



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CARLA CRISTINA JUDICE MARIA

Identificação de genes diferencialmente expressos nas castas de rainha e operária de *Melipona quadrifasciata*.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) CARLA CRISTINA JUDICE MARIA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Campinas

2005

Para meus pais,
Rosa Maria e Fausto.
E irmãos, Fausto, Carlos e Ana.


*“Minha ideologia é o nascer de cada dia.
Minha religião é a luz na escuridão.”*

Gilberto Gil.

Campinas, 06 de abril de 2005.

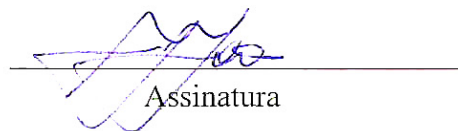
Banca Examinadora

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador)



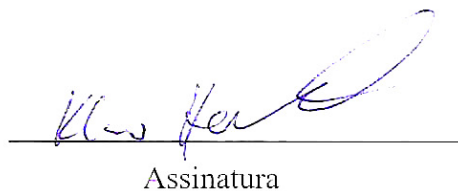
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Azeredo-Espin



Assinatura

Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder



Assinatura

Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger

Assinatura

Prof. Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, inicialmente, pelo auxílio em um momento crítico de minha pós-graduação, para o desenvolvimento de um projeto fora de sua linha de pesquisa. Pelo grande apoio no término do doutorado. Pela compreensão, incentivo e confiança. Pelo aprendizado no preparo dos manuscritos. Pelas conversas nas idas e vindas de Ribeirão Preto e sua amizade. Pelo seu exemplo de dinamismo e inovação.

Ao Professor Doutor Klaus Hartfelder, pelo seu apoio essencial durante o desenvolvimento deste projeto, pela sua orientação constante e imprescindível. Pelas “aulas” sobre as abelhas. Pela objetividade e seriedade. Pelo grande apoio e incentivo na minha formação como pesquisadora.

À Professora Doutora Mari Sogayar, pela importante contribuição a este trabalho. Pela experiência em seu laboratório. Por suas sugestões à tese durante a pré-banca. Por toda a atenção, cuidado e amizade. Pelo seu grande exemplo de profissionalismo.

À Professora Doutora Ana Maria Espin, por ter sido extremamente solícita na minha vinda para a Pós-Graduação do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. Pelo convívio sempre agradável.

À Professora Doutora Zilá Simões, pelas discussões a respeito das abelhas. Pelo apoio científico e comentários à tese feitos em pré-banca.

Ao Professor Doutor Marcelo Brocchi, presente deste os tempos da iniciação científica, pela solicitude e apoio.

Ao companheirismo das amizades feitas no laboratório. Ao Victor, querido companheiro de graduação e bancada; à Fernandinha, minha supervisora na iniciação científica e companheira de moradia; ao Marcos, grande amigo, pela sua orientação nos primeiros passos deste trabalho; à Ana Paula, companheira fiel de bancada; ao Anderson, pela ajuda constante e à Gisele. A esses “dinossauros” do laboratório agradeço pelas discussões científicas, pelas cervejas, pelas gargalhadas, pelo carinho e pela franca amizade. À Odalys, Camila, Anita, Bárbara, Johana, Leandra pela amizade e companheirismo profissional.

Aos demais membros do laboratório pela harmonia na convivência diária. A Andrea, pela sua disponibilidade e atenção. Aos membros da bioinformática pela paciência, em especial ao Marcelo, pela sua criatividade e eficiência.

À Eliane, pelas suas palavras de apoio e carinho. Pela sua ajuda constante e eficiente.

À Priscila, também minha companheira de moradia, pela amizade e carinho. Alguém que eu posso considerar minha irmã mais velha, assim como a Fernandinha. Obrigada por todas as torcidas e vibrações positivas!

À Ana Carolina, assim como o Victor, amiga desde os tempos da graduação, pelos momentos de alegria que compartilhamos. Ao Patrick, nosso biólogo-administrador, por suas palavras de incentivo e pela amizade tão carinhosa.

À querida e saudosa tia Dirce, quem primeiro me apontou a Biologia e tantos outros caminhos de minha vida, alguns dos quais eu nem imaginava trilhar. Pela sua ternura, seus ensinamentos, sempre tão presentes em minha mente, e seu amor.

À minha família, pelo apoio incondicional ao meu trabalho. Pelos valores ensinados que sempre me acompanharão. Pelo amor e carinho nos momentos difíceis. Pelas risadas ao redor da mesa de jantar. À dedicação de meu pai à nossa família, seu esforço será sempre lembrado. Agradeço, em especial, à minha mãe Rosa e ao meu irmão Fausto, pela sua dedicação na fase mais delicada de nossa vida familiar, que me propiciou tranquilidade para continuar meu projeto. Ao carinho e companheirismo também de meus irmãos Carlos e Ana Paula. Caminhar ao lado de vocês é uma grande alegria. Sem dúvidas, dedico essa tese a vocês, família.

Ao meu querido André, pelo seu companheirismo, dedicação, paciência e pela convivência maravilhosa. Por tudo o que temos vivido e aprendido juntos. Também te agradeço por ter cuidado para que eu chegasse bem até aqui, seu carinho constante foi essencial. E, por poder compartilhar essa significativa etapa de minha vida com você. Obrigada, querido!

Às agências de financiamento de pesquisa FAPESP, CNPq e FAEP.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	1
<u>I.1. POLIFENISMO EM ABELHAS E SUAS IMPLICAÇÕES</u>	1
<i>Castas e Nutrição Larval</i>	2
<i>Ação Hormonal</i>	4
<i>Tempo de desenvolvimento e senescência</i>	8
<i>Diferenciação de castas em abelhas sem ferrão do gênero Melipona</i>	9
<u>I.2. SISTEMA ENDÓCRINO, REPRODUÇÃO E ESTRUTURA SOCIAL</u>	10
<u>I.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS</u>	11
OBJETIVOS	15
RESULTADOS.....	16
CAPÍTULO 1.....	17
EXPRESSÃO GÊNICA CASTA-ESPECÍFICA NA ABELHA SEM FERRÃO <i>MELIPONA QUADRIFASCIATA</i> – HAVERIA UM PADRÃO COMUM EM ABELHAS ALTAMENTE SOCIAIS?.....	17
CAPÍTULO 2.....	25
PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA QUE SUSTENTAM OS FENÓTIPOS ALTERNATIVOS DE CASTAS EM UMA ABELHA ALTAMENTE EUSOCIAL	25
CAPÍTULO 3.....	50
<u>3.1. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE LILLIPUTIAN</u>	51
<u>3.2. BANCO DE DADOS SOBRE EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>M. QUADRIFASCIATA</i></u>	59
<u>3.3. RESULTADOS PRELIMINARES DE MICROARRAY</u>	64
DISCUSSÃO GERAL.....	69
APÊNDICE.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMO

O polifenismo de castas é um fenômeno multifacetado, sendo mais evidente em diferenças na capacidade reprodutiva e na longevidade entre rainhas e operárias. No presente estudo, a abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi escolhida para a investigação de diferenças na expressão gênica entre rainhas e operárias recém nascidas. Este estudo foi focalizado em adultos recém nascidos pois esse estágio representa o ponto final do desenvolvimento embrionário e o ponto inicial para o desempenho de tarefas casta-específicas.

Inicialmente, foi empregada a metodologia do “differential display reverse transcription (DDRT)-PCR” e podendo ser detectada a expressão diferenciada de 14 genes entre rainhas e operárias. As diferenças no perfil de expressão foram posteriormente analisadas através de duas bibliotecas subtrativas de cDNA: uma representando genes muito expressos ou induzidos em operárias quando em comparação com rainhas, e a outra representando genes mais expressos na casta rainha.

Embora o número total de seqüências geradas não tenha permitido uma compreensão completa dos transcriptomas das castas, foi possível detectar em rainhas a predominância de genes envolvidos na regulação transcricional e no metabolismo, em relação à ampla diversidade de categorias funcionais das ESTs encontradas na casta operária. Um outro grupo representando seqüências de funções desconhecidas apresentou elevada similaridade a seqüências de *Apis mellifera*, podendo, portanto, conter genes candidatos para investigações em processos específicos das abelhas sociais ou do desenvolvimento de castas de maneira geral.

Além disso, este estudo questionou se rainhas induzidas pelo tratamento com hormônio juvenil (HJ) durante a fase larval poderiam apresentar níveis de expressão gênica similares aos de uma rainha produzida de modo natural. Curiosamente, os dados preliminares sugerem que a rainha artificial não apresenta o mesmo transcriptoma de uma rainha natural, indicando que o HJ pode induzir a diferenciação, mas não em todos os aspectos.

ABSTRACT

Caste polyphenism is a multifaceted phenomenon, most evident in the marked differences in reproductive capacity and longevity between queens and workers. In the present study, the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* was chosen to investigate differences in gene expression between newly emerged adult queens and workers. This study has focused on newly emerged adults since this stage represents the endpoint of post-embryonic development and the starting point for caste-specific task performance.

Initially, the methodology of differential display reverse transcription (DDRT)-PCR was employed and the differential expression for 14 *M. quadrifasciata* genes could be detected between queens and workers. The differences in the expression profile of the castes were further analysed through two subtractive cDNA libraries: one representing the genes that are overexpressed in workers, when compared with queens and the other representing genes which are overexpressed in queens.

Although the total number of sequence does not allow a comprehensive picture of the caste transcriptomes, there seems to exist a predominance of genes involved in transcriptional regulation and metabolism in the queen ESTs, versus a much broader spectrum of categories in the worker ESTs. Another group representing sequences with unknown function displayed significant matches only with the *Apis* database and, therefore, may contain candidates for further investigations on processes specific to social bees or caste development in general.

In addition, this study addressed the question of whether queens induced by treatment with juvenile hormone (JH) during the larval phase display genes with similar expression levels as naturally produced queens. Remarkably, our preliminary data suggest that the artificial queen does not present the same transcriptome of a natural queen, indicating that JH may not induce all aspects of the differentiation process.

INTRODUÇÃO

I.1. Polifenismo em abelhas e suas implicações

Um único genótipo pode produzir fenótipos alternativos, dependendo das variações encontradas durante o desenvolvimento, sendo influenciado tanto por fatores ambientais como por genéticos. Este fenômeno é chamado de plasticidade fenotípica. O polifenismo é um caso especial desta plasticidade, que se refere à capacidade de organismos com o mesmo genoma se desenvolverem distintamente em dois ou mais fenótipos alternativos sem intermediários. A existência de espécies que podem expressar esta característica levanta questões sobre o desenvolvimento e evolução. Da perspectiva do desenvolvimento seria interessante descobrir como é possível para organismos com o mesmo genótipo desenvolver fenótipos tão amplamente variados, quais mecanismos permitem a troca entre essas formas alternativas e como estes mecanismos respondem a sinais específicos no decorrer do desenvolvimento. E, no que concerne aos aspectos evolutivos, determinar se um dado fenótipo tem um valor adaptativo maior em seu ambiente do que um fenótipo alternativo, se um fenótipo é evolutivamente derivado de outro e como evoluiu o uso de um sinal ambiental específico (Nijhout, 1999).

Em insetos é comum a existência de espécies que exibem essa expressão de morfologias alternativas acompanhadas por diferenças fisiológicas e comportamentais. A existência de tipos morfo-fisiológicos distintos dentro de uma mesma espécie que podem se complementar, desempenhando funções diferentes e se beneficiando mutuamente, aliada à sobreposição de gerações caracteriza o grupo dos insetos eusociais, cuja organização colonial se baseia na divisão de trabalho. Mais especificamente, alguns membros da colônia (operárias) são parcial ou totalmente estéreis, enquanto que outros membros (rainhas) possuem um sistema reprodutivo hipertrofiado e

apresentam uma taxa de reprodução muito elevada (Nijhout, 1982, Wilson, 1971). Essa sociedade em castas é encontrada em vários insetos da ordem Hymenoptera, como formigas, vespas e abelhas, e também, cupins da ordem Isoptera. Em sua divisão de trabalho, a rainha fisogástrica (fecundada) atua promovendo a oviposição, que dará origem aos novos membros da colônia, e as operárias exercem trabalhos de cuidado das crias, limpeza da colônia e forrageamento, entre outros.

As abelhas melíferas (Apini) e as abelhas sem ferrão (Meliponini) representam espécies altamente eusociais. Os Meliponini compreendem cerca de 300 espécies, divididas em vários gêneros e sub-gêneros (Camargo e Pedro, 1992), apresentando uma diversidade maior do que a encontrada em abelhas melíferas, com apenas 10 espécies conhecidas.

Castas e Nutrição Larval

As características típicas de uma rainha e de uma operária diferem umas das outras não apenas no que diz respeito aos órgãos reprodutivos, mas inclui também diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990). Compreender essas formas femininas alternativas, rainha/operária, significa desvendar o modo de ação dos sinais iniciais do desenvolvimento de castas, ou seja, qual a sinalização necessária para que uma larva feminina totipotente siga a via de desenvolvimento para rainha ou, alternativamente, para operária.

A dieta nutricional na fase larval pode ser considerada um ponto chave na determinação de castas. Nas abelhas melíferas (*Apis mellifera*), as larvas são alimentadas continuamente durante o desenvolvimento larval, e tanto as larvas que se tornarão rainhas ou operárias, durante os estágios larvais iniciais, recebem uma secreção glandular rica em proteínas (geléia real). Nos estágios larvais finais (quarto e quinto), este tipo de alimento é fornecido em grandes quantidades apenas para as larvas que darão origem às rainhas, enquanto que as larvas destinadas às operárias são nutridas com uma mistura de secreção glandular, mel e pólen. Acompanhando esta troca na dieta, as larvas que darão origem às rainhas são alimentadas com maior frequência do que àquelas destinadas a casta operária (Beetsma, 1985). Essa diferença nutricional chamou a atenção para o papel dos

componentes da geléia real, que foram considerados como possíveis “determinadores” da casta rainha. No entanto, até o momento, nenhuma comprovação dessa ação pode ser identificada na geléia real. Nas abelhas sem ferrão, a assistência das operárias jovens ou nutridoras, fornecendo alimento de modo progressivo para as larvas não ocorre. Nessas abelhas, as operárias constroem as células de cria e, em seguida, armazenam nestas células uma massa alimentar sobre a qual será colocado o ovo pela rainha fisogástrica. Após a oviposição, as operárias lacram as células de cria (Zucchi *et al.*, 1999). As larvas irão se desenvolver dentro de um sistema fechado que contém todos os requerimentos nutricionais necessários para as transformações de larva, pupa e adulto (Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990), permanecendo os novos indivíduos em desenvolvimento sem contato com as operárias até sua emergência. Assim, para as abelhas sem ferrão não há, como em melíferas, uma troca nutricional que atue como sinalizadora para as vias de desenvolvimento rainha ou operária (Hartfelder e Emlen, 2005).

O desenvolvimento de rainhas para a maioria das abelhas sem ferrão depende da quantidade de alimento provisionada para a larva e isso é refletido no tamanho da célula de cria. Foram descritos dois modos pelos quais a ingestão de mais alimento pelas larvas induz a diferenciação em rainha: (i) as células de cria onde se desenvolverão rainhas recebem de duas a três vezes mais alimento do que as células onde nascerão operárias e são, geralmente, construídas nas margens dos favos de cria, ou então, (ii) resultam de uma fusão de duas células de cria próximas, providenciando à larva uma segunda porção alimentar. As abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* constituem uma exceção ao mecanismo de determinação rainha/operária pela modulação da quantidade de alimento para as larvas. As suas células de cria apresentam o mesmo tamanho, independente do tipo de larva que irá se desenvolver, ou seja, se dará origem à rainha, operária ou macho. Ainda, essas células recebem uma massa alimentar semelhante em sua constituição (secreção glandular, mel e pólen) e quantidade (Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990). As diferentes células de cria para representantes das abelhas melíferas e sem ferrão podem ser visualizadas na figura 1.

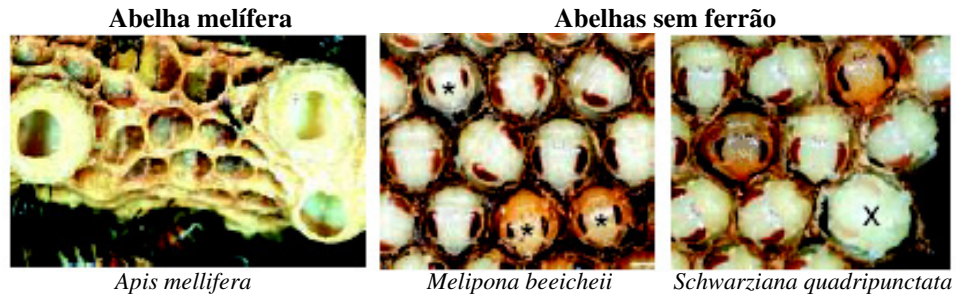


Figura 1. Células de cria em diferentes espécies de abelhas eusociais. Em *A. mellifera* há células maiores com crias na fase larval que se tornarão rainhas. Nas abelhas sem ferrão as células de cria foram abertas e é possível observar crias em fase pupal (diferentes estágios), estágio em que as castas são distinguidas por caracteres morfológicos. Em *Melipona*, o tamanho menor da cabeça e o formato mais fino dos olhos, caracteriza as rainhas, assim como maior abdômen (não mostrado nesta figura) quando comparadas às operárias (rainhas indicadas por *). Em outra espécie sem ferrão, *S. quadripunctata*, pertencente ao grupo das trigonas, a rainha (X) se desenvolve em células maiores e marginais, as realeiras, e são muito maiores que as operárias. Figura retirada de Ratnieks e Wenseleers (2005).

Ação Hormonal

A natureza das diferenças morfo-fisiológicas nas castas femininas de abelhas também tem sido estudada através da ação de hormônios ao longo do desenvolvimento. Entre estes há o hormônio juvenil (HJ), um hormônio que atua durante o ciclo de vida dos insetos em uma variedade de processos, como na metamorfose, na regulação da fertilidade de fêmeas através do estímulo à síntese de vitelogenina, e também na geração dos polimorfismos encontrados em insetos sociais. As formas I e II do hormônio juvenil podem ser encontradas principalmente em lepidópteros, enquanto que nas demais ordens de insetos é detectada a forma III. Os sítios de produção do HJ correspondem a um par de glândulas, *corpora allata*, localizado no complexo retrocerebral, e se encontra ligado ao cérebro através de dois ou três pares de nervos (Hartfelder, 2000).

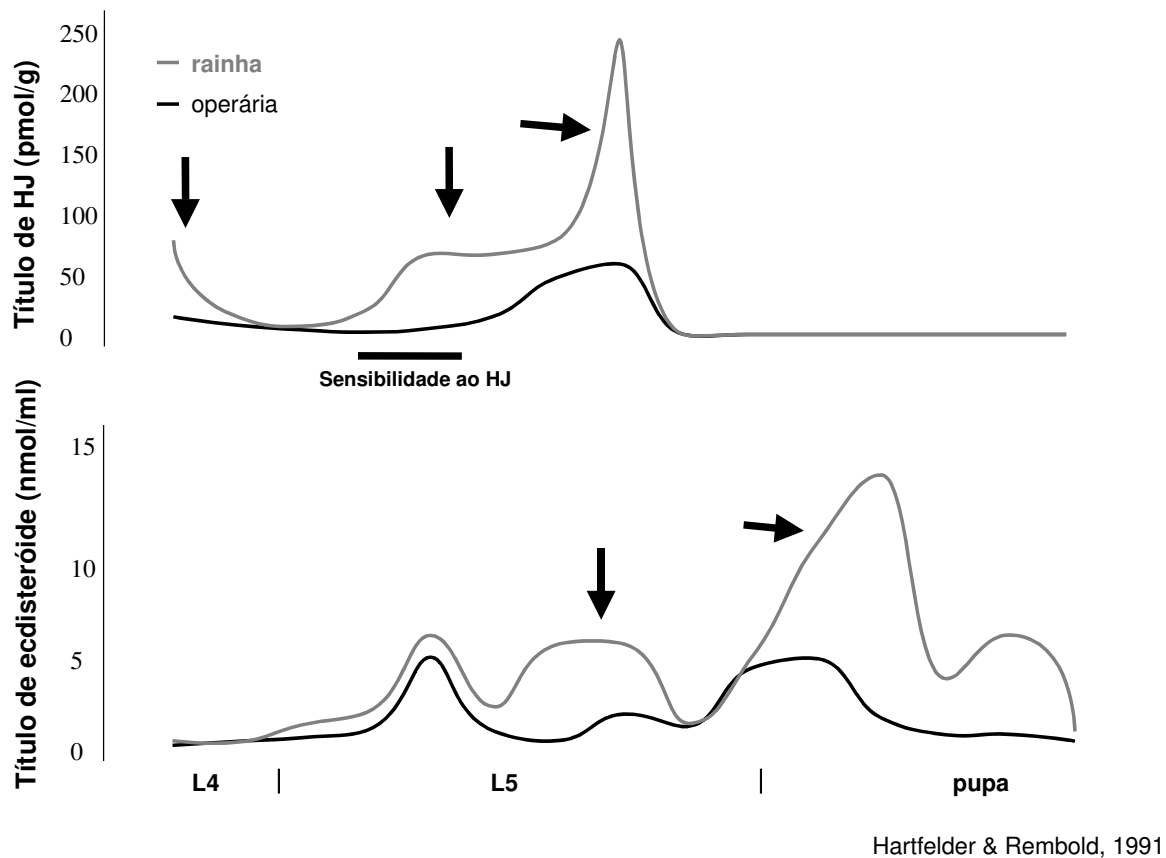
Em abelhas eusociais, o hormônio juvenil afeta o desenvolvimento de castas durante o último estágio larval, ou seja, logo no início da metamorfose destes insetos. O papel do HJ na diferenciação de rainhas em abelhas tem sido mais bem estudado em *A. mellifera*, onde inicialmente foi observada a importância do HJ na determinação de caracteres morfológicos externos femininos (Wirtz, 1973). Nesta espécie, uma rainha fértil apresenta, em média, duzentos ovários por ovário, controlando a reprodução na colônia. Em contraste, as abelhas operárias apresentam somente

poucos ovariolos e são essencialmente estéreis. A alimentação diferenciada recebida pelas larvas nos estágios larvais iniciais (Beetsma, 1985), resulta em uma modulação casta-específica dos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides na fase larval de desenvolvimento (Rembold, 1987, Rachinsky *et al.*, 1990). O período de sensibilidade ao HJ para a indução de rainhas abrange o quarto e o quinto instares larvais, que coincide com o período de alimentação diferenciada em larvas de rainhas e operárias de *Apis*. Destaca-se a ação do HJ no último instar larval, onde se iniciam os processos que culminam na diferenciação das castas, tendo sido observada a formação de grupos de células germinativas por sincronia e mitoses incompletas ocorrendo nos ovários de rainha, enquanto nos ovários de operárias, a morte celular programada mostrou-se uma característica dominante nesse estágio (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998, Schmidt Capella e Hartfelder, 2002).

Nas abelhas sem ferrão, a aplicação do HJ na fase larval de tecelagem de casulo mostrou ser um estímulo indutor de altas taxas de diferenciação de rainhas de diversas espécies (Campos, 1978, Campos *et al.*, 1979, Bonetti *et al.*, 1995). Esta diferença nos períodos de sensibilidade ao HJ entre as abelhas sem ferrão e *Apis* é baseada na natureza diferenciada do estímulo trofogênico (dieta larval) (Hartfelder, 1990). Em abelhas sem ferrão, estudo relacionando o título de HJ com a atividade da *corpora allata* na diferenciação de castas foi feito em *Scaptotrigona postica*, mostrando diferença casta-específica nos títulos de HJ durante o quarto instar larval, se estendendo até o início de alimentação no quinto instar larval e também durante as fases de tecelagem de casulo em larva e pré-pupa, e estando mais elevado em rainha (Hartfelder e Rembold, 1991). Na fase de tecelagem de casulo, a diferença observada refere-se aos elevados níveis de síntese do HJ na *corpora allata* das rainhas, evidenciando a importância deste hormônio na diferenciação de castas em abelhas sem ferrão (Hartfelder, 1987).

A ação dos ecdisteróides na determinação de castas em abelhas sem ferrão também foi estudada em *S. postica*. Os níveis de ecdisteróides medidos na hemolinfa até o final da fase de tecelagem de casulo não mostram diferenças significativas entre as duas castas, mas os valores na larva de operária se mantêm sempre inferiores aos de rainha. Os títulos de ecdisteróides começam a

aumentar na fase de tecelagem de casulo, rapidamente após o HJ ter declinado a níveis mínimos. Na fase de pré-pupa um pico máximo é atingido, mais recentemente, em rainha do que em operária, coincidindo com o início do aumento de HJ nesta casta. Após, no início da fase de pupa há um pico mínimo de ecdisteróides, seguido por um aumento rápido e excessivo do título em ambas castas em pupas de olho vermelho e escuro, com picos em rainhas sendo quase três vezes maiores que as operárias (Hartfelder e Rembold, 1991).



Hartfelder & Rembold, 1991

Figura 2. Títulos de hormônio juvenil e ecdisteróide na hemolinfa durante o desenvolvimento larval (L4 e L5) e pupal de rainhas e operárias da abelha sem ferrão *S. postica*. O período de sensibilidade ao hormônio juvenil é indicado. As setas indicam as fases onde há diferenças nos títulos hormonias (HJ e ecdisteróide) entre as castas de rainha (linha cinza) e operária (linha preta).

Em uma comparação dos níveis de ecdisteróides entre *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* foi observado que rainhas de *Melipona* apresentam níveis de ecdisteróides muito maiores do que operárias, em contraste ao observado para *Apis*, onde os níveis são mais semelhantes. Os níveis nas duas castas femininas apresentam diferenças estatisticamente significativas nos estágios de pupa de olho rosa e vermelho. Essa combinação de diferenças quantitativa e temporal deixou de ser observada na fase de pigmentação do corpo, quando os títulos de ecdisteróides diminuem em ambas as castas. No entanto, com o progresso da pigmentação corporal, os níveis voltam a se diferenciar entre as castas e, ao contrário de *Apis*, as operárias em *Melipona* apresentam um nível maior deste hormônio do que as rainhas. No final do desenvolvimento pupal, os títulos de ecdisteróides caem para um nível basal. Nessa comparação destaca-se que o pico no nível de ecdisteróides na fase pupal em rainhas mostrou-se duas vezes mais elevado em *Melipona* do que em *Apis* (Pinto *et al.*, 2002).

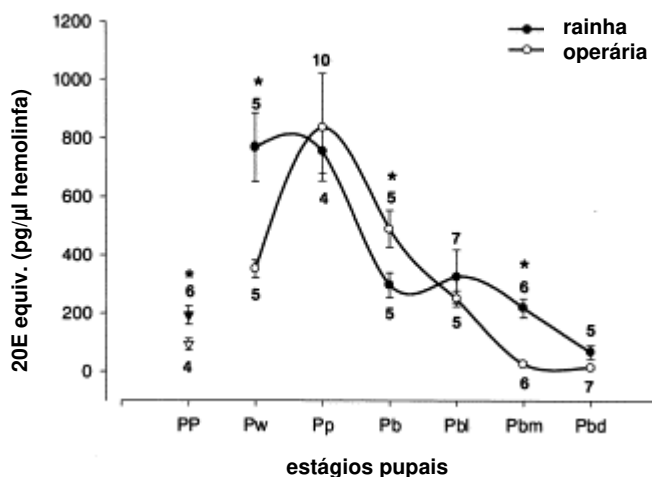


Figura 2. Títulos de ecdisteróide na hemolinfa durante o desenvolvimento pupal de rainhas e operárias de *A. mellifera*. O período pupal foi subdividido em 06 estágios, usando como marcadores morfológicos, a pigmentação progressiva do olho (Pw - Pd) e corpo (Pb1-Pbd). Amostras de pré-pupa (PP) de rainha (▼) e de operária (▽) aparecem como pontos de referencia. Os valores indicam erros padrão e tamanho da amostra. Os asteriscos apontam os estágios de pré-pupa e pupa nos quais os títulos de ecdisteróide diferem de modo significativo entre as castas rainha e operária. Gráfico retirado de Pinto *et al.*, 2002.

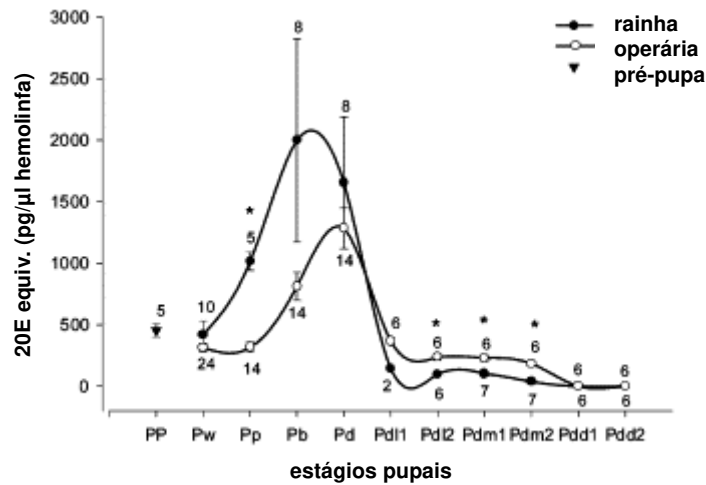


Figura 3. Títulos de ecdisteróide na hemolinfa durante o desenvolvimento pupal de rainhas e operárias de *M. quadrifasciata*. O período pupal foi subdividido em 10 estágios, usando como marcadores morfológicos, a pigmentação progressiva do olho (Pw - Pd) e corpo (Pdl1-Pdd2). Amostras de pré-pupa aparecem como ponto de referência. Os valores indicam erros padrão e tamanho da amostra. Os asteriscos apontam os estágios pupais nos quais os títulos de ecdisteróide diferem de modo significativo entre as castas rainha e operária. Gráfico retirado de *Pinto et al.* 2002.

Tempo de desenvolvimento e senescência

A duração média do desenvolvimento, desde a oviposição até o imago, foi investigada para algumas espécies de *Melipona*, sendo o tempo total de desenvolvimento influenciado pela temperatura e quantidade de abelhas operárias. Em *Melipona quadrifasciata*, o desenvolvimento de rainhas ocorre em um período menor que a de operárias: o desenvolvimento de pupas tem duração de 11,5 a 15 dias para rainhas e de 15,5 a 18 dias para operárias (Pinto *et al.*, 2002). Períodos distintos entre rainhas e operárias também podem ser observados quanto à longevidade. O exemplo máximo de longevidade da rainha fisogástrica em uma colônia efetuando posturas é de 4 a 5 anos em *Melipona compressipes fasciculata* (Oliveira e Kerr, informação pessoal), o que contrasta com a rápida senescência e duração média de vida de 60 dias para a abelha operária. Em *Apis mellifera*, outra espécie de abelha altamente eusocial, a rainha fisogástrica tem uma média de vida de 2 a 3 anos, enquanto que as operárias sobrevivem de 3 a 5 semanas. Esses achados têm despertado forte

interesse do uso de insetos sociais, em particular as abelhas, para estudos focalizados no envelhecimento e na longevidade (Page e Peng, 2001). Abordando envelhecimento e polietismo idade-dependente de operárias nutridora e forrageadora, estudo recente sugere que a vitelogenina está envolvida no decréscimo do nível de hemócitos (células do sistema imune) em abelhas forrageadoras, o que implicaria em sua rápida senescência. Este é o primeiro estudo que aponta para a relação entre HJ (hormônio juvenil) e a manutenção de células somáticas em abelhas, estabelecendo uma relação entre queda da imunidade e o envelhecimento nestes (Amdam *et al.*, 2004).

Diferenciação de castas em abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*

Baseado no excepcional sistema de desenvolvimento de *Melipona* e na observação de que cerca de 25% dos indivíduos femininos emergentes correspondem a rainhas, Kerr (1950) propôs a hipótese da predisposição genética para determinação de castas. Nesta proposta um sistema de dois alelos, dois locus atuaria na diferenciação de modo que um indivíduo duplo heterozigoto daria origem a uma rainha, e um indivíduo homozigoto para pelo menos um dos alelos se desenvolveria em operária, ficando a razão rainha: operária em 1:3. Observações seguintes, feitas por Kerr e colaboradores, mostraram que proporções máximas de rainhas (25%) são encontradas apenas em colônias fortes, portadoras de estoques suficientemente grandes de mel e pólen. Em colônias fracas a proporção de rainhas entre as crias femininas fica abaixo de 25%, pois as larvas geneticamente determinadas a rainhas assumem as características da casta operária (Kerr e Nielsen, 1966). Essas observações indicaram que a qualidade do alimento larval tem um efeito modulador na determinação da casta. Posteriormente, Kerr e colaboradores (1975), trabalhando com *Melipona*, observaram que 75% das pré-pupas apresentavam um volume intermediário ou baixo da glândula *corpora allata*, enquanto que 25% mostravam um volume elevado, mostrando que o hormônio juvenil poderia desempenhar um importante papel na diferenciação de castas.

Uma proposta para validar a hipótese da predisposição genética baseou-se na análise de gerações provenientes de rainhas obtidas após a indução por hormônio juvenil (Velthuis, 1976), porém falhas na formação de colônias (Campos *et al.*, 1979) impediram a comprovação da hipótese. Aliada a essa falha, a ausência de análises genéticas que identifiquem os possíveis locus envolvidos, faz com que essa hipótese seja frequentemente contestada.

Uma hipótese alternativa atribui uma capacidade de decisão própria das larvas na escolha da via de desenvolvimento, rainha ou operária (Ratnieks, 2001). Estudo recente com uma espécie mexicana, a *Melipona beecheii*, defende que a nutrição larval não desigual entre as crias e a super-produção de rainhas consiste em uma evidência do completo controle das larvas no destino de sua casta (Wenseleers *et al.*, 2004). Em publicação recente, os mesmos autores desta hipótese alternativa, propõem que o “policimento” do desenvolvimento larval feito pelas operárias impediria o excesso de rainhas, que implicaria em uma sociedade mantida de forma mais eficiente (Ratnieks e Wenseleers, 2005). Segundo essa visão uma sociedade melhor estruturada faz referência àquelas em que há interação entre os membros adultos da colônia e as larvas, como ocorre em *A. mellifera*.

Independente das distintas modalidades de sinalização inicial, nutricional em abelhas melíferas, grandes quantidades de alimentos em trigonas, ou a predisposição genética em *Melipona*, todas essas vias eventualmente convergem para os padrões de atividade casta-específica do sistema endócrino, o qual coordena os subseqüentes eventos de diferenciação nos tecidos alvos.

I.2. Estrutura social e controle hormonal

A relação entre a ação dos hormônios juvenil e ecdisteróides com os diversos níveis de sociabilidade entre os apídeos tem apontado para o papel do sistema endócrino como mediador do status social. Comparações entre vespas, abelhas solitárias e altamente sociais sugerem que a

transição para um nível elevado de sociabilidade com castas morfologicamente diferenciadas resulta da perda de função gonadotrófica do HJ e de ecdisteróides em ambas as castas, e ação do HJ no controle da troca de atividade interna para externa ao ninho das abelhas operárias (que se processa conforme a idade). De acordo com essa hipótese, os ecdisteróides atuam como suporte para a ação do HJ (Hartfelder *et al.*, 2002).

A conexão entre sistema endócrino, genes e comportamento pode ser analisada atualmente através dos estudos de sociogenômica, que têm sido enfatizados a fim de promover conhecimento mais abrangente em termos moleculares da vida social: como é governada e como pode influenciar aspectos da estrutura genômica, expressão gênica, desenvolvimento do organismo, sua fisiologia e comportamento (Robinson, 1999, Robinson, 2002). Um claro exemplo foi o lançamento do seqüenciamento do genoma de *A. mellifera*, o primeiro inseto a ser seqüenciado não pertencente à ordem Díptera. Além do forte impacto na sociogenômica, as análises comparativas dos genomas de *Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002), *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), *Bombyx mori* (Mita *et al.*, 2004) e de *Apis*, junto a estudos comparativos do transcriptoma de *Apis*, viabilizarão a identificação de genes que estejam ausentes nos genomas de insetos não sociais, sendo alguns destes importantes na compreensão da sociabilidade. Ainda, acredita-se que a complexidade comportamental das abelhas e sua característica social devem estar relacionadas principalmente a diferenças na regulação gênica (Kaufman *et al.*, 2002).

I.3. Estudo da expressão gênica em abelhas

As abelhas altamente eusociais, em especial *A. mellifera*, têm sido consideradas organismos modelo para a compreensão da organização social em insetos (Bloch *et al.*, 2002). Uma das abordagens atuais refere-se aos estudos de expressão gênica focalizados em determinação de castas e aprendizado.

Em *Apis*, a expressão gênica diferencial tem sido abordada por diversas técnicas de biologia molecular como hibridação subtrativa, “differential display” e “arrays”. Em um dos primeiros artigos dessa área (Evans e Wheeler, 1999), foi demonstrado, por hibridação subtrativa, a expressão diferenciada de sete genes, em larvas destinadas a serem rainhas e operárias, em um ponto crítico do desenvolvimento desta abelha. A expressão diferenciada ocorreu antes ou concomitante a alterações fisiológicas (por exemplo, a produção de HJ) comumente usadas como indicadores do início da diferenciação das castas, envolvendo a ativação específica de genes tanto em rainhas quanto em operárias. Em um outro estudo, empregando a técnica do “differential display PCR” foi observada a expressão diferencial de genes nucleares que codificam fatores de ação mitocondrial, sendo mais expressos em larvas de rainhas (Corona *et al.*, 1999). Através desta mesma técnica, foi estudada a expressão gênica regulada por ecdisteróides em ovários durante a fase larval de *A. mellifera*, identificando um homólogo ao gene β -Ftz-F1 e um fator de transcrição tipo-Cut, envolvidos, respectivamente, na cascata de resposta a ecdisona e na manutenção da diferenciação celular (Hepperle e Hartfelder, 2001).

A técnica de “microarray” tem sido empregada para gerar evidências sobre os mecanismos de divergência entre as castas das abelhas eusociais. O primeiro estudo em abelhas usando esta ferramenta contrastou os padrões de expressão gênica entre larvas destinadas a serem rainhas e operárias e então compararam ambas as castas com indivíduos jovens, bipotentes (Evans e Wheeler, 2000). Dentre os resultados obtidos a enzima dihidrodiol desidrogenase (papel geral na desativação de hormônio esteróide em mamíferos) mostrou níveis mais elevados em operária que em rainha, coincidindo com o período de decréscimo do título de esteróides em operárias relativamente a rainhas. Outro dado obtido mostrou que o citocromo P450 (subfamília CYP4) estava sendo fortemente expresso em operárias quando comparado a rainhas. Membros da subfamília CYP4 têm sido descritos na regulação dos níveis de esteróides, além de outras atividades metabólicas.

Além do enfoque da expressão gênica no contexto do desenvolvimento e diferenciação de castas, estudos mais recentes têm avaliado o comportamento dos genes nos processos de aprendizagem e memória. Também utilizando a técnica do “microarray” em conjunto com o Northern blot foi avaliada a expressão diferenciada durante o desenvolvimento comportamental de *A. mellifera* (Kucharski e Maleszka, 2002). Foi constatado que operárias forrageiras super-expressam proteínas da geléia real, um fator de crescimento do disco imaginal, um regulador transcricional (Stck) e várias enzimas, incluindo alfa-glicosidases, aminopeptidases e glicose desidrogenase. Operárias jovens (nutridoras) mostraram aumento na expressão de membros das famílias de SPARC e lectinas, proteínas "heat-shock" e várias proteínas relacionadas à tradução do RNA e função mitocondrial.

O padrão de expressão gênica do cérebro de *Apis* foi também estudado através de bibliotecas de cDNA normalizadas e microarray em uma análise comportamental que abordou a troca de atividades entre operárias nutridoras e forrageadoras, de acordo com suas idades e quotas etárias de indivíduos adultos no ninho (Whitfield *et al.*, 2002). Foram analisados 7.000 clones de ESTs representando transcritos envolvidos em vários processos biológicos, com classificações neurobiológicas particularmente bem representadas através da identificação de seqüências similares a genes de *Drosophila*, envolvidos em transmissão sináptica e comportamento. Em um trabalho seguinte, a expressão gênica no cérebro foi avaliada durante o período de transição de tarefas relacionada à idade em operárias, da atividade de alimentação da cria para forrageamento (Whitfield *et al.*, 2003). Foi possível detectar alteração em 39% dos 5.500 genes avaliados pelos experimentos de microarray, sendo identificados genes de diversas funções supostamente relacionadas ao processo de aprendizagem. Além deste contexto, os transcritos no cérebro de *Apis* também tiveram sua expressão avaliada em operárias expostas ao ferormônio mandibular de rainha (Grozinger *et al.*, 2003). Este trabalho mostrou que o ferormônio afeta a expressão de muitos genes no cérebro de operárias e, em particular, de genes associados com comportamentos regulados por este ferormônio.

Ainda, aponta para a influência das interações sociais sobre a regulação gênica dos membros da colônia.

Os resultados de estudos sobre diferenciação tecido-específica controlada por hormônios (Schmidt Capella e Hartfelder, 1998, Schmidt Capella e Hartfelder, 2002) integram-se com os dados de expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento pós-embriário (Corona *et al.*, 1999, Evans e Wheeler, 1999, Evans e Wheeler, 2000, Guidugli *et al.*, 2004, Hepperle e Hartfelder, 2001). Estes estudos, juntamente com aqueles de expressão gênica no contexto do desenvolvimento comportamental (Kucharski e Maleszka, 2002, Takeuchi *et al.*, 2002, Whitfield *et al.*, 2002) e na mudança de tarefas em abelhas operárias adultas (Grozinger *et al.*, 2003, Whitfield *et al.*, 2003), somam-se à análise do genoma de *Apis*, solidificando esta abelha como modelo para estudos de polifenismo em insetos. Aprofundando os estudos do transcriptoma, ensaios bem sucedidos de silenciamento gênico através de interferência por RNA (RNAi) vêm expandir o potencial de análise da expressão gênica em abelhas, como demonstrado em trabalho com silenciamento do gene da vitelogenina em embriões e indivíduos adultos de *Apis* (Amdam *et al.*, 2003).

O polifenismo presente na espécie em estudo, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, constitui um modelo biológico particularmente importante para o estudo de genes ligados aos processos de diferenciação celular e desenvolvimento. No presente trabalho abordamos a expressão gênica na abelha sem ferrão *M. quadrifasciata*, através da identificação e análise de genes diferencialmente expressos nas castas de rainha e operária, na fase de recém nascidos. Esse estágio representa o ponto final do desenvolvimento pós-embriário e o ponto inicial do desempenho de tarefas casta-específicas. Os dados obtidos nesta espécie aliados àqueles disponíveis para *A. mellifera* forneceram subsídios para uma análise comparativa em abelhas sociais e uma maior compreensão da biologia molecular envolvida no polifenismo de castas.

OBJETIVOS

Identificar diferenças no padrão de expressão gênica entre as castas -rainha e operária- de *Melipona quadrifasciata*, em recém nascidos. Desta forma, o estudo não aborda os determinantes de castas, mas concentra-se no efeito que o processo de diferenciação de castas provoca em abelhas que ainda não se tornaram membros adultos da colônia e que ainda não desempenham tarefas e comportamentos casta-específicos.

Avaliar se a expressão dos genes identificados poderia ser influenciada pelos títulos de hormônio juvenil e ecdisteróides.

Analisar se há um padrão de expressão comum entre as abelhas altamente sociais, correlacionando o perfil de expressão dos genes identificados em *Melipona* com seu perfil em *Apis mellifera*.

Criar um banco de dados sobre expressão gênica em *Melipona* e disponibilizar ferramentas de bioinformática que possam auxiliar em estudos comparativos com outros insetos sociais.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

“Expressão gênica casta-específica na abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* – Haveria um padrão comum em abelhas altamente sociais?”

CAPÍTULO 2:

“Perfis de expressão gênica que sustentam os fenótipos alternativos de castas em uma abelha altamente social.”

CAPÍTULO 3: Resultados complementares

3.1: “Identificação e análise da expressão do gene *lilliputian*.”

3.2: “Banco de dados sobre expressão gênica em *M. quadrifasciata*.”

3.3. “Resultados preliminares de microarrays.”

CAPÍTULO 1

Expressão gênica casta-específica na abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* – Haveria um padrão comum em abelhas altamente sociais?

Artigo publicado

Judice, C., Hartfelder, K. and Pereira, G. A. G. (2004) “Caste-specific gene expression profile in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* - are there common patterns in highly eusocial bees?” *Insectes Sociaux* **51**: 352-358.

Research article

Caste-specific gene expression in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* – Are there common patterns in highly eusocial bees?

C. Judice¹, K. Hartfelder² and G. A. G. Pereira^{1,*}

¹ Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil, e-mail: carlacjm@lge.ibi.unicamp.br; goncalo@unicamp.br

² Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, e-mail: khartfeld@rge.fmrp.usp.br

Received 9 January 2003; revised 10 March 2004; accepted 2 April 2004.

Summary. Caste polyphenism is a multifaceted phenomenon, most evident in the marked differences in reproductive capacity and longevity between queens and workers. The mechanisms underlying caste differentiation and division of labor are mainly addressed in the honey bee, and recently have been studied at the molecular level. Yet, generalizations drawn from studies on this model organism require validation by comparative studies. We choose *Melipona quadrifasciata*, a sister-group species to honey bees, to investigate differences in gene expression between newly emerged adult queens and workers. RNA extracts were subjected to a differential display protocol (DDRT-PCR). The putative differentially expressed genes, for which annotation was available, were validated by RT-PCR and hybridization. Differential expression was observed for *myosin*, *projectin*, *kettin*, *cytochrome P450*, *Rab11* and *Sas10*. Except for *kettin*, all of these were overexpressed in the worker caste. *Projectin* and *kettin* could play roles in caste-specific flight muscle organization. The putative *Rab11* and *Sas10* homolog genes could be involved in fertility-related cell signaling and in longevity-related gene silencing, respectively. Cytochrome P450 overexpression in *Melipona* workers corroborates similar findings in the honey bee, thus indicating a common function in the social insect caste syndrome.

Key words: Meliponidi, caste polyphenism, gene expression, differential display-PCR, longevity.

Introduction

The highly eusocial bees, and especially the honey bee, *Apis mellifera*, have attained the status of model organisms for the comprehension of social organization of insects (Bloch et al., 2002). They exhibit a marked polyphenism in the female castes, especially in the reproductive system and in the morphological structures adapted to colony defense and pollen collection. In the honey bee, these phenotype differences between queens and workers are a result of differential feeding during the early larval stages (Beetsma, 1985), which subsequently result in a modulated activity in the endocrine system, particularly in the juvenile hormone (JH) titer (Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990).

The results from studies on hormonally controlled tissue-specific differentiation (Schmidt Capella and Hartfelder, 1998, 2002) integrate with the data on differential gene expression during postembryonic development (Corona et al., 1999; Evans and Wheeler, 1999, 2000; Hepperle and Hartfelder, 2001; Guidugli et al., 2004). These studies together with those on gene expression in the context of behavioral development (Kucharski and Maleszka, 2002; Takeuchi et al., 2002; Whitfield et al., 2002) and in task performance switch in adult bees (Grozinger et al., 2003; Whitfield et al., 2003) now funnel into a genome analysis effort (<http://hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>), which should further solidify the honey bee's status as champion of insect polyphenism studies. Even though the focus of research efforts and resources on model organisms has received frequent criticisms as an obstacle to comparative studies, their heuristic value as a backbone for broader questions is evident, particularly in the recent advances in the field of Evolutionary Developmental Biology. Therefore, in parallel with the current genomic studies on the honey bee, we initiated an investigation of differential gene expression in the castes of a stingless bee.

* Author for correspondence.

Stingless bees (*Meliponini*) are closely related to the honey bees (*Apini*) (Michener, 2000), which they equal and rival with respect to social organization (Engels and Imperatriz-Fonseca, 1990). They comprise over 300 species scattered over several genera and subgenera (Camargo and Pedro, 1992), so that they are much more diverse than the honey bees, which have only 10 recognized species. The neotropical genus *Melipona* is of special interest for comparative studies since it deviates in many respects from the developmental pattern established for the honey bee and also from those observed in other stingless bee genera (Hartfelder, 1990; Pinto et al., 2002). First of all, caste development in the genus *Melipona* is supposedly governed by a genetic mechanism (Kerr, 1950, 1987). This means that in *Melipona* development there should be no truly bipotential state, in contrast to what is observed in caste development in all of the other social bees. [There is a long-standing controversy about the validity of this hypothesis (see review by Velthuis, 1976), and new, alternative explanations have been put forward (Wenseleers et al., 2003), yet there is not sufficient conclusive experimental evidence to reject it]. Despite these differences in the primary developmental switches for caste development, the endocrine system is also called into action in *Melipona* to subsequently direct differentiation into the queen or worker pathways during metamorphosis, supporting a general convergence on the endocrine system in caste development of the social Hymenoptera. This has been demonstrated by juvenile hormone application experiments (Campos et al., 1975; Campos, 1978; Bonetti et al., 1995) and also by analyses of the developmental profiles of morphogenetic hormones (Hartfelder and Rembold, 1991; Pinto et al., 2002).

In the present study, we employed the differential display reverse transcription (DDRT)-PCR methodology to identify differentially expressed genes in the female castes of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836. We focused on newly emerged adults since this stage represents the endpoint of postembryonic development and the starting point for caste-specific task performance. This stage is particularly interesting for questions on differential longevity, an inherent aspect to caste and a long-standing puzzle in social insects (Page and Peng, 2001). Furthermore, working with bees that had just emerged from their brood cells also permitted to minimize confounding effects on gene expression resulting from social interaction. We identified and sequenced 14 differentially expressed genes in newly emerged queens and workers. Comparison to general non-redundant, and *Apis* EST databases revealed genes with putative structural, metabolic and regulatory functions.

Materials and methods

Samples

The queen and worker bees were obtained from *Melipona quadrifasciata anthidioides* colonies kept at the Departamento de Genética, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto campus). Entire brood frames with late pupal stages were removed and maintained in an incubator

at 28°C. Newly emerged individuals (0–12 hs) of both castes were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C.

RNA extraction

The bee samples were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen) and total RNA of whole body was extracted and treated with DNase (RNasefree DNaseI AmpGrade, Invitrogen). RNA purity and integrity were checked spectrophotometrically and by electrophoresis in 1.2% agarose gels under denaturing conditions.

cDNA synthesis and DDRT-PCR

DDRT-PCR was performed according to the protocol described elsewhere (Liang and Pardee, 1995; Liang, 2002). In brief, 2.0 µg of RNA were submitted to reverse transcription using 200U SuperScript RT (Invitrogen) and dT₁₂VG primer under the following conditions: 10 min at 70°C and 1 h at 42°C. The quality and relative quantity of the reverse transcription products were monitored through concurrent amplification of a *Melipona* actin fragment (actin primers listed in Table 1), cloned in this work (GenBank accession number: CF673302). The actin gene has been employed for sample normalization in many organisms, including bees (Ohashi et al., 1996; Kamikouchi et al., 1998). More specifically related to the present study, Takeuchi et al. (2002) used actin expression for calibration of RNA amounts employed in comparison of gene expression between castes. Nevertheless, to be sure that actin expression is similar in queens and workers, 2 µg of total RNA of each sample was used for reverse transcription and actin amplification. After 20 cycles (unsaturated condition), actin amplification resulted in bands of similar intensity, indicating that the gene has the same constant expression level in both female castes (data not show). This normalization step was employed to minimize the occurrence of false-positive DDRT-PCR fragments. Queen and worker cDNA amplification reactions were conducted using combinations of nineteen 10mer Operon

Table 1. List of oligonucleotides employed in this study

Oligonucleotides	Sequence	Source
Random primers		
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	Operon
OPG-02	5'-GGCACTGAGG-3'	Operon
OPG-03	5'-GAGCCCTCCA-3'	Operon
OPG-04	5'-AGCGTGTCTG-3'	Operon
OPG-07	5'-GAACCTGCCG-3'	Operon
OPG-09	5'-CTGACGTAC-3'	Operon
OPG-14	5'-GGATGAGACC-3'	Operon
OPG-15	5'-ACTGGGACTC-3'	Operon
OPG-16	5'-AGCGTCCTCC-3'	Operon
OPG-18	5'-GGCTCATGTG-3'	Operon
OPG-19	5'-GTCAGGGCAA-3'	Operon
OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'	Operon
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'	Operon
OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'	Operon
OPC-13	5'-AAGCCTCGTC-3'	Operon
OPC-16	5'-CACACTCCAG-3'	Operon
OPC-17	5'-TTCCCCCAG-3'	Operon
OPC-18	5'-TGAGTGGGTG-3'	Operon
OPC-19	5'-GTTGCCAGCC-3'	Operon
Actin primers		
ActApisF	5'-TGCTGCATCATCCTCAAG-3'	This study
ActApisR	5'-ACATCTGTTGGAAGGTGG-3'	This study
ActMelF	5'-CGGGTGGTGGCATAATCTTG-3'	This study
ActMelR	5'-GGGTATGGAAGCCTAAGCTATC-3'	This study

arbitrary primers (OPA, OPC and OPG series, for sequences see Table 1), under the following conditions: 3 min at 96°C and 40 cycles of 45 s at 94°C, 50 s at 40°C and 45 s at 72°C, incorporating [α -³²P] dATP (Amersham) during cDNA fragment extension. Amplification products were submitted to electrophoresis on 6% denaturing sequencing gels. Subsequently the gels were transferred on Whatman 3MM filter paper and exposed to X-OMAT film (Kodak) at -80°C.

Recovery, cloning and sequencing of differentially expressed genes

Fragments representing putative differentially expressed genes were recovered from the gels by elution in boiling water for 15 min. A 1.0 μ l aliquot of the elution product was employed in the reamplification reactions following the initial DDRT-PCR program and the respective primer combinations. PCR products were visualized in 1% agarose gel and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). Competent *E. coli* DH10B cells (Invitrogen) were transformed and positive recombinants were submitted to plasmid extraction (Ausubel, 1993). Inserts were sequenced using a BigDye terminator mix in an automated fluorescence sequencing system ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

Sequence data analysis

Sequences were dynamically translated by BLASTX (Altschul et al., 1997) for comparison of the deduced peptides with the GenBank (nr) database. Additionally, these sequences were run against the translated honey bee EST database (TBLASTX) from honey bee brain (<http://www.life.uiuc.edu/robinson>). Matches were considered significant at a cutoff probability score of $E < 10^{-3}$. Alignments of homologous sequences were performed using ClustalW (Thompson et al., 1997). Searches for protein domains were performed using ProDom database (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom>).

Labeling and hybridization

To confirm differential expression of the identified genes, an RT-PCR-reaction followed by Southern blot analysis was performed for queen versus worker samples. This protocol is particularly useful to study transcripts that are expressed at only low levels, or where the amount of tissue or cells to be analyzed is limited (Pernas-Alonso et al., 1999). In these reactions, duplicates of queen and worker template cDNAs were submitted to the same amplification programs and primer combinations as those employed in the original DDRT-PCR reactions. The resulting PCR profile in an agarose gel was a smear that contained the respective differentially expressed fragments. Fragments derived from the original DDRT-PCR screen were labeled by random priming with [α -³²P] dATP and used as probes. Hybridization was carried out at 65°C for 16 h in a standard Southern blot protocol (Ausubel, 1993).

Results

Cloning of *Melipona quadrifasciata* actin

Actin sequences of *A. mellifera* and *Bombyx mori* were aligned and the most conserved regions were selected to construct oligonucleotide primers corresponding to the *A. mellifera* sequence (from positions 39-114aa; AB023025). These primers were employed in PCR reactions that used as a template cDNA synthesized from total RNA isolated from a mixture of individual females from both castes. A fragment of low intensity was amplified and sequenced. Based on this sequence, specific oligonucleotide primers were designed and used to amplify the corresponding fragment of the

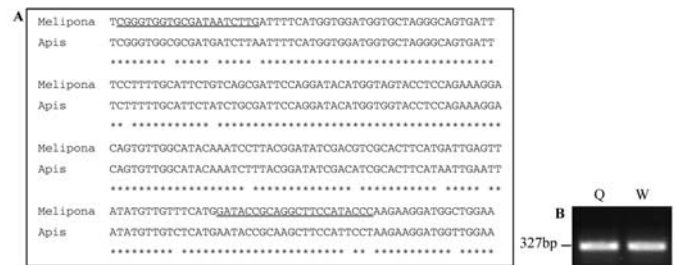


Figure 1. (A) Multiple alignment by Clustal W program of *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera* partial actin cDNA sequences showing identical nucleotides (*). Underlined nucleotides correspond to *Melipona* actin sequence primers. (B) Actin amplification in newly emerged *Melipona quadrifasciata* queens (Q) and workers (W) (fragment length: 327 bp). The intensity of the actin signal was used for cDNA calibration

M. quadrifasciata actin gene (Fig. 1A). In the subsequent DDRT-PCR and RT-PCR experiments, extension of this fragment was employed for calibration of all differentially expressed genes (Fig. 1B).

Screening of differentially expressed fragments

Differential display reactions were performed using cDNAs prepared from total RNA of newly emerged queens and workers. To ensure that the initial amounts of cDNA were equivalent for both samples, the actin fragment was amplified using the specific actin primers designed in this study (Table 1) in 20 PCR cycles. Figure 1B shows that bands with comparable intensity were generated from this procedure, indicating that cDNA concentrations were similar in the queen and worker samples. Subsequently, cDNA fragments were randomly amplified with the random primers listed in Table 1. The respective amplification products were resolved in six sequencing gels run under denaturing conditions. Visual inspection of the autoradiography films revealed a number of caste specific bands (Fig. 2A), indicated by black arrows. The presence of common bands (white arrows) for the queen versus worker samples is important reference for the differential PCR products. Fourteen putative genes that appear preferentially expressed in one of the female castes were isolated, reamplified, cloned and sequenced.

Sequence analysis

Table 2 shows an overview of the analysis of the isolated fragments, indicating the source (caste) from which they were amplified. Sequences were analyzed by BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) against the non-redundant (nr) NCBI GenBank database, and by TBLASTX against the *Apis mellifera* EST database prepared from brain cDNA (Whitfield et al., 2002; <http://www.life.uiuc.edu/robinson>). Seven out of fourteen sequences produced significant hits with known proteins, which could be clustered into four functional Gene Ontology groups: transcriptional

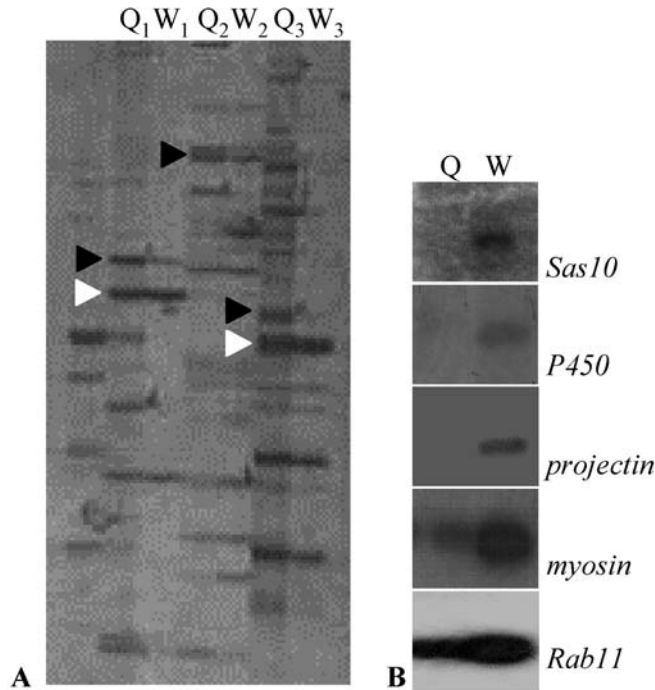


Figure 2. Gene expression profiles of newly emerged *Melipona quadrifasciata* females. (A) Amplification products prepared with the same primer combination in the DDRT-PCR reactions from queen and worker pairs (Q_nW_n) were run side by side in sequencing gels. The white arrows point to genes that are equally expressed in the parallel samples, whereas the black arrows indicate differentially expressed genes in the respective queen/worker pairs. Amplification products of differentially expressed genes were retrieved from the gels for cloning and sequencing. (B) Verification by RT-PCR and Southern hybridization of caste-specific gene expression for identified *Melipona* genes. The hybridization results showed that *projectin*, *Rab11*, *P450*, *myosin* and *Sas10* genes are indeed expressed at higher levels in workers (W) as compared to queens (Q)

regulators (2), structural proteins (3), cell signaling proteins (1) and metabolic enzymes (1) (Table 2). Only three of these sequences have been previously described for *A. mellifera*, namely *Sas10*, *Rab11* and cytochrome *P450*. From the other seven sequences, two produced hits with hypothetical proteins from insects (including honey bee sequences), which have not yet been annotated. The other five *Melipona cDNA* fragments had matches only with hypothetical proteins deduced from honey bee ESTs.

Validation of differential display results by RT-PCR and Southern blot hybridization

The DDRT-PCR technique is prone to methodological problems, such as the lack of linearity between signal intensity and expression levels of the respective fragments, frequently resulting in false-positive clones. To validate differentially expressed fragments identified by this technique, the functionally assigned *Melipona cDNA* fragments were submitted to RT-PCR and Southern blot hybridization (Pernas-Alonso et al., 1999). Caste-specific differential expression could be unambiguously confirmed for five of the fragments: *myosin*, *projectin*, cytochrome *P450*, *Sas10* and *Rab11* (Fig. 2B). *Myosin* and *Rab11* expression was detectable in both castes, with a quantitative modulation in expression levels, while the other fragments showed up exclusively in the worker samples. Nonetheless, this does not imply that the corresponding genes are not expressed at all in queens. However, if expressed, their expression levels should be very low, considering the high number of PCR cycles used in the validation reactions.

Table 2. Sequences (MQ ESTs) were classified into five categories (four Gene Ontolog functional groups, plus apparently conserved genes of unknown function). The BLASTX results show the best hits (first read) against the non-redundant (nr) NCBI database, including organism and score value. The TBLASTX comparison of *Melipona* sequences against *Apis mellifera* brain library ESTs identifies sequences by the respective EST nomenclature. (Id) means GenBank accession number and (*) indicate genes for which caste specific expression was experimentally confirmed (see fig 2B). Most of the differentially expressed genes appear to be overexpressed in workers (W) as compared to queens (Q)

MQ ESTs Id	Functional group	Caste	First match in_ nr database (BLASTX)				<i>A. mellifera</i> hits (TBLASTX)	
			Id	gene	organism	e-value	EST	e-value
(CF673315)	Transcriptional regulator	W	(U63063)	<i>Sas10</i> *	<i>S. cerevisiae</i>	7e-11	BB160003B20A11	3e-08
(CF673307)		W	(AA802501)	<i>SIN3A</i>	<i>D. melanogaster</i>	1e-33		
(CF673305)	Structural	W	(AF252787)	<i>Myosin</i> *	<i>D. melanogaster</i>	6e-34		
(CF673308)		W	(AF047475)	<i>Projectin</i> *	<i>D. melanogaster</i>	4e-04		
(CF673303)		Q	(AB026191)	<i>Kettin</i>	<i>Bombyx mori</i>	6e-28		
(CF673311)	Cell signaling	W	(AY313948)	<i>Rab11</i> *	<i>A. gambiae</i>	6e-52	BB160013A20H10	6e-52
(CF673316)	Metabolic enzyme	W	(AY313948)	<i>P450</i> *	<i>A. gambiae</i>	5e-42	BB160009B20D03	9e-23
(CF673304)	Conserved unknown	W	(NM167948)	CG32306	<i>D. melanogaster</i>	4e-06	BB160008A10C06	1e-04
(CF673312)		W	(XM318394)	AgCP7676	<i>A. gambiae</i>	3e-15	BB160009A10C10	1e-55
(CF673313)		W					BB170004B10E03	3e-04
(CF673314)		W					BB160022A20D01	6e-06
(CF673309)		W					BB170008B10F01	4e-04
(CF673310)		W					BB170032A20E08	1e-04
(CF673306)		Q					BB170004B20D05	4e-47

Discussion

The majority of gene expression studies in relation to caste development in social insects have been performed in the honey bee, *Apis mellifera*. These studies focused on differential gene expression during caste differentiation in the larval stages (Evans and Wheeler, 2000; Hepperle and Hartfelder, 2001; Guidugli et al., 2004) and recently on gene expression related to task performance and learning in adult workers (Kucharski and Maleszka, 2002; Takeuchi et al., 2002; Whitfield et al., 2002, 2003; Grozinger et al., 2003). The impact of regulatory factors, such as juvenile hormone and ecdysteroids, has been implicitly or explicitly addressed in these gene expression analyses.

To investigate possible common patterns in gene expression patterns related to caste in highly eusocial social bees we performed a DDRT-PCR analysis on newly emerged adult queens and workers of *Melipona quadrifasciata*. In this analysis we detected and identified 14 transcripts that are differentially expressed between the two castes at the onset of adult life. When validated by Southern blot analysis most of the differentially expressed genes that could be annotated with respect to putative function (structural proteins, negative transcriptional regulators, metabolic enzymes and a signaling protein), turned out to be overexpressed in the worker caste. A comparative analysis of *Melipona* expressed sequences against *Apis* ESTs, from a normalized brain cDNA library (Whitfield et al., 2002), revealed a high number of common transcripts (10 out of 14 from our data). Notably, five of the *Melipona* ESTs had only matches with *Apis* ESTs but not with annotated or putative coding sequences in other insects, even in those for which genome sequencing has been completed, i.e. *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) and *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002). These genes are therefore candidates for further investigations on processes specific to social bees or caste development in general.

With respect to the *Melipona* ESTs that were putatively assigned a known gene function, such as the cytochrome P450-, myosin-, projectin-, Sas10-, and Rab11-like cDNAs, most of these were overexpressed in the worker caste. The myosin- and projectin-like ESTs that are overexpressed in newly emerged *Melipona quadrifasciata* workers belong to structural genes that are functionally related. Projectin was described in *Drosophila* as a very large protein (900 kDa) present in the Z disc of various muscle types, where it is essential for sarcomere formation. This protein shows actin and myosin interaction sites that are highly conserved structural motifs in muscle proteins (Daley et al., 1998). Projectin and myosin should thus constitute essential elements for flight muscle architecture in worker bees. Overexpression in this caste can be related to the fact that workers must heavily invest in flight muscle structural proteins to carry out long foraging flights during their later life cycle stages. In contrast to these, and also in contrast to honey bee queens, *Melipona* queens do not perform long distance flights, as they mate and establish a new colony in close proximity to their colony of origin (Engels and Imperatriz-Fonseca, 1990).

It is of interest in this context that another muscle structural protein that was detected and identified in this study as a kettin-like EST appeared to be overexpressed in newly emerged queens. It is closely related to projectin, even though these two proteins may not be entirely equivalent in function (Daley et al., 1998). The kettin sequence obtained in this study contains an immunoglobulin domain, typical of the giant muscle kinase titin (or kettin) (Prodom accession number: PD068014). In essence, this could mean that despite their overall morphological similarity, the flight muscles of queens and workers may have a different molecular architecture.

With respect to the Gene Ontology functional group of cell signaling proteins we could detect a Rab11-like EST overexpressed in the worker caste. The sequenced cDNA fragment contained a GTP binding domain (PD000015). Rab11 is a small monomeric GTPase involved in membrane vesicle trafficking, including endocytosis (Meyers and Prekeris, 2002). In the fruit fly, Rab11 mutant females are affected in their fertility, showing some sterile and semi-sterile mutants (Dollar et al., 2002). This protein has been described in other insect species, such as *Periplaneta americana* and *Anopheles gambiae*, and when searching through the honey bee databank we could also find a similar *Apis* sequence expressed in the brain of adult workers, specifically nurses and foragers (Whitfield et al., 2003) (Table 2).

Another group of ESTs of special interest are those putatively classified as gene expression regulators. These include the differentially expressed cDNA fragments *Sas10* and *Sin3A*. The deduced protein sequence for *Melipona* Sas10 grouped with proteins of the Sas10/Utp3 family of *Saccharomyces cerevisiae* (PD023936), which have been identified as regulators involved in chromatin silencing (Kamakaka and Rine, 1998). In insects, no similar sequences have been described so far, and the exact molecular function of this family is still unknown, even in yeast. Southern blot analysis of RT-PCR products confirmed *Sas10* to be overexpressed in *Melipona* workers, as indicated in the initial DDRT-PCR analysis. Such confirmation was not possible for *Melipona* Sin3A. Our reads derived from sequencing of a DDRT-PCR product over-represented in workers contained the characteristic Sin3A transcriptional co-repressor domain (PD232195). This motif characterizes our EST as a gene coding for a negative regulator of gene expression, putatively acting as a global repressor through its association with histone deacetylation (Rundlett et al., 1996). In insects, this gene was described in *Drosophila* where it interacts with *sina* in the photoreceptor Ras-MAPK pathway (Carthew and Rubin, 1990), and where it is probably also essential for cell proliferation and survival (Neufeld et al., 1998).

The clearest picture for any of the differentially expressed *Melipona* genes in the context of caste can currently be attributed to that encoding cytochrome P450. In *Melipona quadrifasciata*, a cytochrome P450 (CYP4G15) EST showed an elevated expression level in the worker caste as compared to newly emerged queens. The *Melipona* cytochrome P450 (CYP4G15) cDNA fragment contains three conserved cytochrome P450 domains: PD260523, PD035994

and PD000027. The CYP4G15 gene was initially identified in *D. melanogaster* (AF159624) in studies investigating P450s related to ecdysteroid biosynthesis (Maibeche-Coisne et al., 2000). CYP4G15 is strongly expressed in the central nervous system of third instar larvae and weakly expressed in adult flies. Cytochrome P450 overexpression in worker bees has been previously reported for *Apis mellifera* in adult life (Whitfield et al., 2002) and also during the final larval stages that are critical for caste differentiation (Corona et al., 1999; Evans and Wheeler, 2000). Thus, it appears to constitute a general and possibly constitutive element in the caste syndrome, occurring in different bee species and observed at different time points in the life cycle.

The results presented in this study provide the first comparative look at genome level on the caste syndrome in highly social bees. The focus of this study was directed towards caste-specific differential gene expression in newly emerged adult *Melipona quadrfasciata* bees. In this respect, our focus differs from that given in most studies on *Apis mellifera* caste development (larval stages that are critical to caste development) or on age-related division of labour in adult worker bees (especially on brain gene expression in nurses and foragers). As mentioned above, the primary mechanism underlying caste development in *Melipona* is thought to be genetic, yet modulated by larval food conditions. The endocrine system then constitutes the integrating element between genetic/trophic starting conditions and the tissue-specific differentiation responses (for review see Hartfelder, 1990). Most of the physiological and even more so the molecular mechanisms involved in *Melipona* caste-development, however, are still poorly understood. Similarly, age-related division of labor has only marginally been addressed in stingless bees, when compared to the impressive amount of data on reproduction and especially the diversification of the queen oviposition process (for reviews see Engels and Imperatriz-Fonseca, 1990; Zucchi et al., 1999) and the results obtained for division of labor in *M. quadrfasciata*, so far indicate a rather high plasticity in task performance (Kerr and Santos-Neto, 1956; Waldschmidt et al., 1998).

In conclusion, by focusing on molecular differences apparent in newly emerged bees of two highly eusocial genera we were able to pinpoint a set of genes belonging to different Gene Ontology functional groups as candidates for in-depth functional studies of inherent characteristics of caste phenotypes, which included longevity determinants.

Acknowledgements

We would like to thank Marcos A. Oliveira for help with experimental protocols and Weyder C. Santana for help in collecting the bee samples. FAPESP and CAPES supported this work.

References

- Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides, S.E. Scherer, P.W. Li, R.A. Hoskins, R.F. Galle et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA. 1600 pp.
- Beetsma, J., 1985. Feeding behaviour of nurse bees, larval food composition and caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). In: *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology: in Memoriam Karl von Frisch, 1886–1982*, (B. Hölldobler and M. Lindauer, Eds.), Sinauer, Sunderland, Mass. pp. 407–410.
- Bloch, G., D.E. Wheeler and G.E. Robinson, 2002. Endocrine influences on the organization of insect societies. In: *Hormones, Brain, and Behavior* (D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Ettgen, S.E. Fahrbach and R.T. Rubin, Eds.), Academic Press, San Diego. pp. 195–237.
- Bonetti, A.M., W.E. Kerr and S.H. Matusita, 1995. Effects of juvenile hormones I, II and III, in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Rev. Bras. Biol.* 55 Suppl 1: 113–20.
- Camargo, J.M.F. and S.R.M. Pedro, 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* 23: 509–522.
- Campos, L.A.O., 1978. Sex determination in bees. VI: effect of a juvenile hormone analog in males and females of *Melipona quadrfasciata* (Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 51: 228–234.
- Campos, L.A.O., H.H.W. Velthuis and F.M. Velthuis-Kluppel, 1975. Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften* 62: 98–99.
- Carthew, R.W. and G.M. Rubin, 1990. seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 63: 561–577.
- Corona, M., E. Estrada and M. Zurita, 1999. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 202: 929–938.
- Daley, J., R. Southgate and A. Ayme-Southgate, 1998. Structure of the *Drosophila* projectin protein: isoforms and implication for projectin filament assembly. *J. Mol. Biol.* 279: 201–210.
- Dollar, G., E. Struckhoff, J. Michaud and R.S. Cohen, 2002. Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development* 129: 517–26.
- Engels, W. and V.L. Imperatriz-Fonseca, 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: *Social Insects – an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (W. Engels, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 168–230.
- Evans, J.D. and D.E. Wheeler, 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5575–5580.
- Evans, J.D. and D.E. Wheeler, 2000. Expression profiles during honeybee caste development. *Genome Biol.* 2: 2.1: 6 pages, available online <http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1>.
- Grozier, C.M., N.M. Sharabash, C.W. Whitfield and G.E. Robinson, 2003. Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 Suppl 2: 14519–14525.
- Guidugli, K., C. Hepperle and K. Hartfelder, 2004. A member of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily is a target of the ecdysone response in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *Apidologie* 35: 37–47.

- Hartfelder, K., 1990. Regulatory steps in caste development of eusocial bees. In: *Social Insects – an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (W. Engels, Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp. 245–264.
- Hartfelder, K. and H. Rembold, 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone-III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J. Comp. Physiol. B* 160: 617–620.
- Hepperle, C. and K. Hartfelder, 2001. Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* 88: 113–116.
- Holt, R.A., G.M. Subramanian, A. Halpern, G.G. Sutton, R. Charlab, D.R. Nusskern, P. Wincker, A.G. Clark, J.M. Ribeiro, R. Wides et al., 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129–149.
- Kamakaka, R.T. and J. Rine, 1998. Sir- and silencer-independent disruption of silencing in *Saccharomyces* by Sas10p. *Genetics* 149: 903–914.
- Kamikouchi, A., H. Takeuchi, M. Sawata, K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo, 1998. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 181–186.
- Kerr, W.E., 1950. Evolution of the mechanism of caste determination in the genus *Melipona*. *Evolution* 4: 7–13.
- Kerr, W.E., 1987. Sex determination in bees. XVII. systems of caste determination in the Apinae, Meliponinae and Bombinae and their phylogenetic implications. *Rev. Brasil. Gen.* 10: 685–694.
- Kerr, W.E. and G.R. Santos-Neto, 1956. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. V. Divisão de trabalho entre operárias de *Melipona quadrifasciata* Lep. *Insectes soc.* 3: 423–430.
- Kucharski, R. and R. Maleszka, 2002. Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0007.
- Liang, P., 2002. A decade of differential display. *Biotechniques* 33: 338–344.
- Liang, P. and A.B. Pardee, 1995. Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 274–280.
- Maibeche-Coisne, M., L. Monti-Dedieu, S. Aragon and C. Dauphin-Villemant, 2000. A new cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*, CYP4G15, expressed in the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 1132–1137.
- Meyers, J.M. and R. Prekeris, 2002. Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. *J. Biol. Chem.* 277: 49003–49010.
- Michener, C.D., 2000. *The Bees of the World*. John Hopkins University Press, Baltimore. 913 pp.
- Neufeld, T.P., A.H. Tang and G.M. Rubin, 1998. A genetic screen to identify components of the sina signaling pathway in *Drosophila* eye development. *Genetics* 148: 277–286.
- Ohashi, K., M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo, 1996. Molecular cloning of cDNA and analysis of expression of the gene for alpha-glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 380–385.
- Page, R.E.J. and C.Y.-S. Peng, 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* 36: 695–711.
- Pernas-Alonso, R., F. Morelli, U. di Porzio and C. Perrone-Capano, 1999. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 4: 395–406.
- Pinto, L.Z., K. Hartfelder, M.M.G. Bitondi and Z.L.P. Simões, 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.* 48: 783–790.
- Rachinsky, A., C. Strambi, A. Strambi and K. Hartfelder, 1990. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 31–38.
- Rembold, H., 1987. Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17: 1003–1006.
- Rundlett, S.E., A.A. Carmen, R. Kobayashi, S. Bavykin, B.M. Turner and M. Grunstein, 1996. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93: 14503–14508.
- Schmidt Capella, I.C. and K. Hartfelder, 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.
- Schmidt Capella, I.C. and K. Hartfelder, 2002. Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* 307: 265–272.
- Takeuchi, H., T. Fujiyuki, K. Shirai, Y. Matsuo, A. Kamikouchi, Y. Fujinawa, A. Kato, A. Tsujimoto and T. Kubo, 2002. Identification of genes expressed preferentially in the honeybee mushroom bodies by combination of differential display and cDNA microarray. *FEBS Lett.* 513: 230–234.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.
- Velthuis, H.H.W., 1976. Environmental and endocrine influences in stingless bee caste determination. In: *Phase and Caste Determination in Insects – Endocrine Aspects*. (M. Lüscher, Ed.), Pergamon Press, Oxford. pp. 63–70.
- Waldschmidt, A.M., L.A.O. Campos and P.J. Marco, 1998. Behavioral plasticity of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponinae). *Rev. Brasil. Biol.* 58: 25–31.
- Wenseleers, T., F.L.W. Ratnieks and J. Billen, 2003. Caste fate conflict in swarm-founding social Hymenoptera: an inclusive fitness analysis. *J. Evol. Biol.* 16: 647–658.
- Whitfield, C.W., M.R. Band, M.F. Bonaldo, C.G. Kumar, L. Liu, J. Pardinas, H.M. Robertson, B. Soares and G.E. Robinson, 2002. Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behaviour in the honey bee. *Genome Res.* 12: 555–566.
- Whitfield, C.W., A.M. Cziko and G.E. Robinson, 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 302: 296–299.
- Zucchi, R., E.V. Silva-Matos, F.H. Nogueira-Ferreira and G.G. Azevedo, 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees – nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sociobiology* 34: 65–86.

CAPÍTULO 2

Perfis de expressão gênica que sustentam os fenótipos alternativos de castas em uma abelha altamente eusocial.

Artigo em fase de submissão (revista *Insect Molecular Biology*)

Carla C. Judice, Marcelo F. Carazzole, Fernanda Festa; Mari C. Sogayar, Klaus Hartfelder e Gonçalo A. G. Pereira.

Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee.

Carla C. Judice¹, Marcelo F. Carazzole¹, Fernanda Festa³; Mari C. Sogayar³, Klaus Hartfelder², and Gonçalo A. G. Pereira^{1*}

1- Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-970, Campinas, S.P., Brazil. carlacjm@lge.ibi.unicamp.br; goncalo@unicamp.br

2- Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, S.P., Brazil. khartfel@rge.fmrp.usp.br

3- Instituto de Química, Universidade de São Paulo – São Paulo, S.P., Brazil.

Abstract

Alternative phenotypes are the result of differential gene expression during development. Using Representational Difference Analysis, we generated 1,278 ESTs from queens and workers of a stingless bee. Genes involved in transcriptional regulation and metabolism were predominant in queens, contrasting with a wider range of functional categories in workers. Most ESTs matched honey bee sequences and showed similar caste distribution. Therefore, caste development in social bees involves the expression of functionally different sets of genes. This was validated by real time PCR for six annotated genes. Interestingly, queens that were developmentally induced by juvenile hormone treatment were more similar to workers than to natural queens in their expression profiles, revealing a new facet in the genetic predisposition to caste in this stingless bee.

1. Introduction

The queen and worker castes of social insects are one of the most impressive examples of polyphenism generated by divergent developmental pathways. In the social Hymenoptera, this caste polyphenism occurs exclusively in the female, being attributed to haplodiploid sex determination that results in asymmetries in genetic relatedness amongst offspring (Wilson, 1971). The proximate developmental mechanisms underlying this complex divergence in morphological characteristics and behavioral patterns in most social insects can, in general terms, be summarized as a specific set of environmental stimuli that trigger a threshold response in the endocrine system (Hartfelder e Emlen, 2004). The latter then takes the lead during the metamorphic stages and directs caste-specific patterns in gene expression (Evans e Wheeler, 2001).

Most gene expression studies on caste development in social insects have been performed in the honey bee, *Apis mellifera*. These studies focused on differential gene expression during critical larval stages using suppression subtractive hybridization and differential display PCR strategies (Evans e Wheeler, 2000, Hepperle e Hartfelder, 2001, Guidugli *et al.*, 2004). The changes in gene expression patterns that underlie division of labor and task performance in adult worker bees have been revealed in a microarray system generated from a large-scale EST sequencing approach on a brain cDNA library (Kucharski e Maleszka, 2002, Takeuchi *et al.*, 2002, Grozinger *et al.*, 2003, Whitfield *et al.*, 2002, Whitfield *et al.*, 2003). These studies also laid the groundwork so that complex social behavior of bees can then be conceptually interpreted as changes in gene regulation (Robinson e Ben-Shahar, 2002, Whitfield *et al.*, 2003), manifest as age- and task- related changes in gene expression in the brain of adult bees (Kucharski e Maleszka, 2002, Takeuchi *et al.*, 2002, Grozinger *et al.*, 2003, Whitfield *et al.*, 2002, Whitfield *et al.*, 2003). These striking recent advances in the functional genomics of honey bee caste development and division of labor are now accompanied by a full-scale genome sequencing project (<http://hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>) and by further EST large-scale sequencing (Nunes *et al.*, 2004). Both genomic and expressed sequence information should provide tools for the investigation of regulatory networks underlying the connection between the endocrine system, developmental programs, and behavior in the evolution of insect sociality.

Unraveling such networks and specially unveiling the hitherto unknown function of conserved genes is still an arduous task in social insects since they are not easily amenable to genetic tests or to transgenic analyses. So far, the only successful strategy to test gene function in the honey bee is by RNA interference

protocols (Beye *et al.*, 2002, Amdam *et al.*, 2003). Comparative analysis of gene expression in closely related species of similar social status could, therefore, be expected to provide additional valuable information on possible conserved circuits involved in developmental pathways and in division of labor between adult colony members. We undertook a study on differential gene expression in the castes of a stingless bee.

Stingless bees (Meliponini) are a large tribus of highly eusocial bees, comprising over 300 species in 14 currently recognized genera (Camargo e Pedro, 1992). The Meliponini are closely related to the honey bees (Apini) (Michener, 2000), which they equal and rival with respect to social organization (Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990). The queen and worker phenotypes of stingless bees are strongly divergent in their morphology and behavior, and in most of the stingless bee genera, the development of these caste differences is initiated by a nutritional signal, that is, queen larvae are provided with a much larger quantity of larval food than worker larvae.

An exception to this rule is the stingless bee *Melipona* genus, where brood cells are all of the same size and all contain similar quantities of larval food. The large percentage of queens emerging from the brood combs is a puzzling phenomenon that has inspired a model for caste determination by genetic predisposition in a two-locus two-allele system (Kerr, 1950). After the allelic difference has set the primary developmental switches for caste development, the endocrine system is then called into action to subsequently direct differentiation into the queen or worker pathways during metamorphosis. In this aspect of endocrine regulation we can, thus, see a general convergence in caste development of the social Hymenoptera (Bonetti *et al.*, 1995, Hartfelder e Rembold, 1991, Pinto *et al.*, 2002). The *Melipona* genus thus differs from the other highly social bees in the initial trigger of caste development, but not so much in the actual differentiation processes during metamorphosis. These features render *Melipona* an interesting model for comparative studies on caste development in bees, especially on the possible consequences resulting from the transition from a nutritional determination of caste, as observed in the majority of social bees, to a genetics-based mechanism, in the genus *Melipona*. In general terms, such a transition is reminiscent of the frequent switches from environmental sex determination (ESD) to genetic sex determination (GSD) frequently observed and described in reptiles (Greenbaum e Carr, 2001). This parallelism is especially intriguing since the postulated caste determining locus in *Melipona* has always been set in conjunction with the sex determining locus (Kerr, 1950).

To investigate the molecular mechanisms underlying caste development in the genus *Melipona*, we recently undertook a comparative study on caste-specific gene expression in *Melipona quadrifasciata* by a differential display RT-PCR approach. Most of the differentially expressed genes that were annotated with respect to function turned out to be overexpressed in the worker caste (Judice *et al.*, 2004). The overexpression observed for the putative Rab10, Sin3A and cytochrome P450 homologs in *Melipona* worker is paralleled by their similar pattern of overexpression in honey bee foragers (Tsuchimoto *et al.*, 2004, Whitfield *et al.*, 2003), suggesting common patterns of caste-specific gene expression in highly social bees. In the present study we extend this approach by establishing a representational difference analysis (RDA). With this focus we were not looking for determinants of caste acting in the premetamorphic and metamorphic stages, but instead, on gene expression in bees that were on the brink to becoming adult members of the colony, but had not yet started to exhibit any caste-specific behavior.

Since the method calls for high-throughput sequencing it was also expected to generate a large set of ESTs for comparative analyses with the honey bee database. From the set of assembled and functionally annotated sequences we selected a set of six clones for which we designed specific primers to confirm their differential expression by real-time RT-PCR. This validation analysis was performed not only on naturally produced queens and workers, but also included queens that were obtained by treatment of larvae with the juvenile hormone analog pyriproxifen. Treatment with juvenile hormone (JH) and analogs has long been shown to induce the expression of morphological queen characteristics in emerging adults (Campos *et al.*, 1975, Bonetti *et al.*, 1995). Consequently, we asked whether queens induced by JH treatment express this set of genes at the same level as naturally produced queens.

2. Results

2.1. Differentially expressed genes: library sequencing, EST quality and redundancy analysis

Sequencing of cDNA subtractive libraries clones from newly emerged bees (worker versus queen), generated using the RDA methodology (Pastorian *et al.*, 2000), resulted in a total of 1,510 sequences (Table 1), composed of 658 reads from the queen minus worker (QU) library and 860 reads from the worker minus queen (WO) library. The sequences were analyzed and 228 reads were filtered as low quality (Phred < 20; 82 sequences from the QU library and 146 from the WO library) or as contaminants (12 represented ribosomal

RNA, vector or poly-A sequences; 2 QU and 10 WO). The set of 1,278 high quality ESTs consisted of 574 sequences (45%) from QU and 704 sequences (55%) from WO. After assembly using the CAP3 program these reads were clustered into 337 unique sequences, from which 14 were subsequently removed from further analysis because they lacked a clear coding region (non coding RNA). The remaining unique sequences were distributed into 134 contigs (contiguous sequences originating from 1,005 ESTs) and 189 singlets. Table 1 summarizes these data. The unique sequences were deposited in the GenBank, under accession numbers: CO729449-CO729473, CO776957 and CO578497-CO578779.

The high efficiency of the RDA methodology to extract differentially expressed transcripts is illustrated by the fact that 84% of the contigs were composed of sequences with exclusive occurrence in the WO (92) library or the QU library (21). Only 21 contigs were represented by ESTs from both libraries (MIX contigs), and from these, 8 of which showed a clear tendency to be predominantly represented by ESTs from one of the libraries. For example, contigs 119, 114 and 139 were formed with a queen-to-worker ESTs ratio of, respectively, 224:11, 70:2, and 56:2.

Table 1. Results of base quality analysis and CAP3 assembly for *Melipona quadrifasciata* ESTs sequenced from clones obtained in the cDNA-RDA screen.

	<i>Total</i>	<i>QU</i>	<i>WO</i>	<i>MIX</i>
Total ESTs	1510	658	860	
Excluded sequences	228	84	156	
Total High Quality ESTs	1278	574	704	
Total Unique Sequences (US)	337	85	229	23
Non Coding RNA (NCR)	14 (84)	7	5	2
Total contigs minus “NCR” (# ESTs)	134 (1005)	21 (71)	92 (412)	21 (427:95)
Total singlets minus “NCR”	189	57	132	

2.2. Analysis of assembled sequences

The unique sequences were submitted to similarity searches using the direct nucleotide comparison (BLASTN) or comparison after dynamic translation (BLASTX and TBLASTX) against non-redundant (NR) and *Apis* EST and genomic databases (*Apis* Unigene_NCBI and Honeybee genome project version 1.2 _ NHGRI/USDA). Approximately half of the assembled sequences (161; 47,4%) showed similarity to

sequences in the non-redundant and/or *Apis* databases (BLASTX and TBLASTX, respectively; $E \leq 10^{-5}$), while for the remaining sequences (177; 52,6%) we did not obtain BLAST hits (Figure 1).

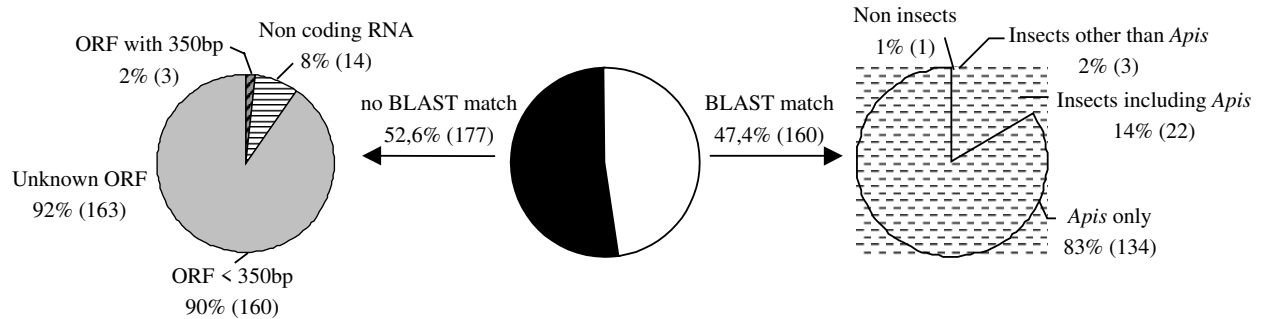


Figure 1. Distribution of CAP3 assembled *Melipona* ESTs after similarity searches employing BLASTX and TBLASTX tools on non-redundant and honey bee databases. The number of sequences present in each group is shown in parentheses. The “BLAST match” results (white area) were considered as significant at an e-value $\leq 1E-05$. These are represented by 47.4% of the assembled sequences. The “no BLAST match” sequences (black area) comprise 52.6% of the assembled ESTs. After screening for possible technical artifacts, 8% of the “no BLAST match” sequences were considered as non-coding RNA and 92% were classified as “unknown ORFs” (left pie graph), which consist of 163 ESTs shorter than 350 bp and 3 ESTs of at least 350 bp. The significant “BLAST match” results are shown relative to the *Apis* databases and the non-redundant database: 83% of the *Melipona* sequences showed similarity to *Apis* genes, 14% exhibited similarity to genes from *Apis* and other insects, 2% matched with genes from insects other than *Apis*, and 1% matched with *Apis* and mammal (right circle).

To check the protein coding potential in the set of “no BLAST match”, sequences were submitted to searches for putative open reading frames using the ORF Finder program (NCBI homepage). As mentioned above (Table 1), fourteen sequences did not show any clear ORF. The other 163 sequences yielded a positive result for possible open reading frames and were classified as “unknown ORFs” (Figure 1). In this figure, the unique sequences were also organized according to their identity as follows: group I (NR minus *Apis*) consists of 3 sequences that matched in the NR, but not in the *Apis* database; group II (NR- *Apis*) has 24 sequences with matches in both NR and *Apis* databases; group III (*Apis* only) has 134 unique sequences with matches only in *Apis* database. Group IV (No Hits-ORF) contains the unknown ORFs. The relative frequencies of the unique sequences and the ESTs in their different categories were observed for each caste and identity group (Table 2), showing that the ESTs are not equally distributed between the castes, and probably reflecting differences in the physiology of workers and queens.

Table 2. Relative frequencies of unique sequences (contigs and singlets) and ESTs for each caste according their identity groups and source library (QU, queen-library, WO, worker library. US stands for unique sequences).

<i>Relative frequency inside the castes</i>				
<i>Identity groups</i>	<i>QU</i>		<i>WO</i>	
Contigs	<i>US</i>	<i>EST</i>	<i>US</i>	<i>EST</i>
(I) NR minus <i>Apis</i>	0.0	0.0	0.9	0.6
(II) NR <i>Apis</i>	2.6	0.7	5.4	11.6
(III) <i>Apis</i> only	11.5	16.2	19.2	31.0
(IV) No Hits ORF	12.8	72.8	15.6	36.2
Total	26.9	89.7	41.1	79.3
Singlets				
(I) NR minus <i>Apis</i>	0.0	0.0	0.4	0.2
(II) NR <i>Apis</i>	3.8	0.5	2.7	0.9
(III) <i>Apis</i> only	23.1	3.2	25.4	8.9
(IV) No Hits ORF	46.2	6.5	29.6	10.6
Total	73.1	10.3	58.1	20.7

For all sequences of group I and for 23 sequences of group II, putative protein functions could be assigned (Table 3), most of which based on their *D. melanogaster* orthologs. Interestingly, one sequence of group II, coding for a putative serine/threonine kinase, showed homology to *Apis* and mammals (*Mus musculus*), but not to another insect sequence. In the queen caste, only five genes could be annotated, three of which being related to gene expression control (transcription and signaling) and two to protein biosynthesis. For the worker caste, a much larger number of genes were annotated and these covered a much wider spectrum of molecular function and/or biological process categories, such as learning, memory, behavior, defense processes, cell signaling, growth and maintenance, and genes involved in transcriptional regulation.

Table 3. Putative Biological Process or Molecular Function for the unique sequences (from groups I and II) showing significant similarity to known sequences. The reads were organized according to their caste-specific occurrence in the RDA libraries and by the number of ESTs in contigs after assembly (#EST). (Id) means GenBank accession number, and an (*) indicates genes for which higher expression in the predicted caste was confirmed by real time PCR (see Fig. 2). BLASTX results show the best hits against the non-redundant (nr) NCBI database, including E-score value and organism. The TBLASTX results of *Melipona* sequences against *Apis mellifera* are represented by their score values (*Apis* match); (NM) indicates a no match for the *Apis* database.

Id_ GenBank	# EST	<i>Apis</i> match	Best match in non-redundant database_BLASTX Gene name	Organism	Putative biological process or molecular function
Exclusive occurrence in queens:					
CO729469	2	e-26	Grainy head (e-10)	<i>D. melanogaster</i>	Transcription factor
CO729464	2	e-31	Fatty acid synthase(e-16)	<i>A. gambiae</i>	Fatty acid biosynthesis/enzyme
CO729457	1	e-29	CG13880-PA (e-22)	<i>D. melanogaster</i>	Protein biosynthesis
CO729454	1	e-60	Glutamate receptor (e-22)	<i>D. melanogaster</i>	Metabotropic glutamate receptor
CO578657	1	e-09	CG2839 (e-06)	<i>D. melanogaster</i>	Nucleic acid binding
Exclusive occurrence in workers:					
CO729459	48	e-23	JhI-21 (e-10) *	<i>A. gambiae</i>	Amino acid-polyamine transporter
CO729460	7	e-87	Roundabout (e-20)	<i>D. melanogaster</i>	Axon guidance
CO729458	6	e-50	Paramyosin (e-21)*	<i>D. melanogaster</i>	Structural constituent of muscle
CO729466	5	e-39	Diacylglycerol kinase (e-13)*	<i>D. melanogaster</i>	Protein C kinase activation
CO729449	5	NM	ENSANGP00000016183 (e-11)	<i>A. gambiae</i>	Pol protein
CO729467	4	e-26	Scavenger receptor (e-13)	<i>D. melanogaster</i>	Defense response
CO729471	4	e-31	CG2909-PA (e-07)	<i>D. melanogaster</i>	Unknown
CO729470	3	e-30	ENSANGP00000024457 (e-07)	<i>A. gambiae</i>	PDZ Domain
CO729461	3	NM	Pol polyprotein (e-18)	<i>A. gambiae</i>	Pol protein
CO729450	2	e-80	Dunce (e-39)*	<i>D. melanogaster</i>	cAMP-specific phosphodiesterase
CO729452	2	e-96	Serine/threonine kinase (e-23)	<i>M. musculus</i>	Serine/threonine kinase activity
CO729453	2	e-57	MICAL (e-24)	<i>D. melanogaster</i>	Magnetoreception
CO729463	2	e-17	Sulfate permease (e-16)	<i>D. melanogaster</i>	Sulfate transport
CO578625	2	e-10	TPA: HDC16673 (e-14)	<i>D. melanogaster</i>	ATPase activity
CO729456	2	e-81	CG32542-PA (e-24)	<i>D. melanogaster</i>	Epigenetic control of protein activity
CO729472	1	e-22	Receptor type 99A precursor (e-07)	<i>D. melanogaster</i>	Transmembran receptor protein tyrosine phosphatase
CO729462	1	e-117	Tryptophan hydroxylase activator (e-18)	<i>A. gambiae</i>	Tryptophan hydroxylase activation
CO729455	1	e-83	PK61-C (e-23)	<i>D. melanogaster</i>	Protein amino acid phosphorylation
CO729468	1	NM	Receptor guanylyl cyclase (e-09)	<i>D. melanogaster</i>	ATP binding
CO729451	1	e-48	Na+/K+ ATPase (e-36)	<i>D. melanogaster</i>	Na+/K+ -exchanging ATPase
CO729473	1	e-18	ENSANGP00000015979 (e-10)	<i>A. gambiae</i>	Unknown
CO729465	1	e-29	Groucho (e-14)	<i>D. melanogaster</i>	Transcription co-repressor

2.3. Gene expression and juvenile hormone action

We submitted a set of six genes that showed similarity to predicted proteins with known function and where exclusively represented in only one of the two castes to real-time PCR to validate their differential expression characteristics. This set included the predicted genes for fatty acid synthase from the QU library, and for amino acid-polyamine transporter, diacylglycerol kinase, groucho, dunce and paramyosin from the WO library (Figure 2). For the genes selected from the WO library, the relative quantification of transcripts in newly emerged queens and workers confirmed that paramyosin, amino acid-polyamine transporter, diacylglycerol kinase (DGK), dunce and groucho genes are overexpressed in the worker caste in a ratio of 1.3 to 3.2 fold, when compared with natural queens. Out of the six predicted genes, only the one from the QU library, namely: fatty acid synthase (FAS), which did not display the expected higher expression in the queen RNA sample. Taken together, we have found a good correlation between the results obtained from the EST distribution in the respective cDNA subtractive libraries and the quantitative RT-PCR data.

In this real-time PCR study we compared transcript abundance not only between naturally raised queens and workers, but, in addition, we included RNA samples from queens that were induced by the JH treatment. With this comparison we wanted to test to which extent the phenotypic plasticity in morphological character corresponds to gene expression patterns (Figure 2). The real-time PCR analysis revealed that only the FAS gene showed a similar expression between natural and artificial queens, and this was also the gene for which we could not confirm a differential expression between queens and workers. For all other genes, the expression levels in JH-induced queens differed from natural queens. For the DGK encoding gene, the JH-induced queens showed an intermediate expression level when compared to natural queens and workers. For the genes encoding putative amino acid-polyamine transporter, paramyosin, groucho and dunce homologs, the situation was even more extreme, as in these cases the expression levels for JH-induced queens by far exceeded even those of worker samples. This clearly indicates a divergence in hormone-induced morphological queen characters and the caste-specific gene expression pattern at the transition from pupal to the adult stage.

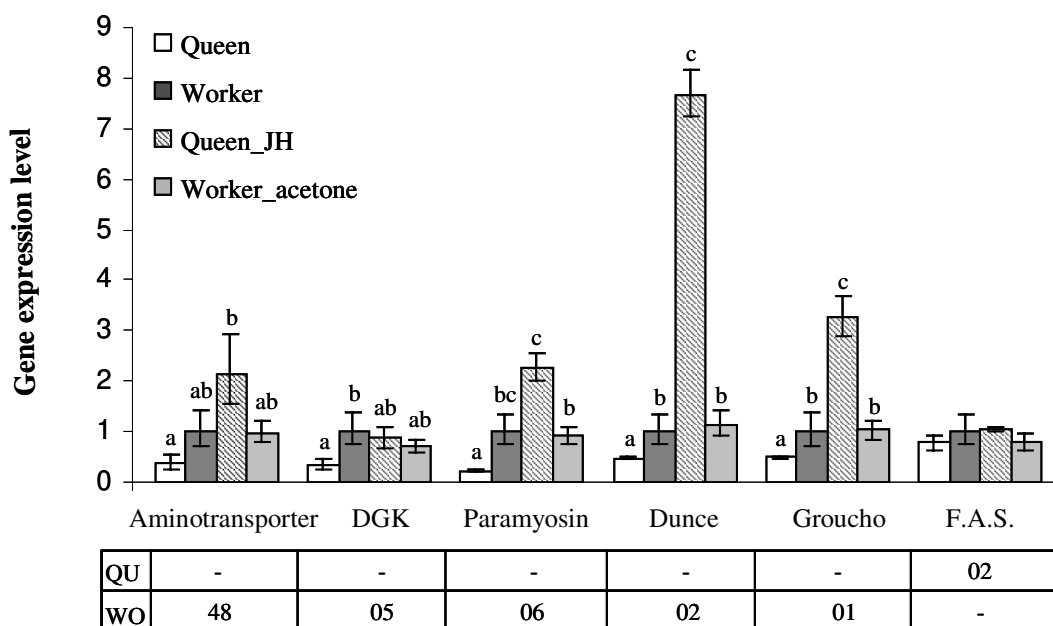


Figure 2. Relative gene expression in newly emerged females of *M. quadrifasciata* for genes with an RDA-predicted occurrence in either the queen or the worker caste. The Y-axis is on \log_{10} scale indicating the gene expression levels (2DDCt method) and the calculated errors (\pm SE) for newly emerged workers, natural queens, for queens obtained by juvenile hormone-treatment of last instar larvae ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ acetone) and for workers that were obtained from the acetone control treatment. Different letters over bars (a, b, c) indicate a significant difference ($p < 0,05$ for aminotransporter and DGK genes; $p < 0,01$ for paramyosin and groucho genes and $p < 0,001$ for dunce gene). The table under the real-time PCR graph shows the number of ESTs representing each of the genes in the RDA libraries.

3. Discussion

3.1. EST analysis and annotation

Although we could obtain similar numbers of high quality ESTs from both the queen and the worker libraries, we noted a very divergent distribution pattern for these sequences once they were clustered (85 unique sequences for queens versus 229 for workers). Conversely, 90% of the queen ESTs became assembled into only 27% of the queen unique sequences, while 79% of the worker ESTs formed 41% of the unique sequences of this caste (Table 2). In particular, we detected that 427 ESTs from the queen library were concentrated in 21 MIX contigs (with 379 ESTs in only 4 contigs) versus 95 ESTs from the subtracted worker library (Table 1). These data suggest that among the differentially expressed genes, the queen library presents some highly transcribed sequences. Finally, we observed that almost 60% of the queen unique sequences

(contigs and singlets) were classified as no hits, versus 45% in the worker unique sequences. Taken together, these results suggest that the transcriptional pattern of a worker bee is considerably more complex than that of a queen.

With respect to the results of local alignment matches, we noted that 52.6% of the ESTs did not yield a BLAST match. At first glance, this large number of no-match ESTs is somewhat strange since that these ESTs cannot all represent species-specific transcripts. An ORF analysis revealed that 92% of these no-match ESTs contained a recognizable protein coding region, whereas for 14 sequences no ORF could be detected, but could represent technical artifacts. However, recent studies on honeybee transcripts also identified ESTs that contained no significant ORF, but that were clearly expressed in different organs and castes and are thought to have a potential function as nuclear RNAs (Sawata *et al.*, 2002, Sawata *et al.*, 2004). Therefore, the no-ORF *Melipona* sequences will also have to be analyzed with more scrutiny to identify possible functions, especially in light of the fact that they were obtained from subtracted libraries.

When compared to other high-throughput EST sequencing projects on bees (Whitfield *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2004), the number of no-match ESTs with a recognizable ORF is much lower, and could be attributed to a number of factors. First, the RDA methodology starts out with a reverse transcription reaction that uses an oligo dT primer, and thus, many of the no-match ESTs may actually represent 3'-untranslated regions of expressed genes. A second reason may also be attributable to the RDA protocol, as this methodology not only has an inherent tendency to normalize libraries, but, also, to highly enrich for subtracted transcripts, that is, for transcripts that may normally be under-represented in library sequencing projects. The most important reason, however, seems to be that this class of ESTs contains an exceedingly large number of short ESTs, a problem encountered not only in this, but, also, in previous studies on the honey bee transcriptome. We have detailed this in Figure 1, where 160 out of the 163 ESTs with an ORF but no match in the nr database (unknown ORFs) are shown to be shorter than 350 bp and only 3 ESTs are equal to or higher than 350 bp. The problem and effect of EST size also becomes apparent when comparing the respective percentages of no-hit ORFs in the contigs (12.8 and 15.6%) and the singlets (46.2 and 29.6%) that were formed after CAP3 assembly of the ESTs (see Table 2).

The next question is whether the 12.8 to 15.6% no-hit ORFs in the contigs may actually represent *Melipona*-specific genes. In a recent comparison, we estimated that 22.6% of a total of 5,000 honey bee ESTs

may actually represent species-specific transcript (Nunes *et al.*, 2004) when compared to *Drosophila* and *Anopheles*, the only fully sequenced insect genomes (Adams *et al.*, 2000, Holt *et al.*, 2002). The estimated divergence time for Hymenoptera and Diptera is set at over 280 million years, and when contrasted with the much more recent divergence between the two bee tribes of highly social bees - they are clearly separated in the Baltic amber (Engel, 2001a) - the above figure of a 12-15% transcript specificity for *Melipona* may indeed be a realistic estimate for transcriptome differences due to phylogenetic distance.

With respect to ESTs representing conserved sequences, the majority of the putative genes listed in Table 3 shows high similarity to sequences from honey bee workers, and the expression of some of these have already been reported for *A. mellifera*. For example, the genes previously identified in newly emerged *Melipona* workers as homologs of the Sin3A transcriptional regulator (Judice *et al.*, 2004), diacylglycerol kinase, RNA binding protein and Na⁺/K⁺ ATPase, have been described as overexpressed in foraging workers of *A. mellifera* (Tsuchimoto *et al.*, 2004). Genes such as *dunce* and one encoding a PKC-like kinase were shown to be expressed in adult honey bee workers (Whitfield *et al.*, 2002), and their counterparts are involved in behavior of *Drosophila* (Davis e Dauwalder, 1991, Tinette *et al.*, 2004). This indicates that the highly eusocial bees utilize a common set of genes in the molecular network underlying their physiological and behavioral phenotype.

The other set of conserved sequences contains the unknown, yet supposedly conserved sequences that displayed significant matches with the *Apis* database but not with other insect species. It consists of 363 ESTs (108 from the QU and 255 from the WO subtractive cDNA library, respectively). The higher number of transcript matches from the *Melipona* worker library may represent a bias due to the fact that the honey bee EST database consists mainly of sequences from worker brain cDNAs (Whitfield *et al.*, 2002) or from worker-derived Open Reading frame ESTs (Nunes *et al.*, 2004). This group of ESTs that are conserved between *Apis* and *Melipona* contains 83% of the unique sequences with blast matches. We take this to mean that the group of social bees may have a set of exclusive genes that may be related to its specific life history traits, and that these genes may not have close matches in the two fully sequenced dipteran genomes or in the near complete silkworm genome (Mita *et al.*, 2004). These bee sequence tags may, therefore, contain interesting candidates for further investigations on processes that may be specific to caste development and division of labor in social insects. A similar picture can be drawn for the annotation result of a *Melipona* gene,

a serine/threonine kinase, with a mammalian gene as its closest match. Such best-match relationships for cell signaling-related genes have also been described for honey bee ESTs with human genes and were thought to reflect certain higher order organismic functions (Whitfield *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2004).

3.2. Functional annotation of queen- and worker-specific transcripts

Among the conserved sequences isolated during this screen for caste-specific genes, only a small set was functionally interpretable (5.9% and 6.8% of the queens and workers unique sequences, respectively) according to their similarity to genes of known function. In the queen caste, only five genes could be annotated. Two of these are related to gene regulation: a predicted protein similar to a honey bee gene with a LIM domain, a motif found in many regulators of developmental pathways (Kadmas e Beckerle, 2004), and the *grainy head* like gene, a *D. melanogaster* homolog of a transcription factor involved in the Frizzled pathway (Lee e Adler, 2004). Two other genes, that are exclusive to the queen library, are apparently involved in protein biosynthesis and in fatty acid synthesis. The fatty acid synthase gene encodes a multi-functional enzyme related to fatty acid and cholesterol metabolism (Bennett *et al.*, 1995). Its differential expression could be related to the higher accumulation of fat in queens. However, the real time PCR results indicate that this gene is also expressed in workers at a similar level (Fig. 2). Another gene showed similarity to a metabotropic glutamate receptor, which couples with various intracellular effectors through G-proteins to mediate and modulate synaptic transmission (Holscher, 1999). In the honey bee, this gene was found and has been reported to be more expressed in brain cells (Funada *et al.*, 2004).

In the worker caste, only one transcriptional regulator homolog was identified, the *groucho* gene which encodes a long-range co-repressor that silences transcription of linked promoters in a relatively indiscriminate manner (Barolo e Levine, 1997, Courey e Jia, 2001). Most of the functionally annotated genes in this caste are related to cell signaling. We could detect a unique sequence, composed of 48 ESTs from WO, representing an amino acid-polyamine transporter, similar to *D. melanogaster JhI-21*, which is present in several insects. In *Drosophila*, this gene is induced by JH and is involved in vitellogenesis (Dubrovsky *et al.*, 2002). Another cell signaling candidate is a putative *Melipona* homolog of a gene that encodes diacylglycerol kinase. This enzyme is critically involved in depleting the diacylglycerol-generated signaling complex (Kano e *et al.*, 2002). In insects, the inhibition of DGK activity has been shown to elevate the concentration of DG

inside the *corpora allata* cells, resulting in a significant dose-dependent decrease in JH biosynthesis (Rachinsky *et al.*, 1994). Therefore, the worker caste-specific expression of DGK could also provide a link between cell signaling and the JH-related regulation of behavioral and physiological caste characters in adult bees (for review see, (Hartfelder e Emlen, 2004). The higher expression of DGK in workers was confirmed by real time PCR.

As another putative member in the DG metabolic pathway, we isolated, from the WO library, a tryptophan hydroxylase activator annotated by GO as diacylglycerol-activated/phospholipid dependent protein kinase C inhibitor, presenting a 14-3-3 protein domain-specific binding activity. Its *D. melanogaster* homolog was initially described as similar to a family of mammalian proteins, called 14-3-3, which activate tyrosine and tryptophan hydroxylases. These are two key enzymes that regulate the biosynthesis of biogenic monoamine neurotransmitters (Swanson e Ganguly, 1992). More recently, studies have reported this gene to be related to learning and memory (Broadie *et al.*, 1997).

Three other annotated genes of the worker library can also be related to nervous system organization and function, namely: *MICAL* that encodes a product with an actin binding activity, which acts in repulsive axon guidance (Terman *et al.*, 2002), the roundabout gene product, which functions as an axon guidance (Kidd *et al.*, 1998), and the protein-tyrosine phosphatase 99A, precursor that is a component of the plasma membrane and has a protein tyrosine phosphatase activity (Tian *et al.*, 1991). In addition, we isolated two putative receptors that could also be related to nervous system functions: a guanylyl cyclase, which is the main receptor for nitric oxide in vertebrates and invertebrates (Bicker, 2001, Ott *et al.*, 2004), and a scavenger receptor, which interacts with a PDZ domain-containing protein (Ikemoto *et al.*, 2000). Interestingly, two PDZ domain-containing proteins were found in libraries generated as caste-specific transcripts of *M. quadrifasciata* workers, one of them in the present work and the other one reported in a previous study (Judice *et al.*, 2004).

The detection of *dunce* as a worker expressed gene represents an interesting finding, which, based on its *Drosophila* homolog, may have direct implications in division of labor of social bees. Its expression was confirmed as being higher in worker than in natural queens, but it was overexpressed in artificial queens when compared to natural queens. This gene was recently found to be essential for a form of cooperative behavior in *Drosophila*, called 'search-aggregation' (Tinette *et al.*, 2004). This consists of a two-step process: initially,

the flies land randomly on different food patches; in a second phase, the remaining group of flies move to the most favorable food source and aggregate there. *Dunce* mutant flies were deficient in this search-aggregation behavior. Thus, if this role of *Dunce* can be functionally confirmed in bees, the higher expression level of this gene in workers indicates that a molecular program for cooperative behavior may be expressed in newly emerged bees, already before they actually become engaged in colony division of labor.

Two other genes were similar to genes encoding POL proteins, involved in retrotransposition (Shankar *et al.*, 2004). The *Melipona* sequences matched with counterparts of *Anopheles gambiae*, *Bombyx mori* and even with *Schistosoma mansoni*, but not with *Apis*, where they have not been reported. This kind of incongruent phylogeny is common for these elements, which are widely spread and seem to be subject to horizontal transfer (Alberola e de Frutos, 1996).

3.3. Caste: Divergence between alternative phenotype morphology and gene expression

A selected set of the conserved and functionally annotated *Melipona* transcripts was submitted to real-time PCR analysis in order to validate the RDA results. This analysis carried out for paramyosin, amino acid-polyamine transporter, diacylglycerol kinase, *dunce* and *groucho* genes, confirmed the caste-specificity of expression for five of the six genes revealed in the RDA screen, contributing strong evidence for the efficiency of our subtractive libraries to reliably reveal differentially expressed genes in a high throughput protocol. However, validating the RDA results was not the sole purpose of this quantitative RT-PCR analysis; but, rather, we also sought to investigate the strength of the connection between the morphological phenotype (queen or worker) and gene expression patterns. For this purpose, we included in the analysis a third set of cDNA samples derived from queens that were obtained by JH treatment of spinning-stage larvae (Campos, 1978).

The outcome of this comparison between natural queens and JH-induced queens was quite surprising, showing remarkable differences in expression levels of caste-specific genes in which caste and/or morphological phenotype. In three of the five genes that were drawn from the worker-specific RDA clones we observed that JH-induced queens were not close to queens. They were either intermediate between queens and worker, or attained expression levels that were even significantly higher than those detected in newly emerged workers. This surprising result can best be interpreted under the hypothesis of a genetic predisposition to caste

determination in the genus *Melipona* (Kerr *et al.*, 1975), and evidencing a certain degree of independence between the morphological caste phenotype and gene expression patterns in young adult bees. The first step in caste determination is thought to involve a genotype-environment interaction in the early larval stages, which then installs caste-specific programs of hormone synthesis during metamorphosis that direct the establishment of the distinct morphologies. From this point of view, we interpret the current results as a relative independence between caste genotype and endocrine regulation of caste differentiation, that is, when a larva of the worker but not of the queen genotype is treated with JH during the critical larval instar, mimicking the queen endocrine situation in stingless bees (Hartfelder e Rembold, 1991), it may actually develop the morphological queen phenotype, but, nevertheless, overexpress worker-specific genes in the adult stage.

The results on a divergence between caste morphology and adult gene expression, thus, draw new attention to the proposed genetic predisposition for caste in *Melipona* (Kerr, 1950), and more recent discoveries of further examples of genetic caste determination in social Hymenoptera reinforce this hypothesis (Julian *et al.*, 2002, Volny e Gordon, 2002, Fraser *et al.*, 2000, Winter e Buschinger, 1986). In the light of the present results, the interaction of different alleles with the endocrine system may explain why the experimental design suggested by (Velthuis, 1976), to test genetic caste determination in *Melipona* bees has failed. This design relied on the induction of queen development by JH and proposed the evaluation of caste ratios in the offspring of these queens. Most of the JH-induced queens, however, failed to establish colonies (Campos *et al.*, 1979), possibly because JH provoked overexpression of some worker-specific genes, as shown in the present study.

In conclusion, the RDA methodology generated a total of 1,278 high quality ESTs that represent 134 contigs and 189 singlets with caste-specific expression in the highly eusocial bee *Melipona quadrifasciata*. Although this total number of sequences certainly provides only a first glimpse into the general picture of caste transcriptomes, a general feature that is already apparent is a predominance of genes involved in transcriptional regulation and metabolism in the queen ESTs, versus a much broader spectrum of categories in the worker ESTs. The relative high representation of metabolism-related gene expression appears as an emergent feature already present in very young queens, which could be interpreted as priming or preparation of the fat body for the future synthesis of proteins and lipids required for the high rates of egg production in queens of highly social bees (Engels e Engels, 1977). In contrast, the differential gene expression profile of

newly emerged workers exhibits a comparatively high percentage (12 out of 22) of signaling and signal transduction-related transcripts in the putatively annotated *Melipona* ESTs, suggesting that the groundwork for the performance of complex tasks and behavioral shifts observed in *Melipona* workers (Waldschmidt *et al.*, 2002) is being laid down at this stage.

4. Experimental Procedures

4.1. Samples and total RNA extraction

The queen and worker bees were obtained from *Melipona quadrifasciata anthidioides* colonies kept at the Genetics Department, University of São Paulo (Ribeirão Preto campus). Entire brood combs with late pupal stages were removed and maintained in an incubator at 28°C. Queens and workers were sampled 0-12 hours after emergence from the brood cells and were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The bee samples (ten workers and ten queens) were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen) and total RNA was extracted and treated with DNase (RNasefree DNaseI AmpGrade, Invitrogen). RNA purity and integrity were checked spectrophotometrically and by electrophoresis in 1.2% agarose gels under denaturing conditions.

4.2. Induction of queen development by a juvenile hormone (JH) analog

The application of JH and JH analogs to spinning-stage larvae has been shown to efficiently induce queen development in *M. quadrifasciata* (Campos, 1978, Bonetti *et al.*, 1995). In the present study, we induced queen formation by application of the JH analog, pyriproxyfen dissolved in acetone (1mg/ml). One microgram of pyriproxyfen was applied on the cuticle of spinning-stage larvae. Control larvae received an acetone application. After applications, the larvae were kept in an incubator until eclosion.

4.3. Subtractive cDNA libraries

Two subtractive cDNA libraries for newly emerged stages were generated: one representing the genes that are overexpressed in workers when compared to queens (named WO) and the other representing genes overexpressed in queens (QU). The methodology employed was the cDNA representative differential analyses (RDA) (Pastorian *et al.*, 2000). The WO library was established with the cDNA of newly emerged

workers as the tester population hybridized against the cDNA of queens as the driver population. For the QU library, the tester was the queen cDNA and the driver was the worker cDNA.

In brief, one microgram of total RNA isolated from both castes was submitted to reverse transcription and long distance PCR, using the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories). The double-stranded cDNAs (1.5µg) were digested with *Mbo*I (Fermentas), ligated to R-adapters (Table 4) and amplified by PCR. These products showed a length of 0.2-1.5 kbp and were isolated in an exponential PCR cycle to generate the respective cDNA representations. The enrichment of differentially expressed transcripts was achieved in two successive rounds of PCR amplification that employed different adapters (J and N, see Table 4) and subtractive hybridization of tester and driver populations in ratios of 1:100 and 1:800, respectively, as previously described (Hubank e Schatz, 1999). The common transcripts between driver and tester populations were removed through the rounds of subtractive hybridization and the libraries were enriched for differential transcripts. DNA purification was carried out using the GFX PCR purification kit (Amersham Biosciences). The final difference products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). Competent DH10B *E. coli* cells (Invitrogen) were transformed and positive recombinants submitted to plasmid extraction (Ausubel, 1993). Inserts were sequenced using a DYEnamic ET terminator kit (Amersham Biosciences) and MegaBACE sequencer.

4.4. Quality analysis of sequences, assembly and BLAST searches

The ESTs were filtered for ribosomal RNA contaminants and poly (A) tail sequences as previously described (Telles e da Silva, 2001), and the vector sequences were trimmed using the Crossmatch program. The quality of sequences was analyzed by the PHRED program (Ewing e Green, 1998) and sequences with at least 250 high quality bases (Phred>20) were considered as “high-quality”. Searches for contaminant sequences, such as bacterial DNA, were performed using BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) against the non-redundant nucleotide sequences (nt) database at GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). The high quality sequences were submitted to assembly by CAP3 (Huang e Madan, 1999). The assembled sequences were dynamically translated by BLASTX and the deduced polypeptides were compared against the non-redundant database. In addition, we compared the *M. quadrifasciata* sequences with those of the closely related honey bee, *Apis mellifera*, by running them against the translated honey bee EST database (TBLASTX) from a

honey bee brain cDNA library (www.life.uiuc.edu/robinson) and against the honey bee genome database (hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee). We also analyzed the similarity of the respective nucleotide sequences using the BLASTN tool on the GeneBank (nr) and *Apis* databases (ESTs and genomic sequences). Matches were considered significant at a cutoff probability score E-value of 10^{-5} . For the *Melipona* ESTs annotated as “no hits found”, a search for open reading frames was performed using the ORF Finder program (NCBI tool), and ORFs were considered when they covered the majority of the EST sequence (minimum length set to 33 amino acids). Molecular function and biological process assignment was performed with Gene Ontology set at level 3.

4.5. Real-time PCR validation

To validate the caste-specific expression of genes detected by the RDA screen, we selected a set of ESTs that showed similarity to predicted proteins with known function. These were submitted to real-time PCR analyses. The selected ESTs represented genes annotated as fatty acid synthase from the QU library, and as amino acid-polyamine transporter, diacylglycerol kinase, groucho, dunce and paramyosin from the WO library. Gene-specific real-time primers were designed using the “Primer Express” software (Applied Biosystems) and the respective template sequences were from clones of the libraries, except for the 28S rRNA gene. The PCR primer sequences used are listed in Table 4.

For the real-time PCR analysis, new cDNAs were synthesized *de novo* from RNA extracted from newly emerged queens and workers. The extracted total RNA (one microgram) was treated with 10 U DNaseI (Invitrogen) and 40U RNase OUT inhibitor (Invitrogen) upon incubation at 37°C for 30 min to remove contaminating DNA. Reverse transcription was performed using 200 U SuperScript, 10mM dNTP mix, oligo dT and random primers (50ng) and the cDNA synthesis was carried out at 42°C for 2 hours. RNA-cDNA hybrids were dissolved using 5U RNase H and incubated at 37°C for 30 min. Real-time PCR assays were carried out using the cDNA products as templates, in 96-well plates, by incorporation of the intercalating dye SYBRGreenI (kit SYBRGreen PCR master mix- Applied Biosystems) and the ABI Prism 5700 detection system (Applied Biosystems) for fluorescence reading. The amplification protocol used for all genes was: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1min.

As a control for RNA concentration and amplification dynamics we used a 28S rRNA sequence, a frequently used as calibrator gene in real-time PCR studies (Pfaffl *et al.*, 2003). The respective forward and reverse primers were derived from *A. mellifera* and were designed to cover two different exons of the 28S rRNA gene (GenBank accession number: AJ302936). This enabled us to simultaneously detect 28S rRNA and amplification of genomic contaminant, visualized by the different PCR product size. For relative quantification of gene expression, we employed the comparative Ct method (Pfaffl *et al.*, 2003), using the 28S rRNA Ct of the worker sample as a reference.

The gene expression results were statistically analyzed by analysis of variance and differences between means by the Tukey's test (5%, 1% and 0.1%) using the VarPC software.

Table 4. RDA adapters and real-time PCR primer sequences and their respective target genes.

Adapters - RDA	Symbol	Sequence
	R12	5'-GATCTGCGGTGA-3'
	R24	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'
	J12	5'-GATCTGTTCATG-3'
	J24	5'-ACCGACGTGACTATCCATGAACA-3'
	N12	5'-GATCTTCCCTCG-3'
	N24	5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'
Target gene – real-time PCR		
<i>Fatty acid synthase</i>	FASF	5'-GATCGCGGGATTGATACCTACT-3'
	FASR	5'-TCGACGGTAACAAAAGTCAAGGA-3'
<i>Dunce</i>	DunF	5'-AGCCGACCTGCGACTTCTC-3'
	DunR	5'-ACATGGACATTAGCCCAATGTG-3'
<i>Groucho</i>	GrouF	5'-CGGCGGACGGTTCGA-3'
	GrouR	5'-GATCCCACGAACGCACTGT-3'
<i>Paramyosin</i>	PmyosF	5'-ATCCGAGGGAAGATCCAGGTA-3'
	PmyosR	5'-TGCCTCTTGTAGATGCTCATTTTC-3'
<i>Amino acid-polyamine transporter</i>	AmitranspF	5'-AGGGAAGATCCCGTCAAGAA-3'
	AmitranspR	5'-GGGTCGTGTAATAATGCCATGT-3'
<i>Diacylglycerol kinase</i>	DGKF	5'-CTTCGTATCGATGCCAGCAA-3'
	DGKR	5'-TTTTGTTGTTTCGTCAATCCGTTT-3'
<i>28S rRNA</i>	r28SF	5'-ACGGTACTCGCACGGTATCG-3'
	r28SR	5'-CACTTTCATTTTCGCCTTTAGGTTT-3'

5. References

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-95.
- Alberola, T. M. and de Frutos, R. (1996) Molecular structure of a gypsy element of *Drosophila subobscura* (gypsyDs) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res* **24**: 914-23.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Guidugli, K. R., Norberg, K. and Omholt, S. W. (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA. *BioMed Central Biotechnology* **3**:1: 8 pages, available online: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/1>.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA.
- Barolo, S. and Levine, M. (1997) hairy mediates dominant repression in the *Drosophila* embryo. *Embo J* **16**: 2883-91.
- Bennett, M. K., Lopez, J. M., Sanchez, H. B. and Osborne, T. F. (1995) Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J Biol Chem* **270**: 25578-83.
- Beye, M., Hartel, S., Hagen, A., Hasselmann, M. and Omholt, S. W. (2002) Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol Biol* **11**: 527-32.
- Bicker, G. (2001) Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroïd insect. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**: 100-10.
- Bonetti, A. M., Kerr, W. E. and Matusita, S. H. (1995) Effects of juvenile hormones I, II and III, in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Rev. Bras. Biol.* **55 Suppl 1**: 113-20.
- Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E. M. and Davis, R. L. (1997) Leonardo, a *Drosophila* 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron* **19**: 391-402.
- Camargo, J. M. F. and Pedro, S. R. M. (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* **23**: 509-522.
- Campos, L. A. O. (1978) Sex determination in bees. VI: effect of a juvenile hormone analog in males and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* **51**: 228-234.
- Campos, L. A. O., Kerr, W. E. and Silva, D. L. N. (1979) Sex determination in bees. VIII. Relative action of genes xa and xb on sex determination in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Genética* **2**: 267-280.
- Campos, L. A. O., Velthuis, H. H. W. and Velthuis-Kluppel, F. M. (1975) Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften* **62**: 98-99.
- Courey, A. J. and Jia, S. (2001) Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* **15**: 2786-96.
- Davis, R. L. and Dauwalder, B. (1991) The *Drosophila dunce* locus: learning and memory genes in the fly. *Trends Genet* **7**: 224-9.
- Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A. and Berger, E. M. (2002) Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1555-65.
- Engel, M. S. (2001) A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bull. Amer. Mus.Nat. Hist.* **259**: 5-192.

- Engels, W. and Engels, E. (1977) Vitellogenin und Fertilität bei stachellosen Bienen. *Insectes Sociaux* **24**: 71-94.
- Engels, W. and Imperatriz-Fonseca, V. L. (1990) Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In *Social Insects - an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*. (Ed, Engels, W.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 168-230.
- Evans, J. D. and Wheeler, D. E. (2000) Expression profiles during honeybee caste development. *Genome Biol.* **2**: 2.1: 6 pages, available online [http:// genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1](http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1).
- Evans, J. D. and Wheeler, D. E. (2001) Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays* **23**: 62-68.
- Ewing, B. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**: 186-94.
- Fraser, V. S., Kaufmann, B., P., O. B. and Crozier, R. H. (2000) Genetic influence on caste in the ant *Camponotus consobrinus*. *Behav Ecol Sociobiol* **47**: 188-194.
- Funada, M., Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., Sasagawa, H., Kitagawa, Y. and Kadowaki, T. (2004) Characterization of the two distinct subtypes of metabotropic glutamate receptors from honeybee, *Apis mellifera*. *Neurosci Lett* **359**: 190-4.
- Greenbaum, E. and Carr, J. L. (2001) Sexual differentiation in the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*), a species with genetic sex determination. *J Exp Zool* **290**: 190-200.
- Grozinger, C. M., Sharabash, N. M., Whitfield, C. W. and Robinson, G. E. (2003) Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100 Suppl 2**: 14519-14525.
- Guidugli, K., C., H. 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 L.*) caste development. *Apidologie* **35**: 37-47.
- Hartfelder, K. and Emlen, D. G. (2004) Endocrine Control of Insect Polyphenism. In *Comprehensive Molecular Insect Science*. (Eds, Gilbert, L. I., Iatrou, K. and Gill, S.), Vol. 3 Endocrinology, pp. 651-704.
- Hartfelder, K. and Rembold, H. (1991) Caste-specific modulation of juvenile hormone-III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J. Comp. Physiol. B* **160**: 617-620.
- Hepperle, C. and Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* **88**: 113-6.
- Holscher, C. (1999) Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J Neurosci Res* **58**: 62-75.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W. H., Rusch, D. B., Lai, Z., Kraft, C. L., Abril, J. F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chaturverdi, K., Christophides, G. K., Chrystal, M. A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C. A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M. E., Hladun, S. L., Hogan, J. R., Hong, Y. S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J. J., Lobo, N. F., Lopez, J. R., Malek, J. A., McIntosh, T. C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S. D., O'Brochta, D. A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M. A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M. V., Sitter, C. D., Shetty, J., Smith, T. J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L. Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M. F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K. J., Wortman, J. R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E. M., Zhang, H., Zhao, Q., et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 129-149.
- Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**: 868-77.
- Hubank, M. and Schatz, D. G. (1999) cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods Enzymol* **303**: 325-49.
- Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. and Inoue, K. (2000) Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6538-43.

- Judice, C., Hartfelder, K. and Pereira, G. A. G. (2004) Caste-specific gene expression profile in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* - are there common patterns in highly eusocial bees? *Insectes Sociaux* **51**: 352-358.
- Julian, G. E., Fewell, J. H., Gadau, J., Johnson, R. A. and Larrabee, D. (2002) Genetic determination of the queen caste in an ant hybrid zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8157-60.
- Kadmas, J. L. and Beckerle, M. C. (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 920-31.
- Kanoh, H., Yamada, K. and Sakane, F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J Biochem (Tokyo)* **131**: 629-33.
- Kerr, W. E. (1950) Evolution of the mechanism of caste determination in the genus *Melipona*. *Evolution* **4**: 7-13.
- Kerr, W. E., Akahira, Y. and Camargo, C. A. (1975) Sex determination in bees. IV. Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics* **81**: 749-56.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Tear, G. (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**: 205-15.
- Kucharski, R. and Maleszka, R. (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0007.
- Lee, H. and Adler, P. N. (2004) The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **121**: 37-49.
- Michener, C. D. (2000) *The Bees of the World*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H., Yasukochi, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Ajimura, M., Ravikumar, G., Shimomura, M., Nagamura, Y., Shin, I. T., Abe, H., Shimada, T., Morishita, S. and Sasaki, T. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* **11**: 27-35.
- Nunes, F. M., Valente, V., Sousa, J. F., Cunha, M. A., Pinheiro, D. G., Maia, R. M., Araujo, D. D., Costa, M. C., Martins, W. K., Carvalho, A. F., Monesi, N., Nascimento, A. M., Peixoto, P. M., Silva, M. F., Ramos, R. G., Reis, L. F., Dias-Neto, E., Souza, S. J., Simpson, A. J., Zago, M. A., Soares, A. E., Bitondi, M. M., Espreafico, E. M., Espindola, F. S., Paco-Larson, M. L., Simoes, Z. L., Hartfelder, K. and Silva, W. A., Jr. (2004) The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. *BMC Genomics* **5**: 84.
- Ott, S. R., Delago, A. and Elphick, M. R. (2004) An evolutionarily conserved mechanism for sensitization of soluble guanylyl cyclase reveals extensive nitric oxide-mediated upregulation of cyclic GMP in insect brain. *Eur J Neurosci* **20**: 1231-44.
- Pastorian, K., Hawel, L., 3rd and Byus, C. V. (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem* **283**: 89-98.
- Pfaffl, M. W., Gerstmayer, B., Bosio, A. and Windisch, W. (2003) Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats: monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real-time RT-PCR. *J Nutr Biochem* **14**: 691-702.
- Pinto, L. Z., Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G. and Simões, Z. L. P. (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.* **48**: 783-790.
- Rachinsky, A., Zhang, J. and Tobe, S. S. (1994) Signal transduction in the inhibition of juvenile hormone biosynthesis by allatostatins: roles of diacylglycerol and calcium. *Mol Cell Endocrinol* **105**: 89-96.
- Robinson, G. E. and Ben-Shahar, Y. (2002) Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? *Genes Brain Behav* **1**: 197-203.
- Sawata, M., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2004) Identification and analysis of the minimal promoter activity of a novel noncoding nuclear RNA gene, AncR-1, from the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Rna* **10**: 1047-58.
- Sawata, M., Yoshino, D., Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Ohashi, K. and Kubo, T. (2002) Identification and punctate nuclear localization of a novel noncoding RNA, Ks-1, from the honeybee brain. *Rna* **8**: 772-85.
- Shankar, R., Grover, D., Brahmachari, S. K. and Mukerji, M. (2004) Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements. *BMC Evol Biol* **4**: 37.

- Swanson, K. D. and Ganguly, R. (1992) Characterization of a *Drosophila melanogaster* gene similar to the mammalian genes encoding the tyrosine/tryptophan hydroxylase activator and protein kinase C inhibitor proteins. *Gene* **113**: 183-90.
- Takeuchi, H., Fujiyuki, T., Shirai, K., Matsuo, Y., Kamikouchi, A., Fujinawa, Y., Kato, A., Tsujimoto, A. and Kubo, T. (2002) Identification of genes expressed preferentially in the honeybee mushroom bodies by combination of differential display and cDNA microarray. *FEBS Lett.* **513**: 230-234.
- Telles, G. P. and da Silva, F. R. (2001) Trimming and clustering sugarcane ESTs. *Genetics and Molecular Biology* **24**: 17-23.
- Terman, J. R., Mao, T., Pasterkamp, R. J., Yu, H. H. and Kolodkin, A. L. (2002) MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**: 887-900.
- Tian, S. S., Tsoulfas, P. and Zinn, K. (1991) Three receptor-linked protein-tyrosine phosphatases are selectively expressed on central nervous system axons in the *Drosophila* embryo. *Cell* **67**: 675-80.
- Tinette, S., Zhang, L. and Robichon, A. (2004) Cooperation between *Drosophila* flies in searching behavior. *Genes Brain Behav* **3**: 39-50.
- Tsuchimoto, M., Aoki, M., Takada, M., Kanou, Y., Sasagawa, H., Kitagawa, Y. and Kadowaki, T. (2004) The changes of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zoolog Sci* **21**: 23-8.
- Velthuis, H. H. W. (1976) Environmental, genetic and endocrine influences in stingless bee caste determination. In *Phase and caste determination*. (Ed, M., L.), Pergamon Press, Oxford, pp. 35-53.
- Volny, V. P. and Gordon, D. M. (2002) Genetic basis for queen-worker dimorphism in a social insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6108-11.
- Waldschmidt, A. M., Marco-Junior, P., Barros, E. G. and Campos, L. A. (2002) Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. *Braz J Biol* **62**: 923-8.
- Whitfield, C. W., Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C. G., Liu, L., Pardinas, J., Robertson, H. M., Soares, B. and Robinson, G. E. (2002) Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behaviour in the honey bee. *Genome Res.* **12**: 555-566.
- Whitfield, C. W., Cziko, A. M. and Robinson, G. E. (2003) Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* **302**: 296-299.
- Wilson, E. O. (1971) *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Winter, U. and Buschinger, A. (1986) Genetically mediated queen polymorphism and caste determination in the slave-making ant, *Harpagoxenus sublaevis* (Hymenoptera: Formicidae). *Entom. Gener.* **11**: 125-137.

CAPÍTULO 3

Resultados complementares:

3.1. Identificação e análise da expressão do gene *lilliputian*.

3.2. Banco de dados sobre expressão gênica em *M. quadrifasciata*.

3.3. Resultados preliminares de microarrays.

3.1. Identificação e análise da expressão do gene *lilliputian*

Durante os ensaios de differential display (conforme metodologia descrita no Capítulo 1) foi isolado uma EST com baixa similaridade a um fator repressor de regulação transcricional, *SIR1* (silent information regulator) de *Saccharomyces cerevisiae*. Devido ao baixo “score” de similaridade, as investigações com essa EST foram descartadas.

Porém, a ação de silenciadores em diversos organismos despertou interesse por uma possível relação destes fatores de transcrição aos processos de envelhecimento e diferenciação em fêmeas de abelhas. Dentro destes, o mais conservado em diversos organismos refere-se ao *SIR2*. A proteína Sir2 desempenha papel essencial no silenciamento da transcrição em locos de determinação sexual, no DNA ribossomal e em telômeros de leveduras. Ainda, tem se descrito sua ação no reparo da quebra do DNA fita dupla, regulação do ciclo celular e desacetilação de histonas (Shore, 2000, Yang *et al.*, 2000). Através da comparação de seqüências dos mais diversos organismos, obtidas no GeneBank, incluindo leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), protozoários (*Leishmania sp.*), insetos (*Drosophila melanogaster*), camundongos e humanos entre outros; foram encontrados alguns domínios bem conservados. Estas regiões serviram como molde para o desenho de primers degenerados para *SIR2* (Tabela 1), que foram empregados na detecção deste gene em meliponídeos.

A amplificação de um possível *Sir2* foi feita através de uma RT-PCR, sendo o RNA total extraído de rainhas e operárias recém nascidas usado como molde. Para a PCR foram utilizados oligonucleotídeos degenerados (forward: 5'-TAYACNCARAAYWWHGA-3'; reverse: 5'-TTDWWN ARNACYTGNGGNAC-3'). As condições de transcrição reversa e PCR seguiram de acordo com o que foi descrito no Capítulo 1.

Interessantemente, a amplificação de um potencial gene similar ao *SIR2* foi observada apenas para a amostra de operária, sendo que nenhuma amplificação foi detectada em rainha. Esse

produto de PCR gerado em operária foi então isolado, clonado e seqüenciado. Busca por similaridade empregando-se o BLASTX resultou em um segmento de 320pb com alta similaridade (6e-12) ao gene *lilliputian*, recentemente descrito em *Drosophila melanogaster*.

Com a finalidade de se confirmar a expressão diferencial de *lilliputian* entre rainhas e operárias foi feito novamente uma RT-PCR, que mostrou maior amplificação desta seqüência em operárias e para confirmar se as bandas observadas realmente correspondiam à seqüência homóloga ao gene, o gel foi usado para um Southern blot e posterior hibridização (Fig.1).

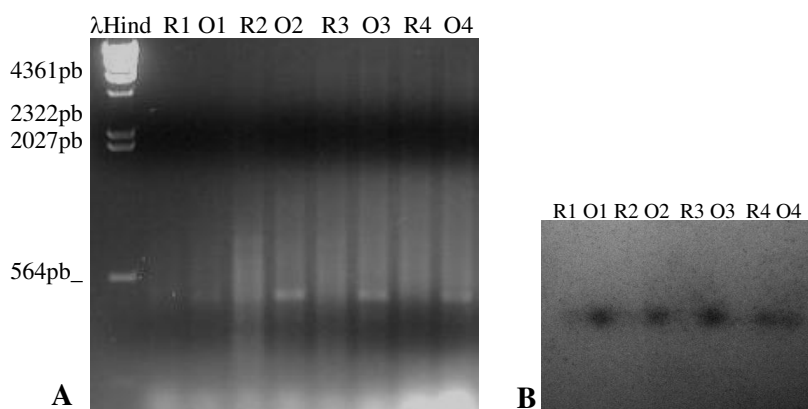
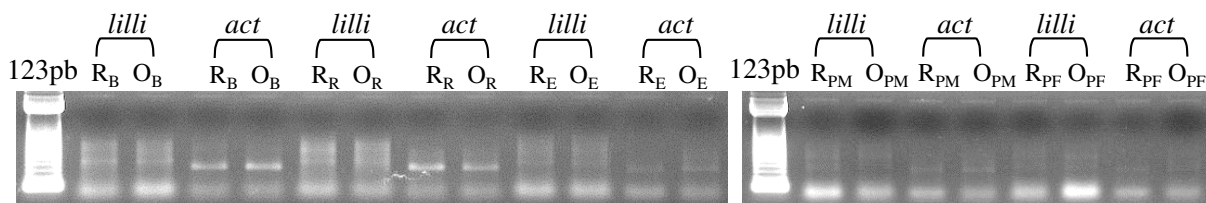


Figura 1. Confirmação por RT-PCR (A) e Southern blot (B) da expressão diferencial de *lilliputian* entre operárias (O) e rainhas (R). Moldes para a PCR foram cDNAs únicos de rainha e operária, variando-se a sua quantidade: 1 (0.1µl); 2 (1 µl); 3 (2 µl) e 4 (4 µl). A normalização das amostras foi feita através da quantificação por espectrometria dos cDNAs usados como molde nas reações.

Como este gene foi detectado com expressão diferenciada entre rainha e operária na fase de recém nascido, partiu-se então para uma investigação de seu padrão de expressão em outras fases do desenvolvimento de *Melipona*; empregando se oligonucleotídeos específicos (forward: 5'-CTTGAACATAGTAAACGACG-3'; reverse: 5'-AATAGCACTTGGTGGACC-3'). As fases avaliadas foram de pupas de corpo branco de olho branco, olho rosa, olho preto e pupas com pigmentação corporal média e forte.

Para que a análise da expressão pudesse ser quantitativa, foi realizada em paralelo às amplificações de *lilliputian*, PCR para o gene da actina. Este gene tem sido descrito como normalizador para ensaios de RT-PCR em abelhas (Kamikouchi *et al.*, 1998). Ainda, a amplificação

de actina permite um controle do comportamento dos cDNAs em relação às reações enzimáticas. Para tal foram empregados oligos específicos desenhados com base na seqüência de actina de *Apis* (forward: 5'-TGCTGCATCATCCTCAAG-3'; reverse: 5'-ACATCTGTTGGAAGGTGG-3'), seguindo-se as mesmas condições de PCR estabelecidas para *lilliputian*, uma vez que os oligos apresentavam



temperatura de acoplamento semelhante (Fig.2).

Figura 2. Amplificações com oligonucleotídeos específicos para *lilliputian* e *actina* para rainhas e operárias (R e O, respectivamente) nas fases pupais de olho branco (B), olho rosa (R), olho escuro (E), de pigmentação corporal média (PM) e forte (PF). As amostras de rainha e operária foram dispostas de modo intercalado (primeiro rainha-R e, em seguida, a operária-O).

Como resultado, amplificações para actina apresentaram resultados satisfatórios para as fases de pupas de olho branco, rosa e preto, já as pupas pigmentadas mostraram fraca amplificação para actina, o que pode ter sido gerado pela interferência de pigmentos na PCR. A amplificação para actina entre rainha e operária de mesma fase se mostrou bastante similar. Quanto a *lilliputian*, a amplificação, quando ocorreu, foi muito fraca. É importante colocar aqui que mesmo nas amostras em que a actina foi bem amplificada, a detecção para *lilliputian* mostrou bandas de baixa intensidade e nitidez.

Buscando aprimorar a amplificação deste gene foi empregada a estratégia de nested PCR (Kim *et al.*, 2001, Meerbach *et al.*, 2001). Inicialmente, os cDNAs foram amplificados com os oligos degenerados e o produto desta PCR foi usado como molde para uma segunda amplificação, agora com os oligos específicos. Deste modo, a amplificação foi obtida em rainhas e operárias de todas as fases pupais analisadas, mesmo para as pupas pigmentadas que mostraram baixa amplificação de actina (Fig.3).

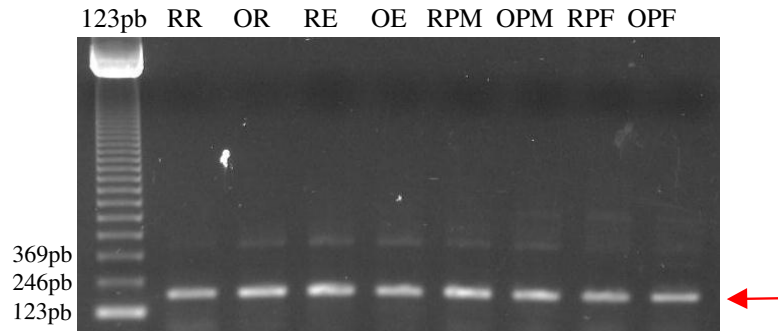


Figura 3. Resultado gerado pela PCR nested. Foi possível observar amplificação de *lilliputian* em rainhas (R) e operárias (O) de todas as fases avaliadas (seta): pupas de olho rosa (R), olho escuro (E), de pigmentação corporal média (PM) e forte (PF).

O produto de PCR obtido mostrou o tamanho esperado para amplificação a partir dos oligos específicos. Para checar se o produto amplificado correspondia realmente a um fragmento do gene em estudo, um novo seqüenciamento foi realizado. A seqüência obtida foi submetida ao BLASTX e resultou em identidade ($2e-04$) com o gene *lilliputian* de *D.melanogaster*, como esperado.

A metodologia foi então empregada para verificar a expressão tecido-específica em operárias recém nascidas. Os tecidos escolhidos consistiam em ovários (visando estabelecer uma relação entre infertilidade de operárias com alterações na identidade e crescimento celular gerado por este gene quando mutado ou super-expresso, como visto em *D. melanogaster*), lóbulos ópticos e cérebro (ação do gene nestes tecidos identificada em *D. melanogaster*), corpo gorduroso e corpo gorduroso não dorsal (tecidos que respondem a estímulos hormonais em insetos).

Trabalhou-se apenas com tecidos de operárias porque havia a necessidade de se padronizar a técnica de extração de RNA a partir de uma quantidade reduzida de amostra e avaliar seu rendimento. Ainda, a fase recém nascida foi escolhida devido a facilidade em se coletar os tecidos, bem definidos neste período. Quanto à extração de RNA, o rendimento foi muito baixo, de modo que todo o RNA recuperado foi usado para a transcrição reversa. A partir dos cDNAs gerados foi feita amplificação para actina, o qual resultou em bandas de fraca intensidade, mostrando a necessidade de aumentar a quantidade de cDNA molde para a PCR (decorrente da diminuta quantidade RNA total presente nas amostras) e, conseqüentemente, também do uso de maior

número de indivíduos para compor as amostras de tecido. Em paralelo, testou-se a amplificação de *lilliputian* com a técnica do nested PCR, que permitiu sua identificação em ovários, cérebro e corpos gordurosos de *Melipona* (Fig.4).

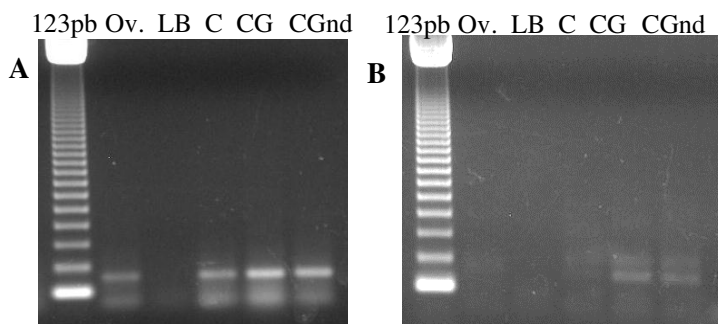


Figura 4. Análise da expressão tecido-específica gerada por PCR nested (A) e por amplificação direta com os oligos específicos de *lilliputian* (B). Tecidos: ovários (Ov), lóbulos ópticos (LB), cérebro (C), corpo gorduroso (CG) e corpo gorduroso não dorsal (CGnd).

A amplificação nos lóbulos ópticos também era esperada, uma vez que este gene atua no desenvolvimento dos olhos de *Drosophila* (Wittwer *et al.*, 2001). Provavelmente as reações enzimáticas foram inibidas pela presença de pigmento presente em grande quantidade neste tecido, que estaria atuando como quelante enzimático. Este pigmento nos olhos (independente da fase) e nas fases de pigmentação corporal média e forte encontra-se livre na cutícula do exoesqueleto, uma vez que ela ainda não está esclerotizada. Esta característica pode explicar a ausência de amplificação de *lilliputian* nestas amostras, mostrando que a detecção não é alcançada devido à baixo nível ou ausência de expressão, mas sim pela ação quelante deste pigmento. Quando feita a PCR nos tecidos usando oligos específicos foi observado produto de amplificação nos corpos gordurosos, indicando que havia baixa quantidade de cDNA molde para os demais tecidos; os corpos gordurosos foram os tecidos que apresentaram melhor rendimento na extração de RNA. Este dado também reforçou a idéia de que o nested PCR gera fortes sinais de amplificação mesmo partindo de um baixo número de cópias como molde.

Embora a técnica do nested PCR tenha permitido identificar *lilliputian* em pupas de rainha e operária e nos tecidos de operária recém nascida, ela não permitiu uma análise quantitativa da expressão, aparentemente a expressão deste gene foi a mesma tanto para rainha quanto operária nas fases de pupas. Pode ser que nessas fases este gene esteja sendo expresso sem diferenças nas duas castas. Porém, com o nested, pode-se ter gerado saturação durante as amplificações, o que estaria inviabilizando a detecção da expressão diferenciada. Ainda, pode ser que realmente não haja a expressão diferencial nas fases pupais e que o nested esteja gerando uma alta amplificação de *lilliputian* mesmo a partir de um número muito pequeno de cópias. Isto porque amplificação com os oligos degenerados gerou fragmentos de baixa intensidade. Esta amplificação foi repetida três vezes para este material de pupas, gerando o mesmo resultado.

A nested PCR foi testada também para cDNAs de rainha e operária recém nascidas a fim de avaliar o padrão de amplificação. Ainda amplificações para *actina* e *lilliputian* foram realizadas (Fig.5).

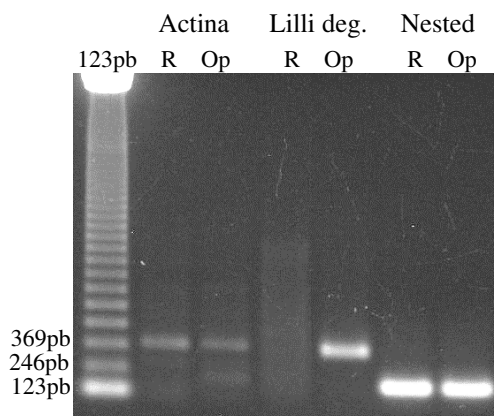


Figura 5. Análise comparativa das metodologias de amplificação de *lilliputian* em rainhas (R) e operárias (O) recém nascidas. Controle: amplificação de actina. Lilli deg: PCR usando apenas os oligos degenerados; Nested: oligos degenerados e específicos.

Pode-se observar boa amplificação para actina tanto em rainha quanto operária, estando um pouco mais fraca em operária (indicando menor quantidade de cDNA). Quanto a *lilliputian*, viu-se expressão diferencial quando se usou os oligos degenerados (reproduzindo o resultado inicial em

recém nascido); e para a nested PCR foi observada amplificação igual para rainha e operária. Este resultado da nested PCR quando comparado ao resultado gerado na amplificação com os degenerados, pode estar reforçando a idéia de que mesmo em quantidade mínimas, *lilliputian* acaba sendo fortemente amplificado; o que pode ter gerado a amplificação nas fases de pupa analisadas. Assim, é possível afirmar que há expressão diferenciada de *lilliputian* em rainhas e operárias recém nascidas e que este gene é também expresso nas fases pupais e em tecidos, como o ovariano, cerebral e de corpos gordurosos, sem, porém se inferir uma análise quantitativa.

Este gene em *D. melanogaster* foi identificado e caracterizado como uma proteína nuclear relacionada à família de fatores de transcrição FMR2 e AF4 de mamíferos (Gecz *et al.*, 1997). Foi descrito que mutações de *lilliputian*, em células ópticas, suprimem a excessiva diferenciação neuronal em resposta a um estímulo constitutivo. No tipo selvagem, este gene apresenta um papel redundante na via de sinalização Ras/MAPK na diferenciação, mas é essencial para o crescimento celular normal. A sua perda de função ocasiona uma redução no tamanho celular e parcialmente suprime o crescimento associado com a perda de função do gene *PTEN*. Os autores deste estudo sugerem que *lilliputian* atua em paralelo com as vias Ras/MAPK e PI3K/PKB no controle da identidade celular e no crescimento celular (Wittwer *et al.*, 2001). Ainda na via Dpp, *lilliputian* seria um ativador transcricional, suprido maternalmente, de *Dpp* durante a padronização dorso-ventral. Alternativamente, *lilliputian* poderia participar de uma via de sinalização em paralelo à via Dpp que também é necessária para a expressão de genes alvo de *Dpp* (Su *et al.*, 2001). Foi descrito também que embriões com ausência da expressão apresentam defeitos no estabelecimento de um citoesqueleto funcional durante a celularização, um fenótipo correlacionado aos de genes zigóticos essenciais para a celularização e a segmentação embriônica, indicando que *lilliputian* representa um novo gene “pair rule” atuando na regulação do citoesqueleto, segmentação e na morfogênese (Tang *et al.*, 2001).

Assim, a ação de *lilliputian* no desenvolvimento de *Drosophila* mostra uma importância muito relevante deste fator nos processos de transcrição e sinalização ao longo da diferenciação.

Estes dados chamam a atenção para o estudo deste gene em organismos onde os processos de diferenciação são essenciais para a presença de formas alternativas, como as formas rainha e operária em abelhas.

Apesar da clara expressão diferencial de *lilliputian* inicialmente encontrada em recém nascidas, este resultado não foi reprodutivo quando a análise da expressão foi estendida para outras amostras de indivíduos desta mesma fase de desenvolvimento.

3.2. Banco de dados sobre expressão gênica em *M. quadrifasciata*

Para otimizar a análise computacional das seqüências geradas (ESTs provenientes dos ensaios de differential display PCR e das bibliotecas subtrativas) e permitir que as informações obtidas a partir destes dados pudessem ser acessadas por demais grupos de pesquisa, foi criado um banco de dados vinculado ao nosso laboratório de bioinformática (www.lge.ibi.unicamp.br).

As ESTs geradas foram identificadas de acordo com a biblioteca à qual pertenciam, isto é, continham na sua nomenclatura a sigla OPI quando referentes a genes induzidos isolados a partir de operária e RAI, quando referentes aos genes induzidos em rainha. Ainda, na nomenclatura das amostras constaram a placa e a posição na placa que ocupavam. Assim, a amostra denominada OPI-001-A01 representa a seqüência de um gene induzido em operária, localizado na placa número 001, ocupando a posição A01.

As seqüências geradas foram submetidas à análise de qualidade de bases pelo programa PHRED (Ewing e Green, 1998), que avalia os cromatogramas e gera um valor de probabilidade de erro para cada base seqüenciada. Assim, cada seqüência ou “read” recebeu um valor de qualidade abaixo ou acima de 20 (seqüências com valor acima ou igual a 20 foram consideradas como portadoras de qualidade boa). Os reads, com suas qualidades fornecidas pelo PHRED, foram organizados e trabalhados através do programa Gene Projects, que foi desenvolvido pelo mestrando Marcelo F. Cazarolle em conjunto aos demais membros do grupo de bioinformática do laboratório LGE (Software Gene Projects: Carazzolle, M.; Araújo, M. R. R.; Formighieri, E. F.; Digiampietri, L.; Pereira, G. A. G. Protocolo no INPI em 09.01.2004, no. 0057290).

Os valores de qualidade de bases produzidos pelo PHRED foram usados por um “script” de trimagem de seqüências similares a vetores de clonagem, poli-A, poli-T e seqüências contaminantes, como provenientes de *E. coli* (Telles e da Silva, 2001). Em seguida, os reads (seqüências) foram utilizados na construção de alinhamentos múltiplos e geração de seqüências

consenso, através dos programas PHRAP (Green, 1996) ou CAP3 (Huang e Madan, 1999). Assim, os reads deram origem a contigs (seqüência consenso formada por reads sobrepostos) e singlets (seqüências únicas, para as quais não se encontrou sobreposição aos demais reads das bibliotecas). A comparação entre contigs e singlets formados por PHRAP e CAP3 neste estudo, mostrou que os contigs formados por PHRAP apresentam maior número de seqüências com um alinhamento falho, ou seja, foi possível observar seqüências que não se encaixavam exatamente na sobreposição dos reads que compunham o contig. Com a adoção de CAP3 todos os contigs se mostraram compostos por seqüências com alta sobreposição. Outro ponto observado durante o processo de anotação foi o de que o número de seqüências que apresentaram similaridade a ESTs de *Apis* foi maior quando os dados foram tratados com CAP3. Devido ao emprego de CAP para alinhamento e agrupamento de ESTs (Kalyanaraman *et al.*, 2003, Prosdocimi *et al.*, 2002, Whitfield *et al.*, 2002) e, principalmente, à menor taxa de erros no momento da formação da seqüência consenso, este estudo adotou o programa CAP3 como o mais adequado para suas análises.

As seqüências de contigs e singlets foram submetidas à buscas por similaridades através da comparação direta de nucleotídeos (BLASTN) ou comparação após tradução dinâmica (BLASTX e TBLASTX) contra os bancos de dados “non-redundant” (NR). Ainda, as seqüências de *M. quadrifasciata* foram comparadas com seqüências de *A. mellifera* presentes no banco de ESTs (usando TBLASTX) vindas de uma biblioteca de cDNA de cérebro de operárias (www.life.uiuc.edu/robinson) e no banco de seqüências genômicas (hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee; versão 1.2; NHGRI/USDA). Em seguida, os reads foram anotados utilizando os dados fornecidos pelas buscas por similaridade e também através da anotação automática do programa Gene Ontology (www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi). Um esquema das etapas acima descritas encontra-se abaixo (Fig. 1).

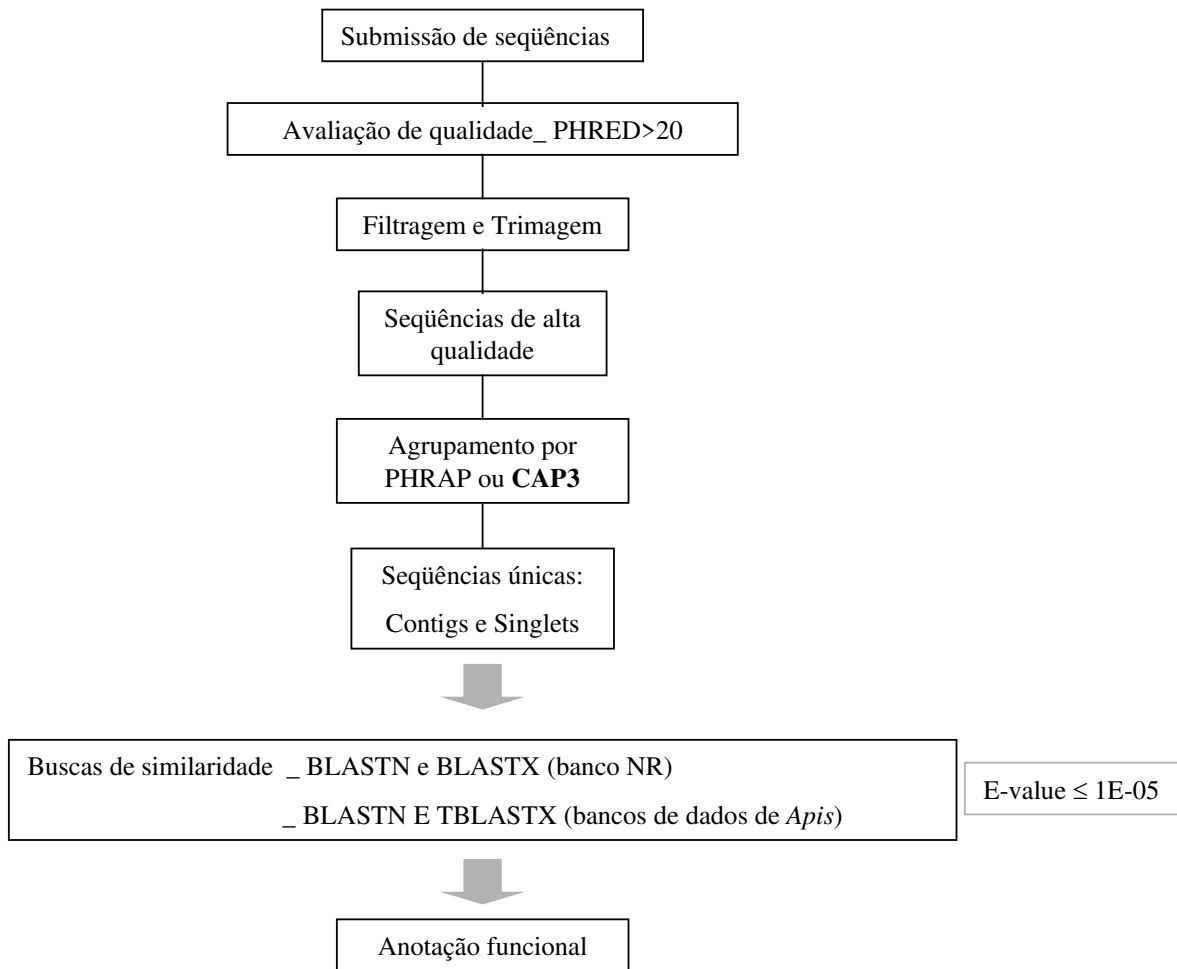


Figura 1. Fluxograma representando etapas de submissão e tratamento das seqüências.

Uma análise computacional que permite inferir a expressão dos genes representados pelos contigs foi feita através da ferramenta “Northern eletrônico”. Como dito anteriormente, cada contig é composto por seqüências vindas exclusivamente de uma única biblioteca ou de ambas as bibliotecas (rainha e operária). Supondo que o ContigX seja composto por 20 seqüências da biblioteca A e 10 da biblioteca B, poderia se dizer que o gene representado teria seu nível de expressão duplicado na biblioteca A em relação a B. Porém, o número total de seqüências que

compõe cada biblioteca deve ser considerado, de forma que haja uma normalização do número de seqüências presentes em cada contig em relação ao numero total de seqüências de sua biblioteca de origem. Voltando ao exemplo, considerando que, no total, a biblioteca A tem 1000 seqüências e a B apresenta 500, então, o ContigX seria composto por 50% ($20/1000 = 0.02$) de seqüências vindas de A e 50% ($10/500 = 0.02$) de B. portanto, o nível de expressão deste gene seria igual nas duas condições testadas (A e B). A normalização e comparação entre as condições é feita pelo “Northern eletrônico”.

Ainda, a página dispõe dos serviços que permitem download de seqüências, buscas por palavra-chave, buscas por similaridade (utilizando os programas BLASTN, BLASTX e TBLASTX contra os bancos do NCBI, ESTs e genoma de *Apis* e ESTs de *Melipona quadrifasciata*), submissão de novas seqüências e uso do programa Gene Projects. O usuário da página pode, assim, comparar os seus dados aos dados de *Melipona* e criar análises independentes usando ferramentas empregadas e desenvolvidas também neste projeto de doutorado. A figura 2 mostra a página inicial do nosso site (www.lge.ibi.unicamp.br/abelha), apresentando os serviços e ferramentas (Fig. 2A), assim como a disposição das seqüências de acordo com a anotação por CAP3 (Fig. 2B) e de acordo com o “northern eletrônico” (Fig. 2C). A maioria das ferramentas empregadas e os “scripts” para automação dos serviços foram desenvolvidos pelo grupo de bioinformática do LGE, composto pelos alunos: Marcos Renato Araújo, Marcelo Falsarella Carazzolle, Eduardo Formighiere e Diego Cursi.

Os pesquisadores interessados em consultar estes dados adquirem um login e senha junto ao webmaster do laboratório LGE. Com esse cadastro, os serviços disponíveis na página tornam-se acessíveis.

A


LGE GENÔMICA E EXPRESSÃO **Expressão Gênica em Abelha**

Gene Projects Serviços Grupo Sobre a Abelha Links Contato

Principal
 Submissão
 Gene Projects
 Anotação Phrap
 Anotação CAP3
 Northern eletrônico
 Blast
 Busca
 Links
 Download
 EMBOS\$
 Relatório de Erro
 Programas
 Suporte

“Identificação e análise de genes diferencialmente expressos nas castas de rainha e operária de *Melipona quadrifasciata*”

No projeto em andamento procuramos estabelecer uma análise comparativa entre rainhas e operárias recém emergidas da abelha sem ferrão *M. quadrifasciata*, estágio que representa o final do desenvolvimento pós-embrionário e início do desempenho de tarefas casta-específicas. O enfoque da análise é comparação do transcriptoma das castas femininas. Um *screening* inicial têm sido feito na fase recém emergida e genes de interesse maior serão empregados em estudo de expressão nas fases de pupa, analisando-se o comportamento dos genes ao longo do desenvolvimento e como se diferenciam entre rainhas e operárias. Para o *screening* de genes diferencialmente expressos, estão sendo empregadas técnicas como differential display RT-PCR, bibliotecas subtrativas de cDNA e microarrays.



Melipona quadrifasciata (manducaia)

Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas

B

KEYWORD: **BUSCAR EM MQ** (MO AVANÇADO)

Lista das sementes.

Semente	Criada em	Atualizada em	Criador	Anotador	Cluster	Reads	Prog/db	First hit	E-value	Bases	Qual*
Contig23	01/06/2004	01/06/2004	abelha	indefinido	0	2	Blastn/NR	gi 24639488 ref NP_226857.1 CG32498-PE Drosophila melanogaster	1e-39	356	71 %
							Blastn/NT	gi 21430657 gb AY119147.1 Drosophila melanogaster RE53611 full insert cDNA	9e-16		
							Blastn/EST	No hits found			
							TBlastn/EST	gi 45754021 gb CK629546.1 CK629546.AMD.AA0018-251102-021.H01.AA0018 Apis mellifera cDNA, mRNA sequence	3e-12		
							Blastn/GENOMICO	gn Amel_1.1 Contig4264 [tech=wgs] [organism=Apis mellifera] [strain=DH4]	4e-80		
							TBlastn/GENOMICO	gn Amel_1.1 Contig4264 [tech=wgs] [organism=Apis mellifera] [strain=DH4]	5e-52		

C **Northern Eletrônico**

Legenda: ■ Entrada automática
■ Entrada manual

[Busca Avançada](#)

[Download \(colunas separadas por ponto e virgula\)](#)

Contigs	Bibliotecas			Gene	Componente Celular	Processo Biológico	Função Molecular
Nome:	OPI (%)	RAI (%)	TOTAL	Gene	Componente Celular	Processo Biológico	Função Molecular
Contig119	3.35	96.64	235	No hits found	nao definido	nao definido	nao definido
Contig106	98.07	1.92	73	No hits found	nao definido	nao definido	nao definido
Contig114	1.97	98.02	72	No hits found	nao definido	nao definido	nao definido
Contig139	2.45	97.54	58	No hits found	nao definido	nao definido	nao definido
Contig17	100	0	48	gi 31242079 ref XP_321470.1 ENSANGP00000017402 [Anopheles gambiae]	GO:0016020:membrane	GO:0006810:transport	GO:0005279:amino acid:polyamine transporter

Figura 2. Apresentação e ferramentas do banco de ESTs de *M. quadrifasciata*: (A) página inicial (www.lge.ibi.unicamp.br/abelha), (B) exemplo da página de anotação após agrupamento por CAP3 e (C) exemplos de contigs após processamento do “Northern eletrônico”.

3.3. Resultados preliminares de microarray

3.3.1. Uso do microarray no projeto atual e suas futuras aplicações

A identificação do padrão de expressão dos genes ao longo do desenvolvimento certamente auxiliará na compreensão de como a expressão pode ser modulada a fim de se garantir um tipo capacitado para suas funções casta-específicas.

Uma etapa futura deste trabalho foi delineada com base na idéia acima e nas informações geradas durante o desenvolvimento do doutorado: analisar o padrão de expressão de genes, representados por suas ESTs, provenientes dos estudos com DDRT-PCR e bibliotecas subtrativas de cDNA, em diversas etapas do desenvolvimento de *M. quadrifasciata*, mais especificamente em pupas, através da tecnologia de microarray. Essa metodologia permite a análise em larga escala da expressão genica e tem sido empregada nas mais diversas questões biológicas e organismos, inclusive àquelas relacionadas às abelhas, como aprendizado, memória e desempenho de tarefas etária-específicas, conforme descrito na Introdução.

Testes preliminares com microarray foram realizados com o objetivo de padronizar essa metodologia para a espécie em estudo, e avaliar se, na fase recém nascida, os dados de expressão genica gerados por esta técnica seriam equivalentes àqueles encontrados nas bibliotecas subtrativas e nos ensaios de real-time PCR. Assim, clones representando genes diferencialmente expressos entre rainhas e operárias recém nascidas, gerados através das técnicas de differential display-PCR (Capítulo 1) e de bibliotecas subtrativas (Capítulo 2), representando um total de 768 clones, foram empregados nos ensaios de microarray.

3.3.2. Metodologia

Inicialmente, os clones selecionados tiveram seus fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos M13 universal e M13 reverso (presentes no vetor de clonagem) e os produtos de PCR resultantes foram quantificados em gel de agarose 1% para a garantia da qualidade e da concentração do material amplificado, que deveria permanecer entre 100 e 150 ng/uL. Os protocolos para amplificação, assim como para as etapas posteriores de purificação e precipitação dos produtos de PCR foram realizados de acordo com o protocolo da Genomic Solutions. Após precipitação, os produtos de PCR foram ressuspensos em uma solução de DMSO 50%. Os clones contendo fragmentos dos genes controle, actina e rRNA 28S, foram amplificados de acordo com seus protocolos específicos (descritos nos Capítulos 1 e 2) e purificados em colunas AutoSeq G50 (Amershan). Esses produtos purificados não foram precipitados como os demais clones, apenas foi

adicionado o reagente DMSO ao material, obtendo-se uma solução final de DMSO 50%, assim como para os demais clones. Em seguida, esses fragmentos foram impressos em lâminas de aminosilano (Corning) pelo sistema automatizado Flexys (Genomic Solutions). As lâminas empregadas nos ensaios de microarray foram desenhadas de modo que cada um dos 768 clones selecionados, assim como fragmentos de genes controle, actina e rRNA28S, estivessem representados em triplicata em cada lâmina. A fixação dos fragmentos de DNA às lâminas ocorreu por aquecimento à 80°C por 2 horas.

Na etapa posterior foram preparadas as sondas empregadas na hibridização com os fragmentos de DNA presentes nas lâminas. Nesta etapa houve um primeiro passo de síntese da 1^a fita do cDNA seguido pelo preparo da 2^a fita de cDNA marcada com fluoróforo. Assim, 35ug de RNA total de cada amostra foi submetido à transcrição reversa para a síntese da 1^a fita do cDNA, empregando-se oligo dT 400 mM, SuperScriptII 400U, RNaseOUT 120U, dNTPs 0,5mM, DTT 10mM e tampão First Strand 1X para um volume final de 20uL (reagentes Invitrogen). A reação ocorreu por 2 horas a 42°C. Para desfazer a ligação entre as fitas de RNA e cDNA, o material foi tratado com 7,5uL de NaOH 0,2N por 10 min a 70°C, e em seguida, foi adicionado 7,5uL de HCl 0,2N. O cDNA fita simples foi então submetido à purificação e concentração através de colunas Microcon 30 (Millipore). Para a síntese da segunda fita, 22uL do produto da síntese da primeira fita foi aquecido por 5 min a 94°C. Posteriormente, foram adicionados Random Primers Solution 1X, Klenow 40U (kit BioPrimer DNA Labelling System, Invitrogen), dCTP 0,06 mM, dATP, dTTP e dGTP 0,12mM, e o fluoróforo Cy-3-dCTP 2nmol. A síntese da segunda fita marcada ocorreu por 2 horas a 37°C. Em seguida, a sonda foi purificada e concentrada pela coluna Microcon.

Para a hibridização, 20ul de sonda foi misturada a 100uL da solução de hibridização (SSC 5X; Denhardt's 4,2X; ssDNA 0,21mg/ml; SDS 42%; formamida 42%) e aquecidos por 5 min a 94°C. O material foi colocado sobre a lâmina acondicionada no equipamento de hibridização (GeneTac- Genomic Solutions), permanecendo por 16 horas a 42°C. Após, a lâmina foi lavada por 5 min em temperatura ambiente, duas vezes em solução SSC 0,5X; SDS 0,142%, seguida por duas vezes em solução SSC 0,06X. Para secagem, a lâmina foi centrifugada a 700rpm por 7 min.

Os dados resultantes da hibridização (visualizados pela emissão de luz do fluoróforo) foram captados pelo scanner GeneTAC e analisados pelo programa Biochip Analyser (Genomic Solutions). A imagem gerada permitiu a visualização dos sinais de hibridização em tonalidades de verde devido ao uso do fluoróforo Cy-3. Para obter maior refinamento na análise das imagens geradas foi empregado o programa GeneTAC™ Integrator Analyzer (Genomics Solutions), sendo possível alinhar os pontos de hibridização e identificar e excluir possíveis sinais gerados por

resíduos do processo de hibridização ou até mesmo poeira, distinguindo-os dos sinais verdadeiros de hibridização. Um outro item importante para a análise das imagens refere-se à normalização da intensidade de luz emitida pelo fluoróforo (Cy-3), que permitiu o ajuste das diferenças geradas na marcação das sondas.

Após a normalização, os dados são analisados quanto à expressão diferencial e agrupados por algoritmos descritos para experimentos de expressão gênica.

3.3.3. Resultados preliminares

Nos testes iniciais foi utilizado como molde para a síntese da sonda uma mistura de RNA total proveniente de 10 operárias recém nascidas. Ainda, a lâmina usada nessa fase foi desenhada de modo a receber apenas 96 clones, além dos genes controle, actina e rRNA 28S, em triplicata, sendo os demais espaços preenchidos com a solução DMSO 50%. As primeiras tentativas com microarray usaram protocolos de marcação da sonda na primeira fita do cDNA e resultaram em um sinal de hibridização fraco para a maioria dos clones, sendo possível observar apenas a hibridização da sonda com os controles positivos. Para os testes seguintes, o protocolo de marcação na segunda fita do cDNA foi adotado (descrito acima). Como resultado desta abordagem, a imagem gerada mostrou a eficiência do protocolo para o preparo dos fragmentos de DNA fixados na lâmina e de síntese da sonda. Ainda neste teste, durante a síntese da primeira fita de cDNA, foram usados primers randomicos junto ao oligo dT, o que permitiu a hibridização da sonda com os fragmentos do gene rRNA 28S (Fig. 1).

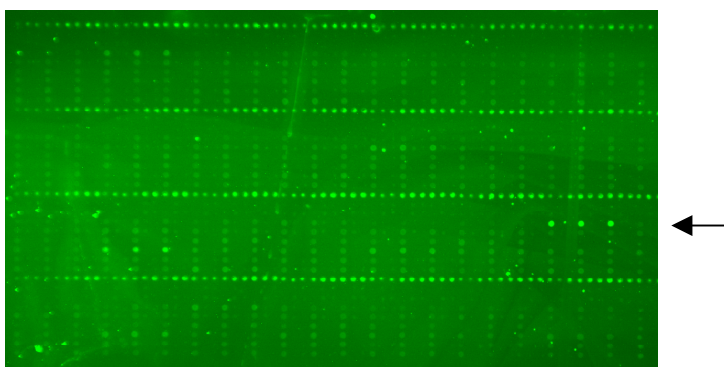


Figura 1. Imagem referente a teste inicial de microarray. A linha contínua de pontos representa os fragmentos dos genes controle: actina e rRNA 28S. Os demais pontos referem-se aos 96 clones em triplicata, alguns genes sinalizam elevados níveis de expressão em relação aos controles (seta).

Na fase seguinte foi avaliado o padrão de expressão em rainhas, operárias e rainhas induzidas pelo hormônio juvenil (HJ). Para o preparo das lâminas foram empregados 768 clones selecionados, além dos fragmentos dos genes actina e rRNA 28S, sendo fixados em triplicata como nos ensaios anteriores.

As amostras de RNA total empregadas foram originadas a partir de 10 rainhas naturais, 10 operárias e 06 rainhas-HJ recém nascidas. A marcação da sonda seguiu o protocolo usado no ensaio anterior, porém apenas o oligo dT foi utilizado como iniciador. Assim, o fluoróforo Cy3-dCTP foi incorporado na síntese da segunda fita do cDNA para as amostras de rainha, operária e rainha-HJ. As imagens resultantes destes ensaios mostraram um elevado nível de resíduos do processo de hibridização nas lâminas, o que dificultou a coleta de dados de expressão genica.

Porém, os dados gerados permitiram avaliar a equivalência entre os níveis de expressão detectados por este método em relação aos encontrados nas bibliotecas subtrativas e nos ensaios de real-time PCR. Para tal, os genes avaliados foram calibrados pela expressão da actina. A actina usada como referência foi aquela presente na mesma sub-divisão, ou grid, em que o gene em estudo estava localizado. Assim, para comparar as amostras de rainha, operária e rainha-HJ, os sinais de hibridização vindos da actina de rainha foram usados como normalizadores para as três amostras. Uma vez normalizadas pela actina, as amostras puderam ser comparadas gene a gene, pois os valores dos sinais de hibridização de cada gene foi corrigido de acordo com a razão da actina entre as amostras. Um exemplo é mostrado na figura 2.

	Rainha		Rainha HJ			Operária		
OPI-006-B12	191522,7		1027592	1077946		735197,3	547429,1	
Actina	189698,7	1	180837,33	0,953287	189698,7	254765,3	1,343	189698,7
		↓		↓		↓		
		R/R		R HJ / R		Op / R		

Figura 2. Esquema usado para normalizar as amostras pela actina. Os números apresentados referem-se à leitura da intensidade de Cy3 para o clone OPI-006-B12 (essa leitura desprezou sinais vindos de resíduos). A referência usada foi a actina de rainha e para tal, é feito uma razão dela com as demais amostras (R/R; RHJ/R; Op/R). A leitura original do gene dividida por essa razão gerou a leitura corrigida do gene (em amarelo), que foi usada nas comparações.

A análise visual baseada nas imagens geradas foi então comparada com a análise dos sinais de hibridização corrigidos pela actina. A figura 3 mostra esse processo para 7 genes avaliados.

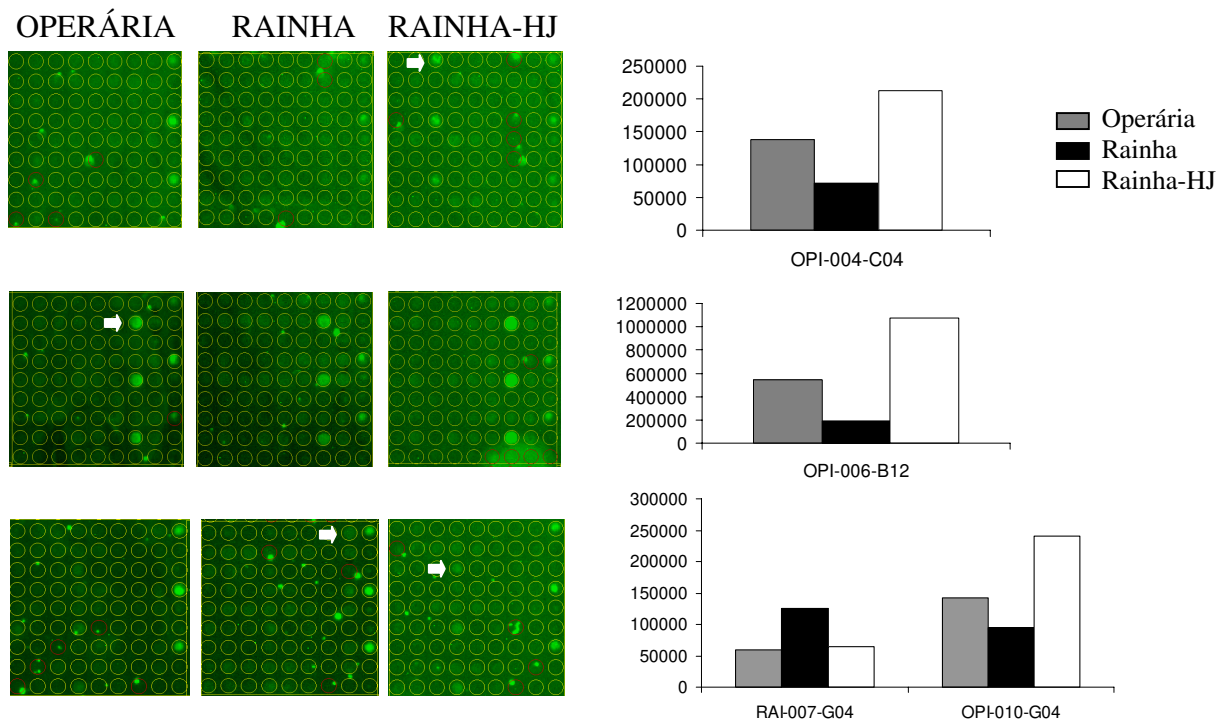


Figura 3. Correlação entre as imagens geradas e os sinais de hibridização corrigidos pela actina. À esquerda da figura encontram-se os grids em que os genes em análise estão inseridos (seta branca). Os círculos amarelos foram usados para o alinhamento dos pontos e os círculos em vermelho referem-se a regiões que foram desprezadas pela análise. No extremo direito de cada grid encontram-se as amostras de actina em triplicata. À direita da figura estão os gráficos gerados após a normalização dos sinais, com o nome de cada clone descrito em sua parte inferior. Clone OPI-004-C04 ocupa posição B2.a3; OPI-006-B12: D2.b7; RAI-007-G04: F2.a8; OPI-010-G04: F2.c4.

Foi possível observar que as diferenças de expressão nas castas rainha e operária, inicialmente encontradas nas bibliotecas subtrativas, também foram demonstradas pelos microarrays. Como mostrado na figura 3, os clones OPI, vindos de bibliotecas que representam os genes mais expressos em operárias em relação ao seu nível de expressão em rainhas, mostraram maior intensidade na hibridização com a sonda de operária. O mesmo é válido para os clones RAI em relação à hibridização com a sonda vinda de rainha. Um outro ponto interessante foi verificar que o padrão de expressão da rainha-HJ se mostrou diferenciado em relação à rainha, estando mais próximo à operária, conforme identificado previamente nos ensaios de real-time PCR (Capítulo 2).

Os dados apresentados referem-se a resultados preliminares no uso da técnica de microarray para o organismo em estudo, e embora tenham contribuído fortemente para a padronização deste método, eles não foram tratados de modo rigoroso em relação às análises estatísticas necessárias para uma interpretação mais fiel da intensidade dos sinais de hibridização. Assim como uma perspectiva futura do trabalho há a padronização completa da técnica e seu uso para determinar a expressão dos genes selecionados, em indivíduos recém nascidos, em outras etapas do desenvolvimento de *M. quadrifasciata*.

DISCUSSÃO GERAL

Os fenótipos de rainha e operária das abelhas sem ferrão são fortemente divergentes em suas morfologias e comportamento, e na maioria dos gêneros das abelhas sem ferrão, o desenvolvimento destas diferenças de castas é iniciado por um sinal nutricional, o que significa que as larvas destinadas a serem rainhas recebem uma quantidade de alimento larval muito maior do que as larvas que darão origem a operárias. As abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* constituem uma exceção a esse padrão, pois suas células de cria são todas do mesmo tamanho e são provisionadas com quantidades semelhantes de alimento. A alta porcentagem de rainhas que nascem dos favos de cria é um fenômeno intrigante que inspirou a formulação de um modelo para determinação de castas baseado em uma predisposição genética com um sistema de dois loci dois alelos (Kerr, 1950). Essa diferença alélica definiria as vias alternativas no desenvolvimento inicial das castas e, em seguida, o sistema endócrino atuaria na subsequente diferenciação de castas, direcionando as vias do desenvolvimento para rainha ou operária durante a metamorfose. Essa ação do sistema endócrino é comum às abelhas sociais, o que permite a consideração de que há uma convergência do desenvolvimento de castas nos Hymenoptera sociais no aspecto da regulação endócrina (Bonetti *et al.*, 1995, Hartfelder e Rembold, 1991, Pinto *et al.*, 2002).

Desta forma, o gênero *Melipona* difere das demais abelhas altamente sociais no estímulo inicial do desenvolvimento das castas, mas não nos processos responsáveis pela diferenciação durante a metamorfose. Essas características tornam as abelhas deste gênero um modelo interessante para estudos comparativos no desenvolvimento de castas em abelhas, especialmente nas possíveis conseqüências resultantes da transição da determinação de castas através da nutrição para o mecanismo genético idealizado para este gênero.

Para investigar os mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento de castas no gênero *Melipona*, o presente trabalho realizou um estudo comparativo da expressão gênica casta-

específica em rainhas e operárias de *M. quadrifasciata* na fase de adultos recém nascidos. Assim, o estudo não aborda os determinantes de castas, mas concentra-se no efeito que o processo de diferenciação de castas provoca em abelhas que ainda não se tornaram membros adultos da colônia e que ainda não desempenham tarefas casta-específicos. Portanto, a análise nessa fase do desenvolvimento permitiu minimizar os efeitos da interação social entre os membros da colônia na expressão gênica.

O estudo inicial da expressão gênica diferencial entre rainhas e operárias recém nascidas foi realizado através da técnica do differential display RT-PCR. Após a etapa de padronização da técnica, seis experimentos de DDRT-PCR foram realizados permitindo o isolamento de cerca de 70 fragmentos representando possíveis genes diferencialmente expressos entre as castas. Por ser uma técnica reconhecidamente geradora de falsos positivos, um cuidado maior foi tomado: foram isolados preferencialmente os fragmentos diferencialmente expressos provenientes de reações de DDRT-PCR que também geraram fragmentos comumente expressos (ver artigo, capítulo 1). Ainda, um outro ponto problemático destes ensaios referiu-se à etapa de re-amplificação dos fragmentos isolados, onde muitas reações falharam em gerar o produto esperado. Esta falha pode ser tida como consequência da baixa estringência da PCR aplicada ou de corresponderem os fragmentos isolados a artefatos da técnica.

Como resultado positivo, foi possível identificar 14 genes diferencialmente expressos entre rainhas e operárias, a maioria apresentando níveis de expressão mais elevados na casta operária. Entre as seqüências com anotação funcional, foram encontrados genes com papel estrutural como os codantes para *myosin*, *projectin*, *kettin*; relacionados à sinalização celular como o da proteína Rab-11; envolvidos na regulação da transcrição gênica como *Sas10* e *Sin3A*; e genes que atuam com funções múltiplas como o citocromo P450 (Judice *et al.*, 2004). Ainda, também foram detectados genes com elevada similaridade a genes de *Apis*, porém sem anotação quanto ao seu papel funcional, sendo assim denominados genes conservados de função desconhecida. Esses genes foram

considerados como candidatos para investigações futuras de seu papel em processos específicos para abelhas eusociais ou no desenvolvimento das castas de modo geral.

Visando estender a análise global de transcritos em recém nascidos das castas femininas de *M. quadrifasciata*, novos genes diferencialmente expressos foram obtidos através da construção de duas bibliotecas subtrativas; uma representando transcritos mais abundantes em rainhas e a outra, mais abundantes em operárias (ver manuscrito; capítulo 2). A metodologia empregada foi a da “Representational Difference Analysis” (cDNA-RDA), o qual, através de hibridações sucessivas, permitiu a subtração de seqüências comuns e o enriquecimento para seqüências diferencialmente expressas nas castas em estudo.

Do total de 1.278 seqüências de alta qualidade analisadas, foi possível obter um número similar de ESTs provenientes das bibliotecas de rainha e operária. No entanto, após clusterização, o número de seqüências únicas em operária foi inferior àquele gerado em rainha, sendo que a maioria das ESTs de rainha ficou agrupada em poucas seqüências únicas enquanto que as ESTs de operária mostraram uma distribuição menos condensada do que em rainha. Ainda, um grande número de ESTs de rainha (379) foi agrupado em um pequeno número de seqüências únicas (4 contigs). Estes dados chamam a atenção para a possibilidade de que uma variedade pequena de genes esteja sendo altamente transcrita na casta rainha e que, em operária, um maior número de genes diversos estaria sendo expresso. Essa idéia pode ser reforçada pelos resultados gerados após as análises de buscas por similaridade, onde a porcentagem de “no hits” foi maior em rainha (60%) do que em operária (45%).

Do total de seqüências de alta qualidade, a quantidade de ESTs que não apresentaram genes similares, classificadas como “no hits”, foi bastante elevada (52%). A comparação das ESTs de *Melipona* com seqüências de organismos de genomas completamente seqüenciados como *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000) e *Anopheles* (Holt *et al.*, 2002), ou próximo à conclusão, como *B. mori* (Mita *et al.*, 2004) e também, com seqüências genômicas e de transcritos de *Apis*, poderiam indicar que os “no hits” representam genes específicos à espécie em estudo. Porém, a elevada

porcentagem de “no hits” previamente descrita em estudos de genoma e transcriptoma em *A. mellifera*, foi atribuída a razões diversas que podem ser aplicadas às ESTs de *Melipona* (Nunes *et al.*, 2004, Whitfield *et al.*, 2002). As prováveis causas deste resultado podem estar relacionadas a artefatos técnicos, como a geração de regiões 3’ não traduzidas dos genes devido ao uso de oligo dT na transcrição reversa; a geração de transcritos poucos representados entre as seqüências genômicas disponíveis; e principalmente, ao fato de que essas ESTs apresentam um tamanho pequeno, tendo em sua maioria uma ORF inferior a 350pb. Conforme descrito anteriormente em *A. mellifera* (Nunes *et al.*, 2004, Whitfield *et al.*, 2002) ORFs curtas podem representar um problema aos programas de alinhamento, o que resulta em baixos níveis de similaridade, e que pode implicar em uma classificação errônea desses transcritos como sendo espécie-específicos. Uma comparação de genes espécie-específicos encontrados em *Drosophila* e *Anopheles* com *Apis* permitiu a inferência do número destes genes para *Apis* (Nunes *et al.*, 2004). Ressaltando que a estimativa de genes espécie-específicos estabelecida para *Apis* se baseou na distância filogenética entre dípteros e himenópteros e estendendo esse tipo de análise para *Apis* e *Melipona*, segundo tempo de divergência previamente descrito (Engel, 2001b), foi possível estimar que cerca de 12-15% dos “no hits” de *Melipona* podem representar genes espécie-específicos.

Para as ESTs com similaridade a genes previamente descritos, foi possível descrever dois grupos: um formado por genes de função ainda não descrita ou desconhecida e o outro grupo por genes de função conhecida. Em relação ao grupo de seqüências conservadas, mas de função desconhecida, as ESTs que o compõe mostraram elevada similaridade somente a seqüências de *Apis*, mas sem similares em outras espécies de insetos. Essas seqüências comuns a *Apis*, mas sem anotação funcional foram encontradas nas duas etapas deste estudo, nos ensaios de DDRT-PCR e de cDNA-RDA. Dentro deste grupo, o número de seqüências de operárias é maior do que o de rainha, o que pode ser uma consequência da composição dos bancos de dados de *Apis*, formados prioritariamente por ESTs vindas de bibliotecas de “Open Reading frame ESTs” (Nunes *et al.*, 2004) e de cérebro de operárias (Whitfield *et al.*, 2002). Devido à expressão comum destes

transcritos nas abelhas altamente sociais, *Apis* e *Melipona*, este grupo pode conter genes exclusivos que se caracterizam como interessantes candidatos envolvidos no desenvolvimento das castas ou na divisão de trabalho nos insetos sociais.

Para as ESTs classificadas como seqüências conservadas de função conhecida, a maioria apresentou alta similaridade a seqüências de *Apis* isoladas de operárias, além dos similares aos genes de outras espécies. De forma geral, os genes homólogos de *Drosophila* foram utilizados como referencia na anotação funcional dessas ESTs. Embora o número total dessas seqüências não nos permita um quadro claro dos transcriptomas das castas, foi possível observar uma predominância de genes envolvidos na regulação transcricional e metabolismo em rainha, em relação a uma faixa mais ampla de categorias funcionais na casta operária. A expressão de genes relacionados ao metabolismo detectada em rainhas muito jovens pode ser interpretada como um preparo dos corpos gordurosos para a futura síntese de proteínas e lipídeos necessários para a tarefa específica desta casta de produzir altas taxas de ovos (Engels e Engels, 1977). Na casta operária, os genes identificados estão envolvidos em grande parte às vias de sinalização, como aquelas presentes nos processos de aprendizagem e memória, entre outros. Esses dados indicam que, já no estágio de recém nascida, os genes estão estruturados para o desempenho de tarefas complexas e mudança de comportamento observadas em operárias de *Melipona* (Waldschmidt *et al.*, 2002).

Como um efeito do processo de diferenciação de castas em abelhas recém nascidas, os dados de expressão gênica em *Melipona* sugerem que o padrão de transcrição de uma abelha operária é mais complexo do que de uma rainha mesmo antes que a divisão de trabalho casta-específica seja estabelecida, e que o metabolismo em rainhas é governado por processos poucos conhecidos em comparação ao metabolismo de operárias.

Os genes identificados como diferencialmente expressos entre as castas de rainha e operária foram considerados como interessantes candidatos para o estudo do efeito de hormônio juvenil (HJ), principal mediador de polifenismos em insetos (Nijhout, 1982) e da diferenciação de castas em abelhas sociais (Hartfelder, 2000), em seu padrão de expressão. Conforme descrito no Capítulo

2, larvas na fase de tecelagem de casulo, principal fase de resposta ao HJ em *Melipona*, foram tratadas com análogo ao HJ, o pyriproxyfen, para induzir o desenvolvimento de rainhas, conforme descrito em estudos anteriores (Bonetti *et al.*, 1995, Campos, 1978). Como controle, algumas larvas foram tratadas somente com acetona, o solvente empregado na solução de aplicação do HJ. Após a emergência, rainhas induzidas e operárias controle foram coletadas e usadas nos ensaios de expressão gênica através da técnica de real-time PCR.

Em nossos estudos preliminares, apenas genes de função conhecida tiveram seu padrão de expressão avaliado. Buscando analisar genes envolvidos em diversas categorias funcionais e provenientes de ambas as castas, foram testados os genes *fatty acid synthase* e *grainy head*, encontrados como sendo mais expressos em rainha, e os genes *roundabout*, *scavenger*, *paramyosin*, *amino acid polyamine transporter* e *diacylglycerol kinase*, mais expressos na casta operária. Como genes calibradores empregamos *actina* e *28S ribossomal*, ambos previamente descritos como comumente expressos nas castas em estudo (Takeuchi *et al.*, 2002, Pfaffl *et al.*, 2003).

Durante os ensaios de real-time PCR, a amplificação dos genes *grainy head*, *roundabout*, *scavenger* e *actina* falhou, possivelmente, devido a problemas técnicos como o uso de oligonucleotídeos cuja seqüência não se mostrou como a mais adequada para este fim.

Para os genes cuja amplificação foi obtida com sucesso, a comparação entre rainhas induzidas e rainhas naturais mostrou clara diferença nos níveis de expressão de genes casta-específicos dentro do mesmo fenótipo morfológico, sendo que a expressão em rainhas induzidas ora se mostrou intermediária aos níveis de expressão de rainhas naturais e operárias ou ora se mostrou mais elevada do que a observada em operárias, mas sempre diferindo do que foi observado para rainhas naturais.

A divergência entre a morfologia da casta e o padrão de expressão gênica, encontrada em nosso estudo, pode explicar as falhas obtidas anteriormente nos testes para comprovar a hipótese da predisposição genética. Inicialmente, foi proposto testar essa hipótese com o desenvolvimento de

rainhas por indução com HJ e a conseqüente análise de suas gerações (Velthuis, 1976). Entretanto, a maior parte dessas rainhas induzidas falharam em estabelecer colônias (Campos *et al.*, 1979).

Os resultados de super expressão de genes específicos à casta operária observados em rainhas recém nascidas induzidas pelo hormônio juvenil, quando interpretados sob a hipótese da predisposição genética para a determinação de casta em *Melipona* (Kerr *et al.*, 1975), apontam para uma possível independência entre o fenótipo morfológico da casta e o padrão de expressão gênica em abelhas jovens. Dessa forma, quando uma larva com genótipo de operária, mas não de rainha, recebe a aplicação do HJ na fase larval, há um mimetismo do sistema endócrino encontrado em rainhas, conforme descrito anteriormente em abelhas sem ferrão (Hartfelder e Rembold, 1991), levando ao desenvolvimento de um fenótipo morfológico de rainha, no entanto, ocorre também a super-expressão de genes específicos à casta operária na fase de jovens adultas. Este é um resultado extremamente significativo, sugerindo que falta às rainhas induzidas características que não podem ser identificadas apenas pelo fenótipo externo. Possivelmente é essa diferença que o nosso experimento conseguiu detectar, mostrando diversos traços de operária na expressão de genes específicos.

Ainda, recentes descobertas de exemplos de predisposição genética na determinação de castas em outros himenópteros sociais, em especial formigas (Fraser *et al.*, 2000, Julian *et al.*, 2002, Volny e Gordon, 2002, Winter e Buschinger, 1986), reforçam a hipótese da predisposição genética das castas em *Melipona* (Kerr, 1950). Assim, pode-se interpretar que estes dados sinalizam a transição de fatores ambientais para genéticos na determinação de castas, o que pode ter conferido maior liberdade durante o processo evolutivo para os insetos que apresentam estrutura social.

Um outro ponto interessante a ser colocado é que a finalização deste trabalho de identificação de genes diferencialmente expressos entre rainha e operárias de *M. quadrifasciata* permitiu isolar interessantes genes-candidatos envolvidos na diferenciação de castas como desencadeadores ou como conseqüência do disparo desse processo, assim como aqueles representados por alguns contigs mistos que apresentam uma grande quantidade de reads de rainha.

Um outro exemplo refere-se ao gene *dunce*, visto como sendo mais expresso na casta de operária. Este gene foi recentemente visto como essencial no comportamento cooperativo em *Drosophila*. Este comportamento pode ser dividido em duas etapas: primeiro, parte de um grupo de moscas voa aleatoriamente em busca de alimento e, em uma segunda etapa, o restante do grupo se movimenta em direção à fonte mais favorável de alimento e se agrega neste ponto. As moscas mutantes em *dunce* apresentam deficiência na execução deste comportamento (Tinette *et al.*, 2004). Se o papel funcional de *dunce* for confirmado em abelhas, pode-se interpretar que as operárias recém nascidas já apresentam uma programação molecular para o comportamento cooperativo definida antes mesmo de sua participação efetiva na divisão de trabalho da colônia.

Genes como estes se caracterizam como alvos de nossas futuras investigações em seu padrão de expressão ao longo do desenvolvimento, correlacionando-a com a arquitetura gênica que dará suporte para os processos ou comportamentos casta-específicos da vida adulta e com os controles hormonais característicos de cada estágio e/ou casta.

Em uma recente publicação a revista *Science* abordou alguns comportamentos animais que têm sido desvendados através da integração de estudos na área de genômica, neurociência e evolução. Um destes exemplos refere-se ao gene *forager*, que codifica para uma proteína quinase dependente de cGMP (PKG), importante molécula da sinalização celular. Este gene foi inicialmente descrito em *Drosophila*, sendo mais expresso em moscas de comportamento mais ativo para vôos (Osborne *et al.*, 1997). A expressão de *PKG* em moscas também afeta o comportamento de identificação de açúcares em fontes alimentares (Scheiner *et al.*, 2004). Em abelhas melíferas, um aumento no nível de expressão de *PKG* no cérebro foi relacionado como incentivador para a troca de atividades nas operárias: de tarefas características às nutridoras, essas abelhas passaram a tarefas de forrageamento, ou seja, assumiram o comportamento de busca por alimento (Ben-Shahar *et al.*, 2002, Whitfield *et al.*, 2003). Um outro estudo envolvendo 19 espécies distintas, desde algas até humanos, mostrou que o há uma forte conservação na seqüência do gene *PKG*, mostrando que este

gene pode modular o comportamento de busca por fontes de alimento em diferentes cenários evolutivos (Pennisi, 2005).

APÊNDICE

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E ENCONTROS RELACIONADAS À TESE

Trabalho Completo:

1. Judice, C. C.; HARTFELDER, K.; FESTA, F.; SOGAYAR, M.; PEREIRA, G. A. G. Caste-specific gene expression in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. In: 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas, 2004, Ribeirão Preto. Proceedings of the IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas (2004). Ribeirão Preto: FUNPEC, 2004. p. 150-155.

Resumos:

1. COLONELLO, N. A.; Judice, C. C.; HARTFELDER, K. Expression profiling of drone accessory glands by representational difference analysis (RDA). In: 8th IBRA Internacional Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas, 2004, Ribeirão Preto -SP. Proceedings of 8th IBRA Internacional Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas- 2004. Ribeirão Preto - SP: FUNPEC, 2004.

2. Judice, C. C.; HARTFELDER, K.; PEREIRA, G. A. G. Profile of differentially expressed genes in castes of *Melipona quadrifasciata*. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambu. XXXII Reunião Anual, Programas e Resumos, 2003. p. 44.

3. Judice, C. C.; HARTFELDER, K. ; PEREIRA, G. A. G. Differential gene expression analyze in female castes of *Melipona quadrifasciata*. In: 49° Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia. Resumos do 49° Congresso Nacional de Genética, 2003. p. 330.

4. Judice, C. C.; OLIVEIRA, M. A.; HARTFELDER, K.; PEREIRA, G. A. G. Identification of differentially expressed genes between queen and worker castes of *Melipona quadrifasciata*. In: V Encontro sobre Abelhas, 2002, Ribeirão Preto. Anais do V Encontro sobre Abelhas, 2002. v. 5. p. 253-253.

5. Judice, C. C.; OLIVEIRA, M. A. ; DANI, S. U.; PEREIRA, G. A. G. Identification of a lilliputian gene (*Drosophila melanogaster*) homologue sequence in *Melipona quadrifasciata*

(stingless bee). In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambu-MG. SBBq/Programa e resumos da XXX Reunião Anual, 2001. p. 34.

6. Judice, C. C.; AIDAR, D. S.; DANI, M. A. C.; DANI, S. U. Differentially expressed sequence tag sequencing (DESTs) of the worker and queen castes of *Melipona* sp (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): report of a pilot study. In: Congresso Nacional de Genética, 2000, Águas de Lindóia, 2000.

7. OLIVEIRA, D. A.; GADAU, J. ; AIDAR, D. S.; Judice, C.C.; DANI, S. U. Construction of a genetic linkage map of *Melipona quadrifasciata anthibodies* lep (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) based on RAPD marker. In: Congresso Nacional de Genética, 2000, Águas de Lindóia-SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-95.
- Alberola, T. M. e de Frutos, R. (1996) Molecular structure of a gypsy element of *Drosophila subobscura* (gypsyDs) constituting a degenerate form of insect retroviruses. *Nucleic Acids Res* **24**: 914-23.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
- Amdam, G. V., Simoes, Z. L., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T. B. e Omholt, S. W. (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp Gerontol* **39**: 767-73.
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Guidugli, K. R., Norberg, K. e Omholt, S. W. (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA. *BioMed Central Biotechnology* **3:1**: 8 pages, available online: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/1>.
- Ausubel, F. M., Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA.
- Barolo, S. e Levine, M. (1997) hairy mediates dominant repression in the *Drosophila* embryo. *Embo J* **16**: 2883-91.
- Beetsma, J. (1985) In *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology: in memoriam Karl von Frisch, 1886-1982*(Ed, Lindauer, M.) Sinauer, Sunderland, Mass., pp. 407-410.
- Bennett, M. K., Lopez, J. M., Sanchez, H. B. e Osborne, T. F. (1995) Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J Biol Chem* **270**: 25578-83.
- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B. e Robinson, G. E. (2002) Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* **296**: 741-4.
- Beye, M., Hartel, S., Hagen, A., Hasselmann, M. e Omholt, S. W. (2002) Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol Biol* **11**: 527-32.
- Bicker, G. (2001) Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroid insect. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**: 100-10.
- Bloch, G., Wheeler, D. E. e Robinson, G. E. (2002) In *Hormones, Brain, and Behavior*, Vol. 3 (Ed, Rubin, R. T.) Academic Press, San Diego, pp. 195-237.
- Bonetti, A. M., Kerr, W. E. e Matusita, S. H. (1995) Effects of juvenile hormones I, II and III, in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Rev. Bras. Biol.* **55 Suppl 1**: 113-20.
- Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E. M. e Davis, R. L. (1997) Leonardo, a *Drosophila* 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron* **19**: 391-402.
- Camargo, J. M. F. e Pedro, S. R. M. (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* **23**: 509-522.
- Campos, L. A. O. (1978) Sex determination in bees. VI: effect of a juvenile hormone analog in males and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* **51**: 228-234.

- Campos, L. A. O., Kerr, W. E. e Silva, D. L. N. (1979) Sex determination in bees. VIII. Relative action of genes xa and xb on sex determination in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Genética* **2**: 267-280.
- Campos, L. A. O., Velthuis, H. H. W. e Velthuis-Kluppel, F. M. (1975) Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. *Naturwissenschaften* **62**: 98-99.
- Corona, M., Estrada, E. e 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.
- Courey, A. J. e Jia, S. (2001) Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* **15**: 2786-96.
- Davis, R. L. e Dauwalder, B. (1991) The *Drosophila dunce* locus: learning and memory genes in the fly. *Trends Genet* **7**: 224-9.
- Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A. e Berger, E. M. (2002) Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1555-65.
- Engel, M. S. (2001a) A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bull. Amer. Mus.Nat. Hist.* **259**: 5-192.
- Engel, M. S. (2001b) Monophyly and extensive extinction of advanced eusocial bees: insights from an unexpected Eocene diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1661-4.
- Engels, W. e Engels, E. (1977) Vitellogenin und Fertilität bei stachellosen Bienen. *Insectes Sociaux* **24**: 71-94.
- Engels, W. e Imperatriz-Fonseca, V. L. (1990) In *Social Insects - an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*(Ed, Engels, W.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 168-230.
- Evans, J. D. e 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.
- Evans, J. D. e Wheeler, D. E. (2000) Expression profiles during honeybee caste development. *Genome Biol.* **2**: 2.1: 6 pages, available online [http:// genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1](http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1).
- Evans, J. D. e Wheeler, D. E. (2001) Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays* **23**: 62-68.
- Ewing, B. e Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**: 186-94.
- Fraser, V. S., Kaufmann, B., P., O. B. e Crozier, R. H. (2000) Genetic influence on caste in the ant *Camponotus consobrinus*. *Behav Ecol Sociobiol* **47**: 188-194.
- Funada, M., Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., Sasagawa, H., Kitagawa, Y. e Kadowaki, T. (2004) Characterization of the two distinct subtypes of metabotropic glutamate receptors from honeybee, *Apis mellifera*. *Neurosci Lett* **359**: 190-4.
- Gecz, J., Bielby, S., Sutherland, G. R. e Mulley, J. C. (1997) Gene structure and subcellular localization of FMR2, a member of a new family of putative transcription activators. *Genomics* **44**: 201-13.
- Green, P. (1996) <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>.
- Greenbaum, E. e Carr, J. L. (2001) Sexual differentiation in the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*), a species with genetic sex determination. *J Exp Zool* **290**: 190-200.
- Grozinger, C. M., Sharabash, N. M., Whitfield, C. W. e Robinson, G. E. (2003) Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100 Suppl 2**: 14519-14525.
- Guidugli, K., C., H. e 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* L.) caste development. *Apidologie* **35**: 37-47.
- Hartfelder, K. (1987) Rates of juvenile hormone synthesis control caste differentiation in the stingless bee *Scaptotrigona postica depilis*. *Roux's Archives of Developmental Biology* **196**: 522-526.
- Hartfelder, K. (1990) In *Social Insects - an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*(Ed, Engels, W.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 245-264.
- Hartfelder, K. (2000) Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**: 157-177.
- Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., Santana, W. C. e Simões, Z. L. P. (2002) Ecdysteroid titers and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 211-216.
- Hartfelder, K. e Emlen, D. G. (2004) In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3 (Eds, Gilbert, K. and Iatrou, S. G.) Endocrinology, L.I., pp. 55 (in press).
- Hartfelder, K. e Emlen, D. J. (2005) In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3 (Eds, Gilbert, L. I., Iatrou, K. and Gill, S. S.) Elsevier, Oxford, pp. 651-703.

- Hartfelder, K. e Rembold, H. (1991) Caste-specific modulation of juvenile hormone-III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J. Comp. Physiol. B* **160**: 617-620.
- Hepperle, C. e Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften* **88**: 113-6.
- Holscher, C. (1999) Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J Neurosci Res* **58**: 62-75.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W. H., Rusch, D. B., Lai, Z., Kraft, C. L., Abril, J. F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chaturverdi, K., Christophides, G. K., Chrystal, M. A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C. A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M. E., Hladun, S. L., Hogan, J. R., Hong, Y. S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J. J., Lobo, N. F., Lopez, J. R., Malek, J. A., McIntosh, T. C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S. D., O'Brochta, D. A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M. A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M. V., Sitter, C. D., Shetty, J., Smith, T. J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L. Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M. F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K. J., Wortman, J. R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E. M., Zhang, H., Zhao, Q., et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 129-149.
- Huang, X. e Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**: 868-77.
- Hubank, M. e Schatz, D. G. (1999) cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods Enzymol* **303**: 325-49.
- Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. e Inoue, K. (2000) Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6538-43.
- Judice, C., Hartfelder, K. e Pereira, G. A. G. (2004) Caste-specific gene expression profile in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* - are there common patterns in highly eusocial bees? *Insectes Sociaux* **51**: 352-358.
- Julian, G. E., Fewell, J. H., Gadau, J., Johnson, R. A. e Larrabee, D. (2002) Genetic determination of the queen caste in an ant hybrid zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8157-60.
- Kadmas, J. L. e Beckerle, M. C. (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 920-31.
- Kalyanaraman, A., Aluru, S., Kothari, S. e Brendel, V. (2003) Efficient clustering of large EST data sets on parallel computers. *Nucleic Acids Res* **31**: 2963-74.
- Kanoh, H., Yamada, K. e Sakane, F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J Biochem (Tokyo)* **131**: 629-33.
- Kaufman, T. C., Severson, D. W. e Robinson, G. E. (2002) The *Anopheles* genome and comparative insect genomics. *Science* **298**: 97-8.
- Kerr, W. E. (1950) Evolution of the mechanism of caste determination in the genus *Melipona*. *Evolution* **4**: 7-13.
- Kerr, W. E., Akahira, Y. e Camargo, C. A. (1975) Sex determination in bees. IV. Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics* **81**: 749-56.
- Kerr, W. E. e Nielsen, R. A. (1966) Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics* **54**: 859-66.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. e Tear, G. (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**: 205-15.
- Kim, Y. H., Cho, K. W., Youn, H. Y., Yoo, H. S. e Han, H. R. (2001) Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J Vet Sci* **2**: 59-63.
- Kucharski, R. e Maleszka, R. (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0007.

- Lee, H. e Adler, P. N. (2004) The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **121**: 37-49.
- Meerbach, A., Gruhn, B., Egerer, R., Reischl, U., Zintl, F. e Wutzler, P. (2001) Semiquantitative PCR analysis of Epstein-Barr virus DNA in clinical samples of patients with EBV-associated diseases. *J Med Virol* **65**: 348-57.
- Michener, C. D. (2000) *The Bees of the World*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H., Yasukochi, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Ajimura, M., Ravikumar, G., Shimomura, M., Nagamura, Y., Shin, I. T., Abe, H., Shimada, T., Morishita, S. e Sasaki, T. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* **11**: 27-35.
- Nijhout, H. F. (1999) When developmental pathways diverge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5348-50.
- Nijhout, H. F. W., D.E. (1982) Juvenil hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quart. Rev. Biol.* **57**: 109-133.
- Nunes, F. M., Valente, V., Sousa, J. F., Cunha, M. A., Pinheiro, D. G., Maia, R. M., Araujo, D. D., Costa, M. C., Martins, W. K., Carvalho, A. F., Monesi, N., Nascimento, A. M., Peixoto, P. M., Silva, M. F., Ramos, R. G., Reis, L. F., Dias-Neto, E., Souza, S. J., Simpson, A. J., Zago, M. A., Soares, A. E., Bitondi, M. M., Espreafico, E. M., Espindola, F. S., Paco-Larson, M. L., Simoes, Z. L., Hartfelder, K. e Silva, W. A., Jr. (2004) The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. *BMC Genomics* **5**: 84.
- Osborne, K. A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R. A., Coulthard, A., Pereira, H. S., Greenspan, R. J. e Sokolowski, M. B. (1997) Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science* **277**: 834-6.
- Ott, S. R., Delago, A. e Elphick, M. R. (2004) An evolutionarily conserved mechanism for sensitization of soluble guanylyl cyclase reveals extensive nitric oxide-mediated upregulation of cyclic GMP in insect brain. *Eur J Neurosci* **20**: 1231-44.
- Page, R. E. J. e Peng, C. Y.-S. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **36**: 695-711.
- Pastorian, K., Hawel, L., 3rd e Byus, C. V. (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem* **283**: 89-98.
- Pennisi, E. (2005) A genomic view of animal behavior. *Science* **307**: 30-32.
- Pfaffl, M. W., Gerstmayer, B., Bosio, A. e Windisch, W. (2003) Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats: monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real-time RT-PCR. *J Nutr Biochem* **14**: 691-702.
- Pinto, L. Z., Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G. e Simões, Z. L. P. (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J. Insect Physiol.* **48**: 783-790.
- Prosdocimi, F., Faria-Campos, A. C., Peixoto, F. C., Pena, S. D., Ortega, J. M. e Franco, G. R. (2002) Clustering of *Schistosoma mansoni* mRNA sequences and analysis of the most transcribed genes: implications in metabolism and biology of different developmental stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97 Suppl 1**: 61-9.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A. e Hartfelder, K. (1990) Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**: 31-38.
- Rachinsky, A., Zhang, J. e Tobe, S. S. (1994) Signal transduction in the inhibition of juvenile hormone biosynthesis by allatostatins: roles of diacylglycerol and calcium. *Mol Cell Endocrinol* **105**: 89-96.
- Ratnieks, F. L. (2001) Heirs and spares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. *Behav Ecol Sociobiol* **50**: 467-473.
- Ratnieks, F. L. e Wenseleers, T. (2005) Policing Insect Societies. *Science* **307**: 54-56.
- Rembold, H. (1987) Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* **17**: 1003-1006.
- Robinson, G. E. (1999) Integrative animal behaviour and sociogenomics. *Trends Ecol Evol.* **14**: 202-205.
- Robinson, G. E. (2002) Development. Sociogenomics takes flight. *Science* **297**: 204-5.
- Robinson, G. E. e Ben-Shahar, Y. (2002) Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? *Genes Brain Behav* **1**: 197-203.
- Sawata, M., Takeuchi, H. e Kubo, T. (2004) Identification and analysis of the minimal promoter activity of a novel noncoding nuclear RNA gene, AncR-1, from the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Rna* **10**: 1047-58.

- Sawata, M., Yoshino, D., Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Ohashi, K. e Kubo, T. (2002) Identification and punctate nuclear localization of a novel noncoding RNA, Ks-1, from the honeybee brain. *Rna* **8**: 772-85.
- Scheiner, R., Sokolowski, M. B. e Erber, J. (2004) Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* **11**: 303-11.
- Schmidt Capella, I. C. e 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.
- Schmidt Capella, I. C. e Hartfelder, K. (2002) Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* **307**: 265-272.
- Shankar, R., Grover, D., Brahmachari, S. K. e Mukerji, M. (2004) Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements. *BMC Evol Biol* **4**: 37.
- Shore, D. (2000) The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14030-2.
- Su, M. A., Wisotzkey, R. G. e Newfeld, S. J. (2001) A screen for modifiers of decapentaplegic mutant phenotypes identifies lilliputian, the only member of the Fragile-X/Burkitt's Lymphoma family of transcription factors in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **157**: 717-25.
- Swanson, K. D. e Ganguly, R. (1992) Characterization of a *Drosophila melanogaster* gene similar to the mammalian genes encoding the tyrosine/tryptophan hydroxylase activator and protein kinase C inhibitor proteins. *Gene* **113**: 183-90.
- Takeuchi, H., Fujiiyuki, T., Shirai, K., Matsuo, Y., Kamikouchi, A., Fujinawa, Y., Kato, A., Tsujimoto, A. e Kubo, T. (2002) Identification of genes expressed preferentially in the honeybee mushroom bodies by combination of differential display and cDNA microarray. *FEBS Lett.* **513**: 230-234.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Rubin, G. M. e Muller, H. A. (2001) Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, lilliputian. *Development* **128**: 801-13.
- Telles, G. P. e da Silva, F. R. (2001) Trimming and clustering sugarcane ESTs. *Genetics and Molecular Biology* **24**: 17-23.
- Terman, J. R., Mao, T., Pasterkamp, R. J., Yu, H. H. e Kolodkin, A. L. (2002) MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**: 887-900.
- Tian, S. S., Tsoulfas, P. e Zinn, K. (1991) Three receptor-linked protein-tyrosine phosphatases are selectively expressed on central nervous system axons in the *Drosophila* embryo. *Cell* **67**: 675-80.
- Tinette, S., Zhang, L. e Robichon, A. (2004) Cooperation between *Drosophila* flies in searching behavior. *Genes Brain Behav* **3**: 39-50.
- Tsuchimoto, M., Aoki, M., Takada, M., Kanou, Y., Sasagawa, H., Kitagawa, Y. e Kadowaki, T. (2004) The changes of gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zoolog Sci* **21**: 23-8.
- Velthuis, H. H. W. (1976) In *Phase and caste determination*(Ed, M., L.) Pergamon Press, Oxford, pp. 35-53.
- Volny, V. P. e Gordon, D. M. (2002) Genetic basis for queen-worker dimorphism in a social insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6108-11.
- Waldschmidt, A. M., Marco-Junior, P., Barros, E. G. e Campos, L. A. (2002) Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. *Braz J Biol* **62**: 923-8.
- Wenseleers, T., Hart, A. G., Ratnieks, F. L. e Quezada-Euán, J. J. G. (2004) Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii*. *Ethology* **110**: 725-736.
- Whitfield, C. W., Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C. G., Liu, L., Pardinas, J., Robertson, H. M., Soares, B. e Robinson, G. E. (2002) Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behaviour in the honey bee. *Genome Res.* **12**: 555-566.
- Whitfield, C. W., Cziko, A. M. e Robinson, G. E. (2003) Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* **302**: 296-299.
- Wilson, E. O. (1971) *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Winter, U. e Buschinger, A. (1986) Genetically mediated queen polymorphism and caste determination in the slave-making ant, *Harpagoxenus sublaevis* (Hymenoptera: Formicidae). *Entom. Gener.* **11**: 125-137.
- Wirtz, P. (1973) In *Departament of Entomology, Agric. Univ. Wageningen*Holland, pp. 155.

- Wittwer, F., van der Straten, A., Keleman, K., Dickson, B. J. e Hafen, E. (2001) Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth. *Development* **128**: 791-800.
- Yang, Y. H., Chen, Y. H., Zhang, C. Y., Nimmakayalu, M. A., Ward, D. C. e Weissman, S. (2000) Cloning and characterization of two mouse genes with homology to the yeast Sir2 gene. *Genomics* **69**: 355-69.
- Zucchi, R., Silva-Matos, E. V., Nogueira-Ferreira, F. H. e Azevedo, G. G. (1999) On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees - nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sociobiology* **34**: 65-86.