



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOTECNOLOGIA**

**Mecanismo molecular da determinação de sexo e casta em**  
***Melipona compressipes* (Hymenoptera: Apidae)**

Carlos Gustavo Nunes da Silva

Manaus  
2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOTECNOLOGIA**

**Mecanismo molecular da determinação de sexo e casta em**  
***Melipona compressipes* (Hymenoptera: Apidae)**

Carlos Gustavo Nunes da Silva

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração de Biotecnologias Agro-florestais.

Manaus  
2008

## Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Silva, Carlos Gustavo Nunes da  
Mecanismo molecular de determinação de sexo e casta  
S586m em *Melipona compressipes* (Hymenoptera: Apidae) / Carlos  
Gustavo Nunes da Silva. - Manaus: UFAM, 2008.  
67 f.; il. color.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade  
Federal do Amazonas, 2008.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gislene Almeida Carvalho Zilse  
Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho  
1. Haplodiploidia 2. Partenogênese 3. Abelhas I. Zilse,  
Gislene Almeida Carvalho II. Astolfi Filho, Spartaco III.  
Universidade Federal do Amazonas IV. Título  
CDU 638.12(043.2)

	SUMÁRIO
AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE ABREVIACÕES	9
LISTAS DE FIGURAS	10
LISTAS DE TABELAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Vida em sociedade	18
1.1.2. Abelhas eusociais (Hymenoptera: Apoidea)	18
1.2. Determinação de sexo	19
1.2.1. Determinação de castas	19
1.3. Abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)	19
1.4. Bases da determinação do sexo em abelhas: haplodiploidia	20
1.4.1. Mecanismo genético complementar envolvido na determinação do sexo em himenópteros	21
1.4.2. Conseqüências do sistema complementar de determinação do sexo ( <i>CSD</i> )	23
1.4.3. Estudos moleculares do gene de determinação do sexo	25
1.5. Determinação de castas em abelhas	26
1.6. Determinação do sexo e castas e suas implicações ecológicas	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Geral	29
2.2. Específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Coleta de amostras	30
3.2. Métodos	31
3.2.1. Extração de RNA total de fases imaturas	31
3.2.2. Isolamento do mRNA	31
3.3. RACE ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> )	31
3.4. Clonagem dos segmentos amplificados	34
3.4.1. Identificação de clones recombinantes por PCR de colônias	34
3.4.2. Extração de plasmídeos	35
3.5. Seqüenciamento	35
3.6. Análise das seqüências por ferramentas de bioinformática	35
3.7. Amplificação de regiões não contempladas pelo RACE por meio de PCRs	35

---

3.8. Busca de motivos e domínios protéicos	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Extração de RNA total e isolamento de mRNA	37
4.2. Etapas de RACE, clonagem e seqüenciamento	37
4.3. Análise da seqüência de aminoácidos da proteína Fem	41
4.3.1. Domínios e motivos protéicos	42
4.4. Implicações no mecanismo de determinação de casta	45
4.4.1. No gênero <i>Melipona</i>	46
4.4.1.1 Hipótese genético - alimentar de Kerr (1975)	47
4.4.2. Proposição de um modelo para a determinação de sexo e casta em <i>Melipona</i> envolvendo o gene <i>fem</i>	48
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. ANEXO	62

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos deu o dom da vida.

Aos meus pais Walter e Maria Regina, incessantes batalhadores pela educação de toda a nossa família, pelo apoio irrestrito e apaixonante às nossas vidas e, em particular, por minhas conquistas acadêmicas. Pelo carinho, cuidado, preocupações e pela amizade eterna! Os amo muito!

A Professora Doutora Gislene Almeida Carvalho Zilse, a qual sempre me deu o rumo nas etapas acadêmicas conquistadas, sendo uma orientadora completa. Sou muito agradecido por todas as informações e influências que dela recebi e pela sorte de tê-la como minha mentora em meus estudos com as abelhas. O melhor de tudo é saber que a tenho como amiga pra todas as horas.

Ao Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho, o qual, sem pestanejar, sempre apoiou as minhas atividades no laboratório de Tecnologias do DNA da UFAM. Além de ser um exemplo como pesquisador e pessoa. Nesses anos de convívio sempre foi um verdadeiro amigo, dando conselhos e dicas, não só para os experimentos, mas também para a vida. Obrigado por tudo que o senhor representa para nós e para toda a nossa imensa e linda Amazônia Brasileira!

Ao Professor Doutor Warwick Estevam Kerr, pelo exemplo de vida, pelo carinho e atenção a mim dispensados. É exemplo pela sabedoria e serenidade em momentos conturbados. Por me *mostrar* e me encantar com as abelhas nativas do Brasil. Sou muito feliz por te-lo conhecido e aprendido com ele que a vida, na prática, pode ser vivida com alegria sob quaisquer circunstâncias.

A Professora Doutora Ana Maria Bonetti por confiar em mim, pelo exemplo de professora e pesquisadora e por ser um ser humano maravilhoso. Obrigado Professora Bonetti pelo seu ânimo inabalável... e, quando se *trata* de nossas abelhinhas, a senhora é imbatível!

Ao amigo Edmar (para os menos íntimos: Professor Doutor Edmar Vaz de Andrade), pelo constante incentivo, e carinho. Pelos ensinamentos e longas conversas, conselhos e “upgrades” científicos e pessoais. Pela sua preocupação conosco e amizade irrestrita e

sincera. Muito obrigado por todos esses momentos que, com certeza, irão se repetir ao longo de nossa existência.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA), em especial a Hélio, Nelson, Fátima, Raquel, Jonilson, Isaura, Klilton Cristiane e Norma pelo convívio e aprendizado, pela ajuda com as coletas de abelhas para realizar esse estudo. Ao Jamil pela ajuda com os desenhos e esquemas e pela amizade.

Aos colegas de *trabalhos* do Centro de Apoio Multidisciplinar, em especial a bióloga Enedina (Dina), ao Jonso, Isabelle, Alessandra. Évelyn, Isabel, Elza, Patrícia, Shayryane, Rogério, André, Roberto Lira, Roberto Bussons, Josué, Hebert, Ângela, Márcia, Gisele, Gabriela, Tiago, Profa Luciana, Profa. Sônia, Profa. Cristina, Prof.Odair e tantos outros pela ajuda e amizade, pelo convívio nesses anos todos.

Aos Professores Doutores Martin Beye e Martin Hasselmann, por gentilmente terem me recebido em seu laboratório na Universidade de Dusseldorf, Alemanha, para a realização de parte dos experimentos e por acolher a mim e minha esposa com toda atenção e cuidado, nunca deixando faltar absolutamente nada.

Ao amigo Nelson. Obrigado pelo convívio, pela sinceridade que é tão importante hoje em dia e pela compreensão. De coração te agradeço por toda a força dispensada a mim, pela torcida que você fez por mim. Como diria RC: você é meu amigo de fé meu irmão camarada!

Ao amigo Lívio “Soares” Figueiredo, pela ajuda imprescindível, pela disposição em me ensinar sobre os mistérios dos computadores, o sistema Linux e o editor de texto Látex, em como toda a sua família, Girlene Soares e Isabela por tanto desprendimento em me ajudar, inclusive aos domingos...

Aos meus alunos e colegas da Universidade Federal do Amazonas e do INPA pela amizade e por tornar o ambiente de trabalho um lugar muito agradável.

A todos os meus familiares por terem tido muita paciência comigo. As minhas irmãs Silvana e Débora e ao meu irmão João Paulo, ao Reinaldo e Leco, pelo suporte e alegria da convivência em família. Ao Sebastião e a dona Neide, por dar todo o suporte necessário no

dia a dia, não medindo esforços em ajudar. A Lia, Walmir, Samuel, Gabriel, Davi, Adriana, Letícia, Júnior, Nissi, Tia Bia, Amerson, Maisa, Asterson, Alderluci e demais membros dessa família linda e que faz meus dias completos.

Ao amigo Danival, pela ajuda em qualquer hora e lugar. Por dar imenso valor a amizade, sabendo realmente o sentido dessa palavra. Um grande abraço Danival!

A inesquecível Gundel que nos hospedou na Alemanha em sua casa com toda amor e que facilitou e em muito nossa vida num país desconhecido.

A minha querida Raquel, pelo amor, paciência e perseverança... por sempre estar comigo nesses dias, me incentivando com amor. Só eu sei o quanto és importante. Pelas palavras de incentivo e força. Por ser a pessoa com o coração mais lindo que conheço, pela gentileza e paixão pela vida, por me fazer muito feliz. Eu te amo!

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na confecção desse trabalho.

As agências financiadoras CNPq, pela bolsa de pesquisa e ao DAAD pela bolsa de pesquisa e passagens para a Alemanha.



## LISTA DE ABREVIações

°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
GPA	Grupo de Pesquisas em Abelhas
H	hora
HJ	Hormônio Juvenil
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
KB	quilobase
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
Min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
ORF	Open Read Frame
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain reaction
Pmol	picomol
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ácido ribonucléico
s	segundo
TA	Temperatura de anelamento
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	Ultra violeta
µg	micrograma
µ	microlitro

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de possíveis resultados de cruzamentos em himenópteros haplodiplóides. Machos nascem de ovos haplóides (não fecundados) e fêmeas de ovos diplóides (fecundados).....19

Figura 2: Distribuição das espécies haplodiplóides dentro do grupo dos Acari e Insecta. As ordens nas quais são encontradas a maioria das espécies com sistema haplodiplóide na determinação de sexo estão em vermelho. Em azul: ordens que possuem haplodiploidia em algumas famílias ou gêneros. Em preto: ordens nas quais não foram identificadas espécies haplodiplóides. Modificada de Evans, Shearman e Oldroyd (2004)..... 20

Figura 3: Esquema de possíveis resultados de cruzamentos dos alelos sexuais hipotéticos x3 e x4. Machos nascem de ovos haplóides (não fecundados) e fêmeas de ovos diplóides (fecundadas) sempre heterozigotos. Em caso de poucos alelos na população, eventualmente podem nascer indivíduos diplóides homozigotos que são machos inviáveis reprodutivamente.....21

Figura 4: Diferentes tipos de determinação de castas entre abelhas com alto nível de eusociabilidade. Da esquerda para a direita: a) destacado com círculo é mostrado uma pupa de aranha de *Apis mellifera*, a qual se encontra em uma célula de cria especial, a realeira. A rainha de *Apis* recebe a partir do terceiro dia de larva um alimento diferenciado (geléia real) das larvas de operárias. Portanto, além de uma quantidade maior de alimento, existe a diferença qualitativa em relação às operárias. B) células de cria de uma abelha do grupo das trigonas (*Meliponini*), na qual se observa a realeira (círculo). Nessas abelhas a quantidade maior de alimento determina o nascimento da rainha. C) em abelhas do gênero *Melipona*, no entanto o mecanismo de determinação de castas é genético - alimentar, há o nascimento de até 25% de rainhas. Na última parte de C encontra-se parte do disco de cria sem a proteção de cera, no qual se pode notar a rainha (em destaque), diferenciada pelo tamanho da cabeça e olhos em relação às operárias.....25

Figura 5: Visão geral da coleta de amostras. A) Meliponário do GPA/INPA. B) Disposição dos discos de cria na colônia de *Melipona compressipes*. C) Disco de cria contendo abelhas em fases imaturas a serem amostradas. D) Retirada de larvas dos alvéolos de cria. E) Fases imaturas utilizadas no experimento (indicadas com seta). O desenho ao centro foi modificado e Camargo e Posey (1990) por Jamil Tannús-Neto.....29

Figura 6: Panorama geral da síntese da extremidade 5'cDNA utilizando-se a técnica RACE. Modificado do protocolo original (RLM RACE kit®, AMBION™).....31

Figura 7: Visão geral do experimento para a síntese de extremidade 3' cDNA a partir da técnica de RACE. Modificado do protocolo original (RLM RACE kit®, AMBION™).....32

Figura 8: Esquema utilizado das reações PCR-RACE pelo KIT RLM-RACE. Modificado do protocolo original (RLM RACE kit, AMBION). Utiliza-se a abordagem de ligação de uma seqüência de oligonucleotídeos de RNA com adaptador (ou seqüência âncora) à extremidade 5' do mRNA mediada pela RNA ligase (RLM – RACE=RNA Ligase Mediated RACE). O mRNA com a daptador é utilizado pela *transcriptase reversa* como molde .....32

Figura 9: Perfil de extração de RNA total de cinco indivíduos na fase de larva L3 pelo método TRIzol® em eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo e visualizado em luz UV.....37

Figura 10: Visualização dos produtos de um dos RACE-PCR das extremidades 5' e 3'. Reações *outer* e *inner*. M= marcador 1kb (Fermentas). 0,5 = cDNA com adaptador diluído 1:2. 0,1 = cDNA com adaptador diluído 1:10. K- = controle negativo (sem cDNA molde). K+ = controle positivo (apenas o iniciador adaptador). Setas vermelhas indicam os *amplicons* escolhidos para nova amplificação e posterior clonagem e seqüenciamento.....38

Figura 11: Perfil eletroforético de *Amplicons* resultantes da PCR de colônias em gel de agarose (1%) corado em brometo de etídeo e visualizando em luz UV. Recombinantes

indicados com a seta foram seqüenciados. M = Marcador 1000bp (Fermentas™).....38

Figura 12: Seqüência total obtida pelo RACE 5' e 3' após análise e edição nos programas StandPackage e Bioedit. A) Seqüência nucleotídica do gene similar ao *fem* de *Apis mellifera* com 1970pb. Região em verde representa a ORF, obtida pelo programa ORFfinder. B) Seqüência de aminoácidos apresentando ORF traduzida com 411 aminoácidos (em vermelho).....39

Figura 13: Esquema dos cinco genes identificados dentro da região de determinação sexual (SDL). Genes estão orientados 5'-3' de acordo com a direção das setas. GB11211, GB13727, GB30480, *fem* e *csd*, são genes prediletos por bioinformática. Apenas *fem* e *csd* foram confirmados por experimentos laboratoriais de RNAi. Modificado de Hasselmann et al. (2008).40

Figura 14: Alinhamento do transcrito de *Melipona compressipes* com a proteína *Fem* de *Apis mellifera* (gi 46276945, utilizando-se o programa BLAST2sequences). É mostrado um índice de 64% de identidade e 75% similaridade (trocas equivalentes)..... 41

Figura 15: Domínios ricos em Arginina-Serina (RS) e Prolina (*Proline Rich Domain*) na seqüência de *Fem-Melipona*. Em amarelo: porção da seqüência com o domínio correspondente à representação gráfica..... 42

Figura 16: Modelo da determinação de castas em abelhas do gênero *Melipona*, sustentada pela hipótese do sistema genético - alimentar proposta por Kerr (1973), sendo dependente da dupla heterozigose dos genes *xa* e *xb* (cada um com dois alelos) (*xa*<sub>1</sub>, *xa*<sub>2</sub> e *xb*<sub>2</sub>, *xb*<sub>2</sub>). Modificado de (KERR, 1973)..... 46

Figura 17: Modelo proposto para a determinação de castas em abelhas do gênero *Melipona*. Em indivíduos diplóides heterozigotos para o gene *csd* há o desenvolvimento de fêmeas, devido à ação do produto do *csd* sobre o gene *fem*, o qual seria expresso e atuaria sobre os genes de casta (*xa* e *xb*). Em fêmeas duplo heterozigotas para os genes de casta o fenótipo esperado é o de rainha (KERR, 1975). Essas ações em casta seriam diferentes em fêmeas que não sejam duplo heterozigotas para os genes de casta, sejam homozigotas

para um dos genes ou duplo homozigotas não estariam sob influência do(s) produto(s) do gene *fem* e, portanto, não haveria ativação da cascata gênica, originando uma operária. Os genes masculinizantes, constitutivos, levariam a masculinização das fêmeas. Em *Melipona*, morfologicamente, operárias são mais similares a machos que às rainhas (KERR, 1997).....49

Figura 18: Modelo proposto da determinação de castas em abelhas do gênero *Melipona*. Nos machos haplóides, a cascata de regulação não seria ativada, uma vez que não haveria o produto completo do *csd* e, por conseguinte a não ativação de *fem* e gene de castas, bem como outros genes feminizantes secundários. Sendo hemizigotos para o *csd*, haveria a expressão exclusiva de genes masculinizantes (que são constitutivos), o que geraria um desenvolvimento normal nesses machos.....50

## LISTAS DE TABELAS

1	Relação de iniciadores ( <i>Primers</i> ) e suas seqüências desenvolvidos e utilizados nas PCRs.....	35
2	Comparação do tipo e número de aminoácidos (AA) para ORF <i>fem</i> em <i>Melipona compressipes</i> e <i>Apis mellifera</i> (gi 46276945).....	43

## RESUMO

A presença de castas entre as fêmeas e um sistema de produção sazonal de machos para renovação da rainha ou fundação de colônias “filhas” é fundamental para a vida em sociedade nas abelhas eusociais. Um sistema peculiar de determinação sexual é encontrado nesses insetos considerados organismos haplodiplóides, no quais, machos viáveis reprodutivamente são haplóides nascidos por partenogêne arrenótica (ovos não fecundados dando origem a machos), enquanto fêmeas são originadas de ovos fecundados. A haplodiploidia tem conseqüências fundamentais para a ecologia populacional e evolução social. A determinação das castas, por sua vez, em abelhas do gênero *Melipona* é sustentada pela hipótese do sistema genético-alimentar proposta por (KERR,1974), sendo dependente da dupla heterozigose, dos genes xa e xb (cada um com dois alelos). O objetivo desse trabalho foi o de seqüenciar genes envolvidos na determinação de sexo e ou castas em abelhas do gênero *Melipona*. Por meio de técnicas de isolamento gênico, utilizando o método de amplificação de extremidades para a obtenção de cDNAs completos (Rapid Amplification of Cdna Ends – RACE). O gene *fem* (*feminizer*) foi clonado e seqüenciado em *M. compressipes* e analisado com o auxílio de ferramentas de bioinformática. Os resultados da análise mostram, que em *Melipona compressipes*, o produto predito do gene tem 64% de identidade e 75% de similaridade com o equivalente (*fem*) em *Apis mellifera*. Possuindo os mesmos domínios ricos em prolina (proline rich domain). Além disso, o gene *fem* é expresso em todos os instares imaturos e inclusive em adultos e igualmente encontrado em cDNAs de machos, operárias e rainhas, mostrando, da mesma forma que em *A. mellifera*, que esse é um gene expresso em todas as fases do desenvolvimento e em ambos sexos e castas, além de ser muito conservado interespecificamente. O gene *fem*, não possui a região hipervariada. Isso, segundo proposta desse trabalho, indicaria outros genes além de *fem* teria funções na ativação dos genes de castas em *Melipona* e dispararia outros genes *feminizantes* em *contra*posição aos genes masculinizantes, esses, por sua vez, constitutivos. É proposto um modelo, que reúne as informações da literatura com a descoberta do gene *fem* em *Melipona*.

## ABSTRACT

The presence of castes among *females* and a system of seasonal production of males in order to found new “daughter” colonies or replace the Queen, is essential to life in society for the high eusocial bees. The haplodiploidy has unique consequences to the populational ecology and social evolution for the social bees. Studies have shown, in depleted populations, that consecutive mating between individuals with equal allele composition for the sex determination gene can cause its extinction. The sex determination genes *csd* (complementary sex determiner) and *fem* (*feminizer*) seems to be at the top of a regulatory cascade in which will originate the different phenotypes, which is indeed an essential way to maintain the eusociability in bees. The sex determination system as well as the several distinct caste determination systems existing among the high eusocial bees are yet poorly understood in their genetic basis and seems to be fairly complex as diverse. The goal of this thesis was to sequence genes involved in the sex or caste determination in the *Melipona* bees. Using the RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) technique, the gene *fem* (*feminizer*) was cloned and sequenced in *M. compressipes* and analysed with help of bioinformatics tools. The analysis show in *Melipona compressipes* that the predicted gene product have 64% of identity and 75% of similarity with its equivalent (*Fem*) in *Apis mellifera*, possessing the same protein domains: Arginine-Serine domain (RS-domain) and proline domain (proline rich domain). The gene *fem* in *M. compressipes* as in *Apis*, do not have hyper variable region which characterizes its paralog gene *csd*. Thus, as this work proposes would indicate that the *fem* product would have function in the activation of genes in *Melipona* switching on other secondary *feminizer* genes in contrast with the masculinizing genes, which are constitutive. We propose a model that put together literature information with the new gene *fem* findings in *Melipona*, aiming a discussion about the regulatory cascade which surpass from the sex determination.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Vida em sociedade

Os Insetos constituem o maior grupo, em número de espécies, descrito, com mais de um milhão. Eles estão na Terra há pelo menos 400 milhões de anos (GRIMALDI; ENGEL, 2005) devido basicamente a cinco características que lhes conferiram sucesso evolutivo entre os seres vivos: a) longevidade de suas linhagens; b) número de espécies; c) diversidade adaptativa; d) biomassa e; e) seu impacto ecológico (GRIMALDI; ENGEL, 2005). Uma grande parte dessas criaturas desenvolveu hábitos sociais que se baseiam na divisão de *trabalho*. Insetos sociais têm atraído a atenção de cientistas desde tempos antigos e, perguntas sobre como complexas sociedades constituída por milhares de diminutas criaturas como abelhas, formigas, vespas ou cupins subsistem e prosperam, bem como o surgimento do comportamento de cooperação para cuidado da cria, forrageamento de defesa, ainda hoje fazem parte das discussões dos estudiosos no assunto. Se levarmos em conta que cada criatura dessas é capaz de executar tarefas no dia a dia que envolvam a complexidade da comunicação, divisão de *trabalho* e uma intensa integração de grupo e que possuem um cérebro com um milionésimo do número de neurônios do nosso, justificaria o estudo minucioso desses seres (WILSON, 2006).

#### 1.1.2. Abelhas eusociais (Hymenoptera: Apoidea)

Existem mais de 20 mil espécies de abelhas cuja ocorrência abrange todo o globo com exceções da Antártida e de regiões muito próximas ao pólo norte que compõe a superfamília Apoidea (MICHENER, 2000). As abelhas formam um grupo monofilético, descendente de vespas esfecóides (Hymenoptera, Aculeata) sendo taxonomicamente, consideradas vespas que em vez de capturarem outros artrópodes como alimento, coletam pólen e néctar diretamente de vegetais para alimentarem sua prole e a si mesmos (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). A maioria das espécies tem hábito solitário, as quais são mais diversificadas em ambientes semi-áridos e temperados (MICHENER, 2000). Aquelas espécies que constituem colônias perenes e apresentam divisão de *trabalho* entre os indivíduos em sua estrutura social além de distintas castas de rainhas e operárias constituem o grupo de abelhas eusociais (KERR, 1996). Abelhas eusociais são mais abundantes em ambientes tropicais e subtropicais (MICHENER, 1979, 2000).

## 1.2. Determinação de sexo

Quanto à determinação de sexo, nas abelhas, machos viáveis reprodutivamente são haplóides nascidos por partenogênese arrenótoca (ovos não fecundados dando origem a machos), enquanto fêmeas são originadas de ovos fecundados (CROZIER, 1977). Machos podem copular mais de uma vez, mas em abelhas do grupo Apinae, a genitália do macho ou pelo menos parte dela é arrancada na cópula, lavando-o a morte logo depois do acasalamento (MICHENER, 2000).

### 1.2.1. Determinação de castas

Em relação às castas, rainhas são fêmeas completas e podem ser copuladas por um ou mais machos conforme a espécie, armazenando os espermatozoides na espermateca e conservando-os por vários anos de acordo com o número de ovos fecundados que irá pôr durante sua vida útil. As operárias também são fêmeas, porém não são férteis e nem copulam com machos. Desenvolvem atividades específicas conforme a faixa etária, durante sua vida, que pode durar algumas dezenas de dias. Algumas funções são executadas dentro da colônia como limpeza, construção de estruturas de cera ou defesa e outras funções desempenhadas fora do ninho, como o forrageamento, para a busca de pólen e néctar em campo aberto. Dependendo da espécie, pode existir desde algumas centenas de operárias em um ninho, chegando até mais de 100 mil indivíduos dentro de uma colônia de *Apis mellifera*, por exemplo (KERR, 19956; MICHENER, 2000).

### 1.3. Abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

As abelhas sem ferrão pertencem à subfamília Apinae e tribo Meliponini, para a qual existe o registro de 52 gêneros com, aproximadamente, 300 espécies com distribuição pantropical. O comportamento eusocial encontrado nas tribos Apini e Meliponini é único entre as abelhas (CAMERON; MARDULYN, 2001).

O gênero *Melipona* (Apidae, Apinae), com ocorrência em toda a região neotropical, é mais diversificado na bacia amazônica, com 35 espécies ocorrendo no Brasil (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). São abelhas robustas com até 35 mm de tamanho; fazem seus ninhos em cavidades preexistentes, geralmente em troncos ocos de árvore, onde

constroem seus discos de cria e mantém seus estoques de alimentos (mel e pólen). Uma das características deste gênero de abelhas é que as rainhas ficam impossibilitadas de alçar vôo, decorrido alguns dias após o acasalamento seu abdômen cresce a tal ponto de suas asas não mais suportarem o peso corporal. Quando um ninho é destruído, portanto, a fuga, desses insetos, para um lugar seguro fica comprometida, sendo que, dentre outros fatores, as rainhas ficam impossibilitadas de “direcionar” a colônia para outro ambiente, como ocorre em *A. mellifera*. Além disso, no surgimento de novas colônias na natureza, operárias do ninho, em divisão, provisionam o novo ninho a partir de recursos da colônia-mãe (KERR, 1987; ROUBIK, 1989; KERR et al.; 2001). Essa relação entre colônia-mãe e colônia-filha não permite que a dispersão populacional seja rápida e a grandes distâncias, sendo comum a presença de “ninhos-irmãos” a distâncias não mais que centenas de metros um do outro (MICHERNER, 1979; CARVALHO-ZILSE; KERR, 2004).

Na Amazônia há uma grande e diversificada flora dependente de insetos para a fecundação cruzada via polinização. Os insetos polinizadores mais abundantes nesse contexto são as abelhas sem ferrão. Segundo Kerr (1994) as abelhas nativas sem ferrão, são responsáveis, conforme o ecossistema, por 40 a 90% da polinização das árvores nativas. Em diversas regiões do país existem espécies já extintas ou em perigo de extinção (KERR, 2002). As espécies mais ameaçadas são as pertencentes ao gênero *Melipona*, visto que são maiores, produzem boa quantidade de mel e, por isso, são comumente predadas (KERR et al.; 2001). Certas espécies de meliponínios tem inclusive sido utilizadas como bioindicadores de áreas sujeitas à degradação pelo homem (LIMA-VERDE; FREITAS, 2002). O principal motivo do desaparecimento dessas abelhas é a redução do número de ninhos devido aos desmatamentos, queimadas e coleta destrutiva das colônias para obtenção de mel. Em relação à predação de ninhos para a coleta do mel, as *Meliponas* são mais vulneráveis ao coletor profissional devido a: 1) ausência de ferrão nessas abelhas; 2) pequena distância entre ninhos e; 3) a impossibilidade de vôo de fuga da colônia como um todo. Ainda mais importante para a manutenção das populações é que a diminuição do número de ninhos significa a redução do número de alelos sexuais do gene de determinação do sexo (*csd*) e conseqüentemente, da variabilidade genética populacional (CARVALHO, 2001), colocando-as em risco de extinção.

#### 1.4. Bases da determinação do sexo em abelhas: haplodiploidia

Em organismos superiores, a diferenciação do sexo não se limita apenas à distinção morfológica de seus pares, ou dimorfismo sexual. Afeta quase todos os aspectos de um organismo, como comportamento, fisiologia e morfologia geral (BEYE et al., 2003). Um sistema peculiar de determinação sexual é encontrado nas abelhas: a haplodiploidia. Ocorre o que se denomina de partenogênese arrenótoca, na qual, em condições normais, os machos originam-se de ovos não fertilizados (haplóides), enquanto fêmeas desenvolvem-se a partir de ovos fertilizados (diplóides) (Figura 1).



Figura 1: Esquema de possíveis resultados de cruzamentos em himenópteros haplodiplóides. Machos nascem de ovos haplóides (não fecundados) e fêmeas de ovos diplóides (fecundados).

O primeiro relato de partenogênese em abelhas foi feito por Dzierzon (1845) em *Apis mellifera* verificando o nascimento de machos a partir de ovos colocados por operárias e, portanto, não fecundados.

Hoje se sabe que esse tipo de determinação sexual é comum entre os Hymenoptera (abelhas, formigas e vespas) além de outras ordens de insetos, como nos Thysanoptera (trips, lacerdinha) e em menor escala nos Coleóptera (besouros) e Homóptera (cochonilhas e pulgões) (BULL, 1983). Além de insetos, outros grupos de Arthropoda, como os Acari (ácaros, carrapatos), tem a haplodiploidia como mecanismo determinante sexual em alguns de seus grupos. Se reunidas, cerca de 20% de todas as espécies de invertebrados seriam haplodiplóides (BULL, 1983; BELL, 1982)(veja figura 2).

A haplodiploidia tem conseqüências fundamentais para a ecologia populacional e evolução social. Nesse tipo de reprodução, machos uniparentais herdam, aleatoriamente, metade do genoma materno, *transmitindo* aos descendentes somente o material genético da mãe, ao passo que, fêmeas herdam genes de origem materna e paterna, podendo *transmitir* ambos para a próxima geração (HAMILTON, 1964; CHARLES WORTH 2004).

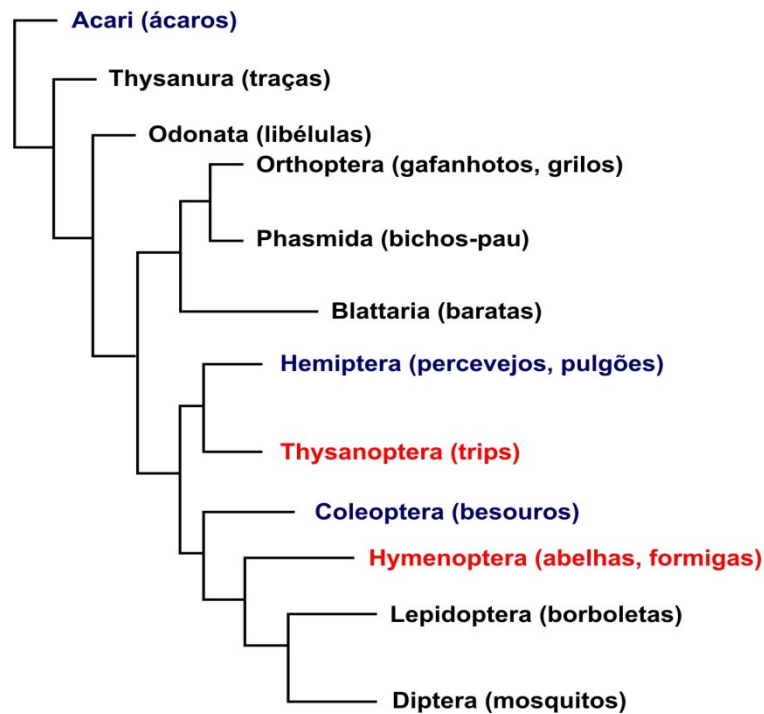


Figura 1: Distribuição das espécies haplodiplóides dentro do grupo dos Acari e Insecta. As ordens nas quais são encontradas a maioria das espécies com sistema haplodiplóide na determinação de sexo estão em vermelho. Em azul: ordens que possuem haplodiploidia em algumas famílias ou gêneros. Em preto: ordens nas quais não foram identificadas espécies haplodiplóides. Modificada de Evans, Shearman e Oldroyd (2004).

#### 1.4.1. Mecanismo genético complementar envolvido na determinação do sexo em himenópteros

Whiting (1933) foi o primeiro a propor um mecanismo de determinação complementar do sexo (*CSD*) nos Hymenoptera. Baseado na ocorrência regular de machos diplóides quando do cruzamento entre linhagens aparentadas de *Bracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) ele e seus colaboradores, propuseram a existência de múltiplos alelos em um único *locus* sexual que segregaria em populações, nas quais as fêmeas são sempre heterozigotas, enquanto indivíduos hemizigotos ou homozigotos, para este gene

sexual, são machos (WIHITING, 1943). Kerr (1987) propôs que esse *locus* multialélico tenha se originado por mutações sucessivas, de maneira que os indivíduos haplóides são sempre machos e os indivíduos diplóides fêmeas.

#### 1.4.2. Conseqüências do sistema complementar de determinação do sexo (CSD)

A heterozigose do gene que determina o sexo leva ao desenvolvimento de fêmeas enquanto a hemizigose produz machos haplóides normais e a homozigose induz o aparecimento de machos diplóides os quais, em algumas espécies, produzem células espermáticas inviáveis ou dão origem a machos com limitações morfológicas para a cópula, sendo, portanto, efetivamente estéreis (NAITO; SUZUKI, 1991) (Figura 3).

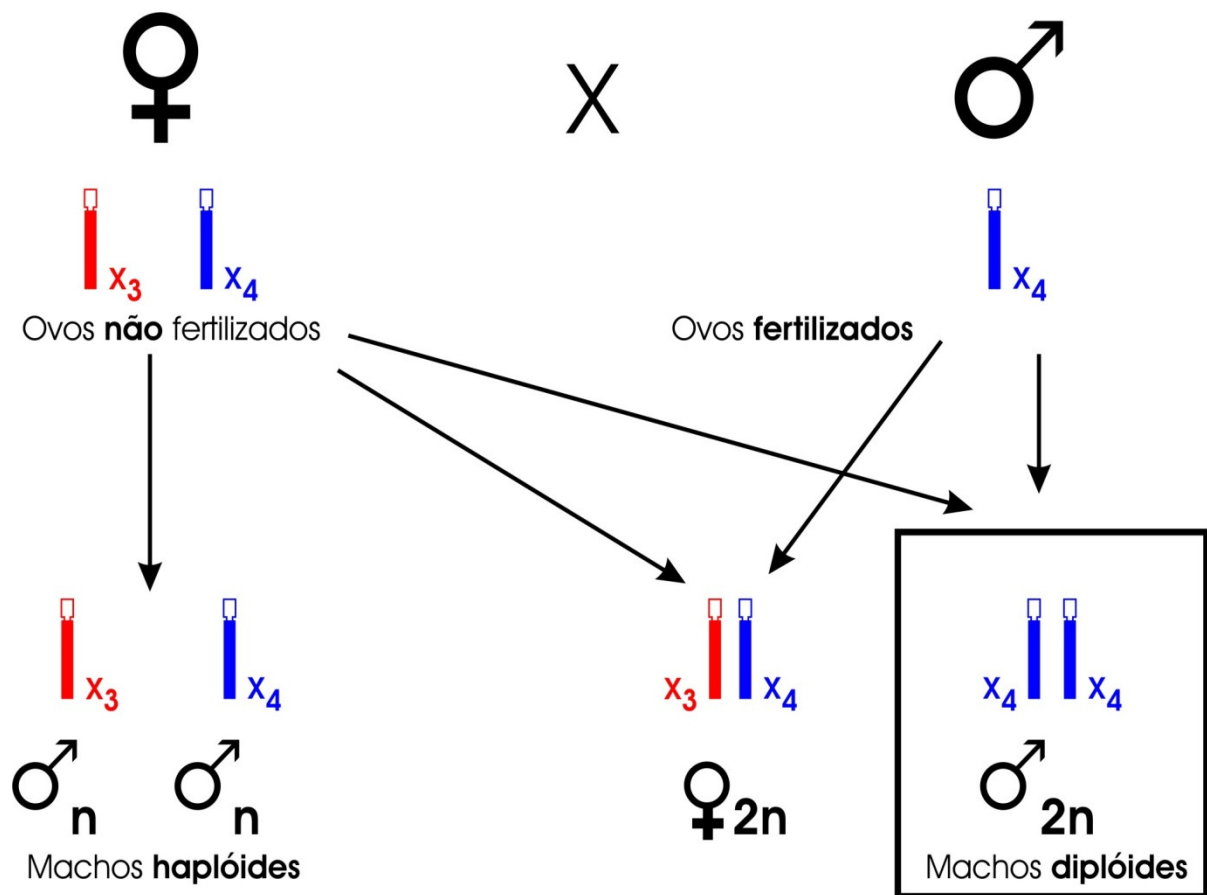


Figura 2: Esquema de possíveis resultados de cruzamentos dos alelos sexuais hipotéticos  $x_3$  e  $x_4$ . Machos nascem de ovos haplóides (não fecundados) e fêmeas de ovos diplóides (fecundadas) sempre heterozigotos. Em caso de poucos alelos na população, eventualmente podem nascer indivíduos diplóides homozigotos que são machos inviáveis reprodutivamente.

A presença de machos diplóides tem sido relatada em muitas espécies de himenoptera (revisão em Cook (1993) e Kerr (1997)). Em algumas espécies de vespas, o tamanho exagerado do corpo faz com que machos diplóides não tenham sucesso na cópula (Naito e Suzuki (1991) citado por Cook e Crozier (1995)) e, em alguns grupos, esses indivíduos nascem com o aparelho reprodutor defeituoso (COOK; CROZIER, 1995). Em *Apis mellifera*, o modelo mais estudado até então, quando machos diplóides são produzidos por endocruzamentos, são mortos ainda na fase larval, por operárias (WOYKE, 1980). Fato semelhante ocorre em abelhas do gênero *Melipona*, nas quais, os machos diplóides são mortos pelas operárias ao nascerem (KERR, 1996; CARVALHO; KERR; NASCIMENTO, 1995; CARVALHO, 2001).

A letalidade da diploidia, em machos, mostra a existência de uma pressão seletiva para o aumento do número de alelos funcionais do gene *csd* distintos nesses insetos (CHARLES WORTH, 2004). Essa pressão para fazer com que o sistema seja altamente polimórfico é similar ao *locus* de auto-incompatibilidade em fanerógamas e alguns fungos, no qual um grande número de alelos coexiste e cruzamentos ocorrem apenas entre indivíduos carregando alelos diferentes (HASSELMANN; BEYE, 2006).

Yokoyama e Nei (1979) constataram que o número de alelos do gene *csd* (antes denominado *xo*) que permanece em uma população de himenópteros varia conforme seu tamanho. Sendo assim, um fator importante é a quantidade de colônias que devem ser mantidas na área de reprodução das abelhas (CARVALHO; KERR; NASCIMENTO, 1995).

Mackensen (1955); Laidlaw, Gomes e Kerr (1956); e Adams et al. (1977) estimaram entre 11 a 17 o número de alelos sexuais diferentes segregantes em populações de *A. mellifera*. Kerr (1997) estimou, aproximadamente, 20 alelos presentes em *M. compressipes fasciculata* e em *M. scutellaris* foram estimados 36 alelos (CARVALHO, 2001). Um mínimo de seis alelos neste *locus* seria necessário para viabilizar as populações panmíticas de muitas espécies de Hymenoptera segundo proposto por Woyke (1980). Kerr e Vencovsky (1982) estimaram que com menos de 44 colônias de *Melipona*, em uma área de cruzamento (aproximadamente 1200 metros de raio, segundo Carvalho (2001), não há diversidade de alelos sexuais suficientes (>6 alelos) para manutenção da população.

Estudos com *M. scutellaris* demonstraram que, em populações reduzidas, acasalamentos consecutivos entre indivíduos com mesmo alelo *csd* podem acarretar sua eliminação (CARVALHO, 2001). Portanto, o equilíbrio no número de alelos sexuais aumenta com o tamanho populacional (YOKOYAMA; NEI, 1979), promovendo o decréscimo no nascimento de machos diplóides e conseqüente sustentação populacional (KERR; VENCovsky, 1982; CARVALHO, 2001).

#### 1.4.3. Estudos moleculares do gene de determinação do sexo

O *locus* de determinação complementar do sexo foi caracterizado molecularmente em *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae) por Beye e colaboradores em 2003. Mapeando uma região entre dois marcadores que co-segregam com a produção de machos diplóides, esses autores identificaram uma região com aproximadamente 13kb, denominada Sex Determination Locus – SDL, que é sempre heterozigoto nas fêmeas nascidas de endocruzamentos controlados (BEYE et al., 1999). Após resultados obtidos em embriões de 0-30 horas de idade, com iniciadores desenvolvidos dentro dessa região, um *transcrito* de aproximadamente 1,5kb foi identificado e denominado gene *csd*. Análises posteriores confirmaram que o *locus* total apresenta 9,3kb e contém nove exons, que codificam uma proteína de aproximadamente 400 aminoácidos (HASSELMANN; BEYE, 2004). A maior evidência que o *csd* é o sinal primário determinante do sexo veio da repressão de sua expressão (BEYE et al., 2003). A micro-injeção de RNA dupla fita de *csd* em ovos fertilizados transformou fêmeas genéticas, em machos. Por sua vez, larvas de machos que foram injetados com o mesmo RNA dupla fita não foram afetadas, indicando que a função do *csd* não seria requerida para o desenvolvimento de zangões (BEYE et al, 2003).

Hasselmann e Beye (2004) determinaram que em *A. mellifera*, a seqüência protéica correspondente a 16 alelos *csd* (era esperado, nessa espécie, entre 11 e 17 alelos por análise de progênie segundo Adams et al., 1977). As diferenças alélicas do *csd*, tanto em tamanho quanto na composição, são enormes, sendo identificados alelos com ORFs (*Open Reading Frames*) que codificam até 411 aminoácidos. Apesar das regiões amino-terminais serem 70,3% idênticas nas seqüências, os domínios de arginina-serina e de prolina foram apenas 40,7% idênticos, com várias inserções e/ou deleções específicas entre proteínas. Comparações também mostram um grande grau de variação entre alelos. Essa alta distinção é também vista em *loci* de auto-incompatibilidade (self-incompatibility - SI) em



plantas (CHALESWORTH, 2003) sugerindo que, semelhantes aos *loci* SI, o *csd* está sob forte seleção para manutenção do polimorfismo na população.

As bases genéticas da determinação de sexo em organismos haplodiplóides ainda são pouco entendidas e parecem ser tanto complexas quanto diversas (BELL, 1982; COOK, 1993). Contudo, com as técnicas avançadas de biologia molecular, algumas respostas sobre a intrigante evolução da haplodiploidia nos Hymenoptera podem ser mais detalhadamente estudadas.

### 1.5. Determinação de castas em abelhas

Segundo Evans (2000) os papéis reprodutivos dos membros de uma colônia seriam freqüentemente fixados por eventos que ocorrem durante o desenvolvimento larval e, um entendimento dos mecanismos bioquímico e genético de determinação de castas permitiria testar vários modelos para se entender a evolução e a manutenção da vida em sociedade.

A determinação da casta, fator essencial para a manutenção da eusociabilidade nas abelhas, é determinada por vias bioquímicas durante o seu desenvolvimento, reguladas pela expressão gênica, capaz de gerar dois fenótipos alternativos: operária (fêmea estéril) ou rainha (fêmea completa) (EVANS, 2000). Tal fenômeno é chamado de plasticidade fenotípica, sendo mais precisamente nesse caso denominado polifenismo, o qual é a capacidade de organismos com o mesmo genoma se desenvolverem distintamente em dois ou mais fenótipos alternativos sem intermediários (JUDICE et al., 2007). São encontrados distintos mecanismos de determinação de castas entre as abelhas com alto nível de eusociabilidade (KERR, 1946, 1948; MICHENER, 1979), que podem ser classificados em três diferentes modos segundo recente revisão sobre o assunto em Hartfelder et al. (2006) (Figura 4). Contudo, apesar de muitos estudos sobre o assunto, um dos grandes desafios sobre a determinação de castas é a explicação de sua intrincada cascata regulatória, especialmente em abelhas do gênero *Melipona*.

---

### 1.6. Determinação do sexo e castas e suas implicações ecológicas

Alguns grupos de insetos sociais estão ameaçados pelo declínio de suas populações, motivando pesquisadores, conservacionistas e até mesmo o poder público, a darem uma atenção mais direcionada a estes representantes da nossa fauna.

Preocupações essas que culminaram no reconhecimento formal da Declaração de São Paulo e na Iniciativa Internacional de Conservação e Sustentabilidade do Uso de Polinizadores ([www..webbee.org.br/bpi/pdfs/declaration\\_pollinators.pdf](http://www.webbee.org.br/bpi/pdfs/declaration_pollinators.pdf)). A diversidade biológica aliada a uma fisiologia distinta faz das abelhas sem ferrão uma rica fonte de informação sobre a evolução da plasticidade social nos Hymenoptera (HARTFELDER et al., 2006) (Figura 4).

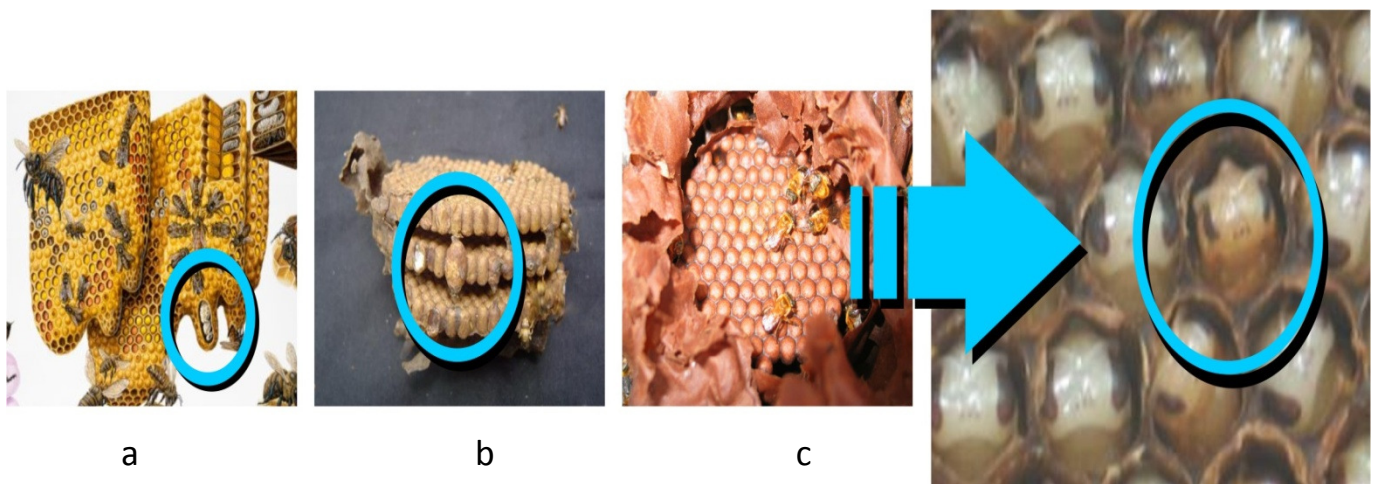


Figura 3: Diferentes tipos de determinação de castas entre abelhas com alto nível de eusociabilidade. Da esquerda para a direita: a) destacado com círculo é mostrado uma pupa de rainha de *Apis mellifera*, a qual se encontra em uma célula de cria especial, a realeira. A rainha de *Apis* recebe a partir do terceiro dia de larva um alimento diferenciado (geléia real) das larvas de operárias. Portanto, além de uma quantidade maior de alimento, existe a diferença qualitativa em relação às operárias. B) células de cria de uma abelha do grupo das trigonas (Meliponini), na qual se observa a realeira (círculo). Nessas abelhas a quantidade maior de alimento determina o nascimento da rainha. C) em abelhas do gênero *Melipona*, no entanto o mecanismo de determinação de castas é genético - alimentar, há o nascimento de até 25% de rainhas. Na última parte de C encontra-se parte do disco de cria sem a proteção de cera, no qual se pode notar a rainha (em destaque), diferenciada pelo tamanho da cabeça e olhos em relação às operárias.

Grupos de Hymenoptera sociais fazem parte da chamada fauna bioindicadora de ecossistema, por causa de sua importância ecológica (MATHESON et al., 1996; ALLEN WARDELL et al., 1998). Qualquer perda da biodiversidade é uma questão preocupação pública, porém perdas de insetos polinizadores podem se tornar um problema em particular uma vez que estão diretamente envolvidos na reprodução das plantas e produção de alimentos. Muitas espécies exploradas na agricultura e populações nativas de plantas dependem da polinização que é realizada por comunidades de polinizadores silvestres, tais como as abelhas sem ferrão. O mecanismo de determinação sexual (*CSD*) das abelhas nativas brasileiras influi diretamente na estabilidade das populações desses insetos em nossas matas ou criadouros (CARVALHO, 2001). O gene *csd* nos himenópteros haplodiplóides funciona de maneira similar ao mecanismo de auto-incompatibilidade em vegetais (CHARLESWORTH, 2004), o qual reduz a viabilidade da população em pequenas comunidades isoladas de plantas. Contudo, as diferenças entre os dois sistemas sugerem que no mecanismo *CSD*, nos haplodiplóides, os efeitos podem ser ainda mais danosos do que no mecanismo de auto-incompatibilidade em plantas. Primeiro, porque as estimativas para o número de alelos de auto-incompatibilidade são bem maiores do que os encontrados em populações de haplodiplóides. Em segundo lugar, e mais importante, a auto-incompatibilidade em plantas é, geralmente, pré-zigótica, resultando na perda de gametas, enquanto no *sl-CSD*, em organismo haplodiplóides, acarreta a perda da progênie (ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004). Em *Melipona* este mecanismo pode ser ainda mais agravado pelo fato de suas rainhas cruzarem, na maioria das vezes com um a poucos machos (PAXTON et al., 1999; CARVALHO, 2001). O *csd* em meliponíneos, assim como seu sistema de determinação de castas, vem há décadas sendo estudado por Kerr e colaboradores (KERR, 1946, 1987, 1997; BONETTI; KERR, 1987; CAMPOS, 1975) e mostram-se relacionados numa intrincada cascata regulatória temporal e sensível a condição alimentares e hormonais. A possibilidade de um *screening* molecular com técnicas mais recentes sobre a (s) região (ões) gênica(s) envolvida(s) neste(s) mecanismo(s) é o desafio desse trabalho e seus subseqüentes. Pesquisas sobre os mecanismos genéticos de determinação do sexo, além das condições demográficas e estrutura populacional em himenópteros sociais, continuam pouco exploradas, porém se faz necessário dado ao fato de que abelhas, vespas e formigas estão incluídos no grupo de insetos que mais contribuem beneficemente à Terra, provendo serviços cruciais aos ecossistemas, como a polinização. A extinção dessas espécies poderá impactar grandemente variados ecossistemas e setores da economia.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Isolar o gene *fem* em *Melipona compressipes*.

### 2.2. Específicos

Determinar e analisar a seqüência nucleotídica da região gênica envolvida na determinação de sexo e casta em *M. Compressipes*;

Analisar a seqüência de aminoácidos da ORF, identificando os domínios protéicos;

Propor um modelo do mecanismo interrelacionando determinação do sexo e casta em *Melipona compressipes*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta de amostras

Foram coletadas larvas, nos estádios L1, L2 e L3 (1º, 2º e 3º estádios, respectivamente), bem como pupas e adultos, machos e fêmeas (rainha e operárias) de *Melipona compressipes* originárias do Meliponário do GPA (Grupo de Pesquisas em Abelhas), localizado no Campus sede do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), Manaus, Amazonas. Larvas e pupas foram retiradas dos alvéolos de cria com auxílio de pinça de procedimento, colocadas em microtubos e acondicionadas em *ultrafreezer*  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posterior utilização, adultos foram coletados diretamente de diferentes colônias (Figura 5).

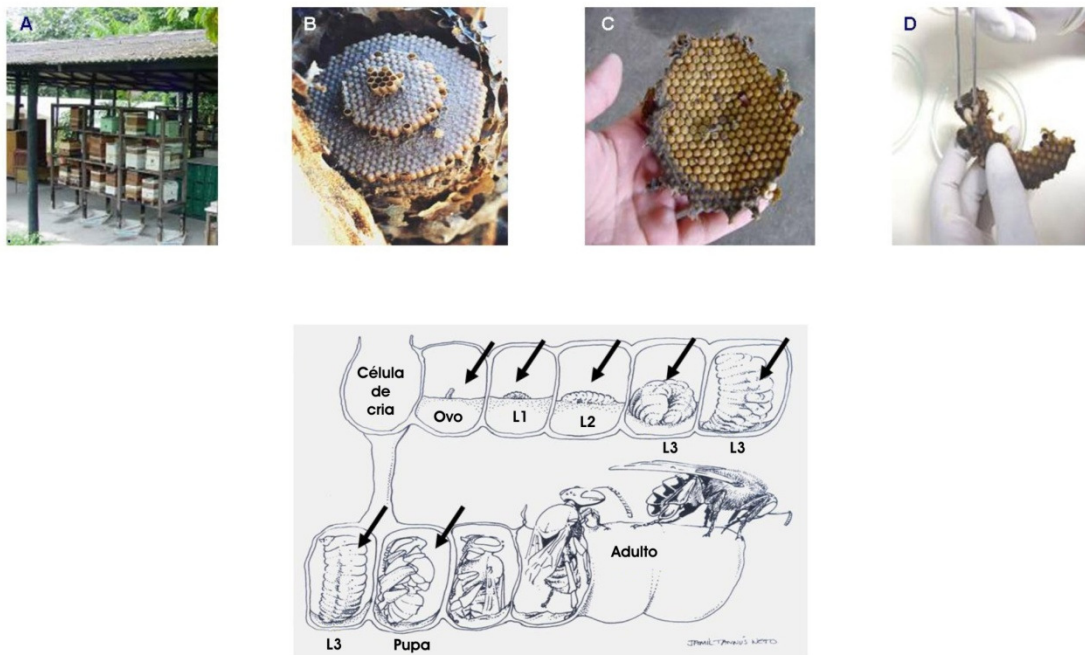


Figura 4: Visão geral da coleta de amostras. A) Meliponário do GPA/INPA. B) Disposição dos discos de cria na colônia de *Melipona compressipes*. C) Disco de cria contendo abelhas em fases imaturas a serem amostradas. D) Retirada de larvas dos alvéolos de cria. E) Fases imaturas utilizadas no experimento (indicadas com seta). O desenho ao centro foi modificado e Camargo e Posey (1990) por Jamil Tannús-Neto.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Extração de RNA total de fases imaturas

Larvas de *M. compressipes* foram maceradas, individualmente, em nitrogênio líquido. Para a extração do RNA total adicionou-se 1,0 mL de TRIzol REAGENT® (INVITROGEN™) para cada 100mg de tecido macerado. A partir desta etapa, seguiu-se o protocolo do fabricante até a remoção de proteínas e DNA e obtenção de RNA total precipitado. A quantidade de RNA total para cada amostra foi determinada por espectrofotometria (UV/VIS Spectrometer® Lambda 11, PERKIN ELMER™) em comprimento de onda de 260 nm. Alíquotas das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (MERCK™) a 1% e coradas com 1 µL de brometo de etídeo (10mg/mL), para a análise da qualidade do RNA.

### 3.2.2. Isolamento do mRNA

O mRNA de *M. compressipes*, em suas respectivas fases de desenvolvimento, foi isolado pelo sistema Dynabeds® mRNA Purification KIT (DYNAL BIOTECH™) a partir do RNA total extraído na etapa anterior. Utilizou-se o RNA com menor degradação para o procedimento e seguiram-se as instruções do fabricante.

## 3.3. RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Em prosseguimento, foi desenhado um par de iniciadores baseados na seqüência nucleotídica do gene *csd-like* de *Melipona compressipes* (acesso no *Genbank*: DQ344619) previamente descrito por Nunes-Silva (2004). Os oligo-nucleotídeos foram sintetizados pelo programa do *software* Oligo properties, no endereço eletrônico <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>. Para os experimentos de cDNA-RACE foram utilizados o First choice RACE kit® (Ambion™) (Figura 6). Duas PCRs são, realizadas para a obtenção de extremidades completas do cDNA (esquemático na Figura 7).

As condições para as gerações de PCR na síntese do cRNA-RACE, tanto para a amplificação da extremidade 5' quanto 3' seguem conforme o protocolo de reação abaixo.

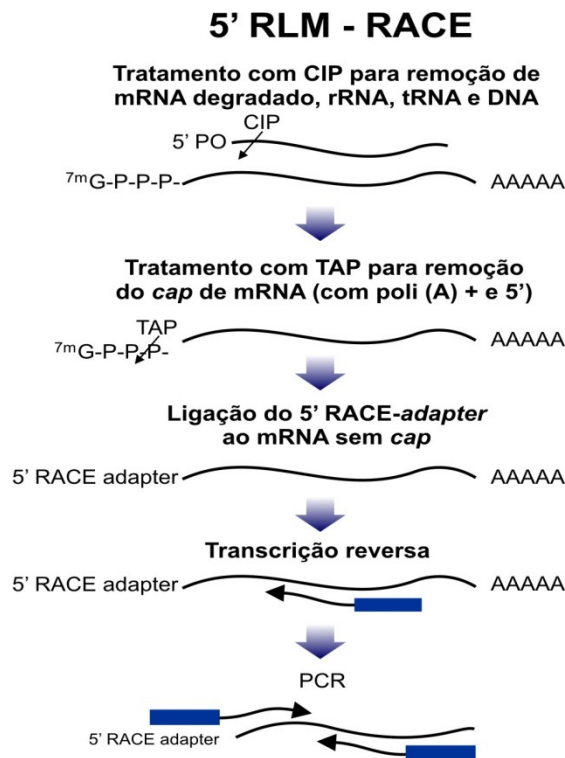


Figura 5: Panorama geral da síntese da extremidade 5'cDNA utilizando-se a técnica RACE. Modificado do protocolo original (RLM RACE kit<sup>®</sup>, AMBION<sup>™</sup>).

1<sup>o</sup> PCR (RACE *outer* iniciadores) – 94<sup>o</sup> C por 2min., 35 ciclos em: 94<sup>o</sup>C por 30s, TA (temperatura de anelamento) por 40s, 72<sup>o</sup>C por 1min. E 40s. 72<sup>o</sup>C por 5min. e 10<sup>o</sup>C pausa.

2<sup>o</sup> PCR (RACE *outer* iniciadores) – 94<sup>o</sup>C por 2min., 25 ciclos em: 94<sup>o</sup>C por 30s, TA por 30s, 72<sup>o</sup> por 1min. e 40s. 72<sup>o</sup>C por mim. 10<sup>o</sup>C pausa.

Para a amplificação da região 5' e 3', além dos iniciadores fornecidos pela fabricante do kit, foram desenhados e utilizados dois iniciadores, sendo 5RACE\_Melip2: ATCTC-CACTgCgTgATATTCTCg; 5RACE\_Melip1: gAACgTgACCACTTTCAAATCTCC para a extremidade 5' e Mel\_End3Race\_1: CagCgAACATggAgTAgAgAATCTC; Mel\_End3Race\_2: gTgAAAgAgATAggTCTAgAgAgC para extremidade 3'.

Para o 3' RACE é necessário a geração da primeira fita da cDNA, a qual é amplificada por PCR em duas etapas nas quais se utiliza um par de oligos iniciadores para amplificação das regiões mais a extremidade do cDNA (*outer* iniciadores) e em seguida um nested PCR com indicadores que garantam a amplificação da porção interna da seqüência

(inner iniciadores). Para tal é necessário um oligo específico na extremidade 3' e um oligo que anele que anele na seqüência com adaptador (extremidade 5'). Duas PCRs são então realizados conforme a esquematizado na figura 7.

## 3' RACE

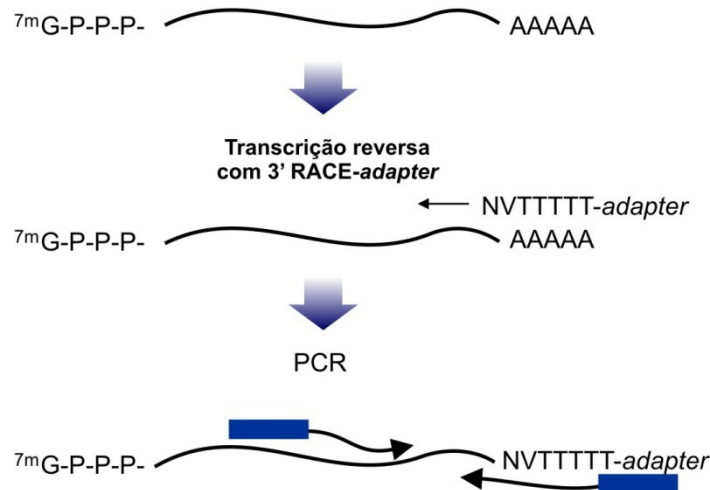


Figura 6: Visão geral do experimento para a síntese de extremidade 3' cDNA a partir da técnica de RACE. Modificado do protocolo original (RLM RACE kit®, AMBION™).

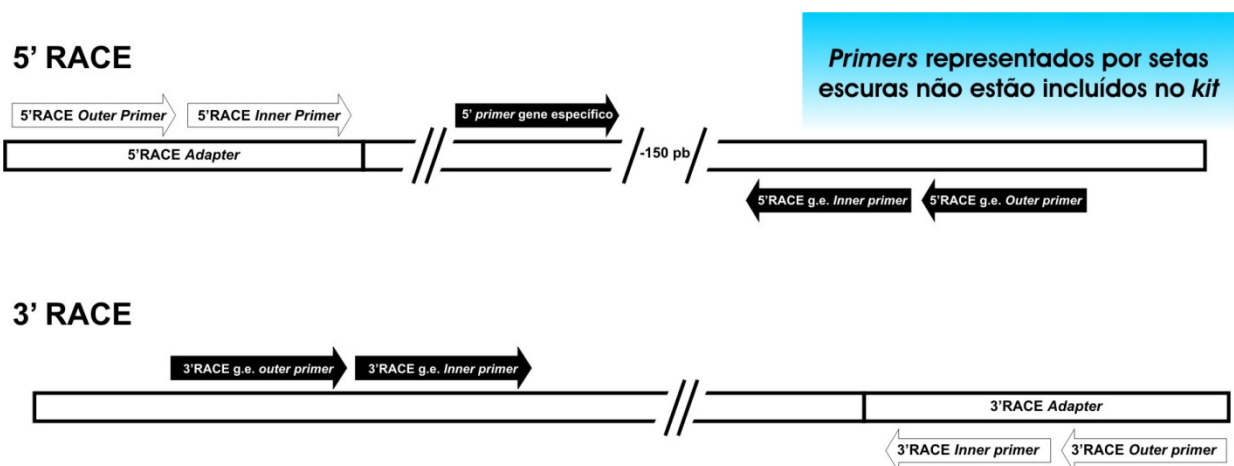


Figura 7: Esquema utilizado das reações PCR-RACE pelo KIT RLM-RACE. Modificado do protocolo original (RLM RACE kit, AMBION). Utiliza-se a abordagem de ligação de uma seqüência de oligonucleotídeos de RNA com adaptador (ou seqüência âncora) à extremidade 5' do mRNA mediada pela RNA ligase (RLM – RACE=RNA Ligase Mediated RACE). O mRNA com a daptador é utilizado pela transcriptase reversa como molde .



Os fragmentos amplificados, do sistema cDNA-RACE, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (MERCK™) a 1% e coradas com 1 µL de brometo de etídeo (10mg/mL). Após a visualização em *transluminador* de luz UV, as bandas resultantes foram excisadas do gel para posterior eluição dos fragmentos utilizando-se o Perfect prep® gel Cleanup kit (INVITROGEM™) para um volume final de 50µL em água miliQ.

A quantificação do DNA eluído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose (MERCK™) a 1% e corada com 1 µL de brometo de etídeo, utilizando-se 5µL da amostra, comparada com 5µL de 50ng/ de marcador *Hind* III. Em alguns casos houve necessidade de *concentrar* o DNA para as subseqüentes aplicações de clonagem molecular. A *concentração* foi realizada em centrífuga de secagem a vácuo (*speedy vacuum*) a 4000rpm por mim., a 42°C. A faixa entre 15 a 20ng/µL de DNA foi considerada satisfatória para as etapas posteriores.

### 3.4. Clonagem dos segmentos amplificados

Para a ligação de fragmentos provenientes da eluição ao vetor, foi utilizado: 3µL do DNA (excisado e eluído), 1µL de vetor pGemTeasy® (Promega™), além de 1µL de DNA ligase (400 U) e 5µL de tampão 2X de DNA ligase, durante a noite, sob temperatura constante de 16°C.

A transformação bacteriana foi realizada utilizando-se células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (DH5α) submetidas a choque térmico de 42°C por 45 segundos. Acrescentou-se 900µL de meio SOC ao sistema de *transformação*, seguido de 1h de crescimento em incubadora a 37°C com agitação constante de 180 rpm. Após o crescimento das colônias, procedeu-se o plaqueamento das mesmas em meio LB sólido, vertido anteriormente em placas de Petri, contendo ampicilina (*concentração* de 100mg/mL). Após o plaqueamento as colônias foram incubadas durante a noite a 37°C.

#### 3.4.1. Identificação de clones recombinantes por PCR de colônias

Após incubação, colônias foram escolhidas aleatoriamente de cada placa para checagem da presença de *transformantes* recombinantes, via PCR, para a qual se utilizou os mesmos iniciadores que deram origem ao fragmento clonado correspondente.

Para a PCR de cada colônia formada retirou-se um pouco de material (das colônias), utilizando-se palitos descartáveis, e introduzindo-o no mix da reação, servindo como fonte de DNA molde para a mesma.

As condições da PCR foram: 94°C por 2min., 35 ciclos em: 94°C por 30s, TA especificada pelos iniciadores por 40s, 72°C por 1min. e 40s., 72°C por 5min. e 10°C pausa. Após a reação o resultado foi verificado em eletroforese em gel de agarose (MERCK™) a 1% e coradas com 1 µL de brometo de etídeo e foi visualizado em *transluminador* de luz UV. As colônias das quais se obteve fragmentos do tamanho esperado foram colocadas para crescimento em 4mL de meio LB líquido por 16h a 37°C para posterior *extração* dos plasmídeos recombinantes.

#### 3.4.2. Extração de plasmídeos

Células de *E. coli* contidas em 4mL de meio LB foram coletadas por centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm à temperatura ambiente. O processo de *extração* foi realizado seguindo o protocolo do Gen Elut HP® Plasmid Miniprep KIT (Sigma™), conforme a orientação do fabricante. O DNA plasmidial *extraído*, foi quantificado em espectrofotômetro. De acordo com a *concentração*, determinou-se o volume do material a ser enviado para o seqüenciamento, o qual deveria conter no mínimo 800ng de DNA.

#### 3.5. Seqüenciamento

Plasmídeos com os insertos foram seqüenciados por Mwgbitech™ (Ebersberg, Alemanha). Os iniciadores utilizados foram SP6 (*reverse*) e T7 (*forward*). O uso de ambos os iniciadores T7 e SP6 para um mesmo fragmento, só foi utilizado no caso de fragmentos acima de 1Kb.

#### 3.6. Análise das seqüências por ferramentas de bioinformática

As seqüências válidas originadas foram montadas utilizando-se o programa STADEN PACKAGE® versão 4.6. O alinhamento das seqüências foi realizado com programa BIOEDIT® versão 5.0.9, utilizando-se a ferramenta ClustalW. Um conjunto de ferramentas foi utilizado acessando-se o site do NCBI (National Centre for Biotechnological

Information) no endereço eletrônico [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), as quais são: BLAST2seq para alinhamento de duas seqüências; BLASTx e BLASTp para busca de seqüências homólogas e ORFfinder para predição de ORFs.

### 3.7. Amplificação de regiões não contempladas pelo RACE por meio de PCRs

Novos oligos foram desenvolvidos, baseados na informação do seqüenciamento dos clones, dos quais, foram identificados três seqüências de diferentes *contigs* da região 5' e cinco *contigs* da região 3', com o objetivo de se obter cDNAs mais completos possíveis. Os iniciadores foram desenhados no programa "Oligo properties calculator" <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> e, ocasionalmente, baseados em alinhamentos de regiões conservadas de alelos do gene (heterólogo) de determinação sexual (*csd*) de *A. mellifera* editados no programa BIOEDIT. Na tabela 1 encontram-se os iniciadores (*Primer*) nessa etapa.

<i>Primer</i>	Sequencia (5'-3')
Melip_rv	gAgCACgACgTATTTTCATACTC
FCRCON1	gATTTAaggCAACgAAgAAgATTTCA
NCRCON2	TATgTCTACAgATTTgACgACgAgAAg
SCRCON1	ATTAATCTTCgTgCATATgAAgTT
NCRCON3	TTACCgCAAATTATAAAACgCTC
Fwgreen_var	ACCgCAAATTATAAAACgCTCAAg
J1_3out_rev	ggAATCATCTTCCTAgTTgAg
J1_3in_rev	TTCTCATgACCTggACATCTTC
Meli1int_fw	AgAAgTTgCAgT(Ag)gAgATAgA
Meli2int_fw	CgTTATTC(CT)CgTTCAAgAgAACgA
Meli1int_rev	TCgTTCTCTTgAACg(Ag)gAATAACg
Meli2int_rev	AACAggAACAATTTg(CT)TCAA
Mel_intrev4	TCgATATTCTCgATAAgAATTTTCA
Meli_intrev5	AggAATAAATCgTggTggAAATg
Mel_intfor3	ACgAg(AC)TATT(Ag)TCAATCCTgAAgA
Mel_intrev3	ggAgATgACAAATATTCTTgTTC
Meli_intspez1_fw	CTTgACAATTTCAgTCATTCAgTgA
Meli_intspez2_fw	gAACTCAAATATgAACTCAACTAggA
Meli_newSeqfw1	TTgCTTTTAgAATgCTTgCATgT
Meli_newSeqfw2	TCTTTCAAATATAggTTTggATC
Melipo_consrev3e	ATCATgAATTgAATCTACTTCgCT
Melip_intspezrev1	TTgAATATTTCTTCACTgAATgACTg
Melip_intspezrev2	ATgACTgAAATTgTCAAgTAATTATAg

Tabela 1: Relação de iniciadores (*Primers*) e suas seqüências desenvolvidas e utilizadas nas PCRs.

Essas amplificações foram realizadas utilizando-se RNA de pupas, as quais se pode distinguir o sexo ou a casta visualmente. Os cDNAs foram sintetizados por meio do Reverse minus H cDNA synthesis KIT<sup>®</sup> mRNA Purification KIT (DYNAL BIOTECH<sup>™</sup>), ambos seguindo o protocolo do fabricante. Eventualmente utilizou-se DNA de machos e fêmeas como molde para observação do perfil de amplificação de DNA genômico. Os *amplicons* com melhores perfis foram submetidos às mesmas etapas anteriores: excisão de bandas do gel, clonagem, seqüenciamento e edição em computador.

### 3.8. Busca de motivos e domínios protéicos

Se considerarmos as seqüências protéicas como “sentenças” da linguagem biológica, sendo os aminoácidos o alfabeto, então, as seqüências-motivo, que fazem parte da cadeia primária das proteínas, poderiam ser consideradas como palavras ou frases dessa linguagem. Portanto, determinar a função de uma seqüência-motivo nessa linguagem é equivalente a determinar o sentido de uma palavra. A identificação de seqüências-motivo tem sido uma tarefa fundamental para a predição de funções de proteínas e originaram vários bancos de dados para esses padrões como PROSITE, BLOCKS, SMART, PRODOM, PIR, Pfam, dentre outros. Esses bancos de dados são construídos baseados nos estudos de seqüências protéicas conhecidas por terem funções no metabolismo, tanto de eucariotos quanto de procariotos. Para a análise de proteína foi realizada a *tradução* da seqüência de nucleotídeos da ORF pelo programa *Transeeq* ([www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/](http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/)). A seqüência de aminoácidos foi analisada por um *pipeline* que proporcionou buscas de motivos e domínios protéicos em três bancos: sistema INTERPRO ([www.ebi.uk/interpro](http://www.ebi.uk/interpro)), PROSITE ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) e o Pfam ([www.sanger.ac.uk/Sfware/Pfam](http://www.sanger.ac.uk/Sfware/Pfam)). Para a análise de domínios protéicos da seqüência isolada, utilizou-se ferramenta de busca PROSITE ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extração de RNA total e isolamento de mRNA

As amostras que apresentaram a menor degradação pela visualização em gel de agarose 1% (Figura 9) foram quantificadas em espectrofotômetro UV. O RNA total utilizado para o prosseguimento do protocolo foi o de larva de estágio L3, do qual se obteve 930ng em uma eluição de volume total de 100 $\mu$ L. A qualidade do cDNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose a 1% e coradas com brometo de etídeo.

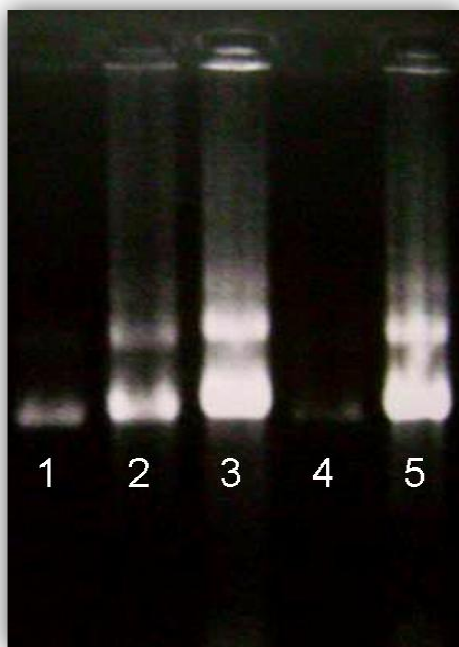


Figura 8: Perfil de extração de RNA total de cinco indivíduos na fase de larva L3 pelo método TRIzol<sup>®</sup> em eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo e visualizado em luz UV.

### 4.2. Etapas de RACE, clonagem e seqüenciamento

Após a amplificação, os respectivos produtos foram re-submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em brometo de etídeo, para logo em seguida, serem excisados do gel para eluição dando seqüência ao passo de clonagem.

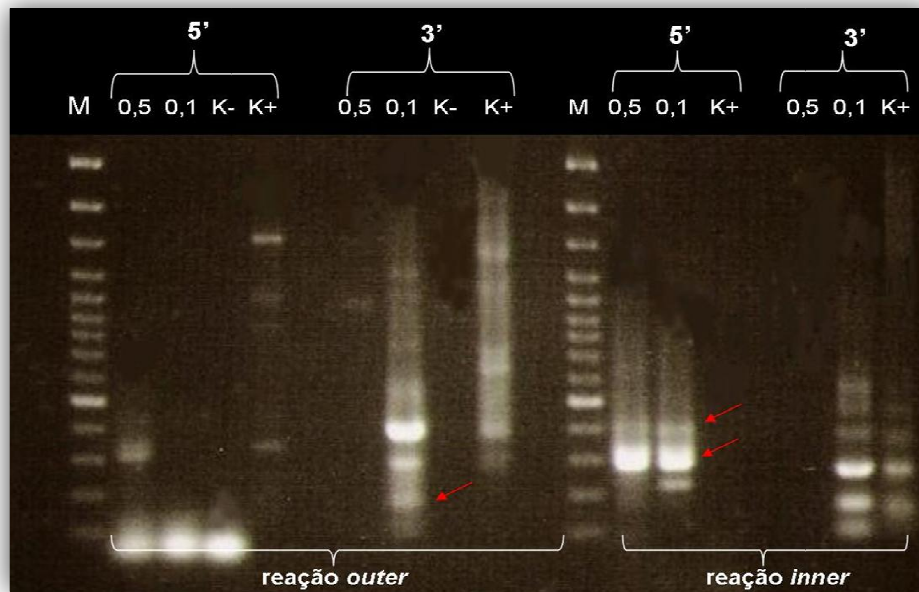


Figura 9: Visualização dos produtos de um dos RACE-PCR das extremidades 5' e 3'. Reações *outer* e *inner*. M= marcador 1kb (Fermentas). 0,5 = cDNA com adaptador diluído 1:2. 0,1 = cDNA com adaptador diluído 1:10. K- = controle negativo (sem cDNA molde). K+ = controle positivo (apenas o iniciador adaptador). Setas vermelhas indicam os *amplicons* escolhidos para nova amplificação e posterior clonagem e seqüenciamento.

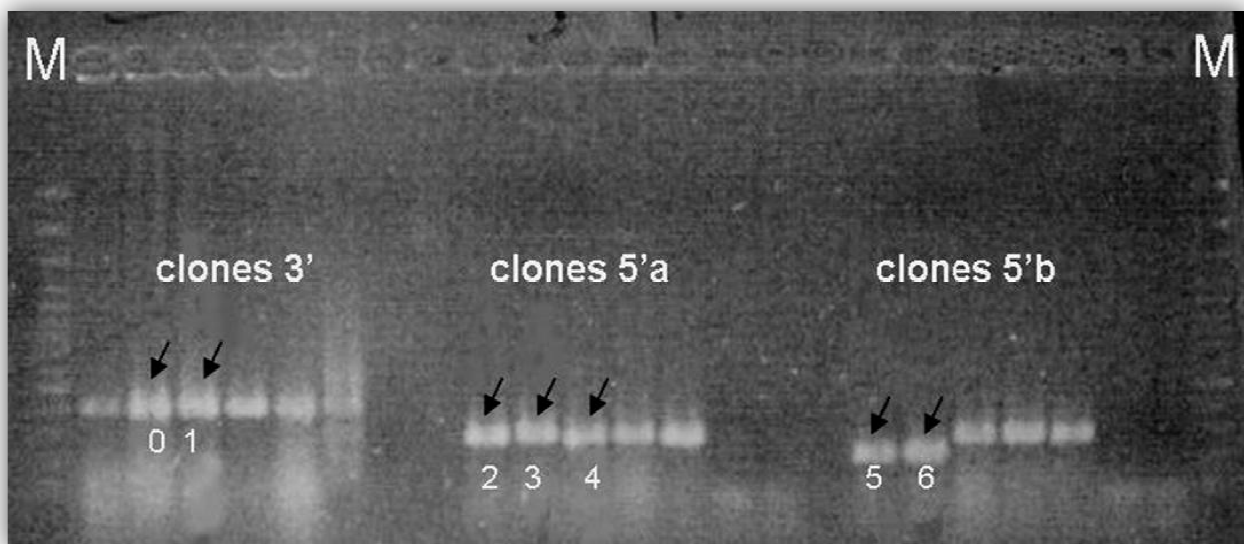


Figura 10: Perfil eletroforético de *Amplicons* resultantes da PCR de colônias em gel de agarose (1%) corado em brometo de etídeo e visualizando em luz UV. Recombinantes indicados com a seta foram seqüenciados. M = Marcador 1000bp (Fermentas™).



Estudos de expressão gênica realizados por Beye et al. (2003) mostram que em *A. mellifera* o gene *csd* é transcrito tanto em machos como em fêmeas, tendo início a 12 horas do desenvolvimento pós-embrionário. Devido à grande diferença entre os alelos *csd* isolados, Hasselmann e Beye (2004), propuseram dois tipos principais. Sequências Tipo I que, na sua ORF possuem uma região hiper-variável que envolve principalmente, resíduos de asparagina e tirosina, nas quais foram identificados nos 16 alelos já citados acima e, seqüências *csd* do Tipo II que não possuem essa região hiper-variada e têm um elevado grau de homologia com o gene *transformer* (*tra*) envolvido na determinação sexual de *D. melanogaster* e *Ceratitis capitata*.

Depois da identificação da região genômica de determinação do sexo bem como seu mapeamento em *A. mellifera* (BEYE et al.; 2003), foi possível mostrar que as seqüências do Tipo II pertencem a um gene localizado *upstream* ao gene *csd*, o qual Hasselmann et al.(2008) denominaram gene *ferminizer* (*fem*), ambos localizados na região genômica de determinação do sexo (Sex Determination Locus – SDL) (HASSELMANN et al.; 2001, 2008) (Figura 13). Dos possíveis cinco padrões gênicos preditos por análise computacional, nesta região, apenas o gene *fem* e *csd*, tiveram funções relacionadas á determinação de sexo, confirmados quando submetidos a experimentos de RNA de interferência (*knockdown*) (HASSELMANN et al., 2008).

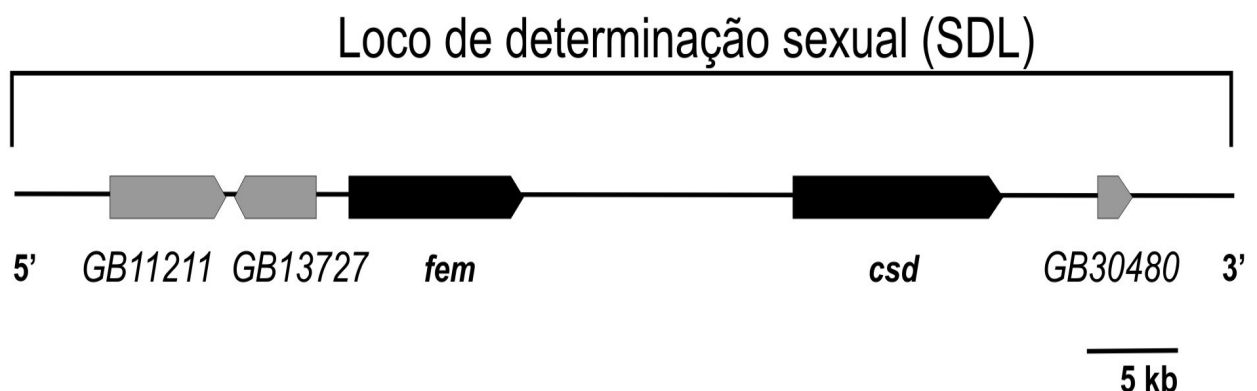


Figura 12: Esquema dos cinco genes identificados dentro da região de determinação sexual (SDL). Genes estão orientados 5'-3' de acordo com a direção das setas. GB11211, GB13727, GB30480, *fem* e *csd*, são genes prediletos por bioinformática. Apenas *fem* e *csd* foram confirmados por experimentos laboratoriais de RNAi. Modificado de Hasselmann et al. (2008).



O gene *fem*, segundo esses autores, em *A. mellifera*, estaria sob influência do produto do gene *csd* que, quando ativado, inicia o completo programa de desenvolvimento de fêmeas, porém não tem influência no desenvolvimento de machos. Segundo Hasselmann et al. (2008) apesar de *M. compressipes*, representando as abelhas sem ferrão e uma variedade de outros himenópteros possuírem um sistema de determinação complementar do sexo, não parece ser o gene *csd* a sua base molecular assim como o modelo em *A. mellifera*, sugerindo que outra, até agora desconhecida, cascata regulatória esteja controlando o mecanismo de determinação sexual nessas espécies (veja proposição em *M. compressipes* nas figuras 18 e 19).

Score = 504 bits (1298), Expect = 6e-141	
Identities = 273/421 (64%), Positives = 318/421 (75%), Gaps = 30/421 (7%)	
Apis 1	MKRNTTNHSHHDERFRQSRSEDSETGLRSRTQEERLRRRREWMIQQEREREHERLKKKMI 60
Melipo 1	MKR ++HSH DER R SRS D ETGLRS+T+EERLRRRREWMI+QE+ REHE+LK KMI 60
Apis 61	LEYELRRAREKKL-----SKRSKSRSPESRGRSNASNTSKTFLSEKLESSDGT 109
Melipo61	LEYE+RRAREK L +SKS+SPE SR R S+TSKT ILS+KLE SDGT 120
Apis 110	S-LFRGPEGTQVSATELRKIKVDIHRVLPCKPTTSDDELKRDIIINPEDVMLKRRRTGEGSK 168
Melipo121	+ LF+GPEGTQVS ELR IKVDIHR +PGK TT+DEL+R I+NPEDV + RR GEGSK 178
Apis 169	PIFEREEIKNILNKTNEITEHRTVLAVNIEKSENETKTCKKYAISSNLSRSRSFQRTS 228
Melipo179	PIFEREEIK+ KT EI EHRTV+A+N E EN++ KKY S RS+S S +R 234
Apis 229	SCHSRYEDSRHEDRNSYRNDGERSCSRDRSREYKDDRYDQLHNVEEKHLRERTSRRRY 288
Melipo235	S ++RYEDS+ + RN+YRND ER SR RSREYK+KDRR+ QLH E ER R + 290
Apis 289	SRSREREQSKYKNE-----REYREYRETSRERSRDRRERGRSREHRIIPSHYIEQIPVP 342
Melipo291	SRSREREQ+++ E ++ R +RE SRERSR+R ER RSREHR+ SHYIEQIPVP 350
Apis 343	VYYGNFPPRPIMVRPWVPMRGQVP-GSRH-IGPLTPFPPRFIPDMYRLRPPPNRFGPM 400
Melipo351	YYG+FP RPIMV P VP+RGQVP G RH +GPL PFPFRFIPDMYRLRPPPNRFGPM 410
Apis 401	Y 401
	Y
Melipo411	Y 411

Figura 13: Alinhamento do transcrito de *Melipona compressipes* com a proteína *Fem* de *Apis mellifera* (gi 46276945, utilizando-se o programa BLAST2sequences). É mostrado um índice de 64% de identidade e 75% similaridade (trocas equivalentes).

Quando alinhada à proteína *Fem* de *A. mellifera*, utilizando-se o programa BLAST2sequences, a seqüência de aminoácidos de *M. compressipes*, obteve-se 64% de identidade e 75% de trocas equivalentes (aminoácidos com propriedades semelhantes) (Figura 14).

#### 4.3. Análise da seqüência de aminoácidos da proteína *Fem*

A ORF predita para *M. compressipes* apresentou dez aminoácidos a mais que a ORF do gene *fem* de *A. mellifera* (gi 46276945).

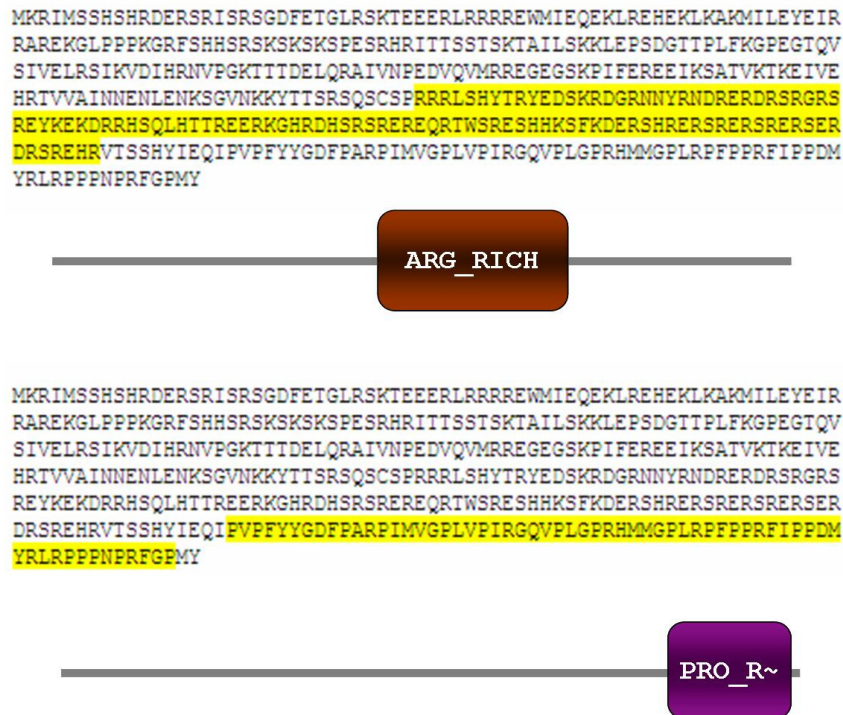


Figura 14: Domínios ricos em Arginina-Serina (RS) e Prolina (*Proline Rich Domain*) na seqüência de *Fem-Melipona*. Em amarelo: porção da seqüência com o domínio correspondente à representação gráfica.

#### 4.3.1. Domínios e motivos protéicos

Proteínas com múltiplos sítios de ação, ou domínios e motivos protéicos, perfomam processos críticos na célula (LENINGHER, 2000). Dois domínios protéicos: arginina-serina (Arginine – Serine rich domain ou domínio rico em arginina-serina) e PR-rich (*Proline Rich Domain* ou domínio rico em prolina), são característica na seqüência de *fem* de *A. mellifera* quando traduzida. Esses domínios se encontram nas posições 218 a 329 e 340 a 409 na seqüência de *Fem* de *A. mellifera*; também presentes no transcrito isolados de *M. compressipes* conforme se vê no alinhamento da figura 16.

Comparações entre as seqüências de *A. mellifera* e *M. compressipes* indicam, como acontece com o gene *csd* e *fem* em *A. mellifera*, que o isolado *fem-Melipona* é um membro da família das proteínas ricas em arginina-serina (proteínas SR) (BEYE et al. 2003), devido aos domínios majoritários encontrados. Essa é a mesma classe funcional (proteína SR) que a proteína Tra (*Transformer*) envolvida na cascata de determinação sexual de *Drosophila melanogaster* indicando um amplo papel para essas proteínas na determinação de sexo, o que pode ser explorado utilizando-se análises comparativas de seqüências. Em dípteros, até o momento, genes ortólogos *tra* e *tra2* (*transformer 2*) são considerados responsáveis pelo *splicing* do gene *double-sex* (*dsx*) fêmea-específico (PANE et al. 2002; SHERARMAN, 2002) baseado em dados funcionais bem como em característica de domínios de ligação dentro do próprio gene *dsx* que é responsável pela diferenciação entre machos e fêmeas.

Aminoácido	<i>M.compressipes</i>	<i>A.mellifera</i>
	411aa	401aa
Ala	7	5
Arg	69	71
Asn	11	17
Asp	16	15
Cys	1	3
Gln	9	10
Glu	44	46
Gly	20	15
His	19	13
Ile	20	20
Leu	18	20
Lys	30	28
Met	10	8
Phe	10	9
Pro	30	26
Ser	45	4
Thr	22	22
Trp	2	2
Tyr	11	15
Val	17	12

Tabela 2: Comparação do tipo e número de aminoácidos (aa.) para a ORF *fem* em *Melipona compressipes* e *Apis mellifera* (gi 46276945).

Em eucariotos superiores, o *splicing* alternativo do pré-mRNA é utilizado como via comum para a regulação da expressão gênica (SMITH; VALCARCEL, 2000; BLACK, 2003).

Proteínas SR constituem uma família altamente conservada (FU, 1995; MANLEY; TACKE, 1996). Essas proteínas têm múltipla função no *splicing* e parecem participar virtualmente de todos os passos desse processo (MANLEY; TACKE, 1996), sendo igualmente importantes na regulação do mecanismo, capazes de ativar-lo ou reprimir-lo por

meio de interações com elementos no pré-mRNA. Tal função é conhecida como *splicing enhancers* (ou *splicing silencers*) (TACKE; MANLEY, 1999).

Domínios de arginina-serina estão, no caso de proteínas SR, provavelmente envolvidos na interação com moléculas de RNA e em interações proteína-proteína. Domínios de prolina, neste tipo de molécula, têm função desconhecida (BLENCOWE et al., 1998). Contudo, sabe-se que tais domínios são críticos para vias metabólicas de sinalização intracelular além de serem essenciais em certos processo como crescimento celular, transcrição e sinalização pós sináptica (ZARRINPAR; BHATTACHARYYA; LIM, 2003).

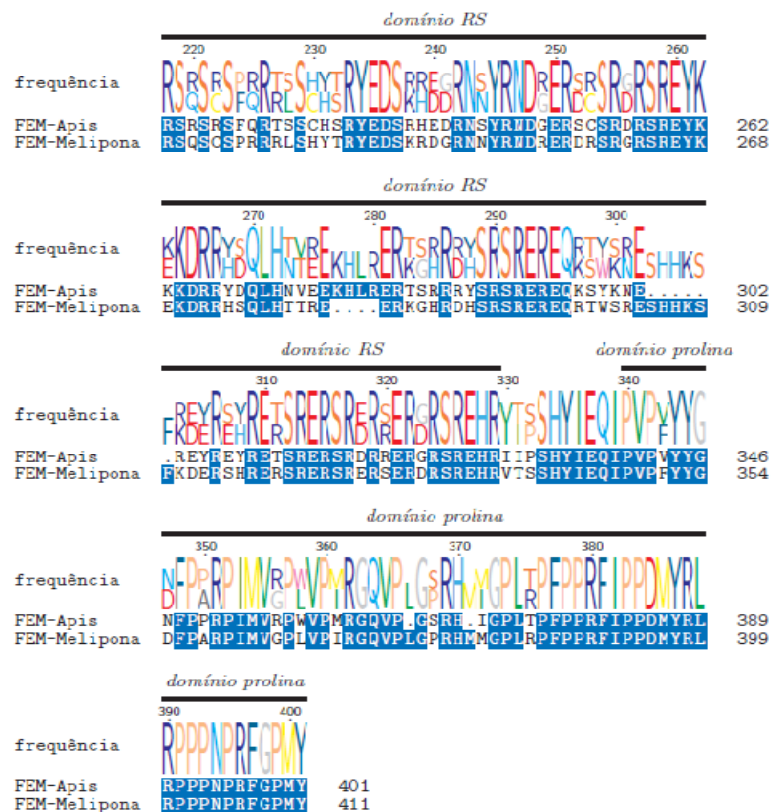


Figura 15: Alinhamento das regiões ricas em arginina-serina (domínio RS) e prolina (domínio prolina) de Fem de *Apis mellifera* (gi 46276945) e *Melipona compressipes*.

Proteínas com domínios arginina-serina estão classificadas em dois grupos distintos: proteínas SR com motivos de reconhecimento de RNA (RRM - *RNA Recognize Motif*) que se ligam diretamente com RNA na sua porção amino-terminal (HASTINGS; KRAINER, 2001) e as que não possuem esse tipo protéico, denominadas de *SR-related proteins* (BLENCOWE et al., 1999). Do mesmo modo que em Fem de *A. mellifera*, a proteína predita, Fem, de *M. compressipes*, não possui o motivo de reconhecimento de RNA (RRM), sugerindo que ambos são membros atípicos da família SR (BLENCOWE et al., 1999).

Pesquisas têm revelado que a função de proteínas SR é regulada por meio da fosforilação de seus domínios arginina-serina por múltiplas quinases (YEAKLEY et al., 1999). Diferenças em sítios de fosforilação são possíveis fontes de especificidade protéica. Muitos desses sítios (motivos protéicos) foram encontrados na seqüência estudada.

#### 4.4. Implicações no mecanismo de determinação de casta

##### 4.4.1. No gênero *Melipona*

Diferentemente do gênero *Apis*, em abelhas *Melipona* aparentemente não há diferença entre as células de crias (alvéolos) de rainhas e operárias, quanto à forma, quantidade e qualidade de alimento que recebem. O fechamento da célula (operculação) ocorre logo após a ovoposição, eliminando-se qualquer possibilidade de contato com abelhas adultas ou imaturas durante o desenvolvimento e, portanto, qualquer tipo de alimentação diferenciada provenientes desse contato. Ainda hoje, o mecanismo de determinação de casta nesses insetos é intrigante e não há um consenso sobre sua atuação.

A determinação das castas operária e rainha e, nessas abelhas, sustentada pela hipótese do sistema genético-alimentar proposta por Kerr (1974), seria dependente da dupla heterozigose de dois genes: xa e xb (cada um com dois alelos) (Figura 16). Esses genes seriam ativados pelo Hormônio Juvenil (HJ), pelas glândulas *corpora allata*, a qual ativaria diferentes genes feminizantes levando a uma segregação de operárias e rainhas (KERR; NIELSEN, 1966; BONETTI; MATUSITA, 1995).

Larvas de operárias que recebem dose *extra* de HJ, segundo essa hipótese, desenvolvem ovários idênticos aos de rainhas (BONETTI, 1982). (Campos (1975), demonstrou que se administrando HJ em pré-pupas de *M. marginata* muitas destas se transformavam em rainhas em número maior que o produzido no grupo controle (sem HJ) e, em alguns casos, em 100%. Esses resultados também foram verificados para *M. quadrifasciata* (CAMPOS; DRUMOND; LACERDA, 1983). Ainda em *M. quadrifasciata*, de acordo com Kerr, Akahira e Camargo (1975), a quantidade de alimento ingerido nas fases embrionárias afetam um número de células no desenvolvimento das glândulas *corpora allata* aumentando a produção de HJ. A dissecação de pré-pupas bem alimentadas mostrou

a segregação no tamanho da glândula, indicando que a maior ou menor quantidade de alimento é o responsável direto pelo volume das *corpora allata*. Foi constatado que o HJ aplicado topicamente em larvas de outros grupos de abelhas sem ferrão com *Partamona cupira*, *Schwarziana quadripunctata* e *Scaptotrigona* sp, também afeta a determinação das castas, indicando que o mecanismo fisiológico seria o mesmo (CAMPOS, 1975).

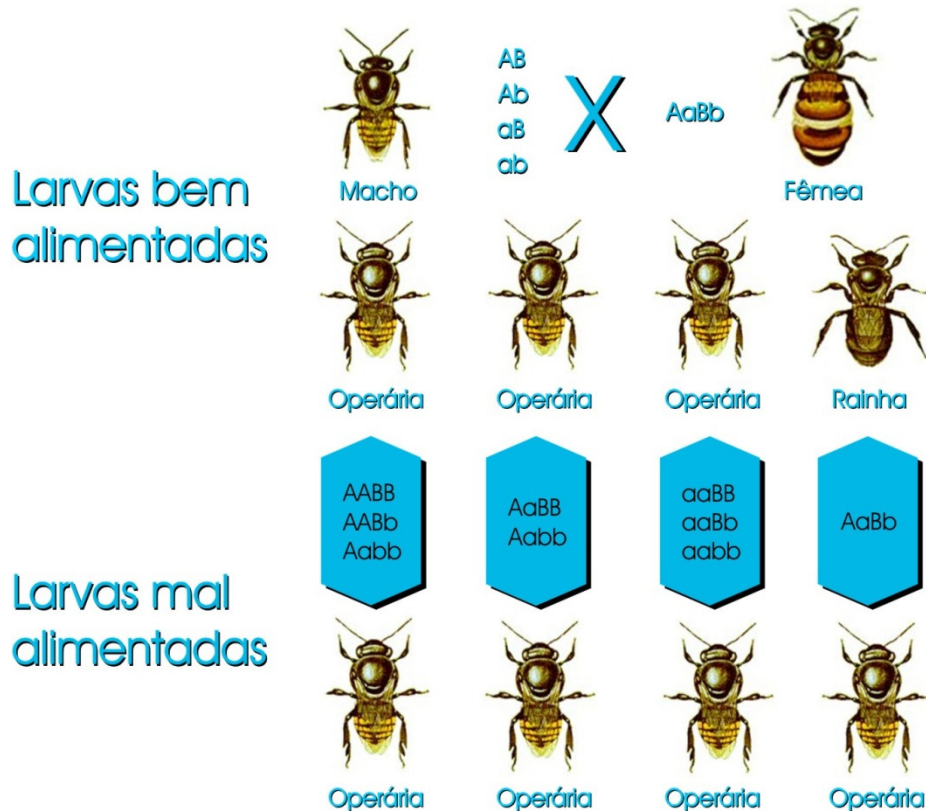


Figura 16: Modelo da determinação de castas em abelhas do gênero *Melipona*, sustentada pela hipótese do sistema genético - alimentar proposta por Kerr (1973), sendo dependente da dupla heterozigose dos genes  $xa$  e  $xb$  (cada um com dois alelos) ( $xa_1$ ,  $xa_2$  e  $xb_1$ ,  $xb_2$ ). Modificado de (KERR, 1973).

Bonetti, Kerr e Matusita (1995) determinaram dosagens mínimas necessárias de HJ I, II e III e seus efeitos na produção de rainhas a partir de larvas de *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *M. compressipes* e *M. scutellaris*, sendo o HJ I o mais eficiente, seguido pelo HJ III. O efeito do HJ III foi estudado em *M. scutellaris* por Nunes-Silva et al. (2006) o qual induziu o nascimento de 100% de rainhas.

Enquanto o HJ é comprovadamente necessário para o surgimento de rainhas outros fatores, ao contrário, podem inibir a ativação de genes determinantes de castas responsáveis pela produção de uma suposta enzima, a Hormônio Juvenil Sintetase (denominação dada por Kerr, Akahira e Camargo (1975)), tais como o aumento da temperatura (heat shock) (CARVALHO, 2000; NUNES-SILVA et al., 2006) e a homozigose de um ou dos dois genes (*xa* ou *xb*) (KERR; AKAHIRA; CAMARGO, 1975).

#### 4.4.1.1 Hipótese genético - alimentar de Kerr (1975)

Com base no modelo de regulação em eucariotos proposto por Britten e Davidson (1969), Kerr (1975) propôs a hipótese molecular da determinação da casta nas *Melipona* (KERR; AKAHIRA; CAMARGO, 1975), na qual os genes *xa* e *xb* em dupla heterozigose ( $xa_1, xa_2,$  e  $xb_2,xb_2$ ) (ver figura 17) produziriam um RNA ativador que ativaria genes receptores ( $Rxa+xb$ ) e o gene *pjhs* (gene do HJ sintetase). Essa enzima então agiria em um precursor do HJ culminando na sua produção. No caso de dupla homozigose ou homozigose por parte de apenas um dos genes, uma quantidade menor ou nula de HJ sintetase seria produzida sendo incapaz de acionar uma segunda bateria de genes que determinam características secundárias de fêmeas, no caso das rainhas ou dos machos para o surgimento de operárias. No caso das operárias estes genes não permitiriam o desenvolvimento completo de órgãos como espermateca ou ovário, característicos de fêmeas completas.

Após a hipótese genética - alimentar de Kerr para *Melipona*, trabalhos subseqüentes foram desenvolvidos à sua luz oferecendo algumas pistas sobre o seu mecanismo, sem, contudo ser plenamente comprovada.

Seguindo uma abordagem diferente, a partir dos trabalhos de Kerr, Akahira e Camargo (1975), vários estudos começaram a testar os efeitos do HJ, constatando sua fundamental importância no controle gênico da determinação de casta em *Meliponini* (CAMPOS, 1975; CAMARGO et al., 1976; BONETTI; KERR, 1987; MACIEL-SILVA; KERR, 1991; BONETTI; KERR; MATUSITA, 1995; NUNES-SILVA et al., 2006).

Em uma revisão recente sobre determinação de castas em abelhas sociais, Hartfelder et (2006) apresentam resultados parciais sobre a descoberta de candidatos a marcadores moleculares por AFLP em *Melipona*, corroborando com a hipótese de Kerr no

que se refere a pré-determinação genética de rainhas, sem contudo concordar que o fator alimentação fez parte do mecanismo. Divergências a parte, é claro o envolvimento de genes determinantes de casta na questão, os quais são fundamentais para o desencadear de uma cascata de eventos regulatórios da expressão gênica nesses insetos.

#### 4.4.2. Proposição de um modelo para a determinação de sexo e casta em *Melipona* envolvendo o gene *fem*

Em indivíduos diplóides heterozigotos para o gene *csd* (por exemplo  $x_1x_2$ ) há o desenvolvimento de fêmeas, devido a ação do produto do *csd* sobre o gene *fem*, o qual seria a atuante sobre os genes de casta ( $x_a$  e  $x_b$ ) (Figura17).

Em fêmeas duplo heterozigotas para os genes de casta ( $x_{a_1}, x_{a_2}: x_{b_1}, x_{b_2}$ ) o fenótipo esperado é o de rainha (KERR, 1975). O produto do gene *fem* nessas condições estaria agindo sobre os genes de casta, ativando-os, resultando na expressão de outros genes feminizantes que promovam características de fêmea completa (rainha). Essas ações em cascata seriam diferentes em fêmeas que não sejam duplo heterozigotas para os genes de casta. Sendo homozigotas para um dos genes ( $x_{a_1} x_{a_1}: x_{b_1} x_{b_2}$  ou  $x_{a_1} x_{a_2}: x_{b_1} x_{b_1}$  ou  $x_{a_2} x_{a_2}: x_{b_1} x_{b_2}$  ou  $x_{a_1} x_{a_2}: x_{b_2} x_{b_2}$ ) ou duplo homozigotas ( $x_{a_1} x_{a_1}: x_{b_1} x_{b_1}$  ou  $x_{a_2} x_{a_2}: x_{b_2} x_{b_2}$  ou  $x_{a_2} x_{a_2}: x_{b_1} x_{b_1}$  ou  $x_{a_1} x_{a_1}: x_{b_2} x_{b_2}$ ) não estariam tendo influência do(s) produto(s) do gene *fem* e, portanto, não haveria ativação da cascata gênica completa, originando uma operária. Os genes masculinizantes, os quais seriam constitutivos (KERR, 1997), levariam a masculinização das fêmeas. Segundo Kerr (1975) a determinação do sexo nas abelhas sociais levou a evolução gradual de dois tipos de sistema de determinação de castas: um em meliponíneos, mostrando que, morfológicamente, operárias são mais similares a machos que às rainhas, fato que corrobora com o modelo proposto devido à ação constitutiva dos genes masculinizantes ativos em fêmeas incompletas (operários), e outro em *Apis*, onde fêmeas (operárias e rainhas) são mais semelhantes entre si, se comparadas a machos.

Em indivíduos homozigotos o produto gênico do *csd* não seria completo, não ativando assim a cascata de genes feminizantes. Nesses indivíduos os genes masculinizantes constitutivos expressariam as características de machos em indivíduos diplóides. Em himenópteros em geral, esses machos diplóides, muitas vezes são inviáveis



reprodutivamente (INABA, 1939; NAITO; SUZUKI, 1991; STOUTHAMER; LUCK; WARREN, 1992; AGOZE et al., 1994).

Nos machos haplóides, a cascata de regulação não seria ativada, uma vez que não haveria o produto completo do *csd* e, por conseguinte a não ativação de *fem* e genes de casta, bem como outros genes feminizantes secundários. Sendo hemizigotos para o *csd*, haveria a expressão exclusiva de genes masculinizantes (que são constitutivos), o que geraria um desenvolvimento normal nesses machos (Figura 18).

O gene *fem* foi encontrado pelos experimentos de RACE e amplificando em cDNA de *M. compressipes* em todas as fases de desenvolvimento, desde ovo à adulto. Esse gene, em *A. mellifera*, é da mesma forma expresso em todas os instares, sendo muito conservado interespecificamente e desprovido da região hipervariada, presente no gene *csd* (HASSELMANN et al.,2008). Porém o gene *csd* é expresso (no gênero *Apis* em geral (HASSELMANN et al.,2008) apenas nas primeiras horas embrionárias, no estágio de ovo.

Em *Apis* é relativamente simples isolar ovos de machos, operárias e rainhas, pelo próprio tamanho distinto das células de cria, o que favorece à seleção para experimentos de genéticos nos quais estão envolvidos genes específicos determinantes de sexo e ou casta. O mesmo não é possível, com as técnicas atuais, em *Melipona*, onde todas as células de cria são idênticas, sejam de macho, operárias ou rainha. Portanto, em fases imaturas, nesse trabalho, foram utilizados pools de indivíduos, tendo a possibilidade de ter-se extraído RNA de ambos os sexos e castas.

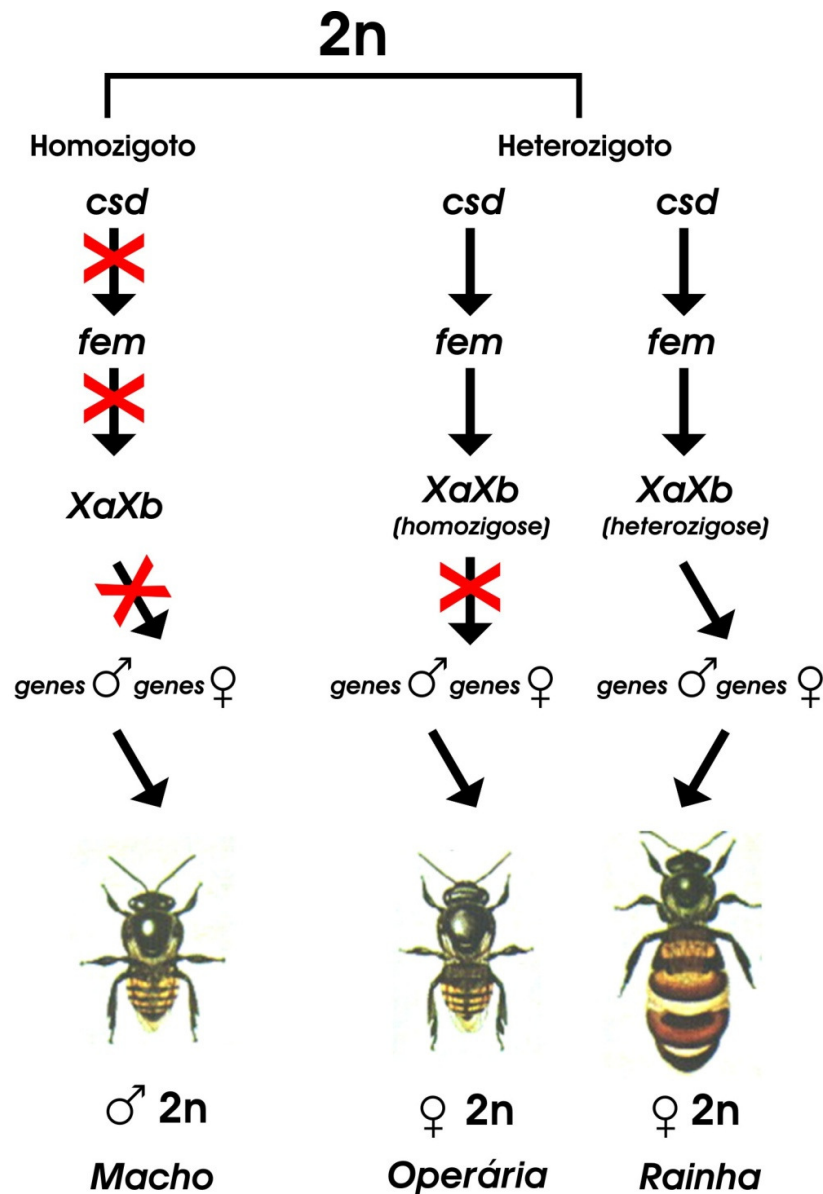


Figura 17: Modelo proposto para a determinação de castas em abelhas do gênero *Melipona*. Em indivíduos diplóides heterozigotos para o gene *csd* há o desenvolvimento de fêmeas, devido à ação do produto do *csd* sobre o gene *fem*, o qual seria expresso e atuaria sobre os genes de casta (*xa* e *xb*). Em fêmeas duplo heterozigotas para os genes de casta o fenótipo esperado é o de rainha (KERR, 1975). Essas ações em casta seriam diferentes em fêmeas que não sejam duplo heterozigotas para os genes de casta, sejam homozigotas para um dos genes ou duplo homozigotas não estariam sob influência do(s) produto(s) do gene *fem* e, portanto, não haveria ativação da cascata gênica, originando uma operária. Os genes masculinizantes, constitutivos, levariam a masculinização das fêmeas. Em *Melipona*, morfologicamente, operárias são mais similares a machos que às rainhas (KERR, 1997).

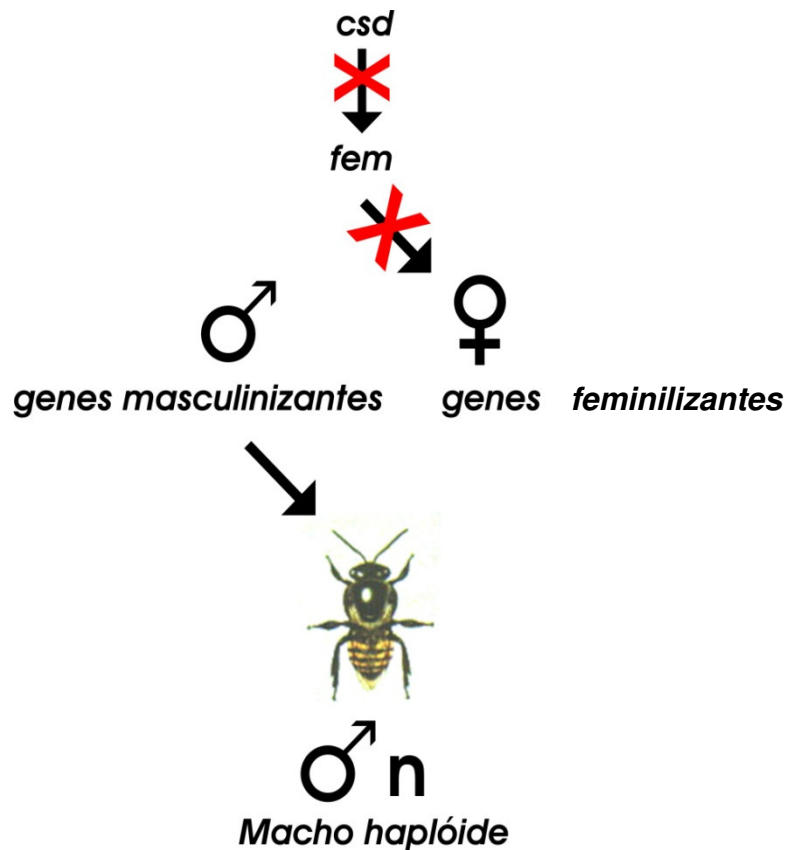


Figura 18: Modelo proposto da determinação de castas em abelhas do gênero *Melipona*. Nos machos haplóides, a cascata de regulação não seria ativada, uma vez que não haveria o produto completo do *csd* e, por conseguinte a não ativação de *fem* e gene de castas, bem como outros genes feminizantes secundários. Sendo hemizigotos para o *csd*, haveria a expressão exclusiva de genes masculinizantes (que são constitutivos), o que geraria um desenvolvimento normal nesses machos.

Os dados da literatura sobre a estimativa do número necessário de diferentes alelos do *csd* em *Melipona* são bastantes e dão indícios claros da presença desse gene no grupo (KERR; VENCOVSKY, 1982; KERR, 1997; CARVALHO; KERR; NASCIMENTO, 1995; CARVALHO, 2001), fato pelo qual não se descartou o *csd* no modelo de cascata regulatória proposto (Figura 18 e 19), porém serão necessários novos experimentos, lançando mão de novas abordagens para o isolamento desse gene e seus respectivos alelos em *Melipona*.

## 5. CONCLUSÕES

A seqüência do gene *fem* para a espécie *Melipona compressipes* possui 1.970 pares de base incluindo as regiões não traduzidas (UTRs), sendo sua ORF com 1.236 pares de bases a qual traduzida produz uma seqüência de 411 aminoácidos, revelando tamanho aproximado com o mesmo gene em *Apis mellifera*.

A seqüência de aminoácidos desse produto protéico, em *Melipona compressipes*, tem 64% de identidade e 75% de similaridade com o equivalente (*Fem*) em *Apis mellifera*, possuindo os mesmos domínios protéicos que caracterizam a molécula: domínio rico em arginina-serina (*RS-domain*) e domínio rico em prolina (*Proline Rich Domain*).

O gene *fem* é expresso em todos os instares imaturos e inclusive em adultos, além de ser igualmente encontrado em cDNAs de machos, operários e rainhas, mostrando que da mesma forma que em *A. mellifera* é um gene expresso em todas as fases do desenvolvimento e em ambos sexos e castas, além de ser muito conservado interespecificamente.

O gene *fem*, da mesma maneira que em *Apis*, não possui a região hipervariada que caracteriza o seu parálogo, o gene *csd*. Isso, segundo proposta desse trabalho, indicaria que o produto de *fem* teria funções na ativação dos genes de casta em *Melipona* e dispararia outros genes *feminizantes* em contraposição aos genes *masculinizantes*, esses constitutivos segundo Kerr (1997).

Um modelo, que reúne as informações na literatura com a descoberta do gene *fem* em *Melipona* é proposto visando uma maior discussão sobre a cascata regulatória que vai desde a determinação do sexo nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário e influência todo o desenvolvimento culminando na diferenciação de castas nas fêmeas diplóides.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.; ROTHMAN, E.; KERR, W.; PAULINO, Z. L. Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. **Genetics**, v. 86, n.3, p. 583-596, 1977.

AGOZE, M. E.; DREZEN, J.; RENAULST, S.; PERIQUET, G. Analysis of the reproductive potential of diploid males in the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 84, p. 213-218, 1994.

ALLEN-WARDELL, G.; BERNHARDT, P.; BITNER, R.; BURQUEZ, A.; BUCHMANN, S.; CANES, J.; COX, P.; DALTON, V.; FEINSINGER, P.; INGARM, M.; INOUE, D.; JONES, C.; KENNEDY, K.; KEVAN, P.; KOOPOWITZ, H.; MEDELLIN, R.; MEDELLIN-MORALES, S.; NABHAN, G. The potential consequences of pollinator decline on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 8-17, 1998.

BELL, G. The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality [S.1.]: **University of California Press**, 1982. 635 p.

BEYE, M.; GROHMANN, L.; POCH, A.; BURGTORF, C. A scientific note on the preparation of high molecular weight dna from honeybee *Apis mellifera* 1. Pupae for pfge analysis. **Apidologie**, v. 30, n. 4, p. 349-350, 1999.

BEYE, M.; HASSELMANN, M.; FONDRK, M. K.; PAGER, R. E.; OMHOLT, S. W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an sr-type protein. **Cell**, v. 114, n. 4, p. 419-429, 2003.

BLACK, D. Mechanisms of alternative pre-messenger rna splicing. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 291-336, 2003.

BLENCOWE, B.; BOWMAN, J.; MCCRACKEN, S.; ROSOSINA, E. Sr-related proteins and the processing of messenger rna precursors. **Biochem. Cell Biol.**, v. 77, p. 277-291, 1999.

BLENCOWE, B.; ISSNER, R.; NICKERSON, J.; SHARP, P.A coactivator of pre-mrna splicing. **Genes Dev.**, v. 12, p. 996-1009, 1998.

BONETTI, A. M. Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1982.

BONETTI, A. M.; KERR, W.; MATUSITA, S. H. Effects of juvenile hormones I, II and III in single and fractionated dosage in *Melipona* *bess*. **Rev. Bras. Biol.**, v. 55, 1995.

BONETTI, A. M.; KERR, W. E. Sex determination in bees. Xxxiii. Brood of a laying queen treated with juvenile hormone-iii. **Rev. Bras. Gen.**, v. 10, n. 3, p. 593-597, 1987.

BRITTEN, R. DAVIDSON, E. Gene regulation for higher cells: a theory. **Science**, v. 165, p. 349-357, 1969.

BULL, J. Evolution of Sex Determining Mechanisms. [S.1]: **Benjamin/Cummings Publishing Company**, 1983. 316 p.

CAMARGO, C. A. ALMEIDA, M.; PARRA, G.; KERR, W. Genetic of sex determination in bees. ix. Frequencies of queens and workers from larvae under controlled conditions (hymenoptera, apoidea). **J. of the Kansas Entom. Soc.**, v. 49, p. 120-125, 1976.

CAMARGO, J. M. F.; POSEY, D. A. Knowledge of the kayapo on stingless social bees (meliponidae: Apidae: Hymenoptera): additional notes. Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi **Serie Zoologia**, v. 6, n. 1, p. 17-42, 1990.

CAMERON, S. A.; MARDULYN, P. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (hymenoptera: Apinae). **Systematic Biology**, v. 50, n. 2, p. 194-214, 2001.

CAMPOS, L.; DRUMOND, M.; LACERDA, L. Sex determination in bees. vxiii. The role of juvenile hormone I, II and III in caste determination in *Scaptotrigona xanthotricha*. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 2, p. 209-211, 1983.

CAMPOS, L. A. O. Sex determination in bees. vii. Juvenile-hormone and caste determination in a stingless bee. **Naturwissenschaften**, v. 62, n. 2, p. 98-99, 1975.

CARVALHO, G. Contribuição a reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas conseqüências. **Tese** (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2000.

CARVALHO, G. The number of sex alleles (*csd*) in a bee population and its practical importance, **Jour. Hym. Res.** (10)1: 10-15., 2001.

CARVALHO, G. A.; KERR, W. E.; NASCIMENTO, V. A. Sex determination in bees. XXXIII. Decrease of xo-heteroalleles in a finite population of *Melipona scutellaris* (apidae, meliponini). **Rev. Bras. Gen.**, v. 18, n. 1, p. 13-16, 1995.

CARVALHO-ZILSE, G.; KERR, W. Substituição natural de rainha fisogástricas e distância de vôo dos machos em tiúba (*Melipona compressipes fasciculta* Smith, 1854) e urucu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 649-652, 2004.

CHARLESWORTH, B. Sex determination in the honeybee. **Cell**, v. 114, n.4, p. 397-398, 2003.

CHARLESWORTH, D. Sex determination: Balancing selection in the honey bee. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. R568-R569, 2004.

COOK, J. M. Experimental test of sex determination in goniozus-nephantidis (hymenoptera, bethylidae). **Heredity**, v. 71, p. 130-137, 1993. Part 2.

COOK, J. M.; CROZIER, R. H. Sex determination and population biology in the hymenoptera. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n.7, p. 281-286, 1995.

CROZIER, R. H. Evolutionary genetics of hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 22, p. 263-288, 1997.

DZIERZON, J. Gutachen uber die von hern director stohr im ersten und zweiten kapitel des general-gutachens aufgestellten fragen. **Eichstadt Bienenzeitung**, v. 1, p. 109-113, 119-121, 1845.

EVANS, J.; SHEARMAN, D. OLDROYD, B. Molecular basis of sex determination in haplodiploids. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 3, p. 120-121, 2004.

EVANS, J. D. Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 9, p. 1436-1438, 2000.

FU, X. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. **RNA**, v.1, p. 663-660, 1995.

GRIMALDI, D. A.'ENGEL, M. S. The evolution of Insects. [S.1]: **Elsevier Academic Press Inc**, 2005.

HAMILTON, W. The evolution of social behavior i. **Journal of Theoretical Biology**, v. 7, p. 1-16, 1964.

HARTFELDER, K.; MAKERT, G.R.; JUDICE, C. C.; PEREIRA, G. A. G.; SANTANA, W. C.; DALLACQUA, R.; BITONDI, M. M. G. Physiologia and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 144-163, 2006.

HASSELMANN, M.; BEYE, M. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. **PNAS**, v. 101, n. 14, p. 4888-4893, 2004.

HASSELMANN, M.; BEYE, M. Pronounced differences of recombination activity at the sex determination locus of the honeybee, a locus under strong balancing selection. **Genetics**, v. 174, n. 3, p. 1469-1480, 2006.



HASSELMANN, M.; FONDRK, M. K.; PAGER, R. E.; BEYE, M. Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). **Insect Molecular Biology**, v. 10, n. 6, p. 605-608, 2001.

HASSELMANN, M.; GEMPE, T.; SCHIOETT, M.; NUNES-SILVA, C.; OTTE, M.; BEYE, M. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway. **Nature**, London, 2008.

HASSELMANN, M.; VEKEMANS, X.; PFLUGFELDER, J.; KOENIGER, N. KOENIGER, G.; TINGEK, S.; BEYE, M. Evidence for convergent nucleotide evolution and high allelic turnover rates at the complementary sex determiner gene of western and asian honeybees. **Molecular Biology Evolution**, v. 25, p. 696-708, 2008.

HASTINGS, M.; KRAINER, A. Pre-mrna splicing in the new millennium. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 302-309, 2001.

INABA, F. Diploid males and triploid females of the parasitic wasp *Habrobacon pectinumphorae watanabe*. **Cytologia**, v. 9, p. 517-534, 1939.

JUDICE, C. Identificação de genes diferencialmente expressos nas castas de rainha e operária de *Melipona quadrifasciata*. **Tese** (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, 2005.

KEARNS, C.; INOUE, D.; WASER, N. Endangered mutualisms: the conservation of plan-pollinator interactions. **Ann. Rev. of Ecol. and Syst.**, v. 29, p. 83-112, 1998.

KERR, W. Formação das castas no gênero *Melipona* (illiger, 1806). In: **Anais ESALQ-USP**. [S.1.: s.n.], 1946.

KERR, W. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **Anais Esp. Sup. Agri. Luiz Queiroz**, v. 5, p. 181-276, 1948.

KERR, W. Genética e biologia de abelhas. **Ciência e Cultura** (São Paulo), v. 25, p. 927-934, 1973.

KERR, W. Extinção de espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponínios. In: **Anais do 5º Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto**. [S.1.: s.n.], 2002. P. 4-9.

KERR, W.; AKAHIRA, Y.; CAMARGO, C. A. Sex determination in bees iv. Genetic control of juvenile hormone product in *Melipona quadrifasciata* (apidae). **Genetics**, v. 81, p. 749-756, 1975.

KERR, W.; CARVALHO, G.; SILVA, A. D.; ASSIS, M. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégias**, v. 12, n. 2, p. 20-41, 2001.

KERR, W. E. Sex determination in bees. 3. caste determination and genetic-control in *Melipona*. **Insectes Sociaux**, v. 21, n. 4, p. 357-367, 1974.

KERR, W. E. Evolution of population structure in bees. **Genetics**, v. 79, p. 73-84, 1975.

KERR, W. E. Sex determination in bees. 17. systems of caste determination in the apinae, meliponinae and bombylinae and their phylogenetic implications. **Revista Brasileira de Genética**, v. 10, n. 4, p. 685-694, 1987.

KERR, W. E. Communication among *Melipona* workers (hymenoptera, apidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 7, n. 1, p. 123-128, 1994.

KERR, W. E. Sex determination in honey bees (apinae and meliponinae) and its consequences. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 4, p. 601-611, 1997.

KERR, W. E.; NIELSEN, R. A. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. **Genetics**, v. 54, n. 3, p. 859-&, 1966.

KERR, W. E.; VENCOSKY, R. Bee breeding .i. effect of the number of colonies. **Revista Brasileira de Genética**, v. 5, n. 2, p. 279-285, 1982.

LIDLAW, H.; GOMES, F.; KERR, W. Estimations of the number of lethal alleles in a panmictic population of *Apis mellifera*. **Genetics**, v. 41, p. 179-188, 1956.

LENINGHER, C. **Princípios de Bioquímica**. [S.I.]: Guanabara Kogan, 2000.

LIMA-VERDE, L.; FREITAS, B. M. Occurrence and biogeographic aspects of *Melipona quinquefasciata* in ne brazil (hymenoptera, apidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 3, p. 479-486, 2002.

MACIEL-SILVA, V. L.; KERR, W. E. Sex determination in bees .xxvii. castes obtained from larvae fed homogenized food in *Melipona compressipes* (hymenoptera, apidae). **Apidologie**, v. 22, n. 1, p. 15-19, 1991.

MACKENSEN, O. Further studies on a lethal series in the honey bee. **Journal of Heredity**, v. 46, p. 72-74, 1955.

MANLEY, J.; TACKE, R. Sr proteins and splicing control. **Genes Dev**, v. 10, p. 1569-1579, 1996.

MATHESON, A.; BUCHMANN, S.; O'TOOLE, C.; WESTRICH, P.; WILLIAMS, I. **The conservation of bees**. [S.I.]: Academic Press, 1996.

MICHENER, C. **The bees of the world**. [S.I.]: Johns Hopkins University Press, 2000.

MICHENER, C. D. Biogeography of the bees. **Annals of the Missouri Botanical Gardem**, v. 66, p. 277-347, 1979.

NAITO, T.; SUZUKI, H. Sex determination in the sawfly *Athalia rosae ruficornis*: occurrence of the triploid male. **J. Heredity**, v. 82, p. 101-104, 1991.

NUNES-SILVA, C.; KERR, W.; BONETTI, A. M.; CARVALHO-ZILSE, G. Effect of juvenile hormone iii and heat shock in caste determination in *Melipona scutellaris* latreille, 1811 (hymenoptera, Apidae). **Magistra**, v. 18, p. 100-102, 2006.

PANE, A.; SALVEMNI, M.; BOVI, P. D.; POLITO, C.; SACCONI, G. The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. **Development**, v. 129, n. 15, p. 3715-3725, 2002.

PAXTON, R. J.; GIOVANETTI, M.; ANDRIETI, F.; SCAMONI, E.; SCANNI, B. Mating in a communal bee, *andrena agilissima* (hymenoptera andrenidae). **Ethology Ecology & Evolution**, v.11, n. 4, p. 371-382, 1999.

ROUBIK, D. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. [S.I.]: Cambridge, 1989.

SHEARMAN, D. The evolution of sex-determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. **Genetica**, v. 116, p. 25-43, 2002.

SILVEIRA, F.; MELO, G.; ALMEIDA, E. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. [S.I.]: MMA, 2002. 253 p.

SMITH, C.; VALCARCEL, J. Alternative pre-mrna splicing: the logic of combinatorial control. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, p. 341-388, 2000.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.;WARREN, J. Genetics of sex determination and the improvement of biological control using parasitoids. **Environmental Entomology**, v. 21, p. 427-435, 1992.

TACKE, R.; MANLEY, J. Determinants of sr protein specificity. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 358-362, 1999.

WHITING, P. Selective fertilization and sex determination in hymenoptera. **Science**, v. 78, p. 537-538, 1933.

WHITING, P. Multiple alleles in complementary sex determination in *Habrobracon*. **Genetics**, v. 24. P. 110-111, 1943.

WILSON, E. How to make a social insect. **Nature**, v. 443, p. 919-920, 2006.

WOYKE, J. Effect of sex allele homo-heterozigosity on honeybee colony populations and their honey production: favorable development conditions and unrestricted queens. **Journal of Apicultura Research**, v. 19, n. 1, p. 53-63, 1980.

YEAKEY, J.; H., T.; OLESEN, J.; DYCK, J.; WANG, H. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mrna splicing factors. **Journal of Cell Biology**, v. 145, p. 447-455, 1999.

YOKOYAMA, S.; NEI, M. Population-dynamics of sex-determination alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. **Genetics**, v. 91, n 3, p. 609-629, 1979.

ZARRINPAR, A.; BHATTACHARYYA, R.; LIM, W. The structure and function of proline recognition domains. **Science**, v. 179, p. 1-10, 2003.

ZAYED, A.; ROUBIK, D. W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 271, p. S9-S12, 2004.

## ANEXO

Publicação de dados do doutorado.

HASSELMANN, M.; GEMPE, T.; SCHIOETT, M.; NUNES-SILVA, C.; OTTE, M.; BEYE, M. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway. **Nature**, London, 2008.