für Wissenschaftlichen Biologie, Abt. C, Zeitschrift für Vergleichende Physiologie, Berlin, v. 139, 120-200, 1931.

Kubo, T.; Sasaki, M.; Nakamura, J.; Sasagawa, H.; Ohashi, K.; Takaeuchi, H. e Natori, S. *Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (Apis mellifera L.) with age and/or role.* J. Biochem., 119(2):291-5, 1996.

Kucharski, R.; Maleszka, R.; Hayward, D. C. e Ball, E. E. *A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain.* Naturwissenschaften, v. 85(7), 343-6, 1998.

Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, v. 227, 680–685, 1970.

Levy, J. N.; Gemmill, R. M. e Doane, W. W. *Molecular cloning of a-amylase genes from Drosophila melanogaster. II. Clone organization and verification.* Genetics, v. 110, 313–324, 1985.

Michener, C. D. *The social behavior of the bees.* Harvad Univ. Press, Cambridge, MA. 1974.

Muller, F. L.; Lustgarten, M. S.; Jang, Y.; Richardson, A. e Van Remmen, H. *Trends in oxidative aging theories*. Free Radical Biology and Medicine, v. 43, 477–503, 2007.

Nelson, C. M.; Ihle, K. L; Fondrk, M. K.; Page, R. E. e Amdam, G. V. *The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization*. PLoS Biology, v. 5(3), 673-677, 2007.

Nelson, D. R. e Blomquist G. J. *Insect waxes*, pp. 1–90, in R. J. Hamilton (ed.). *Waxes: Biochemistry, Molecular Biology, and Function*. W. W. Christie, The Oily Press, England, 1995.

Nijhout, H. F. e Wheeler, D. E. *Juvenile hormone and the physiological basis of insect polyphenisms.* Q. Rev. Biol. v. 57, 109-133, 1982.

Ohashi, K.; Sawata, M.; Takeuchi, H.; Natori, S. e Kubo, T. *Molecular Cloning of cDNA and Analysis of Expression of the Gene for a-Glucosidase from the Hypopharyngeal Gland of the Honeybee Apis mellifera* L. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 221, 380–385, 1996.

Ohashi, K.; Natori, S. e Kubo, T. *Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee Apis mellifera L*. Eur. J. Biochem., v. 249, 797-812, 1997.

Ohashi, K.; Natori, S. e Kubo, T. *Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (Apis mellifera* L.) Eur. J. Biochem., v. 265, 127±133, 1999.

O'Reilly, L. A., Huang, D. C. S. e Strasser, A. *The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry*. EMBO J., v. 15, 6979±6990, 1996.

Page, R. E. e Peng, C. Y. S. *Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, Apis mellifera L*. Experimental Gerontology, v. 36(4-6), 695-711, 2001.

Page, R. E. e Erber, J. *Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor.* Naturwissenchaften, v. 89, 91-106, 2002.

Page, R. E. e Amdam, G. V. *The making of a social insect: development architectures of social design.* Bioessays, v. 29, 334-343, 2007.

Painter, T. S. e Biessele, J. J. *The fine structure of the hypopharyngeal gland cell of the honey bee during development and secretion*. Zoology, v. 55, 1414-1419, 1966.

Pankiw, T. e Page, R. E. *Response thresholds for sucrose predict foraging division of labor in honeybees*. Behav Ecol Sociobiol, v. 47, 265-267, 2000.

Pankiw, T. e Page, R. E. *Effects of pheromones, hormones and handling on sucrose response thresholds of honey bee (Apis mellifera L.).* J. Comp. Physiol. A, v. 189, 675-684, 2003.

Peiren, N.; Vanrobaeys, F.; de Graaf D. C.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. e Jacobs, F. J. *The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach.* Biochim. Biophys. Acta., 1752:1-5, 2005.

Peiren, N.; de Graaf D. C.; Vanrobaeys, F.; Danneels, E. L.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. e Jacobs, F. J. *Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage.* Toxicon, v. 52(1), 72-83, 2008.

Piulachs, M. D.; Guidugli, K. R.; Barchuck, A. R.; Cruz, J.; Simões, Z. L. P. e Bélles, X. *The vitellogenin of the honey bee, Apis mellifera: structural analysis of the cDNA and expression studies.* Insect Biochem. Mol. Biol., v. 33, 459–465, 2003.

Powell, J. R.; Rico, M. e Andjelkovic, M. *Population genetics of Drosophila amylase III. Interspecific variation.* Evolution, v. 34, 209–213, 1980.

Quinn, L.; Coombe, M.; Mills, K.; Daish, T.; Colussi, P.; Kumar, S. e Richardson, H. *Buffy a Drosophila Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions.* The EMBO Journal, v. 22(14), 3568±3579, 2003.

Remolina, S. C.; Hafez, D. M.; Robinson, G. E. e Hughes, K. A. *Senescense in the worker honey bee Apis mellifera.* Journal of Insect Physiology, v. 53, 1027-1023, 2007.

Robinson, G. E.; Page, R. E.; Strambi, C. e Strambi, A. *Hormonal and genetic control of behavioral integration in honeybee colonies.* Science, v. 246, 109-112, 1989.

Robinson, G. E.; Strambi, C.; Strambi, A. e Feldlaufer, M. F. *Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid haemolymph titres in adult worker and queen honeybees (Apis mellifera).* Journal of Insect Physiology, v. 37, 929-935, 1991.

Robinson, G. E. *Regulation of division of labor in insect societies.* Annual Review of entomology, v. 37, 637-665, 1992.

Robinson, G. E.; Fahrvach, S. E.; Winston, M. L. *Insects societies and the molecular biology of social behavior*. Bioessays, v. 19, 1099-1108, 1997.

Robinson, G. E. e Vargo, E. L. *Juvenile Hormone in Adult Eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and Behavioral Pacemaker.* Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 35, 559-583, 1997.

Robinson, G. E.; Grozinger, C. M. e Whitfield, C. W. *Sociogenomics: Social life in molecular terms.* Nat. Rev. Gen., v. 6(4), 257-270, 2005.

Rösch, G.A. *Untersuchungen über die arbeitsteilung im bienenstaat. 1. Teil: Die tätigkeiten im normalen bienenstaate und ihre beziehungen zum alter der arbeitsbienen.* Zeitschrift für Vergleichende Physiologie, Berlin, v. 2, 571-631, 1925.

Rutz, W.; Gerig, L.; Wille, H. E Luscher, M. *Function of juvenile hormone in adult worker honeybees, Apis mellifera*. Journal of Insect Physiology, v. 22(11), 1485-1491, 1976.

Sachse, S.; Rappert, A. e Galizia, C. G. *The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code*. Eur. J. Neurosci., v. 11(11), 3970-82, 1999.

Sakagami, S. F. *Untersuchungen über die arbeitsteilung in einem zwergvolk der honigbiene.* Beiträge zur Biologie des Bienenvolkes, *Apis mellifera* L. Japanese Jounal of Zoology, Tokyo, v. 11, 117-185, 1953.

Sanger, F.; Nicklen, S. e Coulson, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 74(12), 5463-7, 1977.

Sano, O.; Kunikata, T.; Kohno, K.; Iwaki, K.; Ikeda, M. e Kurimoto, M. *Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (Apis mellifera) by two-dimensional gel electrophoresis.* J. Agric. Food Chem., v. 52, 15–20, 2004.

Santos, K. S.; Dos Santos, L. D.; Mendes, M. A.; De Souza, B. M.; Malaspina, O. e Palma, M. S. *Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (Apis mellifera* L.). Insect Biochem. Mol. Biol., v. 35, 85–91, 2005.

Sappington, T. W. *The major yolk proteins of higher Diptera are homologs of a class of minor yolk in Lepidoptera.* Journal of Molecular Evolution, v. 55(4), 470-475, 2002.

Sasagawa, H.; Sasaki, M. e Okada, I. *Hormonal control of the division of labor in adult honeybees (Apis mellifera L.) I. Effect of methoprene on corpora allata and hypopharyngeal gland, and its a-glycosidase activity.* Appl. Ent. Zool. v. 24(1), 66–77, 1989.

Scharlaken, B.; de Graaf, D. C.; Goossens, K.; Peelman, L. J. e Jacobs, F. J. *Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge*. Dev. Comp. Immunology, 32, 883-889, 2008.

Schiemenz, P. *Über das herkommen des futtersaftes und die speicheldrüsen der biene, nebst einem anhange über das riechorgan.* Zeitschrift für Wisssenschaften Biologie, Abt, C, Zeitschrift für Vergleichende Physiologie, Berlin, v. 38, 71-135, 1883.

Schmitzová, J.; Klaudiny, J.; Albert, S.; Schroder, W.; Schreckengost, W.; Hanes, J.; Júdová, J. e Simúth, J. *A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera L*. Cell. Mol. Life Sci., v. 54, 1020-1030, 1998.

Schrempf, A.; Heinze, J. e Cremer, S. *Sexual cooperation: mating increases longevity in ant queens.*. Curr Biol. v. 15(3), 267-70, 2005.

Schulz, D. J.; Huang, Z. Y. e Robinson, G. E. *Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees.* Behav. Ecol. Sociobiol., v. 42, 295–303, 1998.

Sevrioukov, E. A.; Burr, J.; Huang, E. W.; Assi, H. H.; Monserrate, J. P.; Purves, D. C.; Wu, J. N.; Song, E. J. e Brachmann, C. B. *Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development.* Genesis, v. 45(4), 184-93, 2007.

Silva-de-Moraes, R. L.; Caramelo, K. A.; Feddersen Jr, A. *Estudos citofotométricos das glândulas hipofaríngeas de operárias de Scaptotrigona postica e Melopona quadrifasciata anthidioides Lep. (Hymenoptera, Apidae).* Naturalia, São Paulo, v. 10, 147-155, 1985.

Simões, D. e Bego, L. R. *Estudo da regulação social em Nannotrigona (Scaptotrigona) postica Latreille, em duas colônias (normal e com rainhas virgens) com especial referência ao polietismo etário (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).* Boletim de Zoologia, São Paulo, v. 4, 89-98, 1979.

Simpson, J.; Riedel, I. B. M. e Wilding, M. *Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee*. J. Apic. Res. v. 7, 29-36, 1968.

Slessor, K.; Winston, M. L. e Le Conte, Y. *Pheromone communication in the honeybee (Apis mellifera L.).* J. Chem. Ecol., v. 31, 2731-2745, 2005.

Snodgrass, R. E. *Anatomy of the honeybee*. New York: Comstock, 55, 1956.

Soudek, S. *The pharyngeal glands of the honey bee.* Bull Ecole Brno. v. 10. p. 1-63, 1927.

Steinmetz, I.; Schmolz, E. e Ruther, J. *Cuticular lipids as trail pheromone in a social wasp.* Proc. R. Soc. Lond. B, v. 270, 385–391, 2003.

Sun, J.; Folk, D.; Bradley, T. J. e Tower, J. *Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult Drosophila melanogaster*. Genetics, v. 161, 661–672, 2002.

Tatar, M. *Transgenes in the analysis of life span and fitness*. American Naturalist, 154 (suppl.), 67–81, 1999.

Tatar, M.; Bartke, A. e Antebi, A. *The endocrine regulation of aging by insulin-like signals*. Science, v. 299(5611), 1346-51, 2003.

Wagner, D.; Brown, M. J. F.; Broun, P.; Cuevas, W.; Moses, L. E.; Chao, D. L. e Gordon, D. M. *Task-related differences in the cuticular hydrocarbons composition of harvesters ants, Pogonomyrmex barbatus.* J. Chem. Ecol., v. 24, 2021-2037, 1998.

Wagner, D. e Tissot, M. e Gordon, D. *Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants*. J. Chem. Ecol., v. 27(9), 1805-1819, 2001.

Whitfield, C. W.; Band, M. R.; Bonaldo, M. F.; Kumar, C. G.; Liu, L.; Pardinas, J. R.; Robertson, H. M.; Soares, M. B. e Robinson, G. E. *Annotated expressed sequence tags*

and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. Genome Res., 12:555–566, 2002.

Wilson, E. O. *The insect societies.* Belknapp Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1971.

Wilson, E. O. *How to make a social insect.* Nature, v. 443:26, 919-920, 2006.

Winston, M. L. *The Biology of the Honey Bee.* Harvard University Press, Cambridge, MA, 1987.

Wolschin, F. e Amdam, G. V. Comparative proteomics reveal characteristics of life-history transitions in a social insect. Proteome Science, v. 5:10, 2007.

Yamazaki, T. *Genetic analysis of natural populations of Drosophila melanogaster in Japan. V. Genetic variabilities of amylase activities in different developmental stages and their relation to fitness.* Jpn. J. Genet., 61:329-336, 1986.

Yamazaki, T. e Matsuo, Y. *Genetic Analysis of Natural Populations of Drosophila melanogaster in Japan. III. Genetic Variability of Inducing Factors of Amylase and Fitness.* Genetics, v. 108(1), 233–235, 1984.

Ziegler, R. e Van-Antwerpen, R. *Lipid uptake by insect oocytes.* Insect Biochem. Mol. Biol., 36(4), 264-272, 2006.

8. ANEXO

A1. Resumo da análise pelo *pipeline,* das sequências geradas pela biblioteca subtrativa. Do total de 96 clones analisados, 63 seqüências foram classificadas como boas e submetidas posteriormente a testes do BLAST.

Seleção das Sequências

PROGRAMA	DISCRIMINAÇÃO	SEQUÊNCIAS	PORCENTAGEM
Filter_cross_match.pl	ame_ref_chrMT.fa	0	0,00%
Filter_blast.pl	insecta_rRNA.fsa	0	0,00%
Filter_quality.pl	Filtered by quality	33	34,38%
SEQUÊNCIAS BOAS		63	65,62%
TOTAL		96%	100%

A2. Seqüências de *contigs* e *singlets* resultantes das análises do *pipeline*. Estas sequências foram analisadas por meio de algoritmos BLAST para anotação baseada em similaridades com proteínas preditas de *Apis mellifera* (Official Gene Set) e/ou com potenciais ortólogos em outros insetos.

>Contig1
GAGGGAAGATCTTTACGTGGCTTGGAGGACAATTCTGGGAATGCAGGCCAACCTTATCGCAGAA
ATAGTCTCGCATTATCTCTTCATTCGAATTTGGCAGCTTTTCCTGTTCCTAATAATCAAGAAATCTC
ACCTTTTCATGTAGTTGATTCGGCTCGGAGAAGATTTAGTAATGTCAGTGATGTCGTATCCAGAA
AAATTTCTCACACAATTCGATGGAGAACGGTTTCGGCATCAATCGAGCTTACAGTATCTCAAGGA
TCTTCCCTC

>Contig2
GATGCACTTTCTCGAGTTCAGCTCCAACTGATACTAATTCTGGATAAACTTCTCCCACAACTGCA
CCACCAGGAAGCAACATGGCACTTCTCATCCTTTTCAATCCAAGCTTTC

>Contig3
GAATTCACTAGTGATTAGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAAGATCGGAACGACGCGCACGGTACG
GGCAACTCGAGGGCGAACACGTACAATTTCGACTATCCGCAAGTGCCCTACACC

>Contig4
GTTTCTGCTGGATTTTCCTCAAGCTCTAATACCTGGCTTCGTGTCAACGAAAATTACAAGACTGTC
AATCTAGCTGCTGAAAAGAAGGACAAGAACTCGTTCTTCAATATGTTCAAGAAATTTGCGTCGCT
GAAAAAAATCGCCATACTTTAAAGAGGCCAATTTAAATA

>Contig5
GAGGGAAGATCAGGCTAGCCTCCATTAATCCCGGGTCGTGCAAGAAATCGATAACATTATTTAAA
GCGGTAATTACGCCGGCACAATGAGCTTGAAACCGTTTATTAGCCGGCAATTCGTTCAAGGGAG
TGTCCATGAAAGCGGTAAAGTATCGCTGATATTCCGGATATTTTTT

>Contig6
AGACATCCACGATGGCCTCGCTAGCAGATTGTTCCGATGAGAAACTACCACATCCAATTTGTCGT
GCAACACGATTGAATAAATTTGGATGCATTTTCTCGAGTTCAGC

>Singlets
CAGTTACGGTCGATGTAGTCGTGCATCGAGCAGGACTTTTTTTTTTCTTTCTCTCTCTTTCTCCTT
CTCCTAGGTTTCTCGAGCTTATTGTATATTTAGTAGCAGACTGCTTTCTACCGCCGTCCTCGT

A3. Análise de Componentes Principais de operárias nutrizes com o programa Statistica 6.1

	Eigenvalue	% Total	Cumulative	Cumulative
1	8,350343	41,75171	8,35034	41,75171
2	3,729614	18,64807	12,07996	60,39978
3	2,747844	13,73922	14,82780	74,13900
4	1,729173	8,64587	16,55697	82,78487
5	1,240524	6,20262	17,79750	88,98749

	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor
C21:1	0,678469	0,034876	-0,373179	0,025733	-0,061841
C23	0,895491	-0,015458	-0,140113	0,386201	-0,047203
C24	0,769766	-0,108600	0,208016	0,177063	0,496206
C25	0,784999	0,096932	0,202580	0,354078	0,284664
C27:1	0,747076	0,193588	-0,334760	0,234866	-0,292806
C27	0,802550	0,312930	0,144096	-0,036496	0,054827
C28	0,585982	-0,441519	0,381922	0,149323	0,527103
C29:1	0,518677	-0,795688	-0,192152	0,116231	-0,117263
C29	0,499652	0,124386	0,779250	0,145602	-0,246563
9,11,13,15 Met C29	0,696835	0,108310	-0,354828	0,466802	-0,234680
C31:1	-0,110429	-0,624196	0,523508	-0,388136	-0,162788
C31:1	0,156313	-0,803074	-0,011195	0,346847	-0,366339
C31	-0,202462	0,356574	0,804069	0,305894	-0,249228
C32:2	-0,263422	-0,908946	-0,059004	0,086724	-0,032867
C33:1	-0,682830	0,475184	0,197050	0,416751	-0,208995
C33:1	-0,834811	-0,311703	-0,180617	0,310054	-0,049261
C33	-0,645221	-0,268206	0,483304	0,321816	0,094992
C35:2	-0,742541	-0,220972	0,045449	0,415246	0,150902
C35:1	-0,738655	-0,155961	-0,423855	0,254666	0,253421
C35:1	-0,711371	0,510278	-0,212000	0,329428	0,212129
Expl.Var	8,350343	3,729614	2,747844	1,729173	1,240524
Prp.Totl	0,417517	0,186481	0,137392	0,086459	0,062026

Factor Loadings (Unrotated) Extraction: Componentes Principais (Marcados são >0 ,700000)

	Eigen-	Canonicl	Wilks'	Chi-Sqr.	df	p-level
0	4,926536	0,911739	0,120473	52,90827	10	0,000000
1	0,400586	0,534802	0,713987	8,42227	4	0,077279

Teste do Chi-quadrado com as remoções sucessiva das raízes.

	Wilks'	Partial	F-remove	p-level	Toler.	1-Toler.
FACTOR1	0,136324	0,883726	1,51308	0,241354	0,963475	0,036525
FACTOR2	0,319057	0,377591	18,95626	0,000014	0,523357	0,476643
FACTOR3	0,405564	0,297050	27,21400	0,000001	0,503816	0,496184
FACTOR4	0,140390	0,858133	1,90119	0,172138	0,972826	0,027174
FACTOR5	0,242804	0,496173	11,67738	0,000316	0,642454	0,357546

Resumo das Análises de Discriminantes (número de variável no modelo: 5)

Wilks' Lambda: ,12047 aprox. F (10,46)=8,6530 p< ,0000 (3 grps)

p-levels

	N30	NC	N14
N30		0,095003	0,000001
NC	0,095003		0,000000
N14	0,000001	0,000000	

	Observado	N30	NC	N14
N14_P1	N14	28,96992	33,17417	10,18271
N14_P2	N14	31,97574	34,31554	3,21657
N14_P3	N14	35,47447	38,84089	7,68308
N14_P4	N14	22,38047	23,46383	5,07785
N14_P5	N14	50,08343	61,04504	10,50851
N14_P6	N14	11,02031	21,67336	9,78758
N14_P7	N14	11,83814	14,66922	2,84288
N14_P8	N14	43,50449	50,39689	21,74319
*N14_P9	N14	4,29640	6,63529	5,52891
N14_P10	N14	17,43309	24,07840	2,95362
*N30_P1	N30	1,57701	0,87353	16,59126
N30_P2	N30	3,42513	8,95168	14,04267
N30_P3	N30	0,67974	2,37924	23,27771
N30_P4	N30	0,62894	1,03557	18,73768
N30_P5	N30	1,23525	2,75977	16,99427
*N30_P6	N30	3,56199	1,48165	20,72948
N30_P7	N30	5,45325	14,44864	21,47209
N30_P8	N30	23,23000	26,72018	48,35809
*N30_P9	N30	2,45631	1,11917	28,81075
N30_P10	N30	3,97623	11,73200	14,66141
NC_P1	NC	4,45824	1,11669	17,66289
NC_P2	NC	1,91628	0,40127	17,90274
NC_P3	NC	3,61463	0,41714	25,66946
NC_P4	NC	3,61463	0,41714	25,66946
*NC_P5	NC	1,78923	1,85167	28,13719
NC_P6	NC	2,66339	0,61975	17,07275
NC_P7	NC	2,05795	0,66641	23,22880
NC_P8	NC	8,77493	2,00531	31,56096
NC_P9	NC	2,84707	1,40305	30,45279
NC_P10	NC	2,79250	0,35283	20,66194

Quadrado da distância de Mahalanobis por grupo de Centróide. * Marcação incorreta

A5. Análise de Componentes Principais de operárias forrageiras com o programa Statistica 6.1

	Eigenvalue	% Total	Cumulative	Cumulative
1	6,426424	32,13212	6,42642	32,13212
2	3,472747	17,36373	9,89917	49,49586
3	2,404156	12,02078	12,30333	61,51663
4	1,841694	9,20847	14,14502	70,72510
5	1,503131	7,51565	15,64815	78,24076
6	1,213353	6,06677	16,86150	84,30752

	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor
C21:1	0,294226	0,567908	0,183873	0,606189	0,072174	0,070923
C23	0,818711	0,295097	0,058047	0,223870	-0,232419	0,001182
C24	0,406805	0,101171	0,425917	0,474764	0,398074	-0,416561
C25	0,821584	-0,069855	-0,158651	0,160622	-0,178633	-0,060853
C27:1	0,730689	-0,428842	-0,038422	-0,082137	0,220043	-0,173240
C27	0,881788	-0,192736	-0,246154	-0,092072	-0,156204	0,068528
C28	0,488434	-0,054305	0,649146	-0,039989	0,083409	0,388275
C29:1	0,877309	-0,244393	0,169443	-0,232639	0,032099	-0,129533
C29	0,792565	-0,025999	-0,270816	-0,357175	0,062948	0,242351
9,11,13,15 Met C29	0,063669	0,845821	-0,240089	0,205248	-0,204592	0,062289
C31:1	0,408947	0,054390	0,566170	-0,397809	-0,223902	-0,110111
C31:1	-0,349085	-0,372931	-0,503718	0,151814	0,031686	0,519826
C31	0,300348	0,453670	-0,316107	-0,402712	0,600264	0,127948
C32:2	-0,298818	0,056249	0,497929	-0,593310	-0,085551	0,111216
C33:1	0,226361	0,652607	-0,048177	-0,314038	-0,250369	-0,279416
C33:1	-0,685230	-0,348285	-0,146289	-0,058687	0,072556	-0,460304
C33	0,186496	0,654295	-0,111662	-0,109296	0,643517	0,064382
C35:2	-0,787234	0,254601	0,197374	-0,219728	0,264110	-0,111619
C35:1	-0,482984	0,581304	0,440068	0,030111	-0,239800	0,288358
C35:1	-0,000990	0,564942	-0,571230	-0,271251	-0,314343	-0,255826
Expl.Var	6,426424	3,472747	2,404156	1,841694	1,503131	1,213353
Prp.Totl	0,321321	0,173637	0,120208	0,092085	0,075157	0,060668

Factor Loadings (Unrotated) Extraction: Componentes Principais (Marcados são >0 ,700000)

	Eigen-	Canonicl	Wilks'	Chi-Sqr.	df	p-level
0	4,685347	0,907805	0,072276	64,36779	12	0,000000
1	1,433583	0,767518	0,410917	21,78944	5	0,000574

Teste do Chi-quadrado com as remoções sucessiva das raízes.

	Wilks'	Partial	F-remove	p-level	Toler.	1-Toler.
FACTOR1	0,092110	0,784674	3,01857	0,069435	0,825181	0,174819
FACTOR2	0,199692	0,361939	19,39184	0,000014	0,527359	0,472641
FACTOR3	0,182136	0,396827	16,71992	0,000038	0,832452	0,167548
FACTOR4	0,094105	0,768039	3,32220	0,054855	0,817186	0,182815
FACTOR5	0,156399	0,462128	12,80293	0,000205	0,585478	0,414522
FACTOR6	0,151470	0,477166	12,05278	0,000292	0,641609	0,358391

Resumo das Análises de Discriminantes (número de variável no modelo: 6)

Wilks' Lambda: ,0,07228 aprox. F (12,44)=9,9720 p< ,0000 (3 grps)

p-levels

	F14	F30	FC
F14		0,000022	0,000000
F30	0,000022		0,000379
FC	0,000000	0,000379	

	Observed	F14	F30	FC
F14_P1	F14	2,14913	15,05106	17,94717
F14_P2	F14	7,90569	11,06917	11,89715
F14_P3	F14	6,60645	16,21289	28,66878
F14_P4	F14	6,68786	24,02894	27,94410
F14_P5	F14	1,02453	20,74876	32,50425
F14_P6	F14	2,33976	20,21186	28,71023
F14_P7	F14	11,59886	37,68930	62,29842
F14_P8	F14	0,91669	15,21095	26,33326
F14_P9	F14	1,26039	10,77256	20,97349
F14_P10	F14	10,36404	28,28165	41,81350
F30_P1	F30	9,85741	4,25444	19,88603
F30_P2	F30	15,29086	7,57331	12,37273
F30_P3	F30	10,16094	5,33096	13,60303
F30_P4	F30	21,74436	2,32513	10,35720
F30_P5	F30	38,32157	17,70344	39,03432
F30_P6	F30	26,87524	4,95724	14,32711
F30_P7	F30	33,30162	9,79235	10,81360
F30_P8	F30	21,95086	6,77708	10,17542
F30_P9	F30	16,10604	2,23883	14,01768
F30_P10	F30	21,17993	5,41231	20,75064
FC_P1	FC	41,87501	22,85091	3,95802
FC_P2	FC	26,03857	15,19688	2,42764
FC_P3	FC	32,07447	6,78146	4,31152
FC_P4	FC	29,47658	6,23362	3,14697
FC_P5	FC	23,45405	19,41644	7,94644
FC_P6	FC	33,26274	7,80757	3,61214
FC_P7	FC	18,70009	14,84003	4,38536
FC_P8	FC	31,00032	7,91414	2,55866
FC_P9	FC	24,74712	23,28296	10,00982
FC_P10	FC	32,38948	19,43017	2,42494

Quadrado da distância de Mahalanobis por grupo de Centróide. * Marcação incorreta

A7. Análise de Componentes Principais de operárias nutrizes e forrageiras (exceto controle) com o programa Statistica 6.1

	Eigenvalue	% Total	Cumulative	Cumulative
1	8,926808	44,63404	8,92681	44,63404
2	2,685687	13,42843	11,61249	58,06247
3	1,868901	9,34451	13,48140	67,40698
4	1,755935	8,77967	15,23733	76,18665
5	1,177339	5,88670	16,41467	82,07335

	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor
C21:1	0,587214	0,091870	0,655302	-0,221459	0,002947
* C23	0,916486	0,045922	0,203233	-0,042512	-0,153727
* C24	0,703736	0,173110	0,529404	-0,380084	-0,032686
* C25	0,881499	0,123045	-0,088314	-0,007274	-0,008751
* C27:1	0,801955	0,036692	-0,291342	0,202508	-0,110632
* C27	0,941738	0,100699	-0,171046	0,088835	-0,004595
C28	0,515288	-0,343964	0,005152	-0,468681	-0,181022
* C29:1	0,714247	-0,328870	-0,279611	-0,153873	-0,330976
* C29	0,748876	0,349743	-0,408466	-0,006645	-0,240750
9,11,13,15 Met C29	0,171322	0,043093	0,554146	0,286147	-0,530300
C31:1	0,291093	-0,082443	-0,444952	-0,649308	0,219227
C31:1	-0,585671	-0,409775	-0,090739	0,318062	-0,507502
* C31	-0,132051	0,823561	-0,272080	-0,108766	-0,267034
C32:2	-0,537480	-0,471456	-0,230995	-0,428267	-0,339205
C33:1	-0,534021	0,651135	-0,074539	-0,118499	-0,076456
* C33:1	-0,935752	-0,079509	-0,065859	0,067383	-0,127365
C33	-0,365820	0,577626	0,077256	-0,432545	-0,324716
* C35:2	-0,902985	0,040288	-0,006248	-0,234057	-0,134938
* C35:1	-0,729824	-0,180272	0,307130	-0,438786	0,087959
C35:1	-0,444061	0,628167	0,003170	0,124101	0,115589
Expl.Var	8,926808	2,685687	1,868901	1,755935	1,177339
Prp.Totl	0,446340	0,134284	0,093445	0,087797	0,058867

Factor Loadings (Unrotated) Extraction: Componentes Principais (Marcados são >0,700000)

A8. Análise de Discriminantes de operárias nutrizes e forrageiras (exceto controle) com programa Statistica 6.1

	Eigen-	Canonicl	Wilks'	Chi-Sqr.	df	p-level
0	58,69795	0,991589	0,001020	185,9824	60	0,000000
1	5,52535	0,920191	0,060875	75,5714	38	0,000275
2	1,51745	0,776384	0,397228	24,9276	18	0,126923

Teste do Chi-quadrado com as remoções sucessiva das raízes.

	Wilks'	Partial	F-remove	p-level	Toler.	1-Toler.
C21:1	0,001454	0,701200	2,41471	0,102169	0,032984	0,967016
* C23	0,002089	0,488250	5,93941	0,005808	0,054057	0,945943
C24	0,001536	0,663696	2,87138	0,066911	0,019246	0,980754
C25	0,001174	0,868552	0,85760	0,481881	0,171622	0,828378
C27:1	0,001587	0,642437	3,15391	0,051931	0,128070	0,871930
C27	0,001041	0,979486	0,11868	0,947884	0,085875	0,914125
* C28	0,003083	0,330728	11,46728	0,000237	0,086213	0,913787
C29:1	0,001223	0,833631	1,13090	0,364576	0,069384	0,930616
C29	0,001125	0,906606	0,58375	0,633770	0,034859	0,965141
* 9,11,13,15 Met C29	0,001959	0,520611	5,21798	0,009758	0,206664	0,793336
C31:1	0,001056	0,966074	0,19900	0,895620	0,197356	0,802644
* C31:1	0,004294	0,237448	18,19821	0,000015	0,045369	0,954631
C31	0,001301	0,783708	1,56392	0,234751	0,019841	0,980159
* C32:2	0,001765	0,577693	4,14246	0,022460	0,079684	0,920316
C33:1	0,001531	0,666107	2,84048	0,068819	0,122676	0,877324
C33:1	0,001346	0,757536	1,81373	0,182886	0,110962	0,889038
C33	0,001151	0,885857	0,73015	0,548089	0,057868	0,942132
* C35:2	0,001792	0,569078	4,29096	0,019926	0,143308	0,856692
C35:1	0,001109	0,919461	0,49636	0,689642	0,159099	0,840902
* C35:1	0,001699	0,600081	3,77651	0,030371	0,085254	0,914746

Resumo das Análises de Discriminantes (número de variável no modelo: 20)

Wilks' Lambda: ,0,00102 aprox. F (60,51)=7,7867 p< ,0000 (4 grps)

p-levels

	N14	F114	N30	F30
N14		0,000000	0,006979	0,001062
F114	0,000000		0,000000	0,000000
N30	0,006979	0,000000		0,002979
F30	0,001062	0,000000	0,002979	

	Observed	N14	F114	N30	F30
N14_P1	N14	29,0816	238,9616	68,4234	87,4147
N14_P2	N14	11,2516	212,1564	44,5973	63,7691
N14_P3	N14	11,3503	237,8720	37,8622	55,3388
N14_P4	N14	12,3694	232,6705	49,2482	62,4713
N14_P5	N14	10,6899	216,3879	49,6550	57,8783
N14_P6	N14	15,9682	247,6550	26,1402	31,4609
N14_P7	N14	4,6222	214,2529	25,3074	35,4951
N14_P8	N14	31,5502	267,7471	59,9300	73,3649
N14_P9	N14	9,2755	215,9502	32,4193	43,6454
N14_P10	N14	12,6151	189,5363	42,2554	38,4149
F14_P1	F114	197,3248	12,4862	316,9036	273,7363
F14_P2	F114	228,7737	26,3380	368,0735	310,8615
F14_P3	F114	241,6200	23,3213	376,1316	299,6600
F14_P4	F114	254,9274	21,0588	391,3432	314,1643
F14_P5	F114	289,6040	21,4589	443,4284	375,9945
F14_P6	F114	218,2325	19,6669	360,3733	298,3317
F14_P7	F114	233,4163	18,1161	361,0576	309,9455
F14_P8	F114	257,6551	31,2304	390,9332	336,1836
F14_P9	F114	211,9196	22,0057	341,7030	290,2276
F14_P10	F114	213,7191	27,0941	329,8721	275,7622
N30_P1	N30	21,8580	309,8910	7,2646	41,5400
N30_P2	N30	50,7776	381,9757	18,3363	46,2718
N30_P3	N30	36,1830	360,5567	6,0208	50,2484
N30_P4	N30	24,5369	306,4632	10,0396	52,2110
N30_P5	N30	47,9700	398,6457	9,1720	37,7088
N30_P6	N30	38,9086	364,2844	11,8977	31,0358
N30_P7	N30	46,2115	342,9236	23,2224	44,5195
N30_P8	N30	68,5502	377,9985	30,4220	67,7229
N30_P9	N30	41,2236	367,6686	6,3831	59,8815
N30_P10	N30	40,9379	376,7289	7,3346	34,5266
F30_P1	F30	51,4639	274,2980	43,8828	18,6244
F30_P2	F30	42,7951	310,5003	27,4066	18,0288
F30_P3	F30	49,1775	243,7031	48,7741	11,3892
F30_P4	F30	71,1983	357,8149	59,4716	24,5595
F30_P5	F30	85,7853	364,2336	70,6214	25,3504
F30_P6	F30	82,5499	357,5926	60,7586	26,0503
F30_P7	F30	43,1277	323,7560	38,1965	24,5863
F30_P8	F30	72,9374	278,2388	61,5975	24,6980
F30_P9	F30	55,5479	223,7040	82,4508	17,4742
F30_P10	F30	64,2528	346,6061	60,7698	27,5955

Quadrado da distância de Mahalanobis por grupo de Centróide. * Marcação incorreta.

A9. Análise de Componentes Principais de operárias nutrizes e forrageiras (inclusive controle) com o programa Statistica 6.1

	Eigenvalue	% Total	Cumulative	Cumulative
1	9,979635	49,89818	9,97964	49,89818
2	2,164300	10,82150	12,14394	60,71968
3	1,810914	9,05457	13,95485	69,77425
4	1,420430	7,10215	15,37528	76,87640
5	1,092935	5,46467	16,46821	82,34107

	Factor	Factor	Factor	Factor	Factor
C21:1	0,556075	0,190181	0,248461	0,579845	0,258645
* C23	0,881286	0,129682	0,136820	0,315239	-0,114236
* C24	0,790425	0,064385	-0,040553	0,253433	0,321745
* C25	0,899953	0,124883	0,039577	-0,000617	-0,065782
* C27:1	0,841795	0,008035	-0,054459	-0,139794	-0,126342
* C27	0,933683	0,080856	0,099677	-0,139858	-0,121854
C28	0,653458	-0,117115	-0,390496	0,320498	-0,083432
* C29:1	0,805803	-0,166472	-0,280714	0,159733	-0,277452
* C29	0,793293	0,348609	-0,143111	-0,217978	-0,314828
9,11,13,15 Met C29	-0,084728	0,153020	0,565416	0,554933	-0,444349
C31:1	0,511889	-0,030675	-0,606176	0,043174	0,167573
C31:1	-0,664719	-0,227517	-0,011780	0,063681	-0,584108
* C31	-0,059172	0,862373	-0,263950	-0,225198	-0,179307
C32:2	-0,459429	-0,364434	-0,624194	0,309737	-0,222414
C33:1	-0,648950	0,542954	-0,025876	0,103985	-0,038704
* C33:1	-0,919567	-0,067901	-0,099499	-0,011634	-0,085038
* C33	-0,210510	0,674349	-0,452345	0,263902	0,039877
* C35:2	-0,904662	0,050440	-0,222701	0,118025	0,045597
* C35:1	-0,816844	-0,020072	-0,084789	0,387577	0,168707
C35:1	-0,671344	0,460752	0,209855	-0,022255	0,045654
Expl.Var	9,979635	2,164300	1,810914	1,420430	1,092935
Prp.Totl	0,498982	0,108215	0,090546	0,071022	0,054647

Factor Loadings (Unrotated) Extraction: Componentes Principais (Marcados são >0 ,700000)

A10. Análise de Discriminantes de operárias nutrizes e forrageiras (inclusive controle) com programa Statistica 6.1

	Eigen-	Canonicl	Wilks'	Chi-Sqr.	df	p-level
0	27,45227	0,982270	0,000229	385,6456	100	0,000000
1	8,36194	0,945084	0,006504	231,6271	76	0,000000
2	3,18705	0,872450	0,060888	128,7411	54	0,000000
3	1,25490	0,746004	0,254941	62,8692	34	0,001869
4	0,73953	0,652022	0,574868	25,4663	16	0,062016

Teste do Chi-quadrado com as remoções sucessiva das raízes.

	Wilks'	Partial	F-remove	p-level	Toler.	1-Toler.
* C21:1	0,000621	0,368152	12,01390	0,000001	0,075435	0,924565
* C23	0,000351	0,650456	3,76168	0,007870	0,075951	0,924049
* C24	0,001520	0,150406	39,54084	0,000000	0,041546	0,958454
C25	0,000275	0,831528	1,41824	0,241891	0,166837	0,833163
* C27:1	0,000375	0,610165	4,47231	0,002959	0,129961	0,870039
C27	0,000240	0,952247	0,35103	0,878087	0,081220	0,918780
* C28	0,000420	0,544844	5,84773	0,000500	0,228569	0,771431
C29:1	0,000261	0,875440	0,99598	0,434441	0,080212	0,919788
C29	0,000251	0,910101	0,69145	0,633259	0,045264	0,954736
* 9,11,13,15 Met C29	0,000354	0,645395	3,84608	0,006992	0,305575	0,694425
C31:1	0,000250	0,912562	0,67071	0,648263	0,251340	0,748660
* C31:1	0,000388	0,588465	4,89535	0,001686	0,161026	0,838974
C31	0,000275	0,830976	1,42383	0,239953	0,042230	0,957770
C32:2	0,000295	0,774700	2,03576	0,097556	0,185796	0,814204
C33:1	0,000307	0,743596	2,41372	0,055592	0,187302	0,812698
C33:1	0,000243	0,940455	0,44321	0,815205	0,197243	0,802758
* C33	0,000329	0,694475	3,07956	0,020870	0,118721	0,881279
C35:2	0,000276	0,829414	1,43970	0,234534	0,218882	0,781118
C35:1	0,000265	0,861603	1,12439	0,365603	0,249522	0,750478
C35:1	0,000273	0,837430	1,35891	0,263344	0,167876	0,832124

Resumo das Análises de Discriminantes (número de variável no modelo: 20)

Wilks' Lambda: ,0, **00023** aprox. F (100,175)=8,0268 p< ,0000 (6 grps)

p-levels

	N14	N30	NC	F14	F30	FC
N14		0,028837	0,004285	0,000000	0,000007	0,000000
N30	0,028837		0,130653	0,000000	0,000018	0,000000
NC	0,004285	0,130653		0,000000	0,000001	0,000000
F14	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
F30	0,000007	0,000018	0,000001	0,000000		0,000000
FC	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

	Observed	N14	N30	NC	F14	F30	FC
N14_P1	N14	37,9540	58,6796	68,2970	129,4642	89,4140	217,6539
N14_P2	N14	12,1150	26,5105	22,1015	77,7897	51,4884	147,9218
N14_P3	N14	14,4690	28,0864	29,0744	89,4363	50,4603	119,1848
N14_P4	N14	12,9877	32,8466	26,0861	93,0774	54,9266	166,3590
N14_P5	N14	13,1810	33,7553	42,2573	84,8342	52,7757	127,1552
N14_P6	N14	14,1634	18,3292	28,7345	62,1116	33,0036	155,2803
N14_P7	N14	5,2221	10,5046	12,8520	64,5412	29,8541	153,5158
N14_P8	N14	44,7846	61,2970	67,9714	133,7318	85,5535	198,6983
N14_P9	N14	10,5992	16,3006	19,2152	70,3767	35,7791	169,4206
N14_P10	N14	9,7761	16,7963	28,3040	60,3351	27,8758	162,3066
F14_P1	F14	77,4069	82,0590	103,4346	15,1238	67,4935	266,5469
F14_P2	F14	81,2861	97,7732	103,0826	32,8564	71,3032	285,4065
F14_P3	F14	100,5947	109,5576	122,9006	28,5890	71,5636	286,1634
F14_P4	F14	102,9477	114,1192	131,7417	23,3383	78,4903	314,9387
F14_P5	F14	114,8826	139,0243	162,4905	25,4067	111,5401	344,1309
F14_P6	F14	87,2351	111,7170	125,0457	22,0481	80,6879	275,9271
F14_P7	F14	115,6851	126,4046	140,6939	22,4281	109,7030	335,7106
F14_P8	F14	115,9072	120,7034	135,2100	45,5737	103,3568	317,4292
F14_P9	F14	67,4244	76,1383	102,9614	25,5012	58,4490	222,2400
F14_P10	F14	103,4373	104,6554	121,6077	35,4956	81,9748	338,3951
N30_P1	N30	16,9228	6,5746	11,4947	91,8801	45,1291	163,3546
N30_P2	N30	34,2010	22,2552	36,9069	101,1493	49,3955	170,6982
N30_P3	N30	23,4155	7,0644	19,6485	107,4722	50,6914	147,5233
N30_P4	N30	20,0755	8,2692	16,4369	90,8624	51,3875	157,6170
N30_P5	N30	17,8622	8,1341	11,5073	86,1219	27,4223	134,8678
*N30_P6	N30	19,5342	13,2516	7,2434	83,1424	29,8205	160,8183
N30_P7	N30	32,6602	28,4301	48,6534	79,3286	38,6503	132,3246
N30_P8	N30	71,8385	44,0910	61,6460	131,8257	81,0815	185,6534
N30_P9	N30	24,8255	6,0596	11,5808	101,4839	54,1192	149,7082
N30_P10	N30	18,3989	7,7506	21,4567	84,4050	31,3327	134,7010
F30_P1	F30	43,4184	35,8280	44,9367	53,3795	17,7724	193,3412
F30_P2	F30	28,3169	24,9058	34,2517	54,2244	16,2757	171,1898
F30_P3	F30	55,5768	47,6600	59,0194	52,7521	11,6299	194,5561
F30_P4	F30	47,4367	52,7183	62,5851	76,4668	19,3977	190,5418
F30_P5	F30	80,7394	79,7652	85,8814	99,5899	33,0592	220,4707
F30_P6	F30	74,0058	65,4009	68,1617	96,0943	31,7272	245,2142
F30_P7	F30	35,1535	37,8024	44,3920	94,7717	33,8349	148,6702
F30_P8	F30	88,9806	71,1694	88,9993	89,1072	26,3497	210,9770
F30_P9	F30	55,7813	62,5869	65,0698	64,2095	10,1355	223,4328
F30_P10	F30	62,1588	65,0019	73,0937	113,2951	35,5070	223,7298
NC_P1	NC	20,0664	21,5751	4,9833	106,5112	47,3344	164,2709
NC_P2	NC	21,3033	21,3339	9,7444	98,8639	37,5413	149,5335
NC_P3	NC	30,0546	23,6019	6,4354	108,7671	52,9163	171,8822
NC_P4	NC	30,0546	23,6019	6,4354	108,7671	52,9163	171,8822
*NC_P5	NC	22,4273	5,2880	9,0034	92,6306	43,7841	151,7343
NC_P6	NC	18,5831	15,5395	5,1767	100,2963	43,0881	140,9206
NC_P7	NC	24,2478	10,3077	7,9758	112,0057	52,9568	149,7450
NC_P8	NC	32,5797	23,3437	8,7061	138,1845	57,1141	175,0570
NC_P9	NC	21,4118	7,9018	4,5814	93,4314	38,4733	134,4877
NC_P10	NC	18,0090	11,2969	6,0543	82,4462	33,6732	164,4275
FC_P1	FC	249,2498	239,1066	251,5283	403,0854	291,5311	26,1024
FC_P2	FC	238,7772	226,1897	230,5888	381,6070	270,0947	25,6434
FC_P3	FC	158,8344	150,8291	161,8301	311,1045	195,5311	10,1768
FC_P4	FC	138,3009	131,0985	145,0665	271,7107	163,7984	8,6383
FC_P5	FC	131,7615	142,7980	160,2488	236,7867	176,6553	27,3966
FC_P6	FC	130,1527	116,1767	123,8826	258,2576	144,2918	11,3041
FC_P7	FC	131,7686	133,7700	149,5916	215,9471	154,1528	13,2460
FC_P8	FC	133,9155	124,6128	140,5824	275,1877	162,6796	10,1827
FC_P9	FC	131,4319	124,1462	135,0676	253,2095	187,0043	19,5547

Quadrado da distância de Mahalanobis por grupo de Centróide. * Marcação incorreta

A11. Artigo da qualificação

Insect Molecular Biology (2006) **15**(5), 703–714

Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality

OnlineOpen: This article is available free online at www.blackwell-synergy.com

A. S. Cristino*, F. M. F. Nunes†, C. H. Lobo†, M. M. G. Bitondi§, Z. L. P. Simões§, L. da Fontoura Costa¶, H. M. G. Lattorff, R. F. A. Moritz**, J. D. Evans†† and K. Hartfelder‡**

**Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; †Departamento de Genética and ‡Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; §Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ¶Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil; **Institut für Biologie, Molekulare Ökologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ††Bee Research Laboratory, USDA-ARS, BARC-E, Beltsville, MD, USA*

Abstract

The honey bee queen and worker castes are a model system for developmental plasticity. We used established expressed sequence tag information for a Gene Ontology based annotation of genes that are differentially expressed during caste development. Metabolic regulation emerged as a major theme, with a caste-specific difference in the expression of oxidoreductases vs. hydrolases. Motif searches in upstream regions revealed group-specific motifs, providing an entry point to *cis*-regulatory network studies on caste genes. For genes putatively involved in reproduction, meiosis-associated factors came out as highly conserved, whereas some determinants of embryonic axes either do not have clear orthologs (*bag of marbles*, *gurken*, *torso*), or appear to be lacking (*trunk*) in the bee genome. Our results are the outcome of a first genome-based initiative to provide an annotated framework for trends in gene regulation during female caste differentiation (representing developmental plasticity) and reproduction.

Keywords: caste development, oogenesis, meiosis, UCR motifs, AlignACE.

Received 20 April 2006; accepted after revision 17 July 2006. Correspondence: Klaus Hartfelder, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, Brazil. Tel.: +55 16 36023063; fax: +55 16 36331786; e-mail: klaus@fmrp.usp.br

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2·5, which does not permit commercial exploitation.

Introduction

The evolution of social organization in the Hymenoptera is intricately linked to the division of reproductive activities between highly fertile queens and functionally sterile workers (Wilson, 1971). Ontogenetically, these alternative phenotypes primarily reflect the differential feeding of larvae, a mechanism that is especially pronounced in the honey bee, *Apis mellifera*. Queen-destined larvae are fed large amounts of royal jelly during the entire larval feeding phase, whereas larvae destined to become workers receive an altered diet during the last larval instars (Haydak, 1970). This differential feeding program, in turn, acts on the endocrine system where it generates caste-specific signatures in juvenile hormone (JH) and ecdysteroid titres (Hartfelder & Engels, 1998; Rachinsky *et al.*, 1990). These metamorphic hormones are part of the endocrine programme that drives morphogenesis into either of the two alternative pathways.

The major differences between an adult honey bee queen and a worker reside in the reproductive system. A queen usually has close to 200 ovarioles per ovary and is capable of producing several hundred eggs per day. Workers in contrast have between two and 12 ovarioles per ovary (Snodgrass, 1956), which do not show signs of ongoing oogenesis as long as the queen is present. If the queen is lost, a number of workers can activate their ovaries and produce haploid eggs that will develop into drones (Kropácová & Haslbachová, 1971; Page & Erickson, 1988; Moritz *et al.*, 1996).

In order to come to an understanding of the molecular nature and the signal transduction pathways underlying these developmental and ovary activation signals, differential gene expression profiling in honey bee caste development

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 The Royal Entomological Society

was initiated in the late nineties. The main body of currently available data resulted from a cDNA library generated by suppression subtractive hybridization (SSH) that contrasted queen and worker larvae (Evans & Wheeler, 1999). Subsequent macroarray analyses (Evans & Wheeler, 2000) revealed a clustering of these expressed sequence tags (ESTs) into three distinct groups: genes overexpressed in young (bipotent) larvae, genes overexpressed in fifth-instar queen larvae, and genes overexpressed in fifth-instar worker larvae. A second study focusing on oxidative metabolism identified a set of differentially expressed mitochondrial genes (Corona *et al*., 1999). The third approach was a DDRT-PCR screen for hormone responsive genes to investigate the mode of action of ecdysteroids in the differentiation of the larval ovary (Hepperle & Hartfelder, 2001). Many of these EST sets could not be properly annotated at that time, either because of a limited number of fully sequenced insect genomes, or because the libraries contained large numbers of transcripts in 3′-gene regions, including poorly conserved untranslated regions (UTRs). The draft assembly for the honey bee genome (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) now permits a much more reliable annotation of this unique set of experimentally validated genes.

Reproductive activity of honey bees is determined in a two-step process. The basic differences in reproductive capacity between queen and workers manifest themselves during larval development by a wave of programmed cell death that leads to the destruction of over 95% of the ovariole primordia in the larval ovary of workers (Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998). In the adult life cycle of each caste, the co-ordinated flux of egg production through previtellogenic and vitellogenic growth will require the activity of other sets of genes. Some of these act as determinants of the major egg and also embryonic axes. As the fruit fly is the most well developed insect model for axis determination (St Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992), and maternal factors have not yet been functionally characterized in the honey bee, searching the genome assembly (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) provides the first major opportunity to explore putative patterning networks in honey bees.

The vitellogenic growth phase of the honey bee oocyte has long been the centre of attention as a means of describing differential fertility of the female castes (Engels, 1974). The synthesis of large amounts of vitellogenin by the queen fat body is intimately related to her high reproductive rate. The equally high vitellogenin titres in haemolymph of nonreproducing young worker bees, however, have been an enigma as their ovaries are inactive in the presence of the queen. Vitellogenin expression has apparently become uncoupled from oocyte growth during the evolution of the sterile worker caste and has acquired secondary functions. It became involved in the production of royal jelly (Amdam *et al*., 2003) and in the regulation of worker lifespan (Amdam *et al*., 2004) through an inhibitory effect on the endocrine system (Guidugli *et al*., 2005). Along with such unique life-history traits related to socially organized reproduction, honey bees also promise to answer new questions involving meiosis, as the honey bee genome exhibits recombination rates that exceed those of all other higher organisms (Hunt & Page, 1995; Solignac *et al*., 2004) and as honey bee males, being haploid, forego meiosis I in producing gametes.

The honey bee genome sequence database (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) has become an extremely valuable resource not only for comparative genomics, but also for functional genomics. One of the oldest, and for evolutionary biologists most challenging question in social insect biology is the development of a reproductive and a nonreproductive caste (Darwin, 1859). Apart from its implications on evolutionary theory in terms of kin selection (Hamilton, 1964), this is essentially a question of how developmental pathways diverge to shape distinct phenotypes, and how oogenesis is regulated to achieve levels of extremely high (queen) and extremely low (worker) fertility.

The annotation of genes related to caste development and differential reproduction in the honey bee has implications well beyond this species. It represents the first genome-wide annotation of a molecular architecture behind reproductive division of labour. In the light of current discussions on the importance of alternative phenotypes in the evolution of novelties (West-Eberhard, 2003) the honey bee genome information is certainly one of the most valuable resources. In the present manuscript we delineate a strategy on how to transcend from a straightforward gene annotation approach to functional studies based on motif analysis of upstream regulatory regions.

Results and discussion

From caste to BLAST: differentially expressed genes in caste development

The full list of genes that are overexpressed in fifth-instar queen or worker larvae, is made available online in the Supplementary material (Table 1S). This list includes scaffold number, corresponding EST number(s), GLEAN3-predicted protein sequence, similarity and identity indices to corresponding *Drosophila melanogaster* orthologs, as well as protein domain information (Pfam).

A general result was that a relatively large subset of genes (nine of 34) overexpressed in honey bee queen larvae is represented by putative *Drosophila* orthologs for which no Gene Ontology (GO) term for Biological Process is indicated in Flybase. In contrast, all worker genes correspond to functionally relatively well-defined *Drosophila* genes. Even when taking into consideration the conceptual limits in attributing GO terms on biological process from *Drosophila* orthologs to honey bee genes, this finding could have a bearing on basic questions in socioevolution,

© 2006 The Authors

namely, which caste is the novelty, the queen or the worker(s)? Phrased in other terms, the genome sequence information now permits to address at a molecular level questions that are fundamental to understand the role of (and evolutionary trends in) ontogenetic processes that structure insect societies, especially in hymenopterans. Such basic questions are (1) how many degrees of freedom (or release from constraints) may actually have been gained from splitting the functions normally performed by a solitary ancestral hymenopteran female into two or more castes, and (2) how was this release from constraints integrated into postembryonic differentiation processes to generate truly alternative phenotypes. A second observation of potential interest to functional genomics was that a relatively large subset of the caste-related genes maps to chromosome 2 (seven of 51 unique sequences).

Most genes in the caste gene list are represented by one or two EST hits, except for a predicted *hexamerin 70b* gene (GB10869-PA). This gene was evidenced by 10 ESTs, one in a 5′-located exon and nine in the 3′ region (five ESTs comprising parts of exon 7 and parts of the 3′-UTR, the other four ESTs landing in exons 6 and 7). The macroarray data (Evans & Wheeler, 2000) established this gene as overexpressed in the worker caste. Hexamerins are an important class of storage proteins that show interesting expression patterns related to caste and reproduction in many social insects (Martinez *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006a,b). A cDNA encoding the honey bee Hexamerin 70b subunit has recently been cloned and sequenced (Cunha *et al.*, 2005), and hormone manipulation experiments showed that the abundance of *hexamerin 70b* transcripts in larval development is positively correlated with high levels of JH and ecdysteroids. This could actually reflect a regulatory feedback function in JH titre regulation, as exemplified in the termite *Reticulitermes flavipes*, where the Hex1/Hex2 ratio controls JH availability for caste-specifically differentiating tissues (Zhou *et al.*, 2006b).

Within the honey bee caste genes for which GO information was imported and deduced from their *Drosophila* orthologs we noted a predominance of terms clustering as 'cellular physiological process' (95%; GO:0050875) and 'metabolism' (90%; GO:0008152) in the 'Biological Process' (GO:0008150) category (Fig. 1A). GO-statistics differences between queens and workers became apparent in terms clustering as 'cell differentiation' (0% for queen and 28.5% for workers; GO:0030154) and 'metabolism' (96% for queen and 78.5% for worker; GO:0008152) in the 'Biological Process' (GO:0008150) (Fig. 2A).

With respect to 'Molecular Function' (GO:0003674), most terms were related to mRNA translation ('nucleic acid binding' (38%; GO:0003676), 'structural constituent of ribosome' (24%; GO:0003735), 'protein binding' (12%; GO:0005515), 'nucleotide binding' (12%; GO:0000166), 'translation factor activity, nucleic acid binding' (7%; GO:0008135). Further important terms were 'oxidoreductase activity' (19%; GO:0016491) and 'hydrolase activity' (16.5%; GO:0016787) (Fig. 1B). For these latter two terms we noted potentially interesting differences related to caste, with 'hydrolase activity' being overrepresented by worker transcribed genes, whereas 'oxidoreductase activity' was exclusively represented by queen genes (Fig. 2B). Even though these GO assignments on Molecular Function are based on evidence from *D. melanogaster*, without experimental evidence for *Apis mellifera*, the corresponding genes are well conserved in sequence and show the

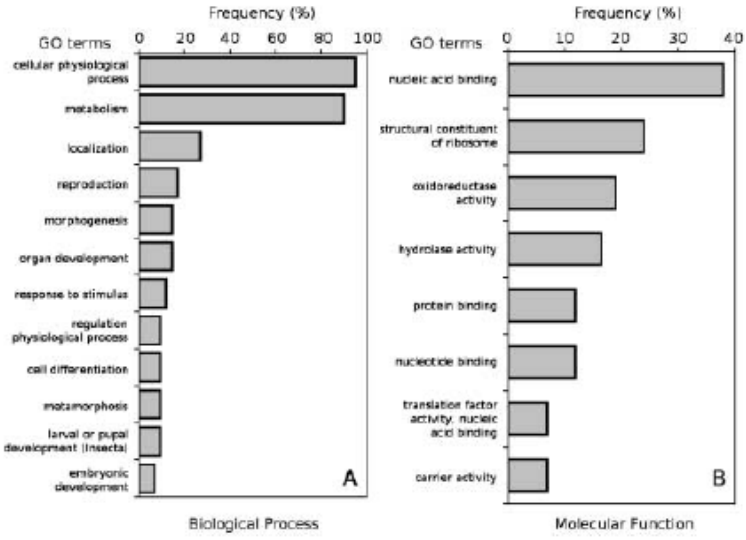


Figure 1. Dominant gene ontology terms for (A) Biological Process and (B) Molecular Function in honey bee genes with an experimentally validated caste-specific expression pattern during the last larval instar. The graph was generated by a FatiGO analysis set at level 3. Frequencies indicate the appearance of GO terms in the total set of queen and worker differentially expressed genes.

© 2006 The Authors

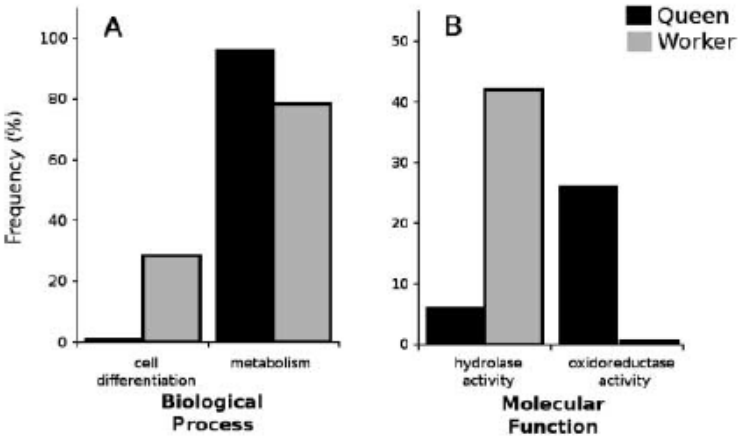


Figure 2. Gene Ontology categories with caste-specific expression patterns for Biological Process (A). Genes classified as part of cell differentiation processes are significantly overexpressed in workers, whereas genes related to metabolism are overexpressed in queen larvae. In the Molecular Function categories (B) we observed an apparent split indicating differential enzyme preferences in queens (overexpress oxidoreductases) and in workers (overexpress hydrolases). The graph was generated by a FatiGO analysis set at level 3. Frequencies indicate the appearance of GO terms in the queen (black bars) and worker differentially expressed genes (grey bars).

relevant protein domains (Supplementary material, Table 1S), and thus, are indicative of functional trends.

In general terms, the caste-specific separation into metabolic pathway preferences, oxidoreductases vs. hydrolases, may reflect the switch in diet that a worker larva experiences during the fourth and fifth larval instar. This represents a switch from a protein/lipid-rich diet to a more carbohydrate-rich diet (Haydak, 1970), and this switch apparently is accompanied by an increase in the expression of genes coding for proteins with hydrolase activity. Similar switches in gene expression patterns have recently been reported for *D. melanogaster* in an experiment where larvae were shifted from a cornmeal diet to a banana diet (Carsten *et al.*, 2005), resulting in the up- or downregulation of 55 genes of a test population of 6000. Among these are five genes with dehydrogenase/oxidoreductase activity. These parallels in dietary switch responses are indicative of conserved coregulated gene networks. An open question is, of course, how these can be co-opted to generate different phenotypes, such as the castes of social insects. In this respect, social insects clearly go a big step beyond the simple metabolic switch response seen in *Drosophila*. They have apparently incorporated divergent metabolic regulation into a network architecture consistent with morphogenetic differentiation. This required that metabolic regulation became integrated through the endocrine system with developmental patterning processes.

The importance of metabolic regulation on caste development has also come to light in a recent Representational Difference Analysis (RDA) study on caste development in the highly eusocial stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Judice *et al.*, 2006). This is particularly interesting because in this genus, caste development is thought to be based on a genetic predisposition (Kerr, 1950). Metabolic regulation may, thus, be a *sine qua non* for caste development, and caste-specific metabolic pathways may be set in motion rather independently of the nature of the initial switch (nutritional or genetic). The question of how this metabolic switch may integrate with the resultant endocrine signature characteristic for each caste is still a widely open field, but, recent studies in *Drosophila* showing an interaction between ecdysone and insulin signalling in the determination of body size (Colombani *et al.*, 2005; Mirth *et al.*, 2005) may provide a lead.

This is also the point to reflect on how justified it is to heuristically rely on *Drosophila* orthologs and to use their GO attributes in a developmental context (caste differentiation) that has no parallel in *Drosophila*. A recent gene expression profiling study in the ant *Camponotus festinatus* employing a microarray set-up of 384 clones showed significantly different expression levels for larval vs. adult ants in 91 genes (21 confirmed by qRT–PCR), including an *Apis hexamerin 70b* ortholog (Goodisman *et al.*, 2005). When comparing the temporal expression patterns of these ant genes with expression profiles for their respective *Drosophila* orthologs (Arbeitsman *et al.*, 2002) relatively little accord was noted for the two species, leading to the suggestion that these genes may have taken on distinct functions due to the long divergence time between dipterans and hymenopterans (Goodisman *et al.*, 2005). Differences aside, these examples show that in practically all studies on large-scale functional considerations in gene expression, we are strongly wedded with *Drosophila*, and even though functional divergence in orthologs may have occurred, there is little experimental gene-by-gene evidence available for any of the major insect orders outside of Diptera.

Functional studies are clearly profiting from the now available honey bee genome sequence, as evident from the increasing number of RNAi experiments in honeybees (see citations in Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). This is still a small number compared with

© 2006 The Authors

the large-scale RNAi assays established for *Drosophila* (Boutros *et al.*, 2004), but the development of cell culture approaches in the honey bee (Bergem *et al.*, 2006) represents a step in this direction.

Alternatively, regulatory functional associations between genes and their integration into networks can be inferred from the presence of response elements in upstream control regions. In our analysis of differentially expressed genes in queen-worker development we took a bioinformatics approach for a first look into the molecular architecture of a developmental polyphenism.

Table 1. Kolmogorov–Smirnov analysis of ROC AUC and MNCP metric for statistical significance of putative regulatory motifs in upstream control regions of genes with queen or worker-specific expression patterns. These motifs were contrasted with a random set of motifs detected in a random set of UCRs of GLEAN3-predicted honey bee genes.

Group pairs	ROC AUC	MNCP
Random × (Queen + Worker)	$P > 0.1$	$P < 0.001$
Random × Queen	$P > 0.1$	$P < 0.005$
Random × Worker	$P > 0.1$	$P < 0.001$
Queen × Worker	$P < 0.1$	$P > 0.1$

Motif search in upstream regions of differentially expressed genes

The genes related to caste development are among the first honey bee genes for which experimentally validated expression data were generated (Corona *et al.*, 1999; Evans & Wheeler, 1999, 2000; Hepperle & Hartfelder, 2001; Guidugli *et al.*, 2004). Certainly, these 51 genes do not comprise all the genes involved in caste development but they are expected be prominent players as they were the ones that stood out in the SSH and DDRT-PCR approaches. The 51 caste genes do not represent gene families but rather fall into many very different molecular function categories. This made us ask whether the observed overexpression pattern of different genes in either queen or worker larvae may be associated with the occurrence of specific regulatory motifs in the upstream control regions (UCR) of these genes.

Three different algorithms, AlignACE (Roth *et al.*, 1998), MEME (Bailey & Elkan, 1995) and MDscan (Liu *et al.*, 2002) were used to construct a pipeline for detecting overrepresented motifs in the two unaligned sets of UCR sequences for the caste-specifically expressed genes. This pipeline was run on a 'top-10' set of 12 genes (six for each caste), which showed the most pronounced caste differences in expression (Evans & Wheeler, 2000) and also on a randomly selected set of UCRs (background control). We calculated four different metrics for each motif: MAP score (Roth *et al.*, 1998), a group-specificity score (Church score) (Hughes *et al.*, 2000), and a ROC AUC and MNCP metric (Clarke & Granek, 2003). A first set of filters was used to detect motifs with a potential for regulatory functions (MAP score ≥ 5; ROC AUC ≥ 0.7). This resulted in 46 motifs out of 123 total UCR motifs found in the queen UCR set and in 71 motifs out of 261 total found in the worker UCR set (Supplementary material, Table 2S).

A parametric statistical test (MANOVA; $P = 0.0001$; Wilks' = 0.78; $F = 7.2$) and a nonparametric statistical test (Kolmogorov–Smirnov; Table 1) on ROC AUC and MNCP indices showed that these two sets of filtered motifs are significantly different from a randomly selected set of motifs. The rank-order metrics, ROC AUC and MNCP, have previously been used to compare the association of short regulatory sequence features with gene expression data (microarray analyses on coregulated genes) and they have been useful in flagging false positives erroneously included in 'top-10' sets of differentially expressed genes (Clarke & Granek, 2003).

To select highly specific motifs found in each data set we used the group-specificity score (Church score ≤ $1e^{-05}$; Hughes *et al.*, 2000) to identify the most likely motifs involved in decision making for pathways leading to queen (two motifs, Fig. 3A) or to worker development (12 motifs with Church score ≤ $1e^{-07}$, Fig. 3B). As the SSH and DDRT-PCR approaches on caste development can be expected to retrieve only a subpopulation of such genes, these motifs represent only a partial scenario of the transcriptional regulatory network underlying caste development. The motifs can now be used to screen other GLEAN3-predicted genes to integrate a candidate list of putatively coregulated genes in caste development that can be submitted to further experimental validation.

Each motif found in UCRs of queen (46) and worker (71) overexpressed genes was compared with the entire set of *D. melanogaster cis*-regulatory motifs contained in the TRANSFAC database (version 4.0; Wingender *et al.*, 2000). Only alignments passing 80% identity for each position-specific site matrix (PSSM) were considered as significant matches. Whereas none of the most specific motifs for each caste showed similarity to any of the *D. melanogaster* motifs, some of the more ubiquitous ones did resemble binding sites of transcription factors, such as *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, *zerknüllt*, *even skipped*, *trithorax-like*, *tailless*, *paired*, *fushi tarazu* and *Adh transcription factor 1* (Supplementary material, Table 2S).

When we plotted the positions of the two queen and the 12 worker motifs in the UCRs of the caste-specifically expressed genes (Fig. 4) an interesting pattern emerged for the worker-specific motifs. Some of the worker motifs appeared to be clustered and occurring in tandem; furthermore, they were positioned relatively close to the predicted translation start sites in some of the genes that are overexpressed during worker development (annotation results of these genes are listed in Supplementary material, Table 1S). A position close to the predicted translation start

© 2006 The Authors

(A) Queen

Motif	MAP	Church	ROC_AUC	MNCP	Motif consensus
Q1	5.50	1.37e-07	0.82	208.38	
Q2	5.27	2.57e-05	0.95	19.20	

(B) Worker

Motif	MAP	Church	ROC_AUC	MNCP	Motif consensus
W1	12.79	5.32e-10	0.74	113.04	
W2	11.39	5.32e-10	0.74	97.89	
W3	8.93	5.32e-10	0.83	237.48	
W4	7.04	5.32e-10	0.83	227.58	
W5	9.31	5.32e-10	0.90	118.10	
W6	9.86	5.32e-10	0.74	334.61	
W7	15.86	5.59e-10	0.74	206.11	
W8	8.55	1.37e-07	0.82	77.90	
W9	7.44	1.37e-07	0.90	35.16	
W10	13.83	1.37e-07	0.74	169.79	
W11	11.09	1.37e-07	0.83	184.30	
W12	10.59	1.37e-07	0.74	68.93	

Figure 3. Putative regulatory motifs and their consensus sequences in UCRs of queen and worker overexpressed genes. Scores for MAP, Church, ROC AUC and MNCP metrics indicate degree of group specificity and significance level.

sites is generally taken as a sign of strong regulatory effect (Davidson, 2001).

As caste development is highly dependent on changes in haemolymph titres of JH and ecdysteroids we also screened the UCRs of the differentially expressed genes for putative nuclear receptor binding sites. Regulatory elements involved in the JH response are not well understood yet, so any prediction in this direction would be elusive (Wheeler & Nijhout, 2003). Functional ecdysone response elements (EcRE) have, however, been identified and it is now well established that the EcR/USP complex binds to direct or inverted (palindromic) repeats (Riddihough & Pelham, 1987; Antoniewski *et al.*, 1995; Perera *et al.*, 2005). A PSSM search (Wassermann & Sandelin, 2004) based on a canonical representation (rGkTCAaT-Gamcy) (Perera *et al.*, 2005) did not reveal any putative EcRE motif in the UCRs of the 51 caste-differentially expressed genes. However, this does not rule out that these genes respond to changes in JH and/or ecdysteroid titres as these hormones require EcR/USP binding primarily in the expression of early genes, but not necessarily for the late response genes (Li & White, 2003; Sullivan & Thummel, 2003).

In conclusion, the predictions from such a combined strategy that searches for group-specific and for conserved regulatory motifs in GLEAN3 predicted honey bee genes

© 2006 The Authors

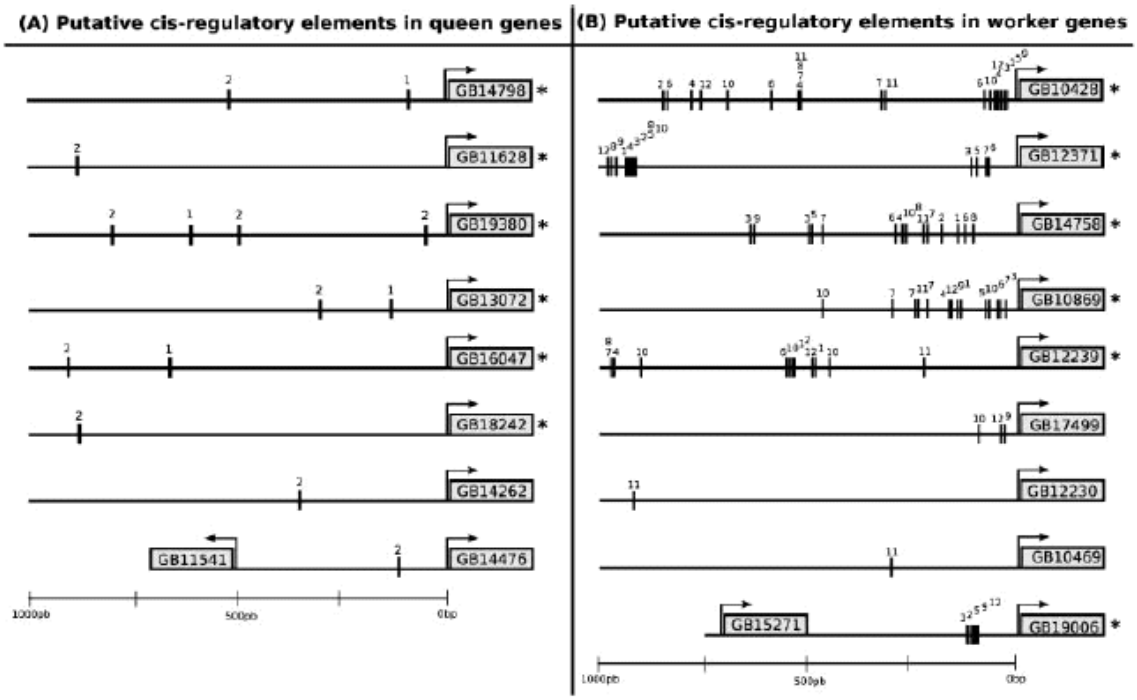


Figure 4. Map of the group-specific motifs found in queen and worker UCRs of caste-specifically expressed genes. The coding region is represented by the GLEAN3 prediction number (assembly 4.0) with arrows indicating the translation start site. Asterisks mark UCRs of the 'top10' set used to find the over-represented motifs.

represents a major transition from nonhypothesis-driven high-throughput screens to hypothesis-driven searches for context-dependent gene expression in honey bees. Such directed search results can serve as a platform for experimental analyses of genome-wide integration in hormonal control of caste development in bees. In addition, this study exemplifies how existent algorithms for detecting shared regulatory motifs can be joined into a toolkit for predicting coregulated gene expression patterns in honey bees. These methods have been shown to be robust and are gaining acceptance for use in functional and comparative genomics (Liu *et al.*, 2004; Pritsker *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005).

Oogenesis and reproduction

As caste development sets the stage for reproductive division of labour, genes involved in reproductive processes are strong candidates for functional analyses. In the present study we performed BLAST searches to identify honey bee orthologs for a list of 32 fly genes with the GO attribute 'oogenesis' and for four genes specifically related to 'vitellogenesis'. The list for fly genes involved in nuclear events in germ cells consisted of 20 genes for 'female meiosis', 12 genes for 'recombination' and 21 genes under the heading 'chromosome segregation including segregation distortion' (Supplementary material, Table 3S). In some cases, these GO attributes for fly genes, of course overlapped.

BLASTN and BLASTX searches for these fly genes against the honey bee genome assembly 3.0 and the GLEAN3 Official Set (aa) retrieved statistically well supported putative bee orthologs for most of these candidates. For the genes involved in meiosis, recombination and chromosome segregation this finding, although not unexpected, is of interest as meiosis in the haploid honey bee drone is strongly modified when compared with a normal diploid meiosis. The first meiosis is initiated but the nucleus remains undivided and only the superfluous centrioles are eliminated as cytoplasmatic buds (Hoage & Kessel, 1968). An interesting gene, thelytoky (*th*), has recently been mapped in this context (Lattorff *et al.*, 2005). It prevents almost completely meiotic recombination in the automixis of laying workers of the Cape honey bee. As an indication of the interplay between meiosis and later development, this locus also appears to be an integral part of various gene cascades involved in caste determination (Lattorff *et al.*, 2006).

The fly genes retrieved in the GO searches for 'oogenesis' represent a much larger range of Molecular Function categories, such as transcription factors, proteins regulating

© 2006 The Authors

translation by RNA binding, RNA helicases, enzymes (ubiquitination, transfer of sugar residues, sulfotransferase), GTPase activity, and several factors binding to cytoskeletal proteins (Supplementary material, Table 3S). This wide range of functional categories is expected as these genes are involved in a series of different steps during oogenesis in the polytrophic meroistic ovary. Oogenesis starts out with the maintenance of germline and somatic stem cell identity in the germline niche in the upper germarium. A key gene involved in this process is *pumilio* (Forbes & Lehmann, 1998), which is represented by a highly conserved bee ortholog, GB10504-PA. The second step is the formation of germ cell cysts, the determination of an oocyte within each cyst, and the survival of these cysts, involving genes such as *benign gonial cell neoplasm* (Lin *et al.*, 1994), *encore* (Hawkins *et al.*, 1996), *ovo* and *ovarian tumour* (*otu*) (Staab & Steinmann-Zwicky, 1995), all well conserved in the honey bee genome. Interestingly, we could not find a clear bee ortholog for *bag of marbles* (*bam*), which is one of the prime early response genes in the cystoblast differentiation pathway in *Drosophila* (McKearin, 1997).

The third step comprises previtellogenic growth of the follicle, and during these stages a number of maternal factors are deposited and anchored either within the oocyte or in the perivitelline space that define the egg and the future embryonic axes (for review see, St Johnston & Nüsslein-Volhard, (1992). In the list of *Drosophila* genes involved in early steps of axis determination a couple of surprises came up in the search for honey bee orthologs. A big surprise was that we could not find a *gurken* ortholog in the bee, even though this gene sets up both the anterior–posterior and dorsal–ventral axes in the *Drosophila* egg (González-Reyes *et al.*, 1995), whereas downstream components of the Gurken signalling cascade appear to be preserved in the bee genome (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Similar apparent gaps in constituents of patterning cascades were noted for the terminal regions of the embryo, such as a lack of a *torso* ortholog, whereas its ligand, *torso-like*, is represented by a well conserved ortholog in the bee (GB18663-PA).

With respect to genes involved in the final processes of oogenesis we primarily looked at genes that play a part during vitellogenesis. There are four genes of interest in this class, the primary one coding for the yolk protein precursor vitellogenin. This gene has already been sequenced for the honey bee (Piulachs *et al.*, 2003) and, as expected, it is much more related to vitellogenins of other insects and even vertebrates than to the *Drosophila* yolk proteins, which apparently are derived from lipases (Hagedorn *et al.*, 1998). The second gene of interest is the bee ortholog to *yolkless*, as this (GB16571-PA) could represent a putative vitellogenin receptor. The other two *Drosophila* genes with clear orthologs in the bee are CG18641 and CG12139, which code for a lipase and an LDL receptor, respectively.

General conclusions

The current analysis made use of previous experimental analyses on differential transcription during caste development of honey bee larvae. In the annotation of these genes, which includes references to Gene Ontology terms associated with their respective *Drosophila* orthologs, two major configurations emerged. First of all, worker genes were better defined in terms of GO attributes, compared with the relatively large number of queen genes that had no GO terms associated to their respective *Drosophila* orthologs. Even when taking into consideration the conceptual limits in attributing GO terms on molecular function and biological process from *Drosophila* orthologs to honey bee genes, this finding could have a bearing on general basic questions in socioevolution, namely, which caste is more divergent from a nonsocial reproductive female bee prototype or reproductive ground plan, the queen or the worker? Less speculative is the second major conclusion coming out of the GO analysis for Molecular Function, showing and confirming (Eder *et al.*, 1983; Corona *et al.*, 1999) the important role of metabolic regulation in caste development. This facet is demonstrated especially clearly in the caste-specific expression of oxidoreductases (queen) vs. hydrolases (workers).

The honey bee genome information provided not only a much improved annotation platform for caste-specifically expressed ESTs, but, even more so, opens the possibility to explore putative regulatory features of the honey bee genome. In the current study we employed modified Gibbs sampling and expectation-maximization algorithms (AlignACE, MDScan, MEME) to detect group-specific motifs in gene regions up to 1000 bp upstream of translation start sites. We detected 14 motifs that were significantly over-represented in the caste genes, when compared with corresponding motifs found in a random set of GLEAN3-predicted honey bee genes. The localization of such motifs in UCRs of worker-overexpressed genes revealed a clustering of such motifs close to the predicted basal promotor regions suggesting strong regulatory effects. Such search strategies and the detected motifs can provide the lead to reveal and unravel *cis*-regulatory networks for and within specific contexts of honey bee biology.

Caste polyphenism in social insects makes a strong case for the emergence of novelties at a microevolutionary level (West-Eberhard, 2003). Without the pretension to discuss exhaustively the mechanisms underlying this surge of developmental plasticity, two major themes become apparent in this and other studies. Regulatory change has been demonstrated in the shut-down of wing disc patterning cascades in ants (Abouheif & Wray, 2002) and is certainly also implicit in observed temporal changes in gene expression during postembryonic development of ants and bumble bees (Goodisman *et al.*, 2005; Pereboom

© 2006 The Authors

et al., 2005). Such change would be expected to involve *cis*-regulatory elements, that is, change in transcription factor binding sites in UCRs, as approached in this study, and also evolutionary change in response thresholds to circulating morphogenetic hormones (for review see, Hartfelder & Emlen, 2005). The second and quite unexpected theme is the acquisition of new systemic functions by evolutionary rather old proteins, such as vitellogenin and hexamerins. These apparently unspectacular proteins have evolved into key players for caste evolution and reproductive division of labour via novel regulatory connectivity with JH (Amdam *et al.*, 2004; Guidugli *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006a,b).

Experimental procedures

Selection and annotation of ESTs representing differentially expressed genes in honey bee caste development

The starting point were 164 entries (mainly 3′-ESTs) in GenBank (BG101532–BG101697) from an SSH library (Evans & Wheeler, 1999; Evans & Wheeler, 2000). When validated by macroarray analyses, a clustering into three major classes became apparent: (I) genes overexpressed in young larvae; (II) genes overexpressed in last instar queen larvae; and (III) genes overexpressed in last instar worker larvae. For this study we excluded the class I ESTs because their expression is not caste-specific, but rather represents expression differences between young (still bipotent) and older larvae. To the class II queen ESTs (82) we added one complete cDNA entry (AY601642) from a DDRT-PCR screen (Corona *et al.*, 1999), and to the class III set of worker ESTs (40) we added seven GenBank dbEST entries (BG149167–BG149173) from a DDRT-PCR screen on ovary development (Hepperle & Hartfelder, 2001).

The EST sequences were submitted to BLASTN searches (parameters: -G 2 -E 3 -W 15 -F 'm D' -U -e 1e-20) against genome sequence assembly Amel_v3.0 to retrieve matches in linked or unlinked genomic contigs and to exclude no-matches (seven ESTs in queen). ESTs that aligned within the same scaffold were checked for clustering and overlap. This clustering also served to exclude genes that were represented by non-overlapping ESTs from both castes. This procedure generated a set of 51 unique putative gene sequences overexpressed in either queen (34) or in worker larvae (17). These 51 nonredundant sequences were submitted to BLASTX searches against the Official Set of GLEAN3-predicted protein sequences (cut-off value at $1e^{-20}$). For ESTs with no significant protein sequence matches, the genomic regions adjacent to the mapped EST were searched to find neighbouring ORFs, especially those nearest to putative 3′ UTRs of predicted proteins, as the EST libraries have a bias in this direction.

Official Set protein sequences were aligned against Amel_v3.0 sequence assembly using TBLASTN to map protein to genome and subsequently, they were aligned using BLASTP against the GenBank nonredundant (nr) and the Flybase protein sequence databases. The manual features annotation procedure of the Artemis 7.0 program (Rutherford *et al.*, 2000) was used to map ORFs, putative splice sites of exons and ESTs to genome coordinates. The final annotation file was generated with a Python script in GFF format (http://www.sanger.ac.uk/Software/formats/GFF/).

Honey bee sequences annotated as orthologs to *D. melanogaster* genes were putatively assigned the GO terms listed in the respective Flybase entry. In addition, the definition of new GO terms (Biological Process ontology) related to caste development and polyphenism (GO:0048651 and GO:0048650, respectively) was co-ordinated with the Gene Ontology Consortium (Ashburner *et al.*, 2000). The FatiGO web tool (Al-Sharour *et al.*, 2004) was used to cluster GO terms (level 3 setting) for Biological Process and Molecular Function.

For the detection of conserved domains, the 51 protein sequences were screened against the Pfam database (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) using the HMMER platform (current release 2.3.2, http://hmmer.wustl.edu/), with a cut-off value set at $1e^{-10}$.

Annotation of oogenesis and reproduction genes

In order to identify putative honey bee orthologs to *D. melanogaster* genes we searched the following GO terms in Flybase: 'oogenesis' (GO:0009993), 'vitellogenesis' (GO:0007296), 'female meiosis' (GO:0007143), 'DNA recombination' (GO:0006310), and 'chromosome segregation' (GO:0007059). Genes related to segregation distortion were searched for in Flybase in phenotypic descriptions and mutant effects of *D. melanogaster* genes as this phenomenon is not represented by a GO term. Hence this group may be more heterogeneous than the others. From this list we removed genes of pleiotropic function (multifaceted GO entries in Biological Process) and genes that lacked defined transcripts in the *Drosophila* genome database.

For the GO terms 'oogenesis' and 'vitellogenesis' we performed TBLASTN and BLASTP searches for 42 fruit fly genes against the Amel_v3.0 genome assembly and the GLEAN3-predicted protein sequences (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006), respectively. The orthologous *D. melanogaster* gene was characterized by the same procedure as described above (reciprocal best hit). For the GO terms 'female meiosis', 'DNA recombination', 'chromosome segregation' and the non-GO group 'segregation distortion', transcripts of *D. melanogaster* were searched against nr databases at NCBI using BLASTP. The obtained sequences were searched against the Amel_v3.0 genome assembly and the GLEAN3-predicted protein sequences using TBLASTN. Homologous sequences (threshold $1e^{-10}$) were predicted using the BioEdit software (Hall, 1999). ORFs showing significant homology (BLASTP, threshold $1e^{-20}$) were assembled and used in BLASTP searches against the nr databases at NCBI.

Motif search in upstream regions in caste-specifically expressed genes

In order to detect overrepresented motifs in the upstream control regions (UCRs) of the two sets of caste-related genes we selected gene subsets based on two criteria: (1) those that had shown the highest caste-specificity in the array analyses (Evans & Wheeler, 2000), and (2) those that had a conserved 5′ region when compared with the *Drosophila* orthologs. These 'top10' genes consisted of six queen genes (GB13072, GB11628, GB19980, GB14798, GB16047 and GB18242) and of six worker genes (GB10869, GB12371, GB12239, GB10428, GB19006, GB14758). The motif search was conducted separately on the two sets of UCR sequences using three methods: AlignAce (Roth *et al.*, 1998), MEME (Bailey & Elkan, 1995) and MDscan (Liu *et al.*, 2002). Default parameters values were used in all searches, except that GC content in intergenic regions was set to 25%, representing the background value established for the honey bee UCR database generated in this study.

© 2006 The Authors

The database containing 10,156 UCR sequences was generated by parsing the Official Set annotation file (downloaded in GFF format from http://www.beegenome.hgsc.bcm.tmc.edu/beeftp.html) to extract upstream regions starting from the terminal 5′-genomic coordinate of each predicted CDS. The UCRs were arbitrarily set to a size frame of 1000 nucleotides (Roth *et al.*, 1998), but were trimmed whenever another predicted ORF was detected in any of these regions.

The MAP (maximum a priori log likelihood) score, group specificity score (called Church score in this manuscript) (Hughes *et al.*, 2000), ROC AUC (area under the curve for a receiver-operator characteristic plot) metric and MNCP (mean normalized conditional probability) metric (Clarke & Granek, 2003) were used to detect motifs that most likely correspond to biologically significant *cis*-regulatory elements. The filters ran on the UCRs of the subsets of queen and worker genes were a MAP score cut-off value of 5.0, followed by a ROC AUC cut-off at 0.7, followed by a group specificity score cut-off at $1e^{-05}$. The UCR database of all GLEAN3 predicted honey bee genes was used as the background to calculate these metrics.

A parametric test (MANOVA) and a nonparametric test (Kolmogorov–Smirnov) were conducted to identify significance levels for the two sets of filtered motifs found in the UCRs of caste-specifically expressed genes against filtered motifs found in the random UCR set. Random motifs were sampled from a motif database (10 391 motifs) generated by running our script 100 times with a random sets of UCR sequences.

The main criterion for identifying known regulatory motifs among these caste-specific ones was the alignment of the PSSM for each bee motif with the *Drosophila melanogaster* sequences in the TRANSFAC database (release 4.0) (Wingender *et al.*, 2000). Only the alignments passing a threshold of 80% identity for each PSSM were considered as significant matches. In addition, we checked for a specific binding motif, the EcR/USP motif (rGkTCAaTGamcy-3′), known to function in the expression of genes responding to morphogenetic hormone titres (Perera *et al.*, 2005).

Operating system and programming tools

An Ubuntu Linux (version Breezy) operating system was used to implement all scripts and pipelines designed for annotation procedures and motif discovery. The Python programming language (http://www.python.org/), Biopython (http://www.biopython.org), and TAMO (Tools for Analysis of Motifs) packages (Gordon *et al.*, 2005) were used in program design. Other web applications were built using the Zope application server (http://www.zope.org) hosted at http://zulu.fmrp.usp.br/beelab.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo; 99/00719-6) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; 472963/2-3-1).

References

Abouheif, E. and Wray, G.A. (2002) Evolution of the genetic network underlying wing polyphenism in ants. *Science* **297**: 249–252.

Al-Sharour, F., Diaz-Uriarte, R. and Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* **20**: 578–580.

Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A. and Omholt, S.W. (2003) Social exploitation of vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 1799–1802.

Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., *et al.* (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp Gerontol* **39**: 767–773.

Antoniewski, C., O'Grady, M.S., Edmondson, R.G., Lassieur, S.M. and Benes, H. (1995) Characterization of an EcR/USP heterodimer target site that mediates ecdysone responsiveness of the *Drosophila Lsp-2* gene. *Mol Gen Genet* **249**: 545–556.

Arbeitsman, M.N., Furlong, E.E.M., Imam, F., Johnson, E., Null, B.H., Baker, B.S., *et al.* (2002) Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* **297**: 2270–2275.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., *et al.* (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet* **25**: 25–29.

Bailey, T.L. and Elkan, D. (1995) Unsupervised learning of multiple motifs in biopolymers using expectation maximization. *Machine Learning J* **21**: 58–83.

Bergem, M., Norberg, K. and Aamodt, R.M. (2006) Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. *BMC Dev Biol* **6**: 17: online.

Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., *et al.* (2004) Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* **303**: 832–835.

Carsten, L.D., Watts, T. and Markov, T.A. (2005) Gene expression patterns accompanying a dietary switch in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* **14**: 3203–3208.

Clarke, N.D. and Granek, J.A. (2003) Rank order metrics for quantifying the association of sequence features with gene regulation. *Bioinformatics* **19**: 212–218.

Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., *et al.* (2005) Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* **310**: 667–670.

Corona, M., Estrada, E. and Zurita, M. (1999) Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol* **202**: 929–938.

Cunha, A.C., Nascimento, A.M., Guidugli, K.R., Simões, Z.L.P. and Bitondi, M.M.G. (2005) Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee. *J Insect Physiol* **51**: 1135–1147.

Darwin, C.R. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. John Murray, London.

Davidson, E.H. (2001) *Genomic Regulatory Systems: Development and Evolution*. Academic Press, San Diego.

Eder, J., Kremer, J.P. and Rembold, H. (1983) Correlation of cytochrome c titer and respiration in *Apis mellifera*: adaptive responses to caste determination defines workers, intercastes and queens. *Comp Biochem Physiol B* **76**: 703–716.

Engels, W. (1974) Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *Am Zool* **14**: 1229–1237.

Evans, J.D. and Wheeler, D.E. (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5575–5580.

© 2006 The Authors

Evans, J.D. and Wheeler, D.E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol 2* **1**: 6 pages, online http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1.

Forbes, A. and Lehmann, R. (1998) Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* **125**: 679–690.

González-Reyes, A., Elliot, H. and St. Johnston, D. (1995) Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. *Nature* **375**: 654–658.

Goodisman, M.A., Isoe, J., Wheeler, D.E. and Wells, M.A. (2005) Evolution of insect metamorphosis: a microarray-based study of larval and adult gene expression in the ant *Camponotus festinatus*. *Evolution* **59**: 858–870.

Gordon, D.B., Nekludova, L., McCallum, S. and Fraenkel, E. (2005) TAMO: a flexible, object-oriented framework for analysing transcriptional regulation using DNA-sequence motifs. *Bioinformatics* **21**: 3164–3165.

Guidugli, K.R., Hepperle, C. and Hartfelder, K. (2004) A member of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily is a target of the ecdysone response in honey bee (*Apis mellifera*) caste development. *Apidologie* **35**: 37–47.

Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S.W., Simões, Z.L.P. and Hartfelder, K. (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett* **579**: 4961–4965.

Hagedorn, H.H., Maddison, D.R. and Tu, Z. (1998) The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv Insect Physiol* **27**: 335–384.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95–98.

Hamilton, W.D. (1964) The genetical theory of social behaviour I. & II. *J Theor Biol* **7**(1–16): 17–52.

Hartfelder, K. and Emlen, D.J. (2005) Endocrine control of insect polyphenism. In *Comprehensive Insect Molecular Science* (Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S., *eds)*, Vol. 3, pp. 651–703. Elsevier, Oxford.

Hartfelder, K. and Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Topics Dev Biol* **40**: 45–77.

Hawkins, N.C., Thorpe, J. and Schüpbach, T. (1996) *encore*, a gene required for the regulation of germ line mitosis and oocyte differentiation during *Drosophila* oogenesis. *Development* **122**: 281–290.

Haydak, M.H. (1970) Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol* **15**: 143–156.

Hepperle, C. and Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* **88**: 113–116.

Hoage, T.R. and Kessel, R.G. (1968) An electron microscopic study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *J Ultrastruct Res* **24**: 6–32.

Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee. *Apis mellifera*. *Nature* (in press).

Hughes, J.D., Estep, P.W., Tavazole, S. and Church, G.M. (2000) Computational identification of *cis*-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cervisiae*. *J Mol Biol* **296**: 1205–1214.

Hunt, G.J. and Page, R.E. (1995) Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* **139**: 1371–1382.

Hunt, J.H., Buck, N.A. and Wheeler, D.E. (2003) Storage proteins in vespid wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. *J Insect Physiol* **49**: 785–794.

Judice, C.C., Carazzole, M.F., Festa, F., Sogayar, M.C., Hartfelder, K. and Pereira, G.A.G. (2006) Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Mol Biol* **15**: 33–44.

Kerr, W.E. (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* **35**: 143–152.

Kropácová, S. and Haslbachová, H. (1971) The influence of queenlessness and of unsealed brood on the development of ovaries in worker honeybees. *J Apicult Res* **10**: 57–61.

Lattorff, H.M.G., Moritz, R.F.A. and Fuchs, S. (2005) A single gene determines thelytokous parthenogenesis in honey bee workers (*Apis mellifera capensis*). *Heredity* **94**: 533–537.

Lattorff, H.M.G., Moritz, R.F.A., Solignac, M. and Crewe, R.M. (2006) Control of reproductive dominance by the *thelytoky* gene in honeybees. *Biol Lett* (in press).

Li, T.R. and White, K.P. (2003) Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*. *Dev Cell* **5**: 59–72.

Lin, H., Yue, L. and Spradling, A.C. (1994) The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* **120**: 947–956.

Liu, X.S., Brutlag, D.L. and Liu, J.S. (2002) An algorithm for finding protein-DNA binding sites with applications to chromatin-immunoprecipitation microarray experiments. *Nature Biotechnol* **20**: 835–839.

Liu, Y., Liu, S., Wei, L., Altman, R.B. and Batzoglou, S. (2004) Eukaryotic regulatory element conservation analysis and identification using comparative genomics. *Genome Res* **14**: 354–366.

Martinez, T., Burmester, T., Veenstra, J.A. and Wheeler, D.E. (2001) Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*. *Insect Mol Biol* **9**: 427–431.

McKearin, D. (1997) The *Drosophila* fusome, organelle biogenesis and germ cell differentiation: if you build it. … *Bioessays* **19**: 147–152.

Mirth, C., Truman, J.W. and Riddiford, L.M. (2005) The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* **15**: 1–12.

Moritz, R.F.A., Kryger, P. and Allsopp, M.H. (1996) Competition for royalty in bees. *Nature* **384**: 31.

Page, R.E. and Erickson, E.H. (1988) Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L). *Behav Ecol Sociobiol* **23**: 117–126.

Pereboom, J.J.M., Jordan, W.C., Sumner, S., Hammond, R.L. and Bourke, A.F.G. (2005) Differential gene expression in queen-worker caste determination in bumble bees. *Proc R Soc B* **272**: 1145–1152.

Perera, S.C., Zheng, S., Feng, Q.L., Krell, P.J., Retnakaran, A. and Palli, S.R. (2005) Heterodimerization of ecdysone receptor and ultraspiracle on symmetric and asymmetric response elements. *Arch Insect Biochem Physiol* **60**: 55–70.

Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P. and Bellés, X. (2003) The vitellogenin of the honeybee, *Apis mellifera*. Structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 459–465.

Pritsker, M., Liu, Y.C., Beer, M.A. and Tavazole, S. (2004) Whole

© 2006 The Authors

genome discovery of transcription factor binding sites by network-level conservation. *Genome Res* **14**: 99–108.

Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A. and Hartfelder, K. (1990) Caste and metamorphosis – hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocr* **79**: 31–38.

Riddihough, G. and Pelham, H.R.B. (1987) An ecdysone response element in the *Drosophila hsp27* promotor. *EMBO J* **6**: 3729–3734.

Roth, F.P., Hughes, J.D., Estep, P.W. and Church, G.M. (1998) Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantification. *Nature Biotechnol* **16**: 939–945.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. and Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualisation and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944–945.

Schmidt-Capella, I.C. and Hartfelder, K. (1998) Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol* **44**: 385–391.

Snodgrass, R.E. (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Cornell University Press, Ithaca.

Solignac, M., Vautrin, D., Baudry, E., Mougel, F., Loiseau, A. and Cornuet, J.M. (2004) A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics* **167**: 253–262.

St Johnston, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**: 201–219.

Staab, S. and Steinmann-Zwicky, M. (1995) Female germ cells of *Drosophila* require zygotic *ovo and otu* product for survival in larvae and pupae respectively. *Mech Dev* **54**: 205–210.

Sullivan, A.A. and Thummel, C.S. (2003) Temporal profiles of nuclear receptor gene expression profiles reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol* **17**: 2125–2137.

Wassermann, W.W. and Sandelin, A. (2004) Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Rev Genet* **5**: 267–287.

West-Eberhard, M.J. (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.

Wheeler, D.E. and Nijhout, H.F. (2003) A perspective for understanding the modes of juvenile hormone as a lipid signaling system. *Bioessays* **25**: 994–1001.

Wilson, E.O. (1971) *The Insect Societies*. Belknapp Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., *et al.* (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**: 316–319.

Zhou, X., Oi, F.M. and Scharf, M.E. (2006a) Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci, USA* **103**: 4499–4504.

Zhou, X., Tarver, M.R., Bennett, G.W., Oi, F.M. and Scharf, M.E. (2006b) Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*: sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene* **376**: 47–58.

Zhu, Z., Shendure, J. and Church, G.M. (2005) Discovering functional transcription factor combinations in the human cell cycle. *Genome Res* **15**: 848–855.

Supplementary material

The following material is available for this article online:

Table S1. Annotation results of caste-specifically expressed honey bee genes.

Table S2. Caste-specific motifs in UCRs of honey bee genes.

Table S3. Annotation of honey bee orthologs to Drosophila melanogaster genes involved in Reproduction.

This material is available as part of the online article from http://www.blackwell-synergy.com

© 2006 The Authors

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo