UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DAVID SANTOS MARCO ANTONIO

**Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do
sistema visual em operárias e zangões de
*Apis mellifera***

Ribeirão Preto – SP
2012

DAVID SANTOS MARCO ANTONIO

**Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do
sistema visual em operárias e zangões de
*Apis mellifera***

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para obten-
ção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder

Ribeirão Preto – SP
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Marco Antonio, David Santos

Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do sistema visual em operárias e zangões de *Apis mellifera*. Ribeirão Preto, 2012.

80 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Klaus Hartmann Hartfelder.

1. Lóbulo Óptico. 2. Olho Composto. 3. *Apis mellifera*.
4. Genética do Olho. 5. Insetos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

David Santos Marco Antonio

Processos Celulares e Moleculares no Desenvolvimento do Sistema Visual em Operárias e Zangões de *Apis mellifera*

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Genética

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Agradecimentos

- À minha companheira Paola Fernanda Fedatto pela amizade, amor, paciência e suporte que têm sido fundamentais na minha vida.
- Ao professor Klaus Hartfelder pela dedicação, apoio. Pelas discussões científicas e críticas construtivas que foram e são essenciais ao meu desenvolvimento profissional e pessoal. Por ter acreditado no meu potencial.
- À minha família sempre me apoiando.
- Às professoras Zilá Luz Paulino Simões e Márcia M. Gentile Bitondi pelo acolhimento, suporte e amizade.
- À técnica Vani Maria A. Corrêa pela grande ajuda em histologia e pelo acolhimento.
- Ao técnico Luiz Aguiar pela ajuda no apiário.
- Aos pós-graduandos Mônica, Sergio, Carolina e Fernanda pelas discussões na parte de Biologia celular e molecular.
- Aos pós-graduandos Francis e Anete pela disponibilidade e paciência nas análises de bioinformática e real-time.
- Às pós-graduandas Karina Guidugli e Adriana Mendes Nascimento pelas discussões científicas e pela disponibilidade em ajudar.
- Aos pós-graduandos Alexandre Cristino e ao professor Roberto Barchuk, pelas discussões sobre evolução, bioinformática e genômica.
- Às técnicas Vera Lúcia Figueiredo e Marcela A. Bezerra Laure que me orientaram nas dissecções. Ao Pedro P. Prado pela ajuda no servidor.
- Aos professores Ademilson Espencer E. Soares, Lionel S. Gonçalves e David de Jong pela ajuda e amizade.
- Às amigas de laboratório Mipsi e Tatiana
- Ao professor Ricardo Ramos e seus alunos pelas discussões sobre o gene *roughest*.
- Aos pós-graduandos Angelika e Hans pelo auxílio e discussões e traduções
- Aos amigos Rogério, Michelle Manfrin, Thiago Francó, Fernanda S., Gesline, Ivan, Umberto, Omar, Rodrigo, Weider, Ana Durvalina, Michelle P., Moysés, Paulo Emílio, Vanessa, Amanda, Tatiana, Liliana, Paulinho e Robertinho pela grande amizade.
- Ao Departamento de Genética e Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos pela infra-estrutura oferecida.
- Agradeço a Deus por tudo.
- Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Resumo

Marco Antonio, D. S. Processos celulares e moleculares no desenvolvimento do sistema visual em operárias e zangões de *Apis mellifera*.

Mecanismos que regem o desenvolvimento do olho composto e lóbulo óptico tem sido amplamente estudados em *Drosophila melanogaster* onde a retina é formada a partir de um disco imaginal anexado com o cérebro e os lóbulos ópticos a partir do primórdio óptico externo. Através de histologia comparativa e análise de expressão gênica no desenvolvimento do sistema visual em *Apis mellifera* nós procuramos elucidar questões sobre plasticidade do desenvolvimento subjacente a fortes diferenças sexo- e casta-específico no olho assim como contribuir com aspectos evo-devo. O desenvolvimento dos lóbulos ópticos ocorre por dobramento neuroepitelial a partir de um centro de diferenciação no cérebro larval. Deste centro, a medula, lamina e lóbula surgem ao mesmo tempo em operárias e zangões. Dois passos marcam a diferenciação da lâmina (i) sua origem a partir da diferenciação de neuroblastos da camada mais externa da medula, isso coincidindo com o primeiro pico de expressão de *roughest*, e (ii) 24 horas mais tarde o aparecimento dos omatídeos hexagonais coincidindo com o segundo pico de expressão de *roughest*. Com a inclusão de genes candidatos relacionados com o desenvolvimento do olho e lóbulos ópticos em insetos [*small optic lobe (sol)*, *eyes absent (eya)*, *minibrain (mnb)*, *sine oculis (so)*, *embryonic lethal*, *abnormal vision (elav)* e *epidermal growth factor receptor (egfr)*] nós encontramos distintos picos de expressão para *sol*, *eya*, *mnb* e *so* em níveis de transcritos e tempo de aparição do pico diferindo entre operárias e zangões. Enquanto estes quatro genes mostraram relativa sincronia durante o desenvolvimento em zangões, o mesmo não ocorreu em operárias. Além disso, em operárias *sol* é muito mais expresso na pré-pupa do que em zangões. Ambos os sexo mostraram padrões muito similares de expressão de *elav*, exceto por um atraso em zangões. Em contraste, a expressão de *egfr* ocorre antes em zangões. Durante a fase chave no desenvolvimento do sistema visual, uma análise global do transcriptoma, por meio de micro-arranjos mostrou vários genes relacionados com ciclo celular entre os diferencialmente expressos. Em conclusão, a relação entre tempo e eventos morfológicos com os padrões de expressão gênica revelou diferenças possivelmente relacionadas com mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do sistema visual altamente dimórfico de *Apis mellifera*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, olho composto, lóbulo óptico, zangão, expressão gênica diferencial.

Abstract

Marco Antonio, D. S. Molecular and cellular processes during visual system development in workers and drones of *Apis mellifera*.

Developmental mechanisms governing compound eye development in insects have been broadly studied in *Drosophila melanogaster*, where the retina is formed from an imaginal disc attached to the larval brain. However little is known about eye development in other insects, most of which do not have such imaginal eye discs. Through a comparative histological and gene expression analysis of eye development in the honey bee, *Apis mellifera*, we intended to elucidate questions about developmental plasticity underlying the marked sex and caste-specific differences in eye size, as well as to contribute to evo-devo aspects. Optic lobe development occurs by neuroepithelial folding initiating from a differentiation center in the larval brain. From this center, the medula, lamina and lobula arise at the same time in drones and workers. Two steps mark the differentiation of the lamina (i) its origin from neuroblasts differentiating in the outer layer of the medula, this coinciding with the first peak of *roughest* expression during the feeding stage of the fifth larval instar, and (ii) 24 hours later, the appearance of hexagonal ommatidia, coinciding with a second peak in *roughest* expression. Upon including further candidate genes related to insect eye development [*small optic lobe (sol)*, *eyes absent (eya)*, *minibrain (mnb)*, *sine oculis (so)*, *embryonic lethal*, *abnormal vision (elav)* and *epidermal growth factor receptor (egfr)*] we found distinct expression peaks for *sol*, *eya*, *mnb* and *so*, with timing and relative transcript levels differing between drones and workers. Whereas these four genes showed a relatively synchronous pattern of expression in drones in the fifth larval instar, this was not so in workers. Furthermore, in prepupae *sol* was higher expressed in workers than the other three genes, and also in comparison to drones. Both sexes showed a strikingly similar expression pattern for *elav*, except for some delay in drones. In contrast, *egfr* expression was found to occur earlier in drones. Through a global transcriptom analysis, done at a key step of larval development, several genes were revealed as differentially expressed, many of these regulating cell cycle steps. In conclusion, the relationship in the timing of morphological events with gene expression patterns revealed differences possibly related to mechanisms underlying development of the highly dimorphic compound eye in the honey bee.

Key words: *Apis mellifera*, compound eye, optic lobe, drone, differential gene expression.

Sumário

Introdução	9
A abelha <i>Apis mellifera</i>	9
Desenvolvimento e ciclo de vida	10
Determinação de castas	11
O genoma de <i>Apis mellifera</i>	13
Genética do desenvolvimento do sistema visual	14
Desenvolvimento do sistema visual: Análise por PCR em tempo real.....	15
Objetivos.....	17
Objetivos Específicos:	17
Material e Métodos	18
Abelhas	18
Produção e classificação de zangões	18
Análise histológica	22
Extração de RNA do lóbulo óptico e cérebro.....	22
Síntese da primeira fita de cDNA.....	23
Métodos computacionais.....	24
Sistema operacional, linguagens de programação e programas	24
Base de dados de sequencias gênicas	25
Construção da tabela de proteínas associadas ao termo Gene Ontology “Eye Development”	25
Busca da região promotora de genes associados ao termo “Eye Development” GO.....	25
Análise <u>in silico</u> dos genes candidatos	26
Anotação dos genes candidatos e desenho de primers	26
Normalização dos perfis de cDNA.....	27
Reação em cadeia da polimerase (PCR semi-quantitativo)	28

PCR quantitativa (Real Time – PCR)	28
Extração e preparo de RNA para micro-arranjos	29
Síntese de aRNA (Amino Allyl RNA)	30
Integridade do RNA para microArray	32
Preparo e hibridação das lâminas de microArray	32
Análise Estatística de dados do MicroArray.....	33
Resultados	34
Análise do desenvolvimento através de cortes seriais.	34
Perfil de transcrição de genes candidatos para o desenvolvimento diferencial do lóbulo óptico	41
Perfil transcricional de genes chaves no desenvolvimento	46
Predição de genes participantes do desenvolvimento dos lóbulos ópticos e retina.....	49
Análise da expressão diferencial do genoma de <i>Apis mellifera</i> por meio de micro- arranjos	50
Análise de Enriquecimento de dados do microarray	53
Análise computacional das regiões reguladoras dos genes diferencialmente expressos	60
Discussão	64
O centro de diferenciação	65
A lóbula e a medula	66
A lâmina e a retina	67
Aspectos moleculares durante a fase de tecelagem de casulo.....	70
Conclusões	72
Referências bibliográficas.....	73
Anexos.....	80

Introdução

A abelha *Apis mellifera*

Sociedades avançadas de insetos são caracterizadas pela sobreposição de gerações, onde descendentes (membros da casta operária) permanecem no ninho e contribuem para o sucesso reprodutivo de seus parentes (casta reprodutiva) ao custo de sua própria reprodução (Winston, 1987). O parente materno (rainha) é altamente adaptado para produção e postura de ovos. A rainha é, usualmente, maior e possui sobrevida de até dois anos enquanto as outras castas vivem bem menos.

Apis mellifera possui uma combinação de características e cooperação social de forma raramente vista no reino animal. É uma vasta fonte de estudos devido aos vários níveis de adaptação que expressa enriquecido pelos benefícios econômicos que traz. A abelha melífera tem sido objeto de estudo de diferentes perspectivas como as de: apicultores, biólogos, ecologistas, estudiosos de comportamento e médicos interessados em reações alérgicas, e todos contribuíram imensamente para o entendimento da biologia deste inseto (Snodgrass, 1956).

Dentro do ninho pode-se ter uma idéia do porque este inseto tem fascinado o homem durante tanto tempo. A infra-estrutura do ninho, primorosamente uniforme e funcional, é composta por cera e própolis produzida pelas operárias e construída por série uniforme de células hexagonais. O favo serve de substrato para as mais diversas interações entre os membros, a cria, estocagem de alimento e centro de mensagem. Em relação às atividades da colônia, ele provê rico cenário de interações sociais e divisão de trabalho tanto em relação às castas como em relação a cada indivíduo (Winston, 1987).

Abelhas melíferas possuem três tipos de membros na colônia: rainhas, operárias e zangões, cada um com suas próprias especializações e lugar na sociedade das abelhas. Uma única rainha na colônia reina sobre o ninho, cercada de operárias do qual ela recebe rica alimentação necessária para desenvolver suas atividades. Seu corpo alongado esconde um ovário superdesenvolvido o qual a transforma em extraordinária máquina de oviposição, capaz de botar milhares de ovos em um só dia. O comportamento calmo da rainha contrasta com seus poderosos feromônios, sinais químicos que agem nas operárias e controlam alguns dos seus comportamentos e provê parte das características sociais das abelhas (Winston, 1987).

Outro membro desta sociedade são os zangões, zelados e alimentados pelas operárias apesar de possuírem apenas uma função: reprodução, na qual eles morrem logo em seguida. Para tanto eles possuem uma maquinaria especialmente adaptada para isso: olhos grandes,

músculos de vôo desenvolvidos e forte ímpeto para o acasalamento (Winston, 1987). Rainhas e zangões são vistos como funcionalmente equivalentes relativos à reprodução e são cogitados a representarem os fenótipos evolutivamente antigos, enquanto o fenótipo operária seria visto como morfotipo derivado de fêmea (Hartfelder *et al.*, 1998). A rainha acasala com vários machos durante o vôo, logo que ela se torna adulta, e estoca o esperma dos vários acasalamentos em uma estrutura especializada, a spermateca, para o resto de sua vida (Page e Peng, 2001).

As operárias realizam diversas e incessantes tarefas no ninho chegando até morrer devido à suas picadas em intrusos. Raramente se reproduzem e a qualquer tempo podem ser vista pelo favo provavelmente cuidando do alimento, limpando os restos do ninho, fechando células, amadurecendo ou estocando mel, organizando pólen para estocagem perto das crias, alimentando ou cuidando da rainha, ou alguma outra das centenas de atividades que desempenham (Michener, 1974).

Apis mellifera pertence a ordem Hymenoptera a qual inclui 100.000 espécies de abelhas, vespas e formigas, muitos dos quais sociais. Dentro da clade de insetos holometábolos (sofrem metamorfose) as abelhas divergiram de um ancestral das ordens Díptera e Lepidóptera a cerca de 300 milhões de anos atrás. Dentro das abelhas sociais da clade Corbiculata, o gênero *Apis* é uma linhagem que evoluiu na Eurásia tropical e migrou para norte e oeste, atingindo a Europa no final do Pleistoceno a cerca de 10.000 anos atrás (Ruttner, 1988). A partir de então, humanos ajudaram a espalhá-la pelo mundo por causa de sua habilidade de produzir mel, cera e outros produtos apícolas de interesse.

Desenvolvimento e ciclo de vida

Os processos de crescimento e metamorfose em insetos holometábolos envolvem algumas das mais complexas interações numa colônia de insetos sociais. Antes de emergir como adultas, as abelhas sofrem a transição através de três estágios: ovo, larva e pupa. O período embrionário dura cerca de três dias e no final o animal atinge o primeiro instar larval. O estágio larval é caracterizado pela alimentação onde a abelha ganha grande quantidade de peso e cresce em tamanho enquanto alimentada em célula de cria aberta. Durante esta fase, a larva passa por cinco mudas e, em seguida, a célula é operculada pelas operárias. Neste momento a larva tece o casulo e posiciona-se com a cabeça voltada para o opérculo. Logo em seguida a larva começa a esvaziar o conteúdo intestinal e inicia a metamorfose tornando-se pré-pupa (Myser, 1954; Michelette e Soares, 1993; Winston, 1987). Nesta fase a cabeça larval e os apêndices alongam-se. O tórax fica reduzido em diâmetro e a cutícula larval e pupal começam a separar-se e o espaço entre elas começa a ser preenchido com fluído da muda. Du-

rante a fase pupal ocorre a transformação total, no final da qual a cutícula passa por um processo de pigmentação e diferenciação gradativa até o momento da eclosão.

Rainhas necessitam de cerca de 16 dias para se desenvolverem do ovo ao adulto, três dias como ovo, seis dias como larva em alimentação (cinco instares) e sete dias como pré-pupa e pupa (Page e Peng, 2001; Winston, 1987). Do quinto instar em diante a rainha se desenvolve mais rápido por ter estágio pupal mais curto e emerge como adulto cinco dias mais cedo que as operárias (Page e Peng, 2001; Winston, 1987). Os zangões se desenvolvem em 24 dias do ovo ao adulto e geralmente vivem uma média de 21 a 32 dias, podendo variar de acordo com a estação. Em abelhas africanizadas o período de desenvolvimento larval (células abertas) é de 4,2 dias em média. Já em zangões o tempo é um pouco maior com cerca de 4 a 7 dias. Depois que a célula é fechada, as fases de tecelagem de casulo e pré-pupal duram cerca de 3 a 5 dias em operárias, 3 a 4 em rainhas e 4 a 6 dias em zangões. Durante o desenvolvimento pupal as operárias e zangões levam cerca de 8 a 9 dias em operárias e zangões e 4 a 5 dias em rainhas (Winston, 1987)

Determinação de castas

A rainha bota ovos em células de zangão ou de operária; ovos não fertilizados se desenvolvem em zangões (haplóides) enquanto fêmeas (rainha ou operárias) são derivadas de ovos fertilizados (diplóides) (Kerr, 1962). A determinação de castas nas fêmeas é baseada em um sistema trofogênico, isto é, a qualidade e quantidade de alimento que uma larva do sexo feminino recebe das operárias determina o seu desenvolvimento em rainha ou operária. Este programa de alimentação diferencial resulta em uma resposta distinta do sistema endócrino (Hartfelder e Engels, 1998) que tem como consequência o desenvolvimento casta-específico dos órgãos, especialmente dos ovários (Schmidt-Capella e Hartfelder, 1998, 2002), e das estruturas externas.

A distinção entre as duas castas femininas é evidenciada pelas suas diferenças no crescimento e tempo de desenvolvimento, duração de vida, morfologia, anatomia, fisiologia e comportamento (Page e Peng, 2001; deWilde e Beetsma 1982). As duas castas femininas desenvolvem em células de tamanhos diferentes. As larvas de operárias se desenvolvem em células hexagonais sob condições restritas de espaço e alimento. Elas são alimentadas primariamente com alimento da cria produzido pelas glândulas hipofaríngea e mandibular das operárias nutridoras, embora também são alimentadas com pequena quantidade de pólen nos primeiros estágios. Larvas de rainha são alimentadas com dieta mais rica e em maior quantidade em células grandes localizadas fora do ninho de cria (Rembold, 1976; de Wilde e Beetsma 1982; Snodgrass, 1956).

As larvas diplóides com menos de 3,5 dias são bipotentes, ou seja, elas podem se desenvolver tanto em rainha como em operária (Jay, 1964; Winston, 1987). Durante este tempo crítico, as larvas que são alimentadas com excesso de secreções glandulares, a geléia real, ganham peso e crescem rapidamente (cerca de 120 horas no estágio larval são 60% mais pesadas) (Weaver, 1966) e se desenvolvem em rainhas. As larvas que são alimentadas com uma mistura de secreções glandulares, pólen e mel (Peng e Jay, 1979) mostram uma taxa de crescimento menor, pesam menos e se desenvolvem em operárias.

A formação de castas em abelhas melíferas ocorre em uma seqüência ordenada de passos. O primeiro é a diferença na alimentação oferecida à larva (Weaver, 1955; Peng e Jay, 1979; Rembold 1976). O segundo passo coincide com a troca de alimentação depois do terceiro instar larval, a maturação casta-específica do sistema neuroendócrino (Ulrich e Rembold, 1983). O terceiro passo é a diferença de tempo na estimulação neuroendócrina que é reflexo da modulação de “pools” hormonais durante o desenvolvimento de ambas castas femininas.

A modulação dos pools hormonais ocorre devido às diferenças nutricionais experimentadas pelas fêmeas durante o início do desenvolvimento pós-embrionário. Esta modulação diferencial se expressa por elevados títulos de hormônio juvenil (HJ), principalmente, em larvas de rainhas quando comparadas com de operárias (Hartfelder e Engels, 1998). Associado com neurohormônios e proteínas receptoras, o HJ regula a transcrição de genes alvos o que resulta em respostas coordenadas tecido-específicas levando a diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Evans e Wheeler, 2000; Cristino *et al*, 2006; Barchuk *et al*, 2007). Muitos dos genes diferencialmente expressos na modulação pelo HJ estão relacionados a taxas metabólicas e respostas celulares a hormônios (Evans e Wheeler, 2000).

Pouco se sabe sobre a nutrição das larvas de zangões, embora parece que há algumas diferenças na composição do alimento dado a eles. Zangões recebem mais alimento do que as operárias, o que resulta no seu maior tamanho, e seu alimento tem mais proteínas do que o da operária (Gontarski, 1954). O alimento dado às larvas mais velhas de zangões contém mais carboidrato, riboflavina, ácido fólico, alguns aminoácidos e vitaminas a mais do que o alimento dado a larvas mais jovens.

Além do sistema reprodutivo, uma das grandes diferenças entre os sexos reside no tamanho dos olhos compostos. Entretanto, embora as diferenças morfológicas externas do olho estão bem caracterizadas entre os sexos (Ribi, 1989), pouco se sabe sobre o desenvolvimento das estruturas internas que compõem o sistema visual tanto em operárias como em zangões. Da mesma forma pouco se conhece sobre genética molecular responsável pelo desenvolvimento diferencial do olho e lóbulo óptico entre os sexos.

O genoma de *Apis mellifera*

Em maio de 2002 *Apis mellifera* foi incorporada na lista de prioridades do *The National Human Genome Research Institute* (NHGRI) e começou a ter seu genoma sequenciado. Em outubro de 2006 foi publicado a versão 4 do genoma de *A. mellifera* e desde então tem permitido estudos aprofundados sobre a genética e biologia molecular desse fascinante inseto eussocial. O projeto genoma permitiu a busca e análise de dados moleculares e a comparação destes dados com diversas outras espécies através de diversas ferramentas de análise em bioinformática. Com isso abriram-se as portas para diferentes estudos que nos permitem conhecer sobre os processos de formação e desenvolvimento dos seres vivos, assim como, as transformações genéticas ocasionadas pelo ambiente, as quais guiam a evolução das espécies.

O genoma de *Apis mellifera* possui características singulares e provê um fascinante “insight” sobre a biologia da abelha. O genoma é distinto de outros insetos por possuir alto conteúdo A + T e CpG e ausência da maior parte das famílias de transposons. Possui maior similaridade com o genoma de vertebrados do que *Drosophila* e *Anopheles* para genes envolvidos em ritmo circadiano, RNA de interferência (RNAi) e metilação de DNA. Além disso, possui mais genes para receptores de odores e genes novos para utilização de néctar e pólen apesar de ter menos genes do que *Drosophila* e *Anopheles* para imunidade inata, enzimas de detoxificação, proteínas de formação da cutícula e receptores gustativos. Possui genes que codificam uma família de proteínas da geléia real exemplificando genes que ganharam funções durante evolução da sociabilidade, a partir do gene *yellow-d*. No genoma de abelha foram detectados novos microRNAs que mostraram expressão casta- e estágio-específico o que sugere um papel na diversificação social (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006).

A determinação dos três fenótipos inicia na fase embrionária com a cascata de expressão gênica ligada à determinação de sexo. A rainha põe ovos nos alvéolos dos favos e estes ovos, quando fertilizados, originam fêmeas e quando não fertilizados geram zangões por partenogênese arrenótoca. A abelha melífera mostra similaridades genômicas com *Drosophila* para a determinação sexual, porém com diferenças significativas no processo. Machos recebem aleatoriamente metade do genoma materno sobre um modo de reprodução haplodiplóide. Neste caso o sexo não é determinado por cromossomos sexuais, mas por composição alélica de um locus chamado de “*complementary sex determiner*” (*csd*) (Beye *et al*, 2003). Acredita-se que o gene *csd* seja o funcional equivalente do gene *tra* de *Drosophila* o qual controla diferenciação sexual somática.

O gene *csd* ocupa a posição de entrada na cascata gênica de determinação de sexo que influencia sobre *splicing* alternativo do gene *doublesex* (*dsx*) anotado no genoma de *Apis mellifera*,

e c por sua vez regulam o padrão de expressão de genes estruturais ligados a processos de diferenciação sexo-específico durante as fases larvais e na metamorfose. Ortólogos de *dsx* e *ix* são encontrados no genoma de abelhas melíferas. O *dsx* passa por splicing sexo-específico o que é consistente com a função conservada de determinação sexual, tanto em moscas quanto em abelhas melíferas. Deste ponto em diante as trajetórias de ambos funcionalmente convergem a partir do gene *dsx* (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006).

Recentemente, novas informações ligaram diretamente a via de determinação sexual com o desenvolvimento do olho. O *knockdown* do gene *fem* (upstream ao *csd* no mesmo locus de determinação sexual) em operárias ocasiona o desenvolvimento de olhos grandes típicos de machos (Hasselmann, 2008). Aliado ao fato de macho e fêmea possuírem o mesmo genótipo faz com que surja uma intrigante questão: quais são os mecanismos genéticos responsáveis pelo maior desenvolvimento do olho em machos? Com isso o estudo do desenvolvimento dos olhos e lóbulos ópticos (sistema visual) torna-se de grande importância não somente para os processos de desenvolvimento mas também aos mecanismos de determinação sexual. Com isso estamos realizando estudos em operárias e zangões em fases chave do desenvolvimento desta notável estrutura sensorial.

Genética do desenvolvimento do sistema visual

A formação do primórdio dos olhos em *Drosophila* começa no segundo instar larval a partir de um disco imaginal. Durante esse processo vários fatores de transcrição ligados na cascata genética realizam papéis críticos e são codificados pelos genes: *eyeless* (*ey*), *sine oculis* (*so*), *eyes absent* (*eya*) e *dachshund* (*dac*). Em resposta à sinalização do fator Decapentaplégico (Dpp) Ey induz a expressão de *eya*. Isso é logo seguido pela indução de SO e em seguida Dac. A co-expressão de Ey, Eya, SO e Dac estabelece um pool de células progenitoras do olho dentro do epitélio. No início do terceiro estágio larval inicia-se o desenvolvimento de um arranjo de neurônios fotorreceptores sinalizados por Dpp e Hedgehog (Hh) (Kenyon *et al*, 2005; Huang, 1996). Ainda nesta fase uma onda morfogenética atravessa o disco imaginal postero-anteriormente deixando clusters de neurônios em diferenciação. Esta onda é marcada por um sulco morfogenético onde as células dentro e ao redor expressam Dpp. À frente do sulco as células entram no estágio pré-proneural marcado pela expressão do fator de transcrição Hairy (H). Logo em seguida ocorre a expressão do gene *atonal* induzindo a diferenciação de neurônios fotorreceptores (Jarman *et al*, 1994). O gene *atonal* marca o início da neurogênese e mais tarde ele se torna restrito ao receptor R8 em cada omatídio (Kenyon *et al*, 2005).

Posteriormente ao sulco morfogenético os neurônios em desenvolvimento podem ser visualizados pela expressão do marcador pan-neural ELAV.

No presente projeto utilizamos genes chaves a fim de determinar o início do desenvolvimento e diferenciação do lóbulo óptico e retina em zangões e operárias de *Apis mellifera*. Concomitante a estes marcadores genéticos foi utilizada informação sobre a diferenciação morfológica/histológica que ajudou a determinar o melhor momento para analisar os genes envolvidos no desenvolvimento do sistema visual. A partir do ponto onde se inicia a diferenciação neuronal foi realizado um estudo da expressão diferencial

Desenvolvimento do sistema visual: Análise por PCR em tempo real

Uma segunda abordagem que utilizada no presente projeto incluiu a análise de transcritos por qRT-PCR de genes conhecidos que possuem importante papel no desenvolvimento do sistema visual de *Drosophila*. Tais genes são: *sine oculis*, *eyes absent*, *minibrain*, *small optic lobes* e *roughest*. Durante o processo de formação do primórdio do olho, o gene *sine oculis* (*so*) é expresso nas células progenitoras do olho e possui papel fundamental na iniciação e progressão do sulco morfogenético e diferenciação neural. Sua expressão também se mantém durante o desenvolvimento do epitélio neural no terceiro instar larval (Kenyon *et al*, 2005). Experimentos mostraram que a perda gradual da função de *so* resulta na progressiva redução do tamanho do olho até a sua perda completa em adultos. A redução no tamanho ocorreu devido à redução do desenvolvimento neuronal durante o terceiro instar larval. A redução da neurogênese é precedida e acompanhada pela expressão reduzida de *dpp* e pelos fatores de especificação do olho Eya e Dac (Kenyon *et al*, 2005). *Sine oculis* atua em conjunto com a proteína *Eyes absent*, um fator de transcrição nuclear os quais se interagem durante a formação do olho em *Drosophila* (Ohto, 1999). A proteína *Eyes absent* é membros de uma rede regulatória com participação no desenvolvimento do olho, músculo, rins e ouvidos. Mutações neste gene estão associadas com desordens congênitas (síndrome bronchio-oto-renal) incluindo doenças em vários órgãos (Desplan, 1997).

Mutações do gene *small optic lobes* (*sol*) produz defeitos específicos no sistema nervoso adulto como resultado da neurodegeneração. Em *Drosophila*, neurodegeneração ocasionada por esse mutante leva à redução de aproximadamente 50% do número de células das neurópilas (medula, lóbula e placa da lóbula) (Delaney *et al*, 1991). Entre os neurônios faltando no olho adulto estão certas classes de neurônios transmedulares que projetam para a lóbula e placa da lóbula. Porém, não é afetado o número de colunas na medula mutante, assim como, lâmina e cérebro central. As alterações de comportamento relacionadas com esse tipo

de mutação envolvem respostas de aterrização e discriminação de superfície. Em *Drosophila* a análise da sequência predita de aminoácidos do Sol mostrou semelhança com dedos de zinco encontrado em receptores de hormônios esteróides e proteínas ligantes de DNA. Também há similaridade com motivos ricos em cisteína do domínio da proteína quinase C. Na parte carboxila terminal da proteína há um segundo domínio similar à proteases neutras ativadas por cálcio (calpaínas) de subunidades de humanos e outros vertebrados (Melloni *et al*, 1989).

Moscas mutantes para o gene *minibrain* (*mnb*) são caracterizadas por específica redução do volume dos lóbulos ópticos e cérebro central em adultos. De modo geral, mudanças na arquitetura neuronal não são aparentes. Desta forma o locus *mnb* parece realizar papel essencial na regulação do número de distintos tipos de células neuronais e, portanto, na regulação do tamanho final. Externamente o número de facetas e de fotorreceptores é normal em *Drosophila* e, portanto, sua aparência externa é indistinguível em relação ao tipo selvagem. Desde que os lóbulos ópticos do cérebro adulto são derivados de neuroblastos, este gene mostra-se excelente candidato para o estudo do desenvolvimento dos lóbulos ópticos (Tejedor *et al*, 1995).

O loco *roughest-irregular chiasm C* (*rst-irreC*) é um importante componente do sistema de sinalização durante o desenvolvimento do olho. A proteína codificada é necessária para a projeção correta das fibras visuais no quiasma óptico do gânglio óptico em *Drosophila* e correta organização e diferenciação omatidial (Boschert *et al*, 1990; Wolff e Ready, 1991; Ramos *et al*, 1993; Schneider *et al*, 1995; Reiter *et al*, 1996). A expressão desta proteína é essencial para o alinhamento das células interomatidiais, que antecede a onda de apoptose no início da vida pupal. A perda desta função *rst-irreC* acarreta em quase total falha do programa de morte celular em remover células supérfluas que desorganizam a retina, as quais se diferenciam em células pigmentares dando ao olho uma aparência de “rugoso” (Wolff e Ready, 1991). Portanto, alelos mutantes do locus *roughest* afetam o sistema visual, tanto na formação do olho composto como no desenvolvimento do lobo óptico (Boschert *et al*, 1990; Ramos *et al*, 1993; Reiter *et al*, 1996; Araújo *et al*, 2003). Este gene mostra-se um importante marcador do desenvolvimento dos lóbulos ópticos visto que em zangões há praticamente o dobro de facetas (Ribi, 1989) comparado com operárias.

Para o estudo do desenvolvimento do sistema visual em *Apis mellifera* foi feita a comparação com genes já conhecidos em *Drosophila* e, também, o estudo da expressão diferencial durante fase crítica do desenvolvimento. Ambas abordagens são necessárias para o entendimento dos complexos mecanismos genéticos fundamentais para os processos altamente regulados que ocorrem durante o desenvolvimento do sistema visual em *Apis mellifera*.

Objetivos

O objetivo geral do presente projeto é a busca de genes diferencialmente expressos no lóbulo óptico e olho envolvidos na plasticidade fenotípica observada entre machos e fêmeas de *Apis mellifera*.

Objetivos Específicos:

- Determinação do início do desenvolvimento e neurogênese.
- Análise da expressão gênica por microArrays em fase específica.
- Anotação dos genes diferencialmente expressos obtidos com auxílio de ferramentas de bioinformática.
- Análise por qRT-PCR de transcritos dos genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento pós-embrionário de operárias e zangões.

Material e Métodos

Abelhas

No presente trabalho utilizamos abelhas operárias e zangões da espécie *Apis mellifera* de diferentes estágios do desenvolvimento obtidas por métodos convencionais de apicultura no Apiário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

As larvas de diferentes fases de desenvolvimento pós-embrionário (L₃, L₄, L₅F₁, L₅F₂, L₅F₃, L₅S₁, L₅S₂, L₅S₃, PP₁, PP₂, PP₃) foram coletadas de diferentes favos. As larvas de operárias foram classificadas baseando-se no seu peso, tamanho da cápsula cefálica e morfologia (Michelette e Soares, 1993; Myser, 1954; Nelson, 1924; Winston, 1987). Como critério de seleção para a fase de tecelagem de casulo (Spinning S) observou-se a gradual esvaziamento do conteúdo intestinal em larvas em células recentemente operculadas. Para a pré-pupa observou-se a segmentação da cabeça e tórax, o alargamento dos olhos, o progresso da apólise, a visualização do intestino e a reabsorção do líquido exuvial (Tabela 2). Após o reconhecimento da fase as larvas e pupas foram imediatamente dissecadas e/ou fixadas.

Produção e classificação de zangões

Devido ao grande gasto energético social, os machos de *Apis mellifera* são produzidos principalmente durante a primavera quando há grande disponibilidade de pólen e néctar. Em períodos de escassez de alimentos é necessária suplementação proteica e energética para uma produção contínua de larvas de zangões. Contudo, a produção machos não é estável e pode variar durante a estação e entre colméias. Para resolver este problema suplementamos a carga de proteína na colméia utilizando uma pasta de pólen preparada da seguinte forma: pólen comercial foi macerado e adicionado xarope de açúcar 50% e mexido vigorosamente até obter uma pasta. A pasta foi aplicada no alto dos favos ou na entrada da colméia (cerca de 100 gramas por aplicação), 3 vezes por semana durante um período de 2 semanas. Neste mesmo período foram adicionados 1,5 litros de xarope de açúcar 2 vezes por semana. Durante todo o processo a colméia foi inspecionada para evitar excesso de crias e de realeiras para evitar o enxameamento. O tratamento foi interrompido por até 10 dias toda vez que a colméia apresentasse sinais de enxameamento ou de super-produção de crias, podendo ser retomado subsequentemente. Se nenhuma das situações anteriores ocorresse, a colméia estava pronta para a postura controlada de zangões em favo especialmente preparado (Figura 1). Para utilização do favo para a postura, o mesmo foi deixado

em caixa vazia e aberta no apiário experimental do Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para que houvesse saque de pólen e mel por outras abelhas até que o quadro ficasse totalmente limpo. A postura controlada de zangões consistiu em prender a rainha com tela especial por 24 horas sob quadro preparado sob as células de zangões. Cerca de 3 dias antes da postura controlada qualquer suplementação alimentar foi interrompida para evitar estoque de alimento em células de zangões.

Figura 1: Favo de colméia de *Apis mellifera* contendo células de zangões (a direita) e células de operárias (a esquerda). Linha branca marca a divisória do favo mostrando a diferença de tamanho das células. Seta branca aponta uma célula preenchida com pólen.

Para a correta classificação dos estágios iniciais de zangões realizamos posturas controladas com favos de zangões em diferentes caixas. Na postura controlada prende-se uma rainha no favo utilizando-se uma gaiola e, portanto, forçando-a a ovipositar naquela região, permitindo que operárias possam livremente transitar e cuidar das crias e da rainha. Com isso é possível obter indivíduos com idade muito próxima. Ao final de 3 dias de desenvolvimento as larvas eclodem e atingem o primeiro instar larval. Realizamos coletas no 4º, 5º, 6º e 7º dia após a postura controlada, afim de medir o diâmetro da capsula cefálica da larva. Definimos como 4º dia sendo L1, 5º dia sendo L2, 6º dia L3 e 7º dia L4 (Figura 1).

Colocamos larvas de zangão em régua de precisão (Leica) sob lupa Leica onde tirou-se fotos para posterior análise. Em cada foto foi possível utilizar a régua como padrão para definição de medida utilizando-se o software Adobe Photoshop CS5. Os dados foram analisados em software R (versão 2.13.2 para Mac) (Figura 2). Utilizamos ANOVA com modelo linear seguido de teste pós-hoc Tukey para testar a hipótese nula entre os grupos. Verificamos que os quatro grupos diferem entre si ($p = 2,2 \times 10^{-16}$, Tabela 1) e, portanto, rejeitamos a hipótese nula de que as médias do diâmetro da capsula cefálica não diferem entre si. Pelo teste pós-hoc de Tukey através de observou-se que todos os grupos diferem entre si (Tabela 1).

O quinto instar larval corresponde a um período de intensa alimentação e, portanto, crescimento. Para melhor definir esta fase em zangões, coletamos indivíduos em fase adiantada de operculação e indivíduos que acabaram de entrar no quinto instar. Com isso pudemos subdividir o quinto instar em três subfases descritas na Tabela 2. Com esta análise fomos capazes de traçar um padrão do desenvolvimento de zangões nos possibilitando determinar o tempo de desenvolvimento de cada fase larval para futuros experimentos.

Figura 2. Diâmetro da cápsula cefálica de zangões de *Apis mellifera*, coletados no 4º dia (L1, n=5), 5º dia (L2, n=5), 6º dia (L3, n=6) e 7º dia (L4, n=7) após a postura controlada. As larvas foram fotografadas e analisadas no software Photoshop CS5. As medidas foram realizadas utilizando-se como padrão a régua de precisão em lupa Leica. Cada cápsula cefálica foi medida transversalmente (latero-lateral) traçando-se uma linha reta entre os pontos mais distantes da capsula cefálica. O gráfico foi plotado utilizando-se o pacote estatístico R versão 2.13.2 para Mac.

Tabela 1. Sumário estatístico dos grupos L1 a L4 e teste pós-hoc de Tukey. Estão representados as análises *box-whiskers* por quadrante de cada fase. A tabela também mostra os resultados do teste pós-hoc de Tukey realizado após tratamento linear com ANOVA. Pode-se verificar que os valores p entre as diferentes fases comparativamente são significativos.

	L1	L2	L3	L4	Tukey	p adj
Max	278	391	691	1163	L1-L2	0,0050337
3° Qu.	263	387	667,5	1078	L1-L3	0,0000000
Média	255,6	365,2	634,2	1054	L1-L4	0,0000000
Mediana	252	362	640,2	1031	L2-L3	0,0000000
1° Qu.	243	354	598,5	1028	L2-L4	0,0000000
Min	242	332	572	971	L3-L4	0,0000000

Como critério de seleção para a fase de tecelagem de casulo (Spinning S) observou-se o gradual esvaziamento do conteúdo intestinal em larvas em células recentemente operculadas. Para a pré-pupa observou-se a segmentação da cabeça e tórax, o alargamento dos olhos, o progresso da apólise, a visualização do intestino e a reabsorção do líquido exuvial (Tabela 2). Após o reconhecimento da fase, as larvas foram imediatamente dissecadas e fixadas ou homogeneizadas em TRIzol (Invitrogen).

Tabela 2. Fases do desenvolvimento larval de operárias e zangões de *Apis mellifera* (Michelette & Soares, 1993)

Fase		Sigla	Características (Operária)
3° instar		L3	1,5 – 4,45 mg
4° instar		L4	4,8 – 24,8 mg
5° instar L5	F (alimentação) – célula aberta	F1	27 – 41 mg / 40 – 129 mg (Zangão)
		F2	54 – 90 mg / 130 – 269 mg (Zangão)
		F3	107 – 115 mg / 270 – 400 mg (Zangão)
	S (spinning) – tecelagem do casulo	S1	Intestino cheio
		S2	Intestino metade vazio
		S3	Intestino completamente vazio
	Pré-Pupa	Medida Tibio-Tarsal	
		PP1	1,2 – 1,44 mm / 1,4 - ,199 (Zangão)
		PP2	1,8 – 2,0 mm / 2,0 – 2,6 (Zangão)
		PP3	cutícula opaca / > 2,6 (Zangão)

Análise histológica

Após a classificação da fase do desenvolvimento, as larvas e pupas tiveram a cabeça removida em salina *Ringer*, e esta foi rapidamente colocada em solução fixadora Bouin (ácido pícrico saturado, formol (35%) e ácido acético na proporção de 15:5:1, respectivamente) por 4 horas em temperatura ambiente ou a 4°C *overnight*. A remoção do fixador foi realizada em 3 lavagens de 30 minutos cada em tampão fosfato com salina (PBS, 100 mM, 0,9% NaCl, pH 7,4) ou até que o ácido pícrico em excesso fosse retirado. A desidratação era realizada em bateria crescente de etanol: 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Cada passo durou 10 minutos e o último passo foi repetido duas vezes.

Para a diafanização, as cabeças foram colocadas em solução 1:1 de benzol e etanol por 15 minutos, seguido de benzol absoluto três vezes de 15 minutos cada. Logo em seguida o material foi colocado em parafina derretida (62°) e após 1 hora foi transferido para nova solução de parafina derretida pelo mesmo período. Após o material ter passado por vácuo em parafina derretida por 30 minutos, os blocos foram montados em forma laminada. Cortes seriais de 8µm foram montadas em lâminas pré-tratadas com poli-lisina (20% diluída em água destilada, imersão de 10 minutos e secagem a 60°C).

Para desparafinização, as lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 80°C por 20 minutos, seguidos de três banhos sucessivos de xilol de 5 minutos cada e série decrescente de etanol 100%, 90%, 80%, 70%, 50% com 5 minutos cada. Os cortes foram mantidos em banho com água corrente por 10 minutos e a coloração foi realizada com hematoxilina e eosina por 2 minutos cada intercalado com um banho de água destilada. Os cortes foram rapidamente desidratados em etanol 90%, 95% e duas vezes em etanol 100% e levados para solução xilol/etanol 1:1 (5 minutos de duração em cada passo) seguidos por três banhos de xilol e finalmente montagem da lamínula com Entellan (Merck).

As lâminas foram analisadas em microscópio invertido Axiovert 35 (Zeiss) e as fotos obtidas em microscópio Olympus BX50 com câmera Nikon DX1200. O programa utilizado foi ACT-1 (Nikon V 2.63).

Extração de RNA do lóbulo óptico e cérebro

Para a extração de RNA seguiu-se o protocolo de TRIzol (Invitrogen) para pequenas quantidades. Diferentes quantidades de lóbulos ópticos foram usadas dependendo da fase de desenvolvimento segundo tabela 3. Para cada fase do desenvolvimento foram realizadas extrações em triplicatas para maior representatividade dos dados. Os lóbulos ópticos

dissecados em salina *Ringer* gelado foram rapidamente colocados em tubos Eppendorf (1,5 mL) contendo 500 µL de TRIzol e estocados em freezer -70°C.

As amostras estocadas a -70°C foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos e homogeneizadas por aspiração repetida em seringas estéreis. Em seguida adicionou-se 200 µL de clorofórmio e os tubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e novamente deixados por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e a fase superior foi transferida para novo tubo contendo 400 µL de isopropanol com 5 µg de glicogênio. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas (12.000 g, 4°C), o sobrenadante foi removido e ao pellet foi adicionado 800 µL etanol 75% (em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%) para lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a 4°C e após remoção do sobrenadante o pellet de RNA foi secado em banho seco a 55°C por 5 minutos e, em seguida, dissolvido em 20 µL de água livre de RNase.

Para eliminar possível contaminação com DNA as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase (Promega) por 40 minutos a 37°C. A inativação da DNase se deu por incubação a 70°C por 15 minutos.

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (NanoVue ND – 1000, GE Healthcare) após diluição apropriada das amostras em água e a leitura foi realizada a 260 e 280 nm.

Tabela 3. Quantidade de pares de lóbulos ópticos (L.O.) usados para extração de RNA, por amostra nas respectivas fases de desenvolvimento.

Fase	# de L.O.	Fase	# de L.O.
L3	30	LS3	16
L4	30	PP1	15
LF1	23	PP2	15
LF2	20	PP3	15
LF3	20	Pupa Olho Branca (Pw)	4
LS1	18	Pupa Olho Marrom (Pb)	4
LS2	16		

Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando transcriptase reversa ImProm-II (Promega). A partir de uma quantidade inicial de 2 a 3 µg de RNA adicionou-se oligo(dT)₁₂₋₁₈(Invitrogen) como inicializador da reação a qual seguiu as instruções da Promega. O volume final da reação foi 20 µL e seguiu as condições descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Reação de síntese da primeira fita de cDNA

<i>Anelamento</i>	25°C	5 minutos
<i>Extensão</i>	42°C	65 minutos
<i>Inativação</i>	70°C	15 minutos
<i>Conservação</i>	4°C	∞

Métodos computacionais

Sistema operacional, linguagens de programação e programas

O trabalho foi desenvolvido em um Macbook Intel core two-duo 2,4 GHz, 3Mb L3 cache, 4 Giga memória RAM, sistema operacional Mac OS X 10.6.8 distribuição Snow Leopard, Kernel Unix (Darwin) versão 10.8.0.

Python é uma linguagem de programação extraordinariamente poderosa, dinâmica e interpretada (não necessita de compilação) usada em uma grande variedade de aplicações. Sua codificação é simples, de alto nível com grande capacidade de introspecção, intuitiva e orientada a objeto. Possui alta compatibilidade e intercambialidade com outras linguagens como Java (Jython), C e C++ entre outras e especialmente apta para trabalhar com longas strings. Todas estas características a tornam especialmente útil para desenvolvimento de algoritmos em Bioinformática. No presente trabalho diversos scripts foram escritos em Python versão 2.7 (vide anexos).

Tabela 5. Principais programas utilizados localmente.

Programa	Utilidade	Site	Referência
BLAST	Alinhamento Local	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
CLUS-TALW	Alinhamento Multiplo	www.genome.jp/tools/clustalw/	(Thompson <i>et al.</i> , 1994)
T-COFFEE	Alinhamento Multiplo	www.tcoffee.org/Projects_home_page/t_coffee_home_page.html	(Notredame <i>et al.</i> , 2000)
PHYLIP	Inferência Filogenética	evolution.genetics.washington.edu/phyml.html	(Felsenstein, 1989)
MEME	Localiza motivos conservados por método estatístico	meme.nbcr.net	(Bailey; Elkan, 1994)
Artemis	Ferramenta de visualização e anotação de sequências	www.sanger.ac.uk	(Rutherford <i>et al.</i> , 2000)
R	Análise estatística e geração de gráficos	cran.r-project.org/	cran.r-project.org/

Base de dados de sequências gênicas

Os dados utilizados no presente projeto foram baixados localmente a partir de diversas localidades dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Principais bases de dados utilizadas.

Base de Dados	Site	Referência
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov	ver site
BEEBASE	hymenopteragenome.org/beebase	(Munoz-Torres <i>et al.</i> , 2011)
FlyBase	flybase.org/	(FlyBase Consortium, 2003)
Pfam	pfam.janelia.org/	(Sonnhammer <i>et al.</i> , 1998)
Gene Ontology	www.geneontology.org/	(Ashburner <i>et al.</i> , 2000)

As regiões promotoras dos genes preditos de *Apis mellifera* foram obtidas através do site <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> utilizando-se a ferramenta “retrieve sequence”. A região considerada foi de 1.000 bases a montante do start códon de cada gene sem considerar o start códon. Foi verificada cada região promotora para impedir sobreposição com genes e, neste caso, a região foi reduzida garantindo apenas sequências não codificadoras, supostamente regulatórias. O banco de dados utilizado foi o GenBank (Tabela 6). Cada região promotora foi estruturada em um dicionário onde a chave recebe o ID gênico e, associado à cada chave, está a sequência correspondente. O dicionário compreende as regiões promotoras de todos os genes mapeados.

Construção da tabela de proteínas associadas ao termo Gene Ontology “Eye Development”

O Gene Ontology define o termo “Processo Biológico” como sendo uma série de eventos realizado por um ou mais conjuntos ordenados de funções moleculares em mais de um passo. Através do banco de dados do FlyBase foi obtido as inferências (“is_a”) ao termo do Gene Ontology “Eye Development” correspondente aos genes de *Drosophila melanogaster*. A partir da lista de genes obteve-se todas as proteínas associadas aos genes (isoformas) montando-se um arquivo separado. Para localizar ortólogos putativos no genoma de *Apis* foi realizado o alinhamento local recíproco de proteína (blastp) a partir do arquivo de proteínas obtidas de *Drosophila melanogaster* utilizando-se o script “get_reciprocal.py” (ver anexo) (E-value $\leq 1e-10$). Com isto foi possível montar arquivo contendo as sequências proteicas de *Apis mellifera* que podem ter participação no desenvolvimento do olho.

Busca da região promotora de genes associados ao termo “Eye Development” GO

As sequências promotoras de genes de *Apis mellifera* obtidas foram baseadas no formato do GenBank, sendo organizadas pelas coordenadas da região relacionadas com o gene em questão. Para associar cada região promotora com o respectivo gene foi criado um arquivo

de conversão de IDs contendo GenBank ID e GB associado baseado no arquivo de anotação da ferramenta “MapView” do NCBI considerando a versão 4.0 do genoma (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes//Apis_mellifera/-mapview/seq_gene.q.gz). O *parsing* do arquivo *seq_gene.q* foi realizado utilizando-se um script em Python.

Em posse do arquivo de conversão de IDs, o dicionário com as sequências promotoras e o arquivo com proteínas relacionadas a “Eye Development” de *Apis* foi possível recuperar as sequências promotoras apenas dos genes relacionados com o termo “Eye Development”.

Análise in silico dos genes candidatos

Para definição estrutural dos genes está sendo utilizada a sequência codificadora completa das proteínas de *Apis mellifera*. Para análise do ortólogo em *Apis mellifera* utilizou-se a versão 4.0 do genoma da abelha (The Honey Bee Genome Consortium, 2006), as ferramentas de FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) e algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.*, 1990) para anotação dos genes, proteínas e sequências amplificadas. Para análise *in silico* dos ortólogos em *Apis mellifera* e dos primers está sendo utilizado o programa Artemis v11 (www.sanger.ac.uk) (Rutherford *et al.*, 2000)

Anotação dos genes candidatos e desenho de primers

A sequência das proteínas Roughest, Mini Brain, Eye absent, Small Optic Lobes e Sine oculis de *Drosophila* foram utilizadas para identificar sequências similares (GB 11991-PA, GB20129-PA, GB11435-PA, GB14881-PA e GB15213-PA respectivamente) presente no banco de dados de *Apis mellifera* versão 4.0 (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) utilizando o algoritmo BLASTP e BLASTN rodando localmente em Mac OS X versão 10.6.8. As sequências codificadoras (CDS) foram extraídas dos bancos e analisadas por BLASTN (versão 2.2.26) contra o banco de dados não-redundante do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para identificação de “*mutual best hits*” e localização de possíveis domínios conservados.

A sequência nucleotídica dos respectivos ortólogos foi utilizada para detecção dos ORFs e montagem dos exons no programa Artemis v.11 (Rutherford *et al.*, 2000). Na anotação as sequências de aminoácidos foram alinhadas com a da proteína predita, considerando a sequência consenso GT-AG para *splicing* de finalização e inicialização de exon (Breathnach e Chambon, 1981). Ao final, as sequências dos exons obtidas foram utilizadas para desenhar primers específicos.

Os primers foram desenhados utilizando-se os programas Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Foram desenhados primers (Tabela 7) para amplificação de exon inteiro e primers que anelavam a parte jusante de um exon com a parte montante do exon seguinte para controlar e detectar possível contaminação das amostras cDNA com DNA genômico.

Tabela 7. Primers específicos para o gene *roughest*, *smal optic lobes* (SOL), *eye absent* (EYA), *sine oculis* (SO) e *minibrain* (MNB).

Primer	Sequência 5' - 3'	T.m.
roughest	F - 5'- ACGAGGATTCGGAGCGACAGG - 3'	62°C
	R - 5'- GGTGCCCCGATGTAGATGTTC G - 3'	62°C
SOL	F - 5'- AGCACCAGAAAGTGGGAAGATT- 3'	61°C
	R - 5'- TACGTTCTTGCCATCCACAG- 3'	61°C
EYA	F - 5'- CCAAAGCGGAAGTGGAAATA - 3'	60°C
	R - 5'- ATGCTACTTGGGCCAGAAGA - 3'	60°C
SO	F - 5' GACATCGGGCATGTATCAACT - 3'	60°C
	R - 5' GTTGCAACTGGTGATGAAGGT - 3'	60°C
MNB	F - 5 TAGGGAATCGACGTGTCGTAA - 3'	60°C
	R - 5'CTGCTGAATCATTGGTGAGGT - 3'	60°C
Met-RNAi-T7	F - 5' TAATACGACTCACTATAGGGCGAGTGGTATCCTCGTTG-CCACAG	60°C
	R - 5' TAATACGACTCACTATAGGGCGATCCGCAAGCCTGAGTATTCC	60°C
Met-RT	F - 5' AGGCGGGAGCATAACACAGTAC	60°C
	R - 5' TTTTCGTGAGTGGCTGCTTC	60°C

Normalização dos perfis de cDNA

Os perfis de cDNA de fita simples foram normalizados pelos genes de expressão quase constitutiva, tais como uma actina citoplasmática (número de acesso no Official_Gene_Set GB17861) e da proteína ribossomal RP49 (número de acesso GenBank AF 441189). Para *actina* os primers utilizados são: ACT-Forward 5'- TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG - 3' e ACT-Reverse 5'- AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA - 3'. Para RP49 os primers utilizados foram: RP49 - Forward - 5' CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT - 3' e RP49 Reverse 5' - TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG - 3'. Ambos genes foram utilizados como normalizadores de PCR quantitativo e semiquantitativo, e a temperatura de anelamento foi de 60°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR semi-quantitativo)

Para amplificação de fragmentos do gene *roughest* foram preparadas reações de PCR a partir dos perfis de cDNA gerados para cada fase de desenvolvimento da abelha. Inicialmente montou-se em um tubo Eppendorf um “master mix” conforme descrito:

Tabela 8: Master mix para reação em cadeia da polimerase.

Água deionizada autoclavada	18,8 µL
Solução tampão para <i>Taq</i> polimerase	2,5 µL
Primer Reverse (0,4 pmol final)	1 µL
Primer Forward (0,4 pmol final)	1 µL
<i>Taq</i> Polimerase - Fermentas (5 U/µL)	0,2 µL
cDNA	0,5 µL
dNTP (0,4 µmM final)	1 µL

As amplificações foram realizados em termociclador PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições:

- 95°C – 5 minutos
- 95°C – 1 minuto
- 57°C a 62°C – 30 segundos (dependendo da temperatura de anelamento de cada primer)
- 72°C – 30 segundos
- Repetição dos passos **b,c** e **d** (29 vezes para os genes *roughest*, *actina* e *rp49*)
- 72°C – 10 minutos

Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% preparados com tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) e posteriormente corados em brometo de etídio (0,2 µg/mL).

PCR quantitativa (Real Time – PCR)

Para amplificação dos genes candidatos estão sendo utilizados perfis de cDNA de cada fase do desenvolvimento da abelha detalhado na tabela 4 e 5. Dois genes controles endógenos foram utilizados o *rp49* e *actina* para normalização dos dados nos teste com o gene *roughest*, e o *rp49* para os demais. A eficiência dos primers dos genes de controle, *actina*, *rp49*, e dos genes candidatos foi verificada em reação quantitativa de PCR utilizando-se diluição de 1:10 até 1:1000 (pelo menos 5 pontos foram considerados) do cDNA e construção de curvas de

regressão linear específicas para cada par de primers. Com o valor de *Slope*, obtido pela curva, calculou-se a eficiência dos primers pela fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})}$. Os valores obtidos para *actina* foram de -3,55 de *Slope*, e correspondente $E = 1,91$; para o *rp49* foram de -3,36 para *Slope* e $E = 1,98$, e finalmente para o primer *roughes* obteve-se -3,63 para *Slope* e $E = 1,88$.

Para as análises por PCR quantitativa foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR*[®] *Green* (Applied Biosystems) para o gene *roughes* e para os demais foi utilizado Maxima *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas). O volume da reação final foi de 14 μL , contendo 7 μL do “*Master mix*” *SYBR Green*, 1 μL de cada primer (Forward e Reverse a 10 pmol), 4 μL de H_2O deionizada e autoclavada e 1 μL de cDNA diluído 1:10. Para cada fase do desenvolvimento foram preparados três perfis de cDNA e de cada perfil foram montadas reações em triplicata para o gene alvo e para os genes controles. As reações foram realizadas em aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A curva de dissociação foi analisada em cada reação e os valores relativos de expressão dos genes foram calculados conforme o procedimento C_T comparativo (Pfaffl, 2001).

Extração e preparo de RNA para micro-arranjos

Definimos a fase de Spinning II para análise com micro-arranjos. Para cada grupo foi feita uma duplicata para maior representatividade biológica (SII A e B) tanto em machos como em fêmeas.

Os lóbulos ópticos dissecados em salina *Ringer* (autoclavado e filtrado em filtro 0,22 μm) gelado foram rapidamente colocados em tubos Eppendorf (1,5 mL) contendo 500 μL de TRIzol. As amostras foram imediatamente homogeneizadas utilizando-se pistilos autoclavados. Em seguida adicionou-se 200 μL de clorofórmio e os tubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e novamente deixados por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e a fase superior foi transferida para novo tubo contendo 400 μL de isopropanol. As amostras em isopropanol foram mantidas em freezer -20°C por 24 horas e em seguida centrifugadas (12.000 g, 4°C) por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e ao pellet foi adicionado 800 μL etanol 75% (em água deionizada tratada com dietilpirocabonato (DEPC) 0,1%) para lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 g por 15 minutos a 4°C e após remoção do sobrenadante o pellet de RNA foi secado em sistema Speedvac por 3 minutos e, em seguida, dissolvido em 20 μL de água livre de RNase.

Afim de garantir maior pureza das amostras os grupos de RNA foram purificados com o kit RNeasy MiniKit (Qiagen) antes de proceder com a síntese de aRNA. A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (NanoVue ND – 1000) e a leitura foi realizada a 260 e 280 nm.

Síntese de aRNA (Amino Allyl RNA)

Para a reação de marcação de RNA com amino allyl (aRNA) utilizamos o Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit(Ambion) e os procedimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante, com modificações para cada amostra. Após purificação 2 µg de RNA total foi utilizado para iniciar a reação de transcrição reversa para sintetizar a primeira fita de cDNA através de inicializador oligo(dT) em reação final de 12 µL em tubo de 0,5 mL. A mistura foi agitada em vórtex, centrifugada 1 minuto a 10.000 rpm e incubada 10 minutos a 70°C em termociclador. Em seguida foi adicionado o master mix (Tabela 9), centrifugado 1 minuto a 10.000 rpm e misturado com pipeta 3 vezes. Cada amostra foi colocada a 42°C por 2 horas em banho-maria pré-aquecido. Após incubação as amostras foram centrifugadas 15 segundos a 10.000 rpm e colocadas em gelo até que o master mix para síntese da segunda fita de cDNA estivesse pronto.

Tabela 9: Master Mix para reação de transcrição reversa

2 µL	10X First Strand Buffer
4 µL	dNTP mix
1 µL	RNase inhibitor
1 µL	ArrayScript

Ao tubo foram adicionados os componentes descritos na tabela 10, de acordo com a ordem da tabela, brevemente centrifugados, homogeneizados por pipetagem 3 vezes, e brevemente centrifugados. Cada tubo foi incubado em termo-ciclador a 16°C por 2 horas coberto com isopor para evitar grande diferença de temperatura com a do laboratório. Após incubação os tubos foram colocados em gelo. Antes de proceder para a purificação de cDNA manteve-se água livre de nuclease aquecida a 55°C em bloco térmico.

Tabela 10: Master Mix para síntese da segunda fita de cDNA

63 µL	Água Nuclease-free
10 µL	10X Second Strand Buffer
4 µL	dNTP mix
2 µL	DNA Polymerase
1 µL	RNase H

Imediatamente após a incubação foi adicionado 250 μL de cDNA Binding Buffer nas amostras, homogeneizados por pipetagem, colocados em filtro para cDNA e centrifugados 1 minuto a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e ao filtro foi adicionado 500 μL de Wash Buffer e novamente centrifugado 1 minuto a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e o tubo com o filtro foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Em novo tubo foi adicionado no filtro 9 μL de água nuclease-free aquecida a 55°C, incubado por 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugado 2 minutos a 10.000 rpm. Mais 9 μL de água nuclease-free aquecida a 55°C foi adicionado ao filtro e novamente centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm. Em seguida as amostras foram colocadas à temperatura ambiente e adicionados os reagentes para síntese de aRNA modificado com amino allyl de acordo com a Tabela 11. A amostra em cada tubo foi gentilmente homogeneizado por pipetagem e brevemente centrifugado. Cada tubo foi incubado a 37°C por 16 horas em banho-maria.

Tabela 11: Master Mix para síntese de aRNA modificado com amino allyl

3 μL	aaUTP (50mM)
12 μL	ATP, CTP, GTP mix (25mM)
3 μL	Solução de UTP (50mM)
4 μL	T7 10X Reaction Buffer
4 μL	T7 Enzyme Mix

Após a incubação a reação foi parada com 60 μL de água nuclease-free, fazendo com que o volume chegasse a 100 μL para a purificação. Em cada tubo adicionamos 350 μL de aRNA Binding Buffer e imediatamente colocamos todo o volume em coluna de filtragem para aRNA, em novo tubo de 2 mL. À coluna de filtragem foi adicionado 250 μL de etanol 100% (Merck), homogeneizado por pipetagem, centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e adicionado à coluna 650 μL de Wash Buffer, centrifugado 1 minuto a 10.000 rpm. Após descartar o filtrado o tubo com a coluna foi novamente filtrado para remover qualquer traço de tampão. A coluna foi transferida para novo tubo e adicionado 100 μL de água nuclease-free aquecida a 55°C e deixada a temperatura ambiente por 2 minutos seguido de centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm.

Com o aRNA purificado e colocado em gelo seguimos com o preparo das cianinas (Cy3 e Cy5)(GE Healthcare- Amersham Cy Dye Post-Labeling ReactiveDyePack). Para isso adicionou-se 11 μL de DMSO a cada cianina, homogeneizou-se em vortex e incubou-se por 1

hora no escuro em temperatura ambiente. 10 µg do aRNA de cada grupo foi secado em Speed-vac, adicionado 9µL de Coupling Buffer e gentilmente ressuspendido em vortex. Ao ressuspendido foi adicionado 11 µL do preparado Dye/DMSO e incubado por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente para permitir a reação de ligamento com as cianinas. Para parar a reação foi adicionado 4,5µL de hidroxilamina 4 M, gentilmente misturado com vortex e incubado no escuro por mais 15 minutos a temperatura ambiente. À cada tubo foi adicionado 5,5 µL de água nuclease-free e prosseguimos com a purificação. Adicionamos 105 µL de aRNA Binding Buffer em cada amostra seguido de 75 µL de etanol 100% (Merck) e homogeneizamos por pipetagem. Imediatamente as amostras foram colocadas em coluna de filtragem de aRNA e centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm. 500 µL de Wash Buffer foi utilizado para a limpeza de cada amostra na coluna e o tubo com a coluna de filtragem foi novamente centrifugado 2 vezes 1 minuto cada a 10.000 rpm para retirar qualquer resíduo. Para eluir o aRNA marcado foi aplicado 10 µL de água nuclease-free pré-aquecida no centro da coluna, deixado à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugado 2 minutos a 10.000 rpm. Este passo foi repetido e o total resgatado foi de aproximadamente 20 µL.

Integridade do RNA para microArray

Para garantir o máximo de integridade de RNA para a preparação do microArray, logo após a purificação do RNA, prosseguimos imediatamente com a síntese de aRNA com as amostras que apresentaram razão 260/280 nm entre 1,7 e 1,9 ou maior que 2 medido em espectrofotômetro NanoVue.

Preparo e hibridação das lâminas de microArray

As lâminas de microarray foram umedecidas em vapor de água, tomando cuidado para não formar gotículas sob a mesma. Imediatamente as lâminas foram secadas em termo-bloco a 58°C e levada para UV crosslinker por 6000 X 100µJ/cm² para fixar o DNA na lâmina. Ao final do processo prosseguimos com as lavagens das lâminas começando em solução SDS 0,2% por 2 minutos sob forte agitação. Em seguida as lâmina foram lavadas 2 vezes em água milliQ com 15 agitos cada e deixadas em isopropanol por 1 minuto. As lâminas foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos e em seguida foram incubadas por pelo menos 45 minutos a 42°C em solução de pré-hibridação (formamida 20 mL, solução de Denhardt's 100X 5 mL, tampão SSC 20X 33,2 mL, SDS 10% 1mL, tRNA 10 mg/mL 0,5 mL e água milliQ 40,3 mL).

Após a pré-hibridação as lâminas foram lavadas em água milliQ 2 vezes com 15 movimentos de agitação e em seguidas colocadas em isopropanol. As lâmina foram centrifugadas

a 2000 rpm por 3 minutos e deixadas em termo-bloco com mapa guia para lamínula em baixo. Para os experimentos utilizamos as duas cianinas, Cy3 e Cy5, e por isso, misturamos as amostras específicas determinadas para cada lâmina em tubos 0,5 mL. Aos tubos adicionamos 40µL de solução de hibridação (formamida deionizada 0,98 mL, tampão SSC 20X 0,98 mL) o qual foi desnaturado a 99°C por 3 minutos. Lamínulas específicas foram limpas em ar comprimido e colocados em cima das lâminas seguindo a ordem do mapa, e o conteúdo do tubo foi pipetado entre a lamínula e a lâmina e deixado que o líquido tomasse toda a superfície. Imediatamente o conjunto foi colocado em cassete próprio contendo 40 µL de solução de hibridação, enrolado em papel alumínio e incubado em banho-maria a 42°C submerso por 16 horas. Após a incubação o cassete foi desmontado e cada lâmina foi colocada em solução pós-hibridação 1 (SDS 2% 50 mL, SSC 20X 100 mL e água milliQ 850 mL) em banho-maria a 42°C por 2 minutos para desgrudar a lamínula. Em seguida as lâminas foram trocadas para novo *coupling jar* contendo solução pós-hibridação 1 e mexidas vigorosamente 30 vezes e deixado descansar por 2 minutos. O procedimento foi repetido com a mesma solução; este procedimento é realizado em cada troca de solução. As lâminas foram transferidas para solução pós-hibridação 2 (SDS 2% 5 mL, SSC 20X 25 mL, água milliQ 970 mL) e o procedimento repetido com a mesma solução. Após 2 minutos de descanso as lâminas foram colocadas em nova solução de pós-hibridação 3 (SSC 20X 100mL, água milliQ 900mL) e mexidas vigorosamente 30 vezes e deixado descansar por 2 minutos, o processo é repetido. As lâminas passavam 2 vezes, também, pela solução de pós-hibridação 4 (SSC 20X 5 mL, água milliQ 995 mL) com 30 movimentos de agitação e descanso de 2 minutos. Os mesmos procedimentos são repetidos 2 vezes, porém agora em *coupling jar* contendo apenas água milliQ e as lâminas são levadas para centrifugação por 3 minutos a 2000 rpm. Em seguida as lâminas foram guardadas em caixa em mantidas no escuro até o momento de escaneá-las.

Análise Estatística de dados do MicroArray.

As análises estatísticas foram desenvolvidas utilizando-se o pacote estatístico R (R Development Core Team, 2011) versão 2.13.2 para Mac. Para a análise estatística de dados do microArray utilizamos o pacote Limma (Smyth, 2005) proveniente da biblioteca Bioconductor (Gentleman, *et al.* 2004) no R. Para análise de expressão diferencial utilizamos abordagem empírica de Bayes e modelo linear (Smyth, , 2004). O design do experimento levou em consideração duplicatas técnicas de spots e de lâminas e, portanto, utilizamos a abordagem utilizada por Smyth *et al.*, (2005). Para normalização de dados de microarray de duas cores (Cy3 e Cy5) utilizamos a abordagem de Smyth, e Speed(2003). Utilizamos o método de correção de fundo descrito em Ritchie *et al.*, (2007) para análise das lâminas.

Resultados

Análise do desenvolvimento através de cortes seriais.

A abelha *Apis mellifera* é um dos mais fascinantes insetos, em grande parte devido à sua estrutura hierárquica altamente estruturada com divisões de tarefas e dominância pela rainha, seus produtos utilizados pelo homem e sua importância como polinizador na natureza. Além disso, este inseto apresenta grande plasticidade fenotípica entre os sexos e castas determinado por regulação gênica e eventos epigenômicos diferenciais orquestrados por alimentação diferencial no caso das castas e por splicing alternativo no gene *double-sex* em machos. Uma das estruturas mais notáveis ocasionadas por esse processo são os olhos. Em zangões o olho possui o dobro do tamanho na fase adulta quando comparado com operárias apesar de possuir o mesmo genoma.

No presente projeto coletamos zangões através de postura controlada em diferentes estágios de desenvolvimento pós-embrionário. Ainda pouco se sabe sobre o tamanho da capsula cefálica e tempo de muda nos estágios iniciais pós-embrionários. Para tanto utilizamos posturas controladas em favo contendo células de zangões e coletamos em períodos de 24 horas para melhor definição do primeiro ao quarto estágios larvais. Com os estágios larvais bem definidos, coletamos indivíduos de 4 dias de desenvolvimento (terceiro instar larval) os quais tiveram sua capsula cefálica removida e imediatamente colocada em solução fixadora e embebida em parafina para obtenção de cortes seriais corados com hematoxilina e eosina.

No quarto dia do desenvolvimento (3º instar larval) notamos um centro de diferenciação (seta amarela Figura 3A) adjacente ao cérebro, no local onde será definido o lóbulo óptico. O definimos como centro de diferenciação por ter origem neuroepitelial e não disco imaginal do olho como em *Drosophila*. Este centro apresenta-se em forma discoide, constituído essencialmente de corpos de neurónios e está próximo à epiderme. Na epiderma encontra-se uma região com maior espessamento (seta preta Figura 3-A) próxima ao lóbulo óptico quando comparado com regiões mais distantes. A epiderme na região com maior espessamento dará origem à retina no adulto. Nesta fase a capsula cefálica mede em média 630 µm sendo que o centro de diferenciação é inferior a 100 µm.

Coletas realizadas 24 horas mais tarde (4º instar larval) mostram zangões com um grande aumento na capsula cefálica, tendo em média 1050 µm de diâmetro. É evidente que o centro de diferenciação continua mantendo seu formato parecido com no estágio anterior (L3) (seta amarela Figura 3B). Contudo, apesar da forma parecida, o centro de diferenciação apre-

senta-se com diâmetro maior que 100 μm . A epiderme também mantém o espessamento na região adjacente ao centro de diferenciação (seta preta Figura 3B) quando comparado com regiões mais distantes como por exemplo na região evidenciada com uma estrela na Figura 3B.

Figura 3: Desenvolvimento do lóbulo óptico em fases larvais iniciais em zangões visualizado em cortes histológico corados com hematoxilina e eosina.. A) Terceiro instar larval em zangões. Seta amarela mostra o primórdio do lóbulo óptico. Seta preta mostra a epiderme espessa logo acima, lembrando uma estrutura tipo placóide. B) Quarto instar larval em zangões. A seta amarela mostra o começo do desenvolvimento do lóbulo óptico, ainda em fase inicial de diferenciação. Adjacente ao lóbulo óptico o placóide epidermal continua mais espessa (seta preta), sendo que dorsalmente, estrela, a epiderme encontra-se mais fina. Barra 100 μm .

Após o quarto instar a larva atinge a fase de alimentação do quinto, onde há um grande aumento de peso. A fase de alimentação é mais longa e costuma demorar cerca de 36 horas ao invés de 24 como as anteriores. Desta forma pesamos indivíduos logo após a ecdise entre quarto e quinto instar, e indivíduos com as células quase totalmente operculadas. Com isso pudemos dividir a fase de alimentação em três sub-partes: as primeiras 12 horas após a ecdise, com animais pesando entre 40 e 129 mg, de 12 a 24 horas, com animais pesando entre 130 a 269 mg, e de 24 a 36 horas, com animais pesando mais de 270 mg. Observa-se que zangões aumentam drasticamente em tamanho, e o crescimento geral é acompanhado pelos lóbulos ópticos que não apresentam mais o aspecto indiferenciado do centro de diferenciação das fases anteriores. Agora é possível observar o surgimento de uma estrutura que está começando a cobrir o antigo centro de diferenciação (seta amarela Figura 4A). Do antigo centro de diferenciação surge uma estrutura com aspecto glomerular formado por corpos celulares neuronais, sendo que o interior apresenta grande densidade de axônios (seta preta Figura 4A). Tais axônios conectam esta estrutura com uma outra, proximal em relação ao cérebro e também pro-

veniente do centro de diferenciação. Ainda não é possível notar diferenças significantes na epiderme até 24 horas da fase de alimentação do quinto instar. Notavelmente, após 24 horas do início da fase de alimentação o lóbulo óptico mostra diferenciação das estruturas de forma mais acelerada. A estrutura que cobre o antigo centro de diferenciação se parece mais com a lamina no olho adulto (seta amarela Figura 4B). Internamente à lamina o centro de diferenciação apresenta-se semelhante à medula no adulto, com aspecto glomerular composta externamente por grossa camada de corpos celulares neuronais e internamente pelos axônios. Internamente à medula encontra-se outra estrutura, a lóbula (estrela branca Figura 3B), que cerca de 12 horas antes apresentava-se apenas como pequena massa de neurônios e agora está mais desenvolvida e densamente conectada com o cérebro pelos axônios. A epiderme também está bem mais espessa que 12 horas antes, sendo que o espessamento atinge regiões mais dorsais e ventrais (estrela preta Figura 4B).

Figura 4: Desenvolvimento do lóbulo óptico durante a fase de alimentação do quinto instar larval em zangões. A) Fase de alimentação II em zangões. Seta amarela mostra o primórdio da lamina cobrindo a medula (seta preta). Estrela mostra o espessamento característico da epiderme adjacente ao primórdio de lóbulo optico. B) Fase de alimentação III em zangões. A seta amarela mostra lamina cobrindo a medula. A medula está bem desenvolvida e é evidenciada pela seta preta. Internamente, uma nova estrutura está evidente (estrela branca), fortemente conectada com o cérebro pelos feixes axonais. Nota-se a epiderme adjacente mais espessa (estrela) atingindo regiões mais dorsais e ventrais. Barra 100 μ m.

Após intensa alimentação a larva atinge o peso crítico e não é mais alimentada pelas abelhas nutridoras. A partir deste ponto a larva entra em metamorfose e mantém suas funções fisiológicas com a reserva adquirida e estocada no corpo gorduroso. O opérculo da célula é fechado e a larva começa a tecer seu casulo. Durante a fase de tecelagem de casulo a lâmina continua a se desenvolver, cobrindo internamente a medula (seta Figura 5A). A epiderme apresenta-se da mesma forma que na fase anterior. Cada estrutura do lóbulo óptico (lâmina,

medula e lóbula) está com tamanho aumentado em relação à fase de alimentação. Na Figura 5B (seta) nota-se o aparecimento de feixes axonais conectando a epiderme adjacente (retina) com a camada mais externa do lóbulo óptico, a lâmina. Nota-se na epiderme o começo da formação de estruturas colunares, os quais serão os futuros omatídeos no adulto. Internamente à medula, a lóbula, está bem desenvolvida (elipse Figura 5B) e altamente conectada com o cérebro.

Figura 5: Desenvolvimento do lóbulo óptico durante a fase de tecelagem de casulo (Spinning) em zangões. A) Fase de tecelagem de casulo III em zangões. Seta branca mostra a lâmina. B) Fase de tecelagem de casulo III em zangões. Feixes axonais são visíveis nesta fase (seta). Elipse marca a lóbula bem desenvolvida internamente à medula. Nota-se a epiderme adjacente espessa atingindo regiões mais dorsais e ventrais. Barra 100µm.

A fase pré-pupal é caracterizada por profundas modificações morfológicas, entre elas o alargamento dos olhos e a apólise identificando o começo da muda larval-pupal. Devido à formação de nova cutícula e os procedimentos para fixação, as estruturas internas aparecem deslocados. Contudo, é notável o desenvolvimento da retina mostrado pela cabeça de seta na Figura 6A. A lâmina continua a se diferenciar (seta Figura 6A) e é possível observar a conexão axonal entre a mesma e a medula, formando o primeiro quiasma óptico. Entre a lóbula e a medula é possível observar o segundo quiasma óptico (elipse Figura 6A). Durante o processo de diferenciação da retina a parte mais adjacente à lâmina torna-se clusterizada mais rapidamente que as regiões dorsal e ventral da epiderme. Na Figura 6B é possível observar a região mais diferenciada, evidenciando um omatídeo com seus feixes axonais atingindo a membrana basal. Detalhes da retina (Figura 6C) na parte dorsal mostram que o processo de formação dos clusteres omatidiais ainda é inicial.

Figura 6: Desenvolvimento do lóbulo óptico durante a fase pré-pupal em zangões. A) Pré-pupa I em zangões. Cabeça de seta mostra a retina diferenciada. Seta mostra a lâmina com a parte dorsal em processo de diferenciação. Elipse mostra a lóbula deslocada com sua conexão com a medula. B) Amplificação de parte da retina mostrando os omatídeos em processo de diferenciação em destaque na elipse. C) Amplificação da parte dorsal da capsula cefálica mostrando epiderme ainda indiferenciada. Barra 100 μm .

Durante a fase pré-pupal grandes alterações ocorrem no corpo larval com o início da metamorfose. O inseto começa a assumir a identidade do adulto utilizando as reservas adquiridas principalmente durante a fase de alimentação. Em seguida, a nova cutícula é formada e o líquido exuvial reabsorvido. Concluída a ecdise pupal, todas as estruturas do olho estão formadas. Contudo, ainda ocorre um processo de maturação celular e, apesar de não ocorrer aumento do número de células, algumas células se tornam mais diferenciadas por exemplo as células pigmentadas. Na Figura 7 é possível observar a capsula cefálica de zangões 24 horas após a muda pupal. A lâmina, totalmente, diferenciada recobre a medula. Externamente é possível observar uma camada de corpos celulares de neurônios os quais recebem uma grande quantidade de feixes nervosos provenientes da retina. Internamente na lâmina milhares de axônios conectam com neurônios da camada externa da medula. Esta última apresenta uma densa e espessa camada, tanto de corpos celulares neuronais quanto de axônios (internamente) que a conecta com o a lóbula. A lóbula assume forma circular e concentrará toda informação proveniente das camadas mais distais.

Nota-se na retina os omatídeos emitindo suas projeções axonais até a membrana basal. Na membrana basal os feixes axonais são fasciculados formando os feixes nervosos que conduzem o sinal até a lâmina (Figura 7). Durante a fase pupal o olho e o corpo tornam-se mais progressivamente pigmentados. Durante este processo, células pigmentares na retina tornam-se cada vez mais pigmentadas, fazendo com que o olho externamente fique totalmente escuro. Internamente ocorre leve rearranjo das estruturas, principalmente com tecido gorduroso que se encontrava entre a lâmina e a retina. No adulto (Figura 8) há uma intensa redução na distância entre lâmina e retina, provavelmente devido à redução do tecido gorduroso na capsula cefálica, e a lâmina fica aderida à retina, separada pela membrana basal (Figura 8 A e B). Em Figura 8B nota-se que a lóbula (Lo) assumiu um aspecto mais achatado, porém não houve alterações em suas conexões com o cérebro e medula. Esta última também sofreu leve achatamento, sem comprometimento nas conexões previamente estabelecidas. Em corte longitudinal é possível observar o primeiro quiasma óptico entre a retina e a lâmina (seta preta Figura 8) e o segundo quiasma óptico entre a medula e a lóbula (seta branca Figura 8).

Figura 7: Desenvolvimento do lóbulo óptico em zangão após a muda pupal. Fase pupal de olho vermelho correspondente a 24 horas após a metamorfose. L: Lâmina; M: Medula; Lo: Lóbula; Re: Retina. Barra 100 μ m.

Figura 8: Zangão adulto recém-emergido. A) Corte transversal da cabeça evidenciando a área ocupada pela retina e lóbulos ópticos. B) Amplificação dos lóbulos em adulto macho. L: lâmina; M: medula; Lo: lóbula. C) Corte lhorizantal da cabeça de zangão. Seta preta indica o primeiro quiasma óptico. Seta branca indica o segundo quiasma óptico. Barra 100 μ m.

Perfil de transcrição de genes candidatos para o desenvolvimento diferencial do lóbulo óptico

O gene *eyes absent* foi escolhido como um dos genes candidatos por ser membro de uma rede regulatória para o desenvolvimento do olho, entre outras estruturas como músculo, rim e ouvido. Algumas desordens congênitas humanas foram associadas com mutações neste gene, como o síndrome bronquio-oto-renal e doenças em outros órgãos (Desplan, 1997). Há evidências que *sine oculis*, em conjunto com *eyes absent*, é requerido para a regulação do desenvolvimento do olho, tanto em vertebrados e invertebrados, incluindo proliferação celular, padronização e desenvolvimento neuronal (Pignoni *et al*, 1997).

Figura 9: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *eye absent* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. A abcissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operária.

A busca recíproca por um ortólogo predito em *Apis mellifera* a partir da proteína Eyes Absent de *Drosophila* mostrou que o GB11435-PA possui 66% de identidade com score 441 (E-value 2×10^{-146}). O gene *eye absent* possui sete exons que codificam uma proteína de 500 aminoácidos em *Apis*, com um domínio conservado do tipo “Eye-absent”. Em *Drosophila*

apresenta-se com três isoformas, sendo que a FBtr0078964 possui melhor “match” com *Apis*. Pela análise da expressão relativa de transcritos de *eyes absent* observa-se padrões distintos em operárias e zangões (Figura 9). Em operárias, o ponto de maior número de transcritos ocorre no final da fase de alimentação (L5-F3), enquanto em zangões o mesmo ocorre cerca de 96 horas mais tarde (fase pré-pupal 1). Entre a fase de tecelagem de casulo 1 e 2 ocorre novo aumento no número de cópias e novamente outro declínio até a fase pré-pupal 2 em operárias. Em zangões, o número de cópias varia até a fase de tecelagem de casulo1 (S1), em seguida observa-se um rápido aumento culminando 36 horas mais tarde (PP1) para depois declinar drasticamente.

O produto do gene *sine oculis* é essencial para o desenvolvimento do todo o sistema visual por controlar os eventos iniciais de formação de padrão no disco do olho em *Drosophila*, onde é expresso antes da passagem do sulco morfogenético na retina e é requerido para formação dos lóbulos ópticos (Oliver, 1997). O gene *sine oculis* possui 5 exons e codifica uma proteína de 512 aminoácidos com um domínio de ligação de DNA do tipo homeótico envolvido na regulação de transcrição em processos chaves do desenvolvimento eucariótico. O alinhamento local recíproco mostrou o GB15213-PA como ortólogo putativo em abelhas, obtendo melhor pareamento com a isoforma FBpp0089177 (82% identidade), valor de score 369 e E-Value de 7×10^{-118} . O GB15213-PA se encontra no cromossomo 5 na região 5.15 (Versão 4.0). Sua expressão durante o desenvolvimento varia, ocorrendo três picos de expressão em macho, em L4 em F2 e outro em PP1. Antecedendo a metamorfose sua expressão declina a níveis basais (Figura 10). Em operárias, o padrão de expressão é diferente do de zangão. Inicialmente o número de transcritos é baixo em operárias. Durante o desenvolvimento sua expressão aumenta, atingindo um platô em F1, seguido de declínio em F2. Nas próximas 12 horas há um forte aumento de expressão do *sine oculis*, o qual não se mantém na fase pré-pupal. Apesar de mostrarem padrões de expressão bem distintos, nota-se o requerimento, mesmo que temporário, do transcrito durante a formação da retina e lóbulos ópticos em ambos os sexos. O principal pico de expressão em operárias (S3) ocorre 24 horas antes do ponto principal de zangão (PP1) indicando que há necessidade do transcrito precoce em operárias.

Figura 10: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *sine oculis* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. A abscissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operaria.

A proteína Minibrain está relacionada com a neurogênese pós-embriônica em *Drosophila*, ritmo circadiano e desenvolvimento do cérebro. Mutações no gene *minibrain* causam espaçamento anormal dos neuroblastos no centro de proliferação mais externo, implicando em menor progênese neuronal. Consequentemente, as moscas mutantes para este gene apresentam marcada redução dos lóbulos ópticos e hemisférios cerebrais. O gene *minibrain* possui seis exons e codifica uma proteína de 540 aminoácidos com dois domínios conservados, um domínio proteína quinase e outro domínio catalítico do tipo quinase pertencente à subfamília de fosfotransferase. *Drosophila* possui 4 isoformas, sendo que o melhor alinhamento recíproco ocorreu com a isoforma FBpp0289737 obtendo score 714 (E-value 0.0) com o GB20129-PA de *Apis*, mostrando-se muito conservada entre as espécies. Este gene situa-se no cromossomo 7, porém em uma região não orientada (GroupUn.718) na versão 4.0 do genoma de *Apis*. Interessantemente, apesar de zangões possuírem os lóbulos ópticos marcadamente maiores que operárias, a expressão de *minibrain* é muito baixa durante todo o desenvolvimento, quando comparada com operárias (Figura 11). Embora este gene estar relacionado com o tamanho do lóbulo óptico, em especial com o número de neurônios no córtex medular, há pouca variação no número de transcritos em zangões. Inversamente, em operárias ocorrem dois picos de expressão, um em S1 e outro em S3, sendo que a expressão aumenta lentamente desde L3 até S1. Nas próximas 12 horas o número de transcrito cai para logo em seguida aumentar, marcando o final da fase de tecelagem de casulo.

Figura 11: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *minibrain* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. A abscissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operária.

Defeitos específicos no sistema nervoso adulto de *Drosophila* estão diretamente relacionados com mutações do gene *small optic lobe*. A neurodegeneração causada por este mutante chega a reduzir em até 50% do número de células dos lóbulos ópticos. Muitos dos neurônios que estão faltando em moscas adultas mutantes são neurônios transmedulares que projetam para a lóbula e da lóbula para a placa da lóbula (esta última estrutura não está presente em *Apis mellifera* (Delaney *et al*, 1991). O gene *small optic lobes* possui 10 exons e 1343 aminoácidos em *Apis mellifera*. O ortólogo em *Drosophila* possui cinco isoformas, sendo que o melhor alinhamento recíproco ocorreu com FBpp0290798 (Score 1068, E-Value 0.0). Este gene está presente no cromossomo 4 região 4.1 da abelha, e a CDS reconhecido como GB14881-PA. A mesma apresenta dois domínios conservados: CysPc domínio do tipo calpaína (família de peptidase 2) ativada por cálcio e um domínio do tipo dedos de zinco, os quais são regiões de ligação com o DNA atuando como fatores de transcrição. Surpreendentemente, a expressão de *small optic lobe* em zangões é extremamente baixa quando comparado com operárias, utilizando como calibrador a expressão de operária na fase L3 (Figura 12). Em operárias é possível observar três momentos onde ocorre aumento de expressão do gene *small optic lobe*: em F1, em F3 e PP2. A fase F1 marca o desenvolvimento e início da expansão da lâmina, F3 o espessamento da epiderme até regiões mais dorsais e ventrais da capsula cefálica, e PP1 o aparecimento de clusteres omatidiais na epiderme adjacente à lâmina.

Figura 12: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *small optic lobe* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. A abcissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operária.

Os mecanismos de formação do olho e retina fazem parte de uma intrincada rede gênica regulatória dependente de interações com tecidos adjacentes e por isso complexa integração de sinais. Para entender melhor esta complexa rede incluímos em nosso estudo o gene *roughest* por ser um importante componente de sinalização necessário para a correta projeção das fibras visuais no quiasma óptico e correta organização e diferenciação omatidial. O GB11991 de *Apis* foi reconhecido como ortólogo putativo da proteína Roughest de *Drosophila* (FBpp0070537) através de alinhamento recíproco (65% de identidade, Score 581, E-value 0.0). A proteína possui 4 domínios imunoglobulina relacionados à superfamília das imunoglobulinas “IRM”, o qual inclui *kin of irre* (Strünkelnberg *et al*, 2001), *nephrin* (Kestilae *et al*, 1998) e *kirrel2* (Sun *et al*, 2003) e um domínio tipo de molécula de adesão celular (CAM), típico de moléculas de adesão de células neuronais (N-CAM L1). Os quatro domínios imunoglobulina apresentam-se na parte extracelular da proteína e o domínio Ig-CAM faz parte do componente transmembrana. Em *Apis* o gene *roughest* localiza-se no cromossomo 2 região 35 e codifica uma proteína de cerca de 774 aminoácidos. A Figura 11 mostra o padrão de expressão de *roughest*. Em operárias ocorrem dois picos de expressão durante o desenvolvimento (Figura13).

Figura 13: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *roughest* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. Eixo das abcissas mostra as fases do desenvolvimento consideradas. A abcissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operária.

O primeiro pico ocorre em F2, o qual também está presente em zangões, porém em menor intensidade. O segundo pico em operárias ocorre em S1-S2 e em zangões cerca de 24 horas mais tarde, na fase S3-PP1. A expressão em L3 de zangões pode ser um indicativo de outra função do gene *roughest*, pois nesta fase o sistema nervoso ainda apresenta-se muito rudimentar e a epiderme ainda não começou o processo de diferenciação em retina.

Perfil transcricional de genes chaves no desenvolvimento

O gene *epidermal growth factor receptor* tem sido amplamente estudado em diversas espécies por ser um gene chave em diversos processos de formação e diferenciação nos mais diversos tecidos, como desenvolvimento de órgãos, desenvolvimento de órgãos sensoriais, morfogênese pós-embrionária entre outros. O receptor de fator de crescimento epidermal em *Apis mellifera* possui 11 exons e codifica uma proteína de 1423 aminoácidos. O alinhamento recíproco com o GB12207 mostrou identidade maior que 60% com as duas isoformas de *Drosophila* (FBpp0071570 e FBpp0071571; Score 1458 e E-value 0.0). O ortólogo em *Apis* possui dois domínios do tipo receptor L, um domínio do tipo furina envolvido na transdução de sinal por receptores tirosina quinases e um domínio tirosina quinase, também relacionado com transdução de

sinal intracelular. O gene codificando o receptor de fator de crescimento epidermal possui padrão de expressão muito similar entre machos e fêmeas, porém com uma diferença temporal (Figura 14). Zangões mostram um padrão mais precoce quando comparado com operárias. A análise atenta da Figura 12 leva-nos a observar que o padrão de expressão entre F1 e F2 de operária é similar a L3-L4 de zangões. O aumento no número de transcritos em F3-S1 de operárias é similar ao F1-F2 de zangões, e a queda do nível de transcritos em S1-S2 de operária é similar à F2-S1 de zangões. Um novo pico de expressão ocorre em S3 de operárias, enquanto que no macho esse pico ocorre 12 horas antes. Na pré-pupa de operária nota-se o mesmo padrão da fase S3 e PP de zangão 1. Ambos os sexos utilizam o mesmo tempo de desenvolvimento durante a fase larval e, por terem um padrão similar, porém com mudança temporal, este resultado é um forte indicador de heterocronia com respeito ao desenvolvimento do cérebro, dos lóbulos ópticos e da retina, e possivelmente está relacionado com o crescimento geral do corpo.

Figura 14: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *epidermal growth factor receptor* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. A abcissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operária.

Estruturalmente, os lóbulos ópticos e retina (olho composto) são parecidos em ambos os sexos, com diferenças relacionadas principalmente ao tamanho. Contudo uma pergunta fica: qual seria o momento de diferenciação do sistema nervoso em ambos os sexos que pode

ajudar a explicar o tamanho diferencial? Para responder esta questão escolhemos o gene *embryonic lethal abnormal vision (elav)* por ser um marcador para o desenvolvimento e diferenciação neuronal, conhecido em *Drosophila*. Em alinhamento não-recíproco encontramos o GB18785 como sendo o melhor candidato a ortólogo do gene *elav*, tendo valor de score 432 e E-value 4×10^{-149} . A proteína Elav em *Apis* possui 338 aminoácidos codificados por cinco exons no cromossomo 1 região 63, e possui 3 domínios de reconhecimento de RNA (RRM – RNA recognition motif). Em *Drosophila*, estes domínios conferem a capacidade regulatória à proteína, por se ligar diretamente ao mRNA. O padrão de expressão deste gene é muito similar em ambos os sexos, porém, também, com diferença temporal (Figura 15). Entre L3 a S1 nota-se aumento progressivo no número de transcritos em operária, sendo que o mesmo ocorre em zangões entre S1-PP1. Em operárias, o pico de expressão ocorre cerca de 36 horas anterior ao de zangões. Em ambos os sexos, há uma queda após o pico de expressão, sugerindo que o mecanismo de regulação de *elav* seja o mesmo, porém, de alguma forma, atrasado em zangões. Tal mecanismo, provavelmente, está restrito ao cérebro, lóbulos ópticos e retina, visto não alterar o tempo de muda e, portanto, o tempo de desenvolvimento larval.

Figura 15: Quantificação relativa da expressão de transcritos do gene *embryonic lethal abnormal vision* em larvas de zangões e operárias de *Apis mellifera*. A abscissa mostra as fases do desenvolvimento consideradas. Amostras de larvas de terceiro (L3), quarto (L4) e quinto instares larvais (L5 F1-PP3) foram coletadas e analisadas por RT-qPCR em ensaios com SYBR Green (Fermentas). A expressão relativa (na ordenada) foi calculada a partir da equação $E=2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl 2001), sendo utilizado o gene codificador da proteína ribossomal RP49 como controle. Barras acima das curvas correspondem aos erros padrão da média de três pools de amostras biológicas com três replicatas técnicas. As amostras foram calibradas pelo 3º instar de operária.

Predição de genes participantes do desenvolvimento dos lóbulos ópticos e retina

O sistema visual de *Apis mellifera* é um notável exemplo de plasticidade fenotípica. A partir do mesmo conjunto gênico é construído o olho com dois fenótipos, deixando claro um intrínseco e complexo mecanismo de regulação. Muito pouco se conhece sobre a genética do desenvolvimento do olho em *Apis mellifera*. Da mesma forma, pouco se conhece sobre os mecanismos regulatórios responsáveis pelo diferencial fenotípico entre os sexos de *Apis mellifera*. Afim de elucidar possíveis mecanismos gênicos que pudessem explicar a plasticidade fenotípica no olho, criamos uma tabela de genes de *Drosophila* os quais são responsáveis pelo desenvolvimento do olho, reconhecidos pelo Processo Biológico “Eye Development” no universo Gene Ontology. Neste processo buscou-se genes os quais tinham como processo “pai” o termo “Eye Development” em um ou mais níveis acima na hierarquia Gene Ontology. Com isso foi montado uma lista com 457 inferências dos quais foi possível montar uma lista com 291 genes (lista com os genes de *Drosophila* estão inclusos no anexo digital (CD) -Seq_Genes_Eye_Development_Drosophila.txt). A partir da lista de genes com seus respectivos IDs foi possível obter suas respectivas sequências proteicas e isoformas, contabilizando 922 sequências. Muitas proteínas possuem diversas funções em diversos tecidos (pleiotropismo), e por isso foram coletados todos os termos do Gene Ontology dos quais elas também fazem parte. Em seguida, por alinhamento proteico recíproco, montamos uma lista com 1105 sequências proteicas de *Apis mellifera* as quais são candidatas a realizarem as mesmas funções durante o desenvolvimento do olho (lista completa utilizada para as análises se encontra em anexo digital - 5UTR_Apis_Eye_Development.txt). As sequências da região promotora dos genes candidatos de *Apis* foram buscadas e montados em arquivo totalizando 1015 sequências, considerando 1000 bases a montante do start códon do gene (lista completa das regiões promotoras se encontra no anexo digital).

Tabela 12: Amostra da tabela obtida por alinhamento recíproco das proteínas relacionadas com o desenvolvimento do olho em *Drosophila melanogaster*. 1ª coluna: IDs de sequências proteicas de *Apis mellifera*; 2ª coluna: IDs de sequências proteicas de *Drosophila melanogaster*; 3ª coluna: nome do gene em *Drosophila*; 4ª coluna: score do alinhamento; 5ª coluna: e-value do alinhamento.

Apis ID	Drosophila ID	Nome	Score	E-value
GB11974-PA	FBpp0086569	ave-PA	103	2,00E-23
GB11980-PA	FBpp0077778	CG3436-PA	485	2,00E-137
GB11988-PA	FBpp0088336	pb-PD	197	2,00E-50
GB11991-PA	FBpp0070535	kirre-PA	590	1,00E-168
GB12001-PA	FBpp0077547	chinmo-PB	177	2,00E-44
GB12004-PA	FBpp0087499	Jra-PA	147	7,00E-36
GB12017-PA	FBpp0077147	morgue-PA	273	6,00E-74
GB12026-PA	FBpp0073587	CG15744-PA	566	3,00E-161
GB12033-PA	FBpp0071392	CG32687-PA	368	4,00E-102
GB12039-PA	FBpp0073459	Tango4-PA	674	0.0

Análise da expressão diferencial do genoma de *Apis mellifera* por meio de micro-arranjos

Ovos fecundados se desenvolvem em fêmeas (diploides), enquanto ovos não fertilizados se desenvolvem em machos (haplóide). Machos e fêmeas compartilham o mesmo genoma, contudo apresentam padrões de expressão distintos de expressão, principalmente com deslocamento em escala temporal. Afim de buscar possíveis genes que possam participar no desenvolvimento diferencial, foi realizada análise de expressão em todo o genoma de *Apis* (10.620 genes preditos na versão 4.0) durante a fase de tecelagem de casulo 2, por meio de micro-arranjos

Para testar a qualidade das amostras, foi gerado um plot (Figura 14) evidenciando a distribuição das amostras em torno da linha imaginária $y=0$, com subtração pela média local do background. No plotMA (Figura 14) é calculado o valor M ($\log \text{ratio}$, $\log_2\text{Cy3} - \log_2\text{Cy5}$) pelo valor A (intensidade geral, $(\log_2\text{Cy3} + \log_2\text{Cy5})/2$) para cada gene. Este tipo de análise é realizada para verificar e corrigir possíveis imperfeições causadas no procedimento experimental, e não por diferenças intrínsecas das amostra em si

Figura 16: PlotMA normalizado evidenciando a qualidade do array. Os valores foram normalizados dentro de cada array e entre arrays pelo método “loess” e “scale” respectivamente. Ordenada mostra $M = \log_2\text{Cy3} - \log_2\text{Cy5}$, e a Abscissa $A = (\log_2\text{Cy3} + \log_2\text{Cy5})/2$. Linha em $M=0$ mostra a região de centralização das amostras.

Pela análise do figura 16 fica evidente que as amostras estão clusterizadas em torno da linha $y=0$, e que as amostras biológicas estão contribuindo da mesma forma para as análises.

Para determinar a distribuição dos valores entre as amostras de operária e zangão foi gerado um gráfico quantil-quantil plot (Figura 17). Cada ponto do gráfico é formado pelos quantis amostrais, e o alinhamento das amostras em torno da linha (inclinação 1) indica o grau de distribuição das amostras (Smyth e Speed, 2003; Smyth, 2004). Os pontos mais próximos à linha indicam distribuição igual, evidenciando que tais genes não são diferencialmente expressos, enquanto pontos mais distantes da linha mostram estes genes são diferencialmente expressos entre zangões e operárias na fase II de tecelagem do casulo. .

Figura 17 QQ-Plot. Plote de quantil dos dados das amostras contra cada quantil teórico de uma distribuição t de student. Linha diagonal possui inclinação 1 (45°) para suporte nas análises de distribuição.

A Figura 17 fornece valiosa referencia para verificar o padrão de distribuição de genes diferencialmente expressos nas amostras. Contudo, ela ainda não diz o quanto e quais genes são diferencialmente expressos, além de informações relacionadas com a probabilidade de

cada gene pertencer ou não a cada grupo: diferencialmente expressos ou não diferencialmente expressos. Para resolver este problema foi construído uma tabela com os 200 genes mais diferencialmente expressos (parte em Tabela 13; a tabela completa encontra-se no digital).

Tabela 13: Os top 29 genes mais diferencialmente expressos no desenvolvimento do olho, comparando operárias e zangões na fase Spinning II. Coluna “Name” refere-se à identificação do gene no array. Coluna ID é a identificação de acordo com nomenclatura BEEBASE. As colunas seguintes mostram o $\log_2$ Fold Change, AveExpr é $\log_2$ da expressão média normalizada e corrigida com o background em relação aos arrays e canais. A estatística moderada de t por Bayes empírico é mostrado pela letra t. Estatística de significância na coluna P.Value, e B representa log-odds do gene

Name	ID	logFC	AveExpr	t	P.Value	B
AM08319	GB15736-PA	-1.750	9.84	-5.47	0.000953	-4.42
AM10109	GB17538-PA	2.523	9.94	4.98	0.001628	-4.43
AM09500	GB16923-PA	-1.711	9.22	-4.79	0.002030	-4.43
AM11377	GB18819-PA	1.699	11.70	4.68	0.002313	-4.44
AM10109	GB17538-PA	2.570	9.99	4.61	0.002510	-4.44
AM11377	GB18819-PA	1.688	11.57	4.51	0.002808	-4.44
AM11153	GB18592-PA	-1.347	9.83	-4.49	0.002864	-4.44
AM03116	GB10489-PA	-1.459	9.53	-4.34	0.003468	-4.44
AM11700	GB19146-PA	1.869	8.99	4.16	0.004289	-4.45
AM07155	GB14557-PA	1.492	10.16	4.05	0.004948	-4.45
AM08911	GB16331-PA	1.281	10.05	3.99	0.005349	-4.45
AM03136	GB10509-PA	-1.242	9.97	-3.90	0.005976	-4.45
AM11021	GB18458-PA	1.206	9.58	3.85	0.006413	-4.46
AM09265	GB16686-PA	-1.183	11.20	-3.81	0.006708	-4.46
AM03396	GB10771-PA	-1.380	9.50	-3.80	0.006796	-4.46
AM10010	GB17438-PA	1.257	8.59	3.79	0.006868	-4.46
AM05621	GB13010-PA	1.106	9.19	3.73	0.007408	-4.46
AM06997	GB14399-PA	1.146	9.89	3.71	0.007647	-4.46
AM07392	GB14797-PA	-1.243	8.81	-3.66	0.008169	-4.46
AM10988	GB18425-PA	-1.139	8.45	-3.66	0.008220	-4.46
AM11725	GB19171-PA	-1.224	10.26	-3.63	0.008539	-4.46
AM10022	GB17450-PA	1.113	9.31	3.62	0.008578	-4.46
AM05889	GB13282-PA	-1.590	7.68	-3.62	0.008655	-4.46
AM11824	GB19270-PA	-2.072	8.69	-3.57	0.009199	-4.46
AM02974	GB10344-PA	1.915	9.80	3.53	0.009684	-4.47
AM04468	GB11849-PA	1.095	10.88	3.52	0.009809	-4.47
AM00647	AM00647	2.873	9.22	7.84	0.000237	-4.47
AM07647	GB15056-PA	1.270	9.45	3.50	0.010054	-4.47
AM07163	GB14566-PA	1.440	10.16	3.50	0.010077	-4.47

Na tabela 13 estão representados 29 genes (tabela completa no anexo digital) mais diferencialmente expressos e o sumário estatístico associado. Os genes apresentadas na tabela têm alta significância ($p\text{-value} < 0.05$), pertencendo ao grupo de diferencialmente expressos. O valor log do Fold Change pode assumir valores negativos devido a genes que são pouco expressos em comparação com operárias, ou seja, tais genes são mais expressos em operárias e isso ocorre devido ao design do experimento (zangão VS. operária). Observa-se pelo valor de expressão média (AveExpr) o quanto estes genes estão diferencialmente expressos na amostra considerada. Tais genes podem desempenhar diversas tarefas durante o desenvolvimento e em diferentes tecidos. Para avaliar possíveis funções buscou-se informações no Gene Ontology referente a cada ortólogo em *Drosophila*.

Análise de Enriquecimento de dados do microarray

Para buscar informações sobre eventuais processos biológicos para os genes selecionados entre os 200 diferencialmente, utilizou-se os atributos Gene Ontology dos seus respectivos ortólogos em *Drosophila* para. Também devido ao design do experimento dividiu-se os resultados em dois tipos de tabelas: uma tabela de genes mais expressos (*up-regulated*) em zangão, e uma de genes pouco expressos em zangão (*down-regulated* - os quais representam genes mais expressos em operárias). Dentre os processos biológicos verifica-se que os mais enriquecidos são genes com funções relacionadas ao ciclo celular e metabolismo (os quatro primeiros termos da Tabela 14). Também estão presentes diversos termos relacionados com divisão celular como: *cell development*, *transcription*, *morphogenesis of an epithelium*, *organelle localization* e *regulation of cell cycle*. Interessantemente, encontramos como super-expresso em zangões um gene relacionado com a determinação sexual e determinação sexual, que resulta na especificação inicial do status sexual. Isso é uma forte evidência que o desenvolvimento do olho, ainda em fase intermediária do desenvolvimento do indivíduo, pode estar sendo regulado por membro da cascata de determinação sexual. Encontram-se enriquecidos também vários termos relacionados com metabolismo típico de tecidos em rápida divisão como: síntese de compostos nitrogenados e biogênese de ribossomos (Tabela 14). Alguns termos aparecem relacionados com mais de um termo na hierarquia Gene Ontology (GO), devido à sua função pleiotrópica.

Em relação às Funções Moleculares (nível 4 GO) encontram-se vários termos relacionados com as funções descritas para os processos biológicos na tabela 14. Destaca-se funções moleculares relacionadas com ligação de cátions e íons metálicos e atividade de transporte de cátions. Também aparecem muitas enzimas (Tabela 15).

Tabela 14: Tabela de Processos Biológicos nível 5 - Gene Ontology dos genes mais expressos em cérebro (com lóbulo óptico e retina) em zangão. A análise de enriquecimento foi realizada através da busca de ortólogos em *Drosophila* dos genes mais expressos em zangão ($\log_2FC$) e avaliados através da plataforma BABELOMICS.

Processo Biológico nível 5	Termo	Ortólogos em <i>Drosophila</i>
<i>cellular protein metabolic process</i>	GO:0044267	mRpL21-PA,RpS29-PA,Ext2-PB,Ppt1-PA,CG9596-PB
<i>macromolecule biosynthetic process</i>	GO:0009059	CG9596-PB,mRpL21-PA,RpS29-PA,Ext2-PB
<i>electron transport</i>	GO:0006118	CG3560-PA,Ppox-PA,CG5840-PA
<i>RNA metabolic process</i>	GO:0016070	dpn-PA,CG7039-PA,CG2021-PA
<i>cell development</i>	GO:0048468	CG9596-PB,sqh-PA
<i>regulation of cellular metabolic process</i>	GO:0031323	CG9596-PB,dpn-PA
<i>transcription</i>	GO:0006350	l(1)IBi-PA,dpn-PA
<i>biopolymer modification</i>	GO:0043412	Ppt1-PA
<i>intracellular signaling cascade</i>	GO:0007242	CG7039-PA
<i>sex determination</i>	GO:0007530	dpn-PA
<i>porphyrin metabolic process</i>	GO:0006778	Ppox-PA
<i>carbohydrate transport</i>	GO:0008643	CG10960-PB
<i>cofactor biosynthetic process</i>	GO:0051188	Ppox-PA
<i>primary sex determination</i>	GO:0007538	dpn-PA
<i>ion transport</i>	GO:0006811	CG9065-PA
<i>chemoorganotrophy</i>	GO:0015980	Ext2-PB
<i>vesicle-mediated transport</i>	GO:0016192	CG32576-PB
<i>regulation of biosynthetic process</i>	GO:0009889	CG9596-PB
<i>organelle localization</i>	GO:0051640	sqh-PA
<i>nitrogen compound biosynthetic process</i>	GO:0044271	CG5840-PA
<i>sulfur compound biosynthetic process</i>	GO:0044272	Ext2-PB
<i>carboxylic acid metabolic process</i>	GO:0019752	CG5840-PA
<i>establishment of cellular localization</i>	GO:0051649	sqh-PA
<i>negative regulation of cellular process</i>	GO:0048523	dpn-PA
<i>embryonic development ending in birth</i>	GO:0009792	sqh-PA
<i>dosage compensation</i>	GO:0007549	dpn-PA
<i>ribosome biogenesis and assembly</i>	GO:0042254	CG7039-PA
<i>negative regulation of metabolic process</i>	GO:0009892	dpn-PA
<i>mating behavior</i>	GO:0007617	PebIII-PA
<i>cell cycle phase</i>	GO:0022403	mad2-PA
<i>establishment of tissue polarity</i>	GO:0007164	sqh-PA
<i>cell surface receptor linked signal transduction</i>	GO:0007166	Ext2-PB
<i>morphogenesis of an epithelium</i>	GO:0002009	sqh-PA
<i>female gamete generation</i>	GO:0007292	sqh-PA
<i>polysaccharide metabolic process</i>	GO:0005976	Ext2-PB
<i>phosphate metabolic process</i>	GO:0006796	CG3560-PA
<i>adult locomotory behavior</i>	GO:0008344	dpn-PA
<i>larval locomotory behavior</i>	GO:0008345	dpn-PA
<i>regulation of cell cycle</i>	GO:0051726	mad2-PA
<i>nervous system development</i>	GO:0007399	dpn-PA
<i>regulation of protein metabolic process</i>	GO:0051246	CG9596-PB
<i>cell migration</i>	GO:0016477	sqh-PA

com funções relacionadas ao metabolismo celular comum como oxido-redutases e atividade transferase.

Tabela 15: Tabela de Funções Moleculares (nível 4 - Gene Ontology) dos ortólogos mais expressos em zangão. A análise de enriquecimento foi realizada através da busca de ortólogos em *Drosophila* dos genes mais expressos em zangão ($\log_2FC$) e avaliados através da plataforma BABELOMICS

Função Molecular nível 4	Termo	Ortólogos em <i>Drosophila</i>
<i>cation binding</i>	GO:0043169	sqh-PA,CG3732-PA,CG9065-PA,CG10126-PB,Mat1-PA
<i>metal ion binding</i>	GO:0046872	sqh-PA,CG3732-PA,CG9065-PA,CG10126-PB,Mat1-PA
<i>cation transporter activity</i>	GO:0008324	CG9065-PA,CG3560-PA
<i>DNA binding</i>	GO:0003677	l(1)1Bi-PA,dpn-PA
<i>hydrolase activity, acting on ester bonds</i>	GO:0016788	CG15771-PA,Ppt1-PA
<i>transferase activity, transferring phosphorus-containing groups</i>	GO:0016772	l(1)1Bi-PA
<i>translation factor activity, nucleic acid binding</i>	GO:0008135	CG9596-PB
<i>transferase activity, transferring acyl groups</i>	GO:0016746	CG1969-PA
<i>electrochemical potential-driven transporter activity</i>	GO:0015290	CG10960-PB
<i>fatty acid binding</i>	GO:0005504	CG8498-PA
<i>coenzyme binding</i>	GO:0050662	CG8498-PA
<i>oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors</i>	GO:0016627	Ppox-PA
<i>hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds</i>	GO:0016810	CG8132-PA
<i>identical protein binding</i>	GO:0042802	CG5840-PA
<i>metal ion transporter activity</i>	GO:0046873	CG9065-PA
<i>oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors</i>	GO:0016645	CG5840-PA
<i>oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors</i>	GO:0016679	CG3560-PA
<i>sugar transporter activity</i>	GO:0051119	CG10960-PB
<i>transferase activity, transferring glycosyl groups</i>	GO:0016757	Ext2-PB
<i>RNA binding</i>	GO:0003723	mRpL21-PA
<i>purine nucleotide binding</i>	GO:0017076	CG7039-PA

Dentre os genes com atributos GO associados, vários retornaram expressivas funções que podem estar relacionadas com o desenvolvimento diferencial do lóbulo óptico e retina em zangão. Alguns dos genes codificam proteínas as quais fazem parte de conhecidas cascatas bioquímicas depositadas na Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG_) e que são conservadas entre as espécies. Das vias localizadas foram detectados dois ortólogos participantes da via de fosforilação oxidativa, os quais são muito expressos em zangão. Também foram localizados genes que codificam proteínas participantes na via de biosíntese de N-glicano, metabolismo de porfirinas e alongação de ácidos graxos em mitocôndria. Visto que a mitocôndria é a unidade produtora de energia na célula, o enriquecimento de vias relacionadas com esta organela indica sua importância nos tecidos analisados em zangões nesta fase (Tabela 16).

Tabela 16: Tabela de Cascatas Bioquímicas KEGG dos ortólogos mais expressos em zangão. A análise de enriquecimento foi realizada através da busca de ortólogos em *Drosophila* dos genes mais expressos em zangão ($\log_2FC$) e avaliados através da plataforma BABELOMICS.

KEGG Pathways	Termo KEGG	Ortólogos
<i>Oxidative phosphorylation</i>	dme00190	CG9065-PA,CG3560-PA
<i>N-Glycan biosynthesis</i>	dme00510	CG18012-PA
-	dme01030	CG18012-PA
<i>Porphyrin and chlorophyll metabolism</i>	dme00860	Ppox-PA
<i>Fatty acid elongation in mitochondria</i>	dme00062	Ppt1-PA

Tabela 17: Tabela de Processos Biológicos nível 5 de ortólogos *down-regulated* em zangão (*up-regulated* em operárias). A análise de enriquecimento foi realizada através da busca de ortólogos em *Drosophila* dos genes menos expressos em zangão ($\log_2FC$) e avaliados através da plataforma BABELOMICS.

Processo Biológico nível 5	Termo	Ortólogos em <i>Drosophila</i>
<i>cellular protein metabolic process</i>	GO:0044267	S-PA,Hsc70-5-PA,Uev1A-PA,Hsp60-PB,pbl-PA,Mov34-PA,nmo-PC,CG11982-PA,betaTub56D-PB,CG14435-PA,alphaTub84B-PA
<i>organ development</i>	GO:0048513	prc-PB,nmo-PC,betaTub56D-PB,Ald-PH,S-PA,pbl-PA,gl-PA,ttk-PA,E2f-PA
<i>cell development</i>	GO:0048468	S-PA,pbl-PA,gl-PA,ttk-PA,E2f-PA,Act5C-PD
<i>cell morphogenesis</i>	GO:0000902	S-PA,pbl-PA,gl-PA,ttk-PA,nmo-PC
<i>RNA metabolic process</i>	GO:0016070	Bgb-PA,gl-PA,ttk-PA,Rab8-PA,E2f-PA
<i>regulation of cellular metabolic process</i>	GO:0031323	Bgb-PA,gl-PA,ttk-PA,Rab8-PA,E2f-PA
<i>transcription</i>	GO:0006350	Bgb-PA,gl-PA,ttk-PA,Rab8-PA,E2f-PA
<i>biopolymer modification</i>	GO:0043412	Uev1A-PA,nmo-PC,CG11982-PA,CG14435-PA
<i>establishment of cellular localization</i>	GO:0051649	alphaTub84B-PA,S-PA,Gdi-PA,betaTub56D-PB
<i>cell cycle phase</i>	GO:0022403	CG5451-PA,pbl-PA,E2f-PA,alphaTub84B-PA
<i>cell surface receptor linked signal transduction</i>	GO:0007166	S-PA,capaR-PB,nmo-PC,Arr1-PA
<i>female gamete generation</i>	GO:0007292	S-PA,gl-PA,ttk-PA,E2f-PA
<i>DNA metabolic process</i>	GO:0006259	E2f-PA,Gen-PA,mus309-PA,mus81-PA
<i>nervous system development</i>	GO:0007399	S-PA,CG5451-PA,pbl-PA,ttk-PA
<i>nucleotide metabolic process</i>	GO:0009117	CG11089-PA,CG5757-PA,nmdyn-D6-PA
<i>sensory perception of light stimulus</i>	GO:0050953	Arr1-PA,S-PA,gl-PA
<i>cell fate commitment</i>	GO:0045165	S-PA,gl-PA,ttk-PA
<i>photoreceptor cell differentiation</i>	GO:0046530	S-PA,gl-PA,ttk-PA
<i>protein transport</i>	GO:0015031	Rab8-PA,Gdi-PA,S-PA
<i>larval or pupal development</i>	GO:0002165	gl-PA,ttk-PA,nmo-PC
<i>metamorphosis</i>	GO:0007552	nmo-PC,gl-PA,ttk-PA
<i>regulation of signal transduction</i>	GO:0009966	Arr1-PA,S-PA,nmo-PC
<i>cytoskeleton organization and biogenesis</i>	GO:0007010	betaTub56D-PB,alphaTub84B-PA,pbl-PA
<i>anatomical structure formation</i>	GO:0048646	ttk-PA,E2f-PA
<i>vesicle-mediated transport</i>	GO:0016192	Gdi-PA,S-PA
<i>negative regulation of cellular process</i>	GO:0048523	nmo-PC,Arr1-PA
<i>morphogenesis of an epithelium</i>	GO:0002009	prc-PB,nmo-PC
<i>regulation of cell cycle</i>	GO:0051726	alphaTub84B-PA,E2f-PA
<i>imaginal disc-derived appendage development</i>	GO:0048737	nmo-PC

Tabela 17: Continuação.

Processo Biológico nível 5	Termo	Ortólogos em <i>Drosophila</i>
<i>intracellular signaling cascade</i>	GO:0007242	Rab8-PA
<i>cellular macromolecule catabolic process</i>	GO:0044265	Ald-PH
<i>alcohol catabolic process</i>	GO:0046164	Ald-PH
<i>biopolymer catabolic process</i>	GO:0043285	Gen-PA
<i>generation of a signal involved in cell-cell signaling</i>	GO:0003001	Gdi-PA
<i>regionalization</i>	GO:0003002	nmo-PC
<i>nucleoside metabolic process</i>	GO:0009116	CG5757-PA
<i>response to heat</i>	GO:0009408	Hsc70-5-PA
-	GO:0015980	Ald-PH
<i>homophilic cell adhesion</i>	GO:0007156	Cad88C-PA
<i>appendage morphogenesis</i>	GO:0035107	nmo-PC
<i>nitrogen compound biosynthetic process</i>	GO:0044271	CG6287-PA
<i>gene silencing</i>	GO:0016458	vig-PB
<i>male gamete generation</i>	GO:0048232	Act5C-PD
<i>carboxylic acid metabolic process</i>	GO:0019752	CG6287-PA
<i>eye pigment metabolic process</i>	GO:0042441	kar-PA
<i>electron transport</i>	GO:0006118	CG11257-PA
<i>positive regulation of cellular process</i>	GO:0048522	E2f-PA
<i>tube morphogenesis</i>	GO:0035239	pbl-PA
<i>drug transport</i>	GO:0015893	CG11537-PC
<i>regulation of cell proliferation</i>	GO:0042127	E2f-PA
<i>aromatic compound catabolism</i>	GO:0019439	Jheh1-PA
<i>pigment biosynthesis</i>	GO:0046148	kar-PA
<i>response to light stimulus</i>	GO:0009416	Arr1-PA
<i>positive regulation of metabolism</i>	GO:0009893	E2f-PA
<i>establishment of tissue polarity</i>	GO:0007164	nmo-PC
<i>heat shock protein activity</i>	GO:0006986	Hsc70-5-PA
<i>open tracheal system development</i>	GO:0007424	S-PA
<i>phosphate metabolism</i>	GO:0006796	nmo-PC
<i>hydrolase regulator</i>	GO:0051336	Gdi-PA
<i>embryonic anatomical structure morphogenesis</i>	GO:0048598	pbl-PA
<i>body fluid secretion</i>	GO:0007589	capaR-PB
<i>regulation of morphogenesis</i>	GO:0022603	pbl-PA
<i>carbohydrate catabolic process</i>	GO:0016052	Ald-PH
<i>ocellus pigment metabolism</i>	GO:0046158	kar-PA
<i>sensory detection of stimulus</i>	GO:0050906	Arr1-PA
<i>signal transmission along neuron</i>	GO:0019226	Gdi-PA
<i>cytokinetic process</i>	GO:0032506	pbl-PA

Dentre os genes “*down-regulated*” encontram-se muitos relacionados com metabolismo de proteínas, desenvolvimento celular, processo metabólico de RNA e regulação do processo metabólico da célula, os quais estão também presentes entre os genes “*up-regulated*” (Tabela 17). Entretanto, os ortólogos participantes nestes processos são diferentes entre os grupos. Aparentemente, as proteínas participam do mesmo processo, porém com funções diferentes, ou atuando em pontos diferentes do processo. Pode-se observar, por exemplo, o gene *S-PA* (*Star*) que está relacionado com a regulação da via do receptor de fator de crescimento epidermal, rotação ommatidial e comprometimento de destino celular. O gene *nmo-P* (*nemo*), relacionado com processo metabólico de proteínas e desenvolvimento de órgão, também está relacionado com a formação de olho e regulação negativa da via do receptor Wnt. Redução de *nemo* resgata o defeito de olhos pequenos em *Drosophila* induzido pela baixa expressão de *eyeless* e *eyes absent*. Outros membros do grupo pouco expressos em zangão, mas que também fazem parte do mesmo processo biológico (vide Tabela 16-17) são os codificadores de: Bgb-PA, gl-PA, ttk-PA, Rab8-PA, E2f-PA os quais participam de vários processos e são down-regulated. O gene *pbl-PA* (*pebble*) participa em diversas funções listadas como regulação da morfogênese, processo de citocinese e morfogenese de tubos epiteliais. Tais genes, apesar de participarem no mesmo processo, também participam de outras vias.

Entre os ortólogos *down-regulated* destacam-se as funções moleculares ligação de purinas (TC), ligação de íons metálicos, ligação de cátion, ligação de DNA e atividade transferase. Também estão enriquecidas ortólogos que codificam proteínas relacionadas com ligação de fator de transcrição e atividade hidrolase (Tabela 18).

Tabela 18: Tabela de Funções Moleculares 4 - Gene Ontology. Ortólogos menos expressos (*down-regulated*) em zangão. A análise de enriquecimento foi realizada através da busca de ortólogos em *Drosophila* dos genes menos expressos em zangão ($\log_2FC$) e avaliados através da plataforma BABELOMICS

Função Molecular nível 4	Termo	Ortólogos em <i>Drosophila</i>
<i>purine nucleotide binding</i>	GO:0017076	betaTub56D-PB,Rab8-PA,Act5C-PD,Hsc70-5-PA,Hsp60-PB,mus309-PA,nmdyn-D6-PA,alphaTub84B-PA,nmo-PC,Act87E-PB,CG5757-PA
<i>metal ion binding</i>	GO:0046872	nmdyn-D6-PA,CG14435-PA,Cad88C-PA,gl-PA,CG11982-PA,ttk-PA
<i>cation binding</i>	GO:0043169	CG14435-PA,Cad88C-PA,gl-PA,CG11982-PA,ttk-PA
<i>DNA binding</i>	GO:0003677	E2f-PA,mus309-PA,gl-PA,Gen-PA,ttk-PA
<i>transferase activity, transferring phosphorus-containing groups</i>	GO:0016772	Pect-PD,nmdyn-D6-PA,nmo-PC,CG5757-PA
<i>hydrolase activity, acting on acid anhydrides</i>	GO:0016817	betaTub56D-PB,mus309-PA,alphaTub84B-PA
<i>transcription factor binding</i>	GO:0008134	Bgb-PA,Rab8-PA
<i>hydrolase activity, acting on ester bonds</i>	GO:0016788	mus81-PA,Gen-PA
<i>pyridoxal phosphate binding</i>	GO:0030170	CG11241-PA
<i>transferase activity, transferring one-carbon groups</i>	GO:0016741	CG11089-PA
<i>neurotransmitter receptor activity</i>	GO:0030594	capaR-PB
<i>transmembrane receptor activity</i>	GO:0004888	capaR-PB
<i>electrochemical potential-driven transporter activity</i>	GO:0015290	CG11537-PC
<i>cation transporter activity</i>	GO:0008324	CG11537-PC
<i>coenzyme binding</i>	GO:0050662	CG6287-PA
<i>small GTPase regulator activity</i>	GO:0005083	pbl-PA
<i>guanyl-nucleotide exchange factor activity</i>	GO:0005085	pbl-PA
<i>neuropeptide binding</i>	GO:0042923	capaR-PB
<i>hydrolase activity, acting on glycosyl bonds</i>	GO:0016798	CG14934-PA
<i>hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen</i>	GO:0016810	CG11089-PA
<i>peptidase activity</i>	GO:0008233	Mov34-PA
<i>transferase activity, transferring nitrogenous groups</i>	GO:0016769	CG11241-PA
<i>antibiotic transporter activity</i>	GO:0042895	CG11537-PC
<i>ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds</i>	GO:0016879	Uev1A-PA
<i>peptide receptor activity</i>	GO:0001653	capaR-PB
<i>oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors</i>	GO:0016614	CG6287-PA
<i>protein dimerization activity</i>	GO:0046983	Bgb-PA
<i>DNA helicase activity</i>	GO:0003678	mus309-PA
<i>carbon-carbon lyase activity</i>	GO:0016830	Ald-PH
<i>dynein binding</i>	GO:0045502	gl-PA
<i>hydrolase activity, acting on ether bonds</i>	GO:0016801	Jheh1-PA
<i>unfolded protein binding</i>	GO:0051082	Hsp60-PB

Vários genes *down-regulated* fazem parte de importantes vias bioquímicas relacionadas com o metabolismo celular. Destaca-se o ortólogo *mnt*, participante da via de sinalização Wnt, e o CG14934-PA na via de amido e sacarose (Tabela 19).

Tabela 19: Tabela de Cascatas Bioquímicas KEGG dos ortólogos *down-regulated* em zangão. Análise de enriquecimento foi realizada através da busca de ortólogos em *Drosophila* dos genes menos expressos em zangão ($\log_2FC$) e avaliados através da plataforma BABELOMICS.

KEGG Pathways	Termo KEGG	Ortólogos
Glycerophospholipid metabolism	dme00564	Pect-PD,Gdi-PA
Purine metabolism	dme00230	nmdyn-D6-PA,CG11089-PA
Glycine, serine and threonine metabolism	dme00260	CG6287-PA,CG11241-PA
Tyrosine metabolism	dme00350	Gdi-PA
One carbon pool by folate	dme00670	CG11089-PA
Alkaloid biosynthesis II	dme00960	Gdi-PA
Limonene and pinene degradation	dme00903	Gdi-PA
Alanine and aspartate metabolism	dme00252	CG11241-PA
Phenylalanine metabolism	dme00360	Gdi-PA
Aminophosphonate metabolism	dme00440	Pect-PD
Wnt signaling pathway	dme04310	nmo-PC
Galactose metabolism	dme00052	CG14934-PA
Benzoate degradation via CoA ligation	dme00632	Gdi-PA
Starch and sucrose metabolism	dme00500	CG14934-PA
Pyrimidine metabolism	dme00240	nmdyn-D6-PA
Arachidonic acid metabolism	dme00590	antdh-PA

Análise computacional das regiões reguladoras dos genes diferencialmente expressos

Além do conhecimento da própria molécula, muitas outras regiões funcionais do gene podem ser descobertas por busca de padrões em sequências além de domínios proteicos. Alguns desses padrões envolvem a ligação de fatores de transcrição. A expressão diferencial de genes em resposta a variações ambientais e sinalizações para o desenvolvimento de fenótipos dependem da ação destes fatores de transcrição e, portanto, a identificação de motivos regulatórios (onde os fatores de transcrição se ligam) pode fornecer informações cruciais na compreensão dos mecanismos de regulação transcricional.

No presente estudo foram organizados dois grupos de genes: os genes *up-regulated* e genes *down-regulated*. Dentre os 200 diferencialmente expresso foi possível localizar a região promotora de 64 genes *up-regulated* e 74 genes *down-regulated*. A partir de cada grupo buscou-se as regiões regulatórias de até 1000 bases upstream ao gene em questão. Tais regiões foram analisados com o algoritmo MEME, utilizando-se parâmetros padrão e banco de dados de motivos de *Drosophila melanogaster* (Timothy *et. al.*, 1994). A Figura 18 mostra cinco

dos principais motivos conservados nas sequências promotoras dos genes *up-regulated* (mais espessos em zangão) com seus respectivos E-values.

Figura 18: Motivos regulatórios do grupo de genes revelados como *up-regulated* nos micro-arranjos. Os motivos foram preditos através do algoritmo MEME. Sequências upstream ao gene com cerca de 1000 bases foram analisadas. Foram considerados motivos preditos entre 6 e 20 nucleotídeos, utilizando banco de dados de motivos de *Drosophila melanogaster*. O gráfico mostra o E-value e número de sites em que aparece o motivo. Matrix de peso PWM calculada a partir do log da frequência.

Após a identificação dos motivos, os mesmos foram utilizadas para descobrir possíveis fatores de transcrição que possam estar ligando nestas regiões. A Tabela 20 congrega as informações referentes a fatores de transcrição preditos de acordo com a matriz de peso. As funções dos candidatos foram buscadas no FlyBase.

O gene *mothers against dpp* (Mad) é um enhancer da RNA polimerase II e também está relacionado com processos biológicos de desenvolvimento de estrutura anatômica, morfogênese de apêndice pós-embrionário, regulação de processo biosintético de macromoléculas, regulação da fase F do ciclo mitótico. O gene *paired* (prd) está relacionado com regulação da RNA polimerase II, também é um enhancer distal da mesma enzima e fenótipos associados estão relacionados com a subdivisão de sistemas de órgãos, neurônios larvais, sistema nervoso periférico, primórdio da cabeça e órgão do sentido externo composto. O gene *medea* (Med) também está associado com processo de desenvolvimento de estrutura anatomica, regulação de processo desenvolvimental. Também está envolvido com regionalização, proliferação celular e os fenótipos associados estão relacionados com sistema nervoso e formação e manutenção de synapse. O gene *deformed epidermal autoregulatory factor-1* (*deaf-1*) também está envolvido na regulação de transcrição pela

RNA polimerase II como regulador positivo de transcrição, e fenótipos associados mostram estar relacionado com: veia da asa L3, olho, cerda escutelar e cerda mesotorácica.

Nas regiões promotoras foram encontrados motivos de ligação do fator de transcrição *hairy*, o qual tem função molecular associado com regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II. O mesmo está relacionado com a diferenciação dos segmentos em larvas e adulto, e com a subdivisão de órgãos. O gene *brinker* (*brk*) está relacionado com diversos processos como: morfogênese do disco da asa, regulação negativa de expressão gênica, regulação negativa de transcrição da RNA polimerase II. Dentre os fenótipos associados destaca-se o neuroblast NB4-2 e esqueleto cefalo-faríngeal. O gene *trithorax-like* (*Trl*) está envolvido na regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase, e dentre suas funções destacam-se a participação em sistemas de órgãos, morfogênese da asa, compensação de dosagem, divisão nuclear, e desenvolvimento do órgãos compostos externos sensíveis.

Tabela 20: Fatores de transcrição preditos para os motivos encontrado no grupo *up-regulated*. Significância dos fatores de transcrição encontrados é mostrado em forma de p-value.

Fatores de Transcrição	p-value
Mad	0.000132384
prd	0.000461447
Med	0.00103402
Deaf1	0.00440232
h	0.00465765
brk	0.0100501
Trl	0.0125207

Para o grupo de genes *down-regulated* foram obtidos 74 regiões regulatórias, as quais também foram analisadas pelo algoritmo MEME. Foram localizados 10 motivos conservados entre as sequências (Figura 19). O motivo 1 foi localizado em 50 sites e, junto com o motivo 3 e 4, é o mais bem representado. Curiosamente, o motivo TATAbox foi localizado em apenas 19 sequências. A análise dos motivos mais conservados mostrou 18 fatores de transcrição como candidatos, dos quais sete também foram localizados no grupo dos genes *up-regulated*. O gene *twist* (*twi*), *huckebein* (*hkb*), *broad* (*br*), *histone H2B* (*His2B*) liante de DNA, *snail* (*sna*), *heat shock factor* (*Hsf*), *zeste* (*z*), *tinman* (*tin*), *delta* (*dl*), *knirps* (*kni*) estão associados com fenótipos de subdivisão de órgãos, desenvolvimento de órgãos, segmentação de cabeça, mesoderme, diferenciação de segmentos no adulto, órgãos sensíveis a compostos externos, olho (*zeste*). Vários candidatos fazem parte do processo biológico de desenvolvimento de estrutura anatômica e desenvolvimento de órgão. Suas funções moleculares foram associadas a regulação da RNA polimerase II com excessão de *delta* que é um ligante específico de *notch* (Tabela 21).

Motif Overview

Figura 19: Motivos regulatórios do grupo de genes *down-regulated*. Os motivos foram preditos através do algoritmo MEME. Sequências *upstream* ao gene com cerca de 1000 bases foram analisadas. Foram considerados motivos preditos entre 6 e 20 nucleotídeos, utilizando banco de dados de motivos de *Drosophila melanogaster*. O gráfico mostra o E-value e número de sites em quais aparece o motivo. A matrix de peso PWM foi calculada a partir do log da frequência.

Tabela 21: Fatores de transcrição preditos para os motivos encontrado no grupo *down-regulated*. Significância do fatores de transcrição encontrados é mostrado na forma de p-value.

Fatores de Transcrição	p-value	Fatores de Transcrição	p-value
Mad	8,90E-05	His2B	0.00231421
Trl	0.000266221	sna	0.0116635
Espl	0.00168336	Hsf	0.0205551
twi	0.0209677	z	0.0237763
hkb	0.0241981	tin	0.0297254
Deaf1	0.00419455	dl	0.0244632
br-Z1	0.0152808	kni	0.0259837
Med	0.0142633	brk	0.0356508
prd	0.0471312	h	0.0416531

Discussão

O sistema visual de insetos é um atrativo modelo para o entendimento de processos de desenvolvimento, especialmente de formação de padrões (*patterning*). Sabe-se que muitos dos fatores e mecanismos que regem estes processos são conservados e compartilhados com vertebrados, como as proteínas regulatórias (Eyeless/Pax-6, sine oculis/Six3), componentes de tradução de sinal (Notch/Delta) e proteínas de adesão celular (irreC-rst/Dm-GRASP). Isso evidencia, em termos moleculares, planos básicos de construção de estruturas amplamente diversas no reino animal (Gaul e Cutforth, 1997).

Os lóbulos ópticos compreendem mais da metade do cérebro de zangões. Nos três gânglios sinápticos (a lâmina, a medula e a lóbula) a entrada visual proveniente dos olhos compostos é recebida e processada em funções como detecção de movimento e visão de cores (Meinertzhagen, 1993). Uma característica interessante que insetos compartilham com vertebrados em relação ao sistema visual é o mapeamento ponto-a-ponto da imagem em camadas sinápticas no cérebro referido como visuotopia.

A visão requer a extração massiva e paralela de parâmetros em uma forma visuotópica. Como consequência, as neurópilas (gânglios) são arranjadas em colunas e as camadas sinápticas orientadas perpendicularmente, permitindo o estabelecimento seletivo de sinapses entre os neurônios colunares (Fischbach e Hiesinger, 2008). Estudos com a mosca *Calliphora* (blowfly) mostram que seis fotoreceptores do omatídio emitem axônios que vão precisamente conectar com um neurônio na lâmina (Horridge e Meinertzhagen, 1970). Com isso fica uma pergunta: como uma quantidade relativamente pequena de genes pode codificar tão complexa rede regulatória capaz de formar a retina e os gânglios? Uma resposta para esta pergunta deve abranger todos os níveis do programa do desenvolvimento começando com a multiplicação e diferenciação celular, aos mecanismos de formação de sinapses.

Os lobulos ópticos em adultos de Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera são subdivididos em pelo menos três neurópilas, a lâmina, a medula e a lóbula (Cajal e Sanchez 1915). Projeções axonais dos fotoreceptores do olho composto inervam diretamente a lâmina e a medula. No olho, cada omatídeo contém oito tipos de fotoreceptores, dispostos em forma de anel, os quais formam, no centro, o rabdômero fotosensível. Os fotoreceptores 1-6 emitem suas projeções ao primeiro gânglio óptico, a lâmina, e são responsáveis pela visão espacial. Os dois fotoreceptores mais internos, 7 e 8, são responsáveis pela visão de cores, e emitem seus axônios para o segundo gânglio óptico, a medula (Varela, 1970; Ribi, 1979;

Fischbach e Hiesinger, 2008;). Em dípteros, os fotoreceptores de cada omatídeo projetam para o cérebro adulto seguindo uma regra de superposição, o que garante que o mesmo ponto no espaço seja projetado no mesmo cartucho na lâmina ou coluna na medula (Braitenberg, 1967). Os axônios das células monopolares da lâmina (L1-L5) de um único cartucho projetam até as colunas específicas da medula através do primeiro quiasma óptico. Assim, uma coluna da medula recebe informação proveniente de 7 omatídeos. Com isso é fácil perceber que o desenvolvimento dos gânglios ópticos deve ser coordenado com o desenvolvimento da retina e cérebro, em uma rede gênica intrínseca e regulada por complexa interação entre as partes.

O centro de Diferenciação

Em *Drosophila*, as células precursoras dos lóbulos ópticos formam uma estrutura tipo placóide na parte posterior da cabeça na ectoderme embrionária. Este placóide se invagina e eventualmente se funde com o cérebro embrionário (Campos-Ortega e Hartenstein, 1997; Allee *et al.*, 2006). Parte do controle deste processo é realizado pelas proteínas Wingless (Wg) e Decapentaplegic (Dpp) que atuam na regulação da proliferação dos precursores dos lóbulos ópticos e da sua decorrente diferenciação (Gaul e Cutforth, 1997). Na fase larval, a lâmina e medula são formadas a partir de uma estrutura em formato de ferradura, conhecida como centro de proliferação onde as mesmas moléculas atuam de forma decisiva. Se as moléculas Wg e Dpp forem removidas neste momento os precursores da lâmina e da medula falham em assumir seus destinos (Meinertzhagen, 1993; Gaul e Cutforth, 1997).

Em contraste aos dípteros, a maioria dos insetos holometábolos tem o desenvolvimento do disco do olho adiado até o último instar larval, como no caso de *Manduca sexta*. Nesta espécie, e provavelmente nois demais lepidópteros, os discos surgem de células formadas tardiamente na embriogênese, proliferam e crescem durante boa parte da vida larval. Células epidermais do primórdio do olho começam a expressar várias isoformas do *Broad Complex* após a ecdise para último instar larval e as células começam a proliferar e produzem o disco do olho invertido em *Manduca*. Em *Drosophila*, o *Broad Complex* também é requerido no disco do olho, e é a peça fundamental na progressão do sulco morfogênético (Allee, , 2006).

Como os lepidópteros, *Apis mellifera* não possui disco do olho, contudo em fases iniciais do desenvolvimento larval é possível ver um centro de diferenciação adjacente ao cérebro (Figura 3A, seta amarela). Percebe-se que o centro de diferenciação surge de um processo de evaginação do cérebro larval e, portanto, é composto por neuroepiderme. Este centro de diferenciação não sofre grandes alterações até o final do quarto instar larval (Figura

3 B). Externamente ao centro de diferenciação a epiderme é mais espessa, tanto em no terceiro quanto no quarto instar larval (Figura 3 A,B), sendo que em regiões mais afastadas a epiderme é mais fina (estrela na Figura 3B). Este centro de diferenciação dará origem ao primórdio óptico interno.

A lóbula e a medula

Comparado com a lâmina, as neurópilas lóbula e medula são estruturalmente mais complexas e abrigam diversos tipos a mais de neurônios (Fischbach e Hiesinger, 2008). A organização colunar é mantida em correspondência um-a-um entre os cartucho da lâmina a as colunas medulares, e entre a medula e lóbula através do segundo quiasma óptico. A medula é dividida em dez camadas neuronais (M1-M10) e a lóbula em seis (Lo-1-6).

Em *Manduca*, a lóbula, também é formada por diferenciação de neuroblastos a partir de uma segunda estrutura, o primórdio óptico interno (Monsma e Booker, 1996a; Meinertzhagen, 1993). O primórdio da lóbula de *Apis* surge a partir do centro de diferenciação já no quinto instar larval (Figura 4A, B, estrela). No final do quinto instar larval a estrutura que formará a lóbula no centro de diferenciação apresenta-se em formato globular e, aparentemente, deste ponto em diante, esta estrutura não sofre grandes alterações morfológicas até o adulto (Figuras 4 - 6).

Em mutantes *sol* (Small Optic Lobes) de *Drosophila* a estratificação das camadas pode ser severamente interrompido. As camadas externa e interna da medula são separadas pela camada M7, a qual abriga axônios tangenciais. Esta quebra na camada ocorre justamente na região entre a parte proximal da medula, originada do primórdio óptico interno, e a parte distal, originada do primórdio óptico externo (Fischbach e Heisenberg, 1981). Ambas neurópilas independem de inervação, podendo existir em mutantes *sol* completamente sem olhos (Power, 1943; Fischbach, 1983;). As suas lóbulas contêm células descendentes de ambos primórdios ópticos (interno e externo), e a perda celular parece ser devido a degeneração de neurônios já diferenciados. Interessantemente, transcritos deste gene estão muito menos expressos em zangões do que em fêmeas durante todo o desenvolvimento (Figura 12). Operárias possuem três picos de expressão em (F1, F3 e PP2), zangões em L4, F2 e S3, sendo que o desenvolvimento da medula em zangão é mais acentuado, justamente durante a fase de alimentação. Zangões possuem lóbulos ópticos maiores que fêmeas, o que pode sugerir uma outra função desta proteína em *Apis*, ou que mecanismos pós-transcricionais podem estar envolvidos. Como é continuamente expresso nos lóbulos ópticos e olho sugere-se uma participação em múltiplos passos no desenvolvimento destas estruturas.

Enquanto mutantes *sol* possuem medula e lóbula reduzidas, devido a degeneração de neurônios diferenciados, os mesmos possuem escassez de precursores neuronais, causando massiva degeneração axonal (Fischbach e Technau, 1984). Mutantes indicam que o desenvolvimento da lóbula e medula são independentes da indução por inervação da lâmina. Mesmo em mutantes completamente sem olho, as conexões entre medula e lóbula, e esta com o cérebro, se mantém (Fischbach, 1983). Em *Apis*, a expressão de *sine oculis* mostra padrões bem distintos entre os sexos. Entretanto em zangões os níveis de transcrito são altos nas fases iniciais (L3 e L4). Na fase seguinte a medula já está bem desenvolvida em machos, enquanto em operária a expressão mantém um platô até a fase de tecelagem de casulo (Figura 12).

Uma análise global da expressão do gene *minibrain* em abelhas mostrou que este também segue um padrão distinto entre zangões e operárias. Em *Drosophila* este gene parece estar relacionado com o número de neuroblastos no centro de proliferação externo, visto que mutantes *minibrain* causam espaçamento anormal de neuroblastos, implicando em menor progenia. Como consequência, os mutantes exibem marcadamente uma redução dos lóbulos ópticos e hemisférios cerebrais (Tejedor, *et al.* 1995). O maior volume da medula e lóbula em zangões pode ser definido pelo platô da expressão de *minibrain*, que ocorre entre L3 a F3. Nota-se que em operárias os níveis de transcritos estão mais baixos, e que cresce linearmente até atingir o mesmo níveis dos zangões somente durante a fase de alimentação do L5. Nesta fase a medula e lóbula estão estruturalmente definidas, sendo que o aumento de volume devido ao número de células ocorre proporcionalmente em toda a capsula cefálica.

A lâmina e a retina

O crescimento axonal da retina ocorre em uma onda de desenvolvimento, seguindo a onda de diferenciação celular no disco do olho em *Drosophila*. Axônios retinais se projetam através do feixe óptico, formado por monocamada de células gliais sobre axônios, sob controle de cinase de adesão focal Fak56D (Murakami, 2007). Experimentos com crescimento de retina ectópica mostraram que o seu desenvolvimento é autônomo e, portanto, independe da conexão com o cérebro (Steller, *et al.*, 1987). A lâmina é completamente dependente da inervação retinal, ao contrário da medula e lóbula (Power, 1943; Fischbach, 1983). Contudo, o volume do lóbulo óptico está fortemente correlacionado com o número de facetas no olho composto (Power, 1943; Campos-Ortega e Hofbauer, 1990). Neste mesmo estudo foi verificado que a lâmina não se desenvolve e a medula e lóbula são reduzidas.

Diferentemente de *Drosophila melanogaster*, o olho de *Manduca sexta*, surge de um pequeno grupo de células epidérmicas na cápsula encefálica a partir do último instar larval, a qual exibe uma morfologia típica chamada de centro de diferenciação (Monsma e Booker, 1996a,b; Champlin e Truman, 1998b; MacWhinnie *et al.*, 2005). Durante a fase de alimentação e começo da fase de “*wandering*”, no último instar larval em *Manduca*, observou-se um aumento massivo de células em mitose. O centro de diferenciação, que originará o olho, aumenta e o padrão de atividade mitótica é similar ao encontrado no disco imaginal de *Drosophila* (Monsma e Booker, 1996 a e b).

A lâmina em *Drosophila*, junto com a parte distal da medula, surge do primórdio óptico externo (Campos-Ortega e Hofbauer, 1990). Selleck e colaboradores (1991 e 1992) descobriram uma forte correlação do tamanho da lâmina com o número de omatídeos, como consequência direta da influencia indutiva da retina em crescimento. Desta forma, a inervação dos fotoreceptores ativa o ciclo celular final dos neuroblastos precursores da lâmina (Rebay e Doroquez, 2006). Os fatores Hedgehog, liberado por estímulo neural, e Spitz, ligante do Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR, ambos são transportados pelo axônio até a lâmina (Huang e Kunes, 1996). Esta expressa EGFR e assim inicia a montagem do complemento celular pós-sináptico para o cartucho da lâmina (Fischbach e Hiesinger, 2008). Com isso, pela ação orquestrada de Hedgehog e Spitz, o número de neurônios pré-sinápticos determina o tamanho da população pós-sináptica. Isto é corroborado por dados de *Apis mellifera* no presente trabalho, onde a lâmina se desenvolve na medida que a retina se expande (Figuras 3 a 6). Também em zangões, a lâmina se desenvolve inicialmente da parte posterior para a anterior, seguindo um tipo de sulco morfogenético (Eisen e Youssef, 1980). O sulco morfogenético percorre a retina (placóide em Apis) durante L3 e L4., e logo em F1 de zangões percebe-se o começo do desenvolvimento da lâmina, iniciando-se póstero-ventralmente em direção anterior.

Em *Drosophila* a inicialização e propagação de sulco morfogenético requer as vias de sinalização de *decapentaplegic* (*dpp*) e *hedgehog* (*hh*) (Heberlein *et. al.* 1993; Ma *et. al.*, 1993; Pignoni and Zipursky, 1997). A falta de expressão de *dpp* na margem anterior leva a duplicação de todo o disco do olho sugerindo que *dpp* padroniza o disco antes da iniciação do sulco (Pignoni and Zipursky, 1997). Também foi visto que *eya* e *so* são expressos antes, no meio, e depois da passagem do sulco morfogenético (Pignoni e Zipursky, 1997). Mutantes de ambos os genes levam a massiva morte celular (Bonini *et. al.*, 1993). De acordo com Pignoni e colaboradores (1997) *so* e *eya* desempenham papel chave na especificação do olho, regulando múltiplos passos, incluindo proliferação celular no epitélio, iniciação e propagação do sulco

morfogenético e desenvolvimento neuronal. Ao contrário com que ocorre em *Drosophila*, *Apis* possui um padrão de expressão bem divergente do ortólogo predito. Em vez de ser expresso antes e durante a passagem do sulco morfogenético (L3-L4) *eya* é expresso no final da fase de alimentação em operárias, e no começo da fase pré-pupal em zangões. Em F2 de zangões há, também, uma aumento de expressão de *eya*, contudo neste momento o sulco morfogenético já percorreu toda a retina, e é possível ver clusters omatidiais em fase avançada de maturação. Particularmente em zangão, o maior pico de expressão ocorre em pré-pupas, onde a lâmina está quase totalmente formada, e na retina já é possível ver os clusteres omatidiais maduros.

O desenvolvimento da lâmina também está fortemente correlacionado com o padrão de expressão de *epidermal growth factor receptor* (EGFR) em zangões. Verificou-se altos níveis em L3 e L4, sugerindo que a proteína esteja atuando logo em seguida, quando começa a surgir a lâmina. Também em S2 percebe-se que a lâmina continua a se desenvolver, e é possível observar vários feixes axonais chegando na lâmina. Operárias possuem o mesmo padrão que zangões, porém adiado em cerca de 24 horas, sugerindo uma heterocronia. Desta forma, o padrão reflete ao visto em *Drosophila*, no qual à medida que axônios atingem a camada externa da medula são ativados os precursores neuronais formando a lâmina.

Durante o estágio de tecelagem de casulo em *Apis* percebe-se bem o desenvolvimento do córtex da futura lâmina, e no estágio seguinte o córtex encontra-se ainda mais espesso, com densa formação axonal no primeiro quiasma óptico. No final da tecelagem de casulo está ocorrendo o segundo pico de expressão do gene *roughest* (Figura 13) relacionando o desenvolvimento axonal e diferenciação da futura lâmina com a expressão do gene. Tal resultado é corroborado pelos estudos de Varela (1970) e Ribi (1979), que mostraram que a chegada de axônios está relacionado com o desenvolvimento da lâmina em *Apis*. Sabe-se que a proteína Roughest está presente neste local, segundo estudos com hibridação *in situ* em *Drosophila* que mostraram intensa marcação nos discos imaginais e no princípio óptico externo (Ramos *et al.*, 1993). Estudos em *Manduca sexta* também mostraram que os axônios que chegam no primórdio óptico externo (futuro lóbulo óptico) disparam divisões mitóticas controladas em células precursoras distintas, acompanhadas de morte celular programada de neurônios na medula e lâmina, provocando sua diferenciação (Monsma e Booker, 1996 a,b). Desta forma, percebe-se que a expressão do gene *roughest* está intimamente relacionada com o desenvolvimento da lâmina. Tais resultados mostram a similaridade dos processos entre esses três grupos de insetos. Curiosamente, em zangões os níveis de expressão de *roughest* são menores que em operária após a F1, o que pode sugerir um estímulo apoptótico menor,

visto que mutantes possuem olho rugoso devido ao excesso de células, ajudando a explicar o maior número de células na lâmina. Contudo, ainda não se sabe quais mecanismos determinam o tamanho da retina, e quais poderão atuar na lâmina e determinar o tamanho que esta assume.

O desenvolvimento da lâmina só será completado após a metamorfose (Figura 6). No estágio pré-pupal já é possível visualizar a lóbula e medula como estruturas quase totalmente formadas. Aparentemente, entre as fases pré-pupa e pupa de olho branco, tais estruturas sofrem apenas um pequeno rearranjo (Figuras 8 e 9), e a primeira estrutura que começa a se diferenciar é a lóbula seguida da medula. Em *Manduca* esses eventos estão correlacionados com o aumento do título de ecdisteróides que conduz a metamorfose. O término da gênese da medula e lâmina é marcado pela cessação de atividade mitótica no final do estágio pupal em *Manduca*.

Utilizando-se o marcador de desenvolvimento neuronal *Elav* observou-se que ambos os sexos de abelhas possuem o mesmo padrão de expressão, porém com diferença temporal. Pela análise da Figura 15 fica evidente que em operárias há uma requisição precoce de transcritos de *elav* de cerca de 36 horas. Com isso pode-se inferir que a requisição de *elav* esteja relacionado com uma maturação precoce dos olhos e lóbulas em operárias comparadas aos zangões.

Aspectos moleculares durante a fase de tecelagem de casulo

O desenvolvimento do olho de *Drosophila* é governado por cerca de 260 genes. Em abelhas foi possível localizar 922 proteínas ortólogas, das quais muitas são isoformas anotadas, porém, sem dados referentes ao tecido específico de expressão. Para avaliar o conjunto de genes expressos em fase mediana do desenvolvimento do olho foi realizado um experimento de micro-arranjos. Tal experimento pode ajudar a explicar o desenvolvimento diferencial do olho e lóbulos ópticos nas estruturas em processo de formação. Para tanto foi dividido em dois grupos, um composto de genes *up-regulated* e outro dos *down-regulated* (Tabelas 14-19). Interessantemente, em ambos os grupos foram localizados genes participantes de processos relacionados com desenvolvimento celular, transcrição e morfogênese de epitélio, porém os genes eram diferentes e atuam em pontos diferentes do mesmo processo. As vias enriquecidas em análise utilizando o catálogo KEGG mostraram também que há genes participantes em processo de metabolismo típico de tecido em alta taxa de divisão. Em zangões verificou-se a alta expressão de um gene relacionado com

diferenciação sexual, inferindo que membros da cascata de diferenciação sexual também estão atuando diretamente no desenvolvimento do olho.

Dentre os grupos de genes *down-regulated* encontram-se vários relacionados com metabolismo de proteínas e processo metabólico de RNA. Especificamente o gene *star*, que está relacionado com a via do receptor de fator de crescimento epidermal, está pouco expresso em zangão, apesar do fato de o gene *egfr* estar muito expresso nesta fase. Em operárias é visto o oposto: o gene *star* está muito expresso e o *egfr* pouco. O gene *nemo*, relacionado com desenvolvimento do olho pela regulação de expressão de *eya* e *dac*, e na regulação negativa da via do receptor Wnt, está pouco expresso em zangões e, interessante, a baixa expressão dele está relacionada com o resgate em mutantes *small-eye* de *Drosophila* (Braid e Verheyen, 2008)

A análise da região promotora corrobora a necessidade de elementos em processos de divisão celular e formação de órgãos. Grande quantidade de motivos regulatórios está relacionada com genes que regulam a atividade da RNA polimerase II e morfogênese de tecidos.

Conclusões

- O desenvolvimento da lâmina em Zangões está fortemente conectado com o desenvolvimento da retina.
- O mecanismo que determina o tamanho da retina em *Apis mellifera* provavelmente é diferente de *Drosophila*, o qual tem o gene *eyes absent* como um dos principais atuantes.
- O gene *small optic lobe* parece exercer funções outras em *Apis mellifera* não ligadas ao tamanho diferencial dos lóbulos ópticos.
- Expressão de *sine oculis* em fases iniciais do desenvolvimento em zangões é um forte candidato para explicar o desenvolvimento diferencial do olho em zangões.
- O gene *minibrain* pode ajudar a explicar o tamanho diferencial da medula e lóbula em zangões devido à expressão em fase inicial ser maior.
- A expressão precoce de *elav* em operárias pode estar relacionado a uma provável exigência na diferenciação neuronal e, portanto, uma maturação precoce em operárias.
- Entre os genes diferencialmente expressos destaca-se uma expressiva quantidade relacionados com divisão e regulação do ciclo celular, porém em diferentes vias dos processos. Os dados são corroborados com a análise das regiões promotoras.

Referências Bibliográficas

- Allee, P. J., Pelletier C. L., Fergusson E. K., Champlin D. T. (2006). Early events in adult eye development of the moth, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 52: 450-460.
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J.M.M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. & Dopazo, J. 2006. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Research (Web Server issue)* 34:W472-W476.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Araújo, H., Machado, L. C. H., Octacílio-Silva, S., Mizutani, M., Silva, M. J. F., Ramos, R. G. P. (2003). Requirement of the *roughest* gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of *Drosophila* compound eye development. *Mech. Dev.* 120: 537-547.
- Barchuk, A. R., Cristino, A. S., Kucharski, R., Costa, L. F., Simões, Z. L. P., Maleszka, R. (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.* e7:70.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., Omholt, S. W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419-429.
- Bonini N.M., Leiserson W.M., and Benzer S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell.* 72:379-395.
- Boschert, U., Ramos, R. G. P., Tix, S., Technau, G., Fischbach, K. F. (1990). Genetic and developmental analysis of *irreC*, a genetic function required for optic chiasm formation in *Drosophila*. *J Neurogenet* 6: 153-171.
- Braid, L.R., Verheyen, E.M. (2008). *Drosophila* nemo promotes eye specification directed by the retinal determination gene network. *Genetics* 180(1): 283-299.
- Braitenberg, V. (1967). Pattern of projections in the visual system of fly. I. Retina lamina projections. *Exp. Brain Res.* 3:271-298.
- Breathnach, R., Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 349-383.
- Cajal, S.R., Sanchez, D. (1915). Contribucion al concocimiento delos centros nerviosos de los insectos. *Tra. Lab. Invest. Biol.* 13:1-167.
- Campos-Ortega, J. A., Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2a edição, Springer, Berlin.
- Campos-Ortega, J.A., Hofbauer A. (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev. Biol.* 198:264-274.
- Champlin, D. T., Truman, J. W. (1998a). Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development* 125: 269-277.
- Champlin, D. T., Truman, J. W. (1998b). Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of *Manduca sexta*. *Development* 125: 2009-2018.
- Cristino, A. S., Nunes, F. M. F., Lobo, C. H., Bitondi, M. M. G., Simões, Z. L. P., Costa, L. F., Lattorff, H. M. G., Moritz, R. F. A., Evans, J. D., Hartfelder, K. (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Mol. Biol.* 15: 703-714.
- Delaney S.J., Hayward D.C., Barleben F., Fischbach K.F., and Miklos G.L.G. (1991). Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 88:7214-7218.
- Desplan, C. Eye development: governed by a dictator or a junta? *Cell* 91: 861-864 (1997).

- DeWilde J., Beetsma J. (1982). The physiology of caste development in social insects. *Adv. Insec. Phys.* 16:167-246.
- Eisen, J., Youssef, N. N. (1980). Fine structural aspects of the developing compound eye of the honey bee, *Apis mellifera* L. *J. Ultrastruct Res.* 71: 79-94.
- Evans, J. D., Wheeler, D. E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology* e2.1.
- Fischbach, K. F. (1983). Neural cell types surviving congenital sensory deprivation in the optic lobes of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 95(1):1-18.
- Fischbach, K. F., Heisenberg, M., (1981). Structural brain mutant of *Drosophila melanogaster* with reduced cell number in the medulla cortex and with normal optomotor yaw response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(2): 1105-1109.
- Fischbach, K. F., Hiesinger, P.R. (2008). Optic lobe development in *Brain Development in Drosophila melanogaster*. Landes Bioscience & Springer Science.
- Fischbach, K.F., Technau G. (1984). Cell degeneration in the developing optic lobes of the *sine oculis* and *small-optic-lobes* mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 104(1):219-239.
- Friedrich M. (2003). Evolution of insect eye development: first insights from fruit fly, grasshopper and flour beetle. *Integr. Comp. Biol.* 43: 58-521.
- Friedrich M. (2006). Ancient mechanisms of visual sense organ development based on comparison of the gene networks controlling larval eye, ocellus and compound eye specification in *Drosophila*. *Arthropod Struct. Develop.* 35:357-378.
- Gaul U., Cutforth T. (1997). The genetics of visual system development in *Drosophila*: specification, connectivity and asymmetry. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 48-54.
- Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Lacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smith G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5(10).
- Gonstarsky H., Wagner O., (1954). Quantitative versuche zur chemotherapeutischen bekämpfung von nosema-apis zander bei der honigbiene. *Arz. Fors. Dr Res.* 4:161-168.
- Hafen, E, Dickson, B, Brunner, D, Raabe, T. (1994). Genetic dissection of signal transduction mediated by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Prog. Neurobiol.* 42: 287-92
- Hasselmann M., Gempe T., Schiott M., Nunes-Silva C.G., Otte M., Beye M. (2008). Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454:519-522.
- Hartfelder, K., Engels, W. (1998). Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Topics Dev. Biol.* 40: 45-77.
- Heberlein U., Wolff T., and Rubin G.M. (1993). The TGFbeta homolog *dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of the morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell.* 75:913-926.
- Horridge, G.A. (1965). Arthropoda: Receptors for light, and optic lobes. *Em Theodore H. B., Horridge A. (eds.) Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*, Vol. II., San Francisco: Freeman W.H. pp. 1063-1113.
- Horridge, G. A., Meinertzhagen, I. A., (1970). The accuracy of the patterns of connexions of the first- and second-order neurons of the visual system of *Calliphora*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 175:69-82.
- Hsiung, F., Moses, K. (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1207-1214.

- Huang Z., Kunes S., (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* 86: 411-422.
- Jay S.C. (1964). Starvation studies of larval honeybee. *Can. Ento.* 96:784-789.
- Jarman A.P., Grell E.H., Ackerman L. (1994). Atonal is the proneural gene for drosophila photoreceptors. *Nature*. 369:398-400.
- Kenyon K.L., Li D.J., Clouser C. (2005). Fly SIK-type homeodomain proteins sine oculis and optix partner with different cofactors during eye development. *Dev. Dynam.* 234:497-504.
- Kerr W.E., (1962). Genetics of sex determination. *Ann. Rev. Ento.* 7: 157-.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Maennikkoe, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holberg, C., Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephritic syndrome. *Mol. Cell* 1: 575-582.
- Konopova B., Jindra M. (2007). Juvenile hormone resistance gene *Methoprene-tolerant* controls entry into metamorphosis in the beetle *tribolium castaneum*. *PNAS* (104), 488-493.
- Lehrer, M. (1994). Spatial vision in the honeybee: The use of different cues in different tasks. *Vision Res.* 34: 2363-2385.
- Li M., Mead E. A., Zhu J. (2011). Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *PNAS* (108). 638-643.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Ma C., Zhou Y., Beachy P.A., and Moses K. (1993). The segment polarity gene *hedgehog* is required for progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye. *Cell.* 75:927-938.
- Machado, R. C., Pereira, R. N. R., Costa, M. S. A., Ramos, R. G. P. (2002). "In vivo" toxicity of a truncated version of the *Drosophila* Rst-IrreC protein is dependent on the presence of a glutamine-rich region in its intracellular domain. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 74: 285-295.
- MacWhinnie, S. G. B., Allee, J. P., Nelsonm C. A., Riddiford, L. M., Truman, J. W., Champlin, D. T. (2005). The role of nutrition in creation of the eye imaginal disc and initiation of metamorphosis in *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 285: 285-297.
- Meinertzhagen, I. A., Hanson, T. E. (1993). The development of the optic lobe. *Em Bate, M., Arias, A. M. (eds) The Development of Drosophila melanogaster.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1363-1493.
- Melloni E., Pontremoli S. (1989). The Calpains. *Tren. Neur.* 12:438-444.
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* 8: 53-62.
- Menzel, R., Mercer, A. (1987). *Neurobiology and Behavior of Honeybees*. Springer, Berlin.
- Michelette, E. R. F., Soares, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages of Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431-440.
- Michener C.D. (1974). The social behavior of the bees. A comparative study. Harvard Press, Cambridge, Massachusetts.
- Mirth, C., Truman, J. W., Riddiford, L. M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: 1-12.
- Monsma S. A., Booker R. (1996a). Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. I. Patterns of proliferation and cell death. *J. Comp. Neurobiol.* 367: 10-20.

- Monsma S. A., Booker, R. (1996b). Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. II. Effects of deafferentation and developmental hormone manipulation. *J. Comp. Neurol.* 367: 21-35.
- Munoz-Torres MC, Reese JT, Childers CP, Bennett AK, Sundaram JP, Childs KL, Anzola JM, Milshina N, El-sik CG. 2011. Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Research.* 39: 658-662.
- Murakami S. Umetsu D., Maeyama Y. (2007). Focal adhesion kinase controls morphogenesis of the *Drosophila* optic stalk. *Development.* 134:1539-1548.
- Myser, W. C. (1954). The larval and pupal development of the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus. *Ann. Entom Soc. Am.* 47: 683-711.
- Nelson, J. A. (1924). Morphology of the honeybee larva. *J. Agric Res.* 12: 1167-1214.
- Nilsson, D.-E. (1994). Eyes as optical alarm systems in fan worms and ark clams. *Phil. Trans. R. Soc Lond - Ser B* 346: 195-212.
- Nilsson ,D.-E., Kelber, A. (2007). A functional analysis of compound eye evolution. *Arthropod Struct. Dev.* 36: 373-385.
- Nowikoff, M. (1931). Das Modell des Rhabdoms von Komplexaugen. *Biol. Zentralbl.* 51: 325-329.
- Octacílio-Silva, S. (2008). *Estudo da regulação transcricional de Rst nas etapas finais do desenvolvimento do olho composto de Drosophila melanogaster*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Univeridade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga S, Ozaki H, Sato S, Kawakami K(1999). Cooperation of Six and Eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6815–6824.
- Oliver G., Gruss P.,(1997). Current views on eye development. *Trends Neurosci.* 20:415-421.
- Page R.E., Peng C.Y.S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. 1st. *Sym. on Slow Ag. Org.* 36:695-711.
- Paulus, H. F. (2000).Phylogeny of the Myriapoda-Crustacea-Insecta: A new attempt using photoreceptor structure. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 38: 189-208.
- Peng Y.S., Jay S.C. (1976). Effect of diet on queen rearin by caged worker honeybees. *Can. J. Zoo.* 54:1156-1160.
- Pfaffl W.M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2009.
- Pignoni F., Hu B., Zavitz K. H., Xiao J., Garrity P. A., Zipursky L., (1997). The Eye-Specification Proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell.* 91:881-891.
- Pignoni F., and Zipursky L., (1997). Induction of *Drosophila* eye development by decapentaplegic. *Development.*124:271-278.
- Phillips, E.F. (1905). Structure of the compound eye of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 123-157.
- Power, M. E., (1943). The effort of reduction in numbers of ommatidia upon the brain of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp.Zool.* 94:33-71.
- Praagh, J. P. V., Ribí, W. A., Wehrhahn, C., Wittmann, D. (1980). Drone bees fixate the queen with the dorsal frontal part of their compound eyes. *J. Comp. Physiol. A* 136: 263-266.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994).Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *small eye* gene in mice and *aniridia* in humans. *Science.* 265:785-789.
- R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

- Rachinsky, A., Hartfelder, K. (1998). *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: Comparison of six media. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Animal* 34: 646-648.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis - hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocr.* 79:31-38.
- Ramos, R. G. P., Igloi, G. L., Bauman, U., Maier, D., Lichte, B., Schneider, T., Brandestatt, J. H., Frohlich, A., Fischbach, K.-F. (1993). The *irregular chiasm C roughest* locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes Dev.* 7: 2533-2547.
- Ready, D. F., Hanson, T. E., Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* 53: 217-240.
- Rebay I., Doroquez D.B., (2006). Signal integration during development: Mechanisms of EGFR and Notch pathway function and cross-talk. *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Bio.* 41:339-385.
- Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z., Fischbach, K. F. (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: The role of IrreC-rst protein. *Development* 122: 1931-1940.
- Rembold H. (1976). The role of the determinator in caste formation in the honeybee. *Em Lüscher M. (ed.) Phase and Caste Determination in Insects*. Pergamon, Oxford, pp. 21-34.
- Ribi, W. A. (1979). The first optic ganglion of the bee. III. Regional comparison of the morphology of photoreceptor-cell axons. *Cell Tissue Res.* 200: 345-357.
- Ribi, W.A., Engels, E., Engels, W. (1989). Sex and caste specific eye structures in stingless bees and honey bees (Hymenoptera: Trigonidae, Apidae). *Entom. Gener.* 14: 233-242.
- Ritchie, M. E., Silver, J., Oshlack, A., Silver, J., Holmes, M., Diyagama, D., Holloway, A., and Smyth, G. K. (2007). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23, 2700–2707. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/btm412>
- Robert C Gentleman , Vincent J Carey , Douglas M Bates , Ben Bolstad ,Marcel Dettling , Sandrine Dudoit , Byron Ellis, Laurent Gautier, Yongchao Ge, Jeff Gentry, Kurt Hornik, Torsten Hothorn, Wolfgang Huber, Stefano Iacus, Rafael Irizarry, Friedrich Leisch, Cheng Li, Martin Maechler, Anthony J Rossini, Gunther awitzki, Colin Smith, Gordon Smyth, Luke Tierney, Jean YH Yang and Jianhua Zhang. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5:R80.
- Rutherford K., Parkhill J., Crook L. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* 16:944-945.
- Ruttner F. (1988). Principles of geographic variation in honey bees. African honey bees and bee mites. 250-259.
- Schmidt Capella, I.C., Hartfelder, K. (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.* 44: 385-391.
- Schmidt Capella, I. C., Hartfelder, K. (2002). Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. *Cell Tissue Res.* 307: 265–272
- Schneider, T., Reiter, C., Lichte, B., Nie, Z., Eule, E., Bader, B., Schimansky, T., Ramos, R.G.P., Fischbach, K.-F. (1995). Neural recognition in the optic lobe of *Drosophila*: restricted expression of the cell adhesion molecule IrreC-rst is required for normal axonal projections of columnar neurons. *Neuron* 15: 259-271.
- Selleck S.B., Gonzalez C.,Glover D.M. (1992). Regulation of the G1-S transition in postembryonic neuronal precursors by axon ingrowth. *Nature.* 355:253-255.
- Selleck S.B., Steller H. (1991). The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron.* 6(1):83-99.
- Shen,W., and Mardon, G.(1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by direct dachshund expression. *Development.* 124:45-52.

- Sliter, T. J., Sedlak, F. C., Baker, F.C. Schooley, D. A. (1987). Juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*: Identification and titer determination during development. *Insect Biochem.* 17: 161-165.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, Vol. 3, No. 1, Article 3. <http://www.bepress.com/sagmb/vol3/iss1/art3>
- Smyth, G. K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, pages 397–420.
- Smyth, G. K., Michaud, J., and Scott, H. (2005). The use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21(9), 2067–2075. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/content/short/21/9/2067>
- Smyth, G. K., and Speed, T. P. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265–273.
- Snodgrass, R. E (1956). *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publ. Assoc., Ithaca and London.
- Steller H., Fischbach K.F., Rubin G.M., (1987). Disconnected: a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. *Cell*. 50(7):1139-1153.
- Stenkamp, D. L., Cameron, D. (2002). Cellular pattern formation in the retina: Retinal regeneration as a model system. *Rev. Mol. Vision* 8: 280-93.
- Strükelberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., Couet, H. G., Ramos, R. G. P., Fischbach, K. F. (2001). *Rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128: 4229-4239.
- Sun, C., Kilburn, D., Lukashin, A., Crowell, T., Gardner, H., Brundiers, R., Diefenbach, B., Carulli, J. P. (2003). *Kirrel2*, a novel immunoglobulin superfamily gene expressed primarily in cells of the pancreatic islets. *Genomics* 82:130-142.
- Tejedor F., Zhu X.R., Kaltenbach E., Ackermann A., Baumann A., Canal I., Heisenber M., Fischbach K.F. e Pongs O. (1995). *minibrain*: A new Protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14:287-301.
- The Gene Ontology Consortium (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25:25-29.
- The Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949.
- Timothy L. Bailey and Charles Elkan,(1994). "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", *Proc. of the Sec. Int. Conf. Intellig. Syst. Mol. Bio.* pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park.
- Treisman, J. E., Heberlein, U. (1998). Eye development in *Drosophila*: formation of the eye field and control of differentiation. *Curr. Topics Dev. Biol.* 39:119-58
- Truman, J. W., Riddiford, L. M. (1999). The origin of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447-452.
- Ulrich G.M., Rembold H. (1983). Caste-specific maturation of the endocrine system in the female honey bee larva. *Cell Tissue Res.* 230:49-55.
- Varela, F. G., Porter, K. R. (1969). Fine structure of the visual system of the honeybee (*Apis mellifera*). I. The retina. *J. Ultrastruct. Res.* 29: 236-259.
- Varela F. G. (1970). Fine structure of the visual system of the honey bee (*Apis mellifera*). II. The lamina. *J. Ultrastruct. Res.* 31: 178-194.
- Vitt, H. H., Hartfelder, K. (1998). Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Morphol. Embryol.* 27: 351-354.

- Warren, J. T., Gilbert, L. I. (1986). Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 16: 65-82.
- Weaver, N. 1966. Physiology of caste determination. *Annu. Rev. Entomol.* 11: 79-102.
- West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford Univ. Press, New York.
- Whitfield, C. W., Band, M. R., Bonaldo, M. F., Kumar, C. G., Liu, L., Pardinas, J. R. Robertson, H. M., Bento Soares, M. and Robinson, G. E. (2002) Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. *Genome Research* 12:555-566
- Wigglesworth, V. B. (1934). The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II Factors controlling moulting and 'metamorphosis'. *Quartely Journal of Microscopical Science* vol 77, 306:191-212.
- Wilson T.G, Fabian J. (1986). A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Developmental Biology* 118(1);190-201.
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wolff, T. Ready, D. F. (1991). Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113: 825-839.
- Wolff, T. Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. *Em Bate M., Arias A. M.(eds) The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.1277-1327.
- Zdarek J. Haragsim O. (1974). Action of juvenoids on metamorphosis of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 20: 209-221.

Anexos

ANEXO A - CD com Tabelas completas e Scripts referentes à análise de genes diferencialmente expressos

ANEXO B - Manuscrito em preparação: Cellular and molecular processes during development of the visual system in drones of the honey bee, *Apis mellifera*

ANEXO C - Manuscritos em co-autoria, publicados em periódicos internacionais durante o Doutorado

C1. David Santos Marco Antonio & Karina Rosa Guidugli-Lazzarini & Adriana Mendes do Nascimento & Zilá Luz Paulino Simões & Klaus Hartfelder. **RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers.** Naturwissenschaften (2008) 95:953-961.

C2. Oppelt A, Humann FC, Fuessl M, Azevedo SV, Marco Antonio DS, Heinze J, Hartfelder K. **Suppression subtractive hybridization analysis reveals expression of conserved and novel genes in male accessory glands of the ant *Leptothorax gredleri*.** BMC Evolutionary Biology (2010) 10:e273.

CELULAR PROCESSES DURING VISUAL SYSTEM DEVELOPMENT OF DRONES AND WORKERS OF *APIS MELLIFERA*

Marco Antonio, D.S.¹

Hartfelder, Klaus.²

1-Departamento de Genetica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –Universidade de São Paulo, Brasil

2-Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Brasil

Abstract

Marco Antonio, D. S. & Hartfelder, Klaus: CELULAR PROCESSES DURING VISUAL SYSTEM DEVELOPMENT OF DRONES AND WORKERS OF *APIS MELLIFERA*

The processes that drive compound eye development in insects have been broadly studied in *Drosophila melanogaster* in which they arise from imaginal discs. Little is known about optic lobe and retina development in other insects, most of which do not have imaginal eye discs attached to the nervous system. For this reason, a comparative analysis of eye development in the honey bee, *Apis mellifera*, not only contributes to evo-devo aspects comparing the major families of holometabolous insects, but also may elucidate questions about developmental plasticity because the compound eyes of the honeybee show strong sex and caste-specific differences.

Since our primary objective was to elucidate the pattern of cellular differentiation and division during eye development we performed histological and immunolabelling analyses during the postembryonic stages of development, concomitant with a real-time analysis of *roughest* gene expression. For the immunolabelling experiments we used an anti-phospho-histone H3 antibody that labels cells in M phase. We analyzed eye development in worker larvae starting with the third instar until white, pink and brown-eyed pupae, paying special attention to the fifth instar which was subdivided into feeding phase (L5F), cocoon spinning phase (L5S) and prepupae (PP).

Optic Lobe development in *Apis mellifera* occurs by neuroepithelial folding initiating from a differentiation center, in the larval brain. This center sequentially produces the neural layers of the optic lobe (medulla, lobula and lamina). Development of the lamina, which is the last layer to be formed, takes more time and happens in two steps before metamorphosis. The first step is emergence at the beginning of the fifth larval instar coinciding with the first peak of *roughest* gene expression. The second step occurs during the cocoon spinning phase and is marked by its inner differentiation, again accompanied by a second peak of *roughest* expression. During this second peak of *roughest* expression the rhabdomers in the retina become visible. These, however, complete their development only during the pupal stage.

The development of the lamina, lobula and medulla is not complete until after metamorphosis, even though these optic lobe structures are structurally defined already at the beginning of the pupal phase. Retinal development in this phase is marked by gradual pigmentation, axonal bundle shortening and rhabdomer elongation, which reach their final size just prior to emergence of the bees from their brood cells.

Key words: *Apis mellifera*, compound eye, optic lobe, lamina, retina, drones.

Introduction

Like any other holometabole insect *Apis mellifera* undergoes three post-embryonic phases: larvae, pupae and adult. After embryogenesis the larvae undergoes five molts where the cephalic capsule increase in size to hold the growing optic lobe. During pupation the eye gradually pigments until birth (Michelette & Soares, 1993; Nelson, 1924; Myser, 1954; Rachinsky et al., 1990). During larvae development is observed differences in hormonal titers of juvenile hormone and ecdysteroids (Hartfelder & Engels, 1998). These act with neurohormones and receptors to regulate the transcription of target genes leading to coordinated tissue-specific responses (Evans & Wheeler, 2000; Cristino et al., 2006; Barchuk et al., 2007).

The repetitive architecture of compound eye, with large number of ommatidia segregated the compound eyes from any other eye in the nature. The mechanism in which act to form the eye can be divided in three categories: those who establishes the ommatidial mosaic, those determine the architecture of ommatidia and those who determines the design and position of the eye. These mechanisms are the key to understand the adaptability of the compound eye (Nilsson e Kelber, 2007).

Crustaceans and insects have the same ommatidia (Harzsch *et al.* 2005). Between miriapodes and crabs the main differences are the bigger cells and varied number. Outside arthropodes compound eyes are rare. With more than 250 million years the trilobites are the first known animals to have compound eyes (Clarkson *et al.* 2006). Similar architecture can be seen in the chelicerate eye which could be considered derived of marine ancestrals (Harzsch *et al.* 2005).

Development of compound eye and optic lobe in *Apis mellifera*

To be a unique structure of paramount importance in the life of holometaboles insects the eye of bees has been studied in great detail relative to function of visual system (Autrum e Zühl 1964; Menzel e Mercer, 1987; Lehrer, 1994). The compound eye of a worker of *Apis mellifera* holds 5000 ommatidia (Ribi *et al.* 1989) covered by corneal cuticle. Each ommatidia is separated by pigment cells involved. The ommatidia taper and converge to the outer layer of optic lobe. The cornea surface is differentiated in hexagonal facets corresponding to the external terminal of the ommatidia. The surface is covered by bristles coming from the border of each facet (Snodgrass, 1956).

In vertical section the ommatidia lens is seen as a elongated prism. Below is the cone formed by four cells and envolved by pigment cells. A fascicle of eight cells proximal to the cone is the light sensitive part of the ommatidia in which together constitute the retina. In the retinula axis the rabdomere is formed by inner surface of retinal cells. Its terminals produce retinal axons that enter the basal membrane and extend to the optic lobe (Snodgrass, 1956; Varela e Porter, 1969; Eisen e Youssef, 1980).

Many studies has been focused on compound eye of workers due to great importance in the foraging while the eyes of drones has received less attention. The biggest difference in the size is a well known fact (Ribi *et al.*, 1989). A worker has between 4000 to 5000 ommatidia and a drone has between 7000 and 8000. Analysis revealed characteristic distribution of ommatidia with smaller diameter in the eye (Ribi *et al.*, 1989). Ommatidia with bigger diameter in the eyes of drones and, therefore, better spatial resolution, supposedly is related to focus the queen during the fly (Praagh *et al.*, 1980). Threfore arise the question of how this structural differences in the compound eye are established during post-embryonic development. Such processes are related with the sex-especific regulation that involve either genetic factors (related to deterination and differentiation of sex) as nutritional/endocrine (related with caste determination). Seen in this way, the processes that govern eye and optic lobe development are of great interest for developmental biology directed to elucidate the interaction on genetic control and environment

The compound eye development arise from a thickening of ectoderm that covers the optic lobes in the larva. According to Phillips (1905) in a three days old larva there is no differentiated cells that will form the eye. The primordium of cells that will form the eye remains undifferentiated until the third instar despite the possibility to see the primordium in the head. Throughout the distal eye primordium (L1 and L2) the ends form microvilly at the surface. During third and fourty instar start grouping in pre-ommatidia clusters. Those groups start from posterior to anterior. Reaching the end of larval life the clusters reorganize and differentiate in retinal and accessory cells (Eisen e Youssef, 1980). Similar processes has been seen in many others insects. Apparently hte formation of pre-ommatidia groups occurs through similar processes in holometabola (Meinertzhagen, 1993). Once the formation of groups occurs the pre-ommatidia cells undergoes a remarkable number of changes in a oriented fashion.

Although there is a reasonable description of these processes litle is know about molecular mechanisms of optic lobe and eye between castes and sex of *Apis mellifera*.

The roughest gene

The locus *roughest-irregular chiasm C* (*rst-irreC*) is a importante signaling component of the visual system. This gene codifies a protein needed for correct projection of axon bundle in the optic quiasma in the optic ganglia of *Drosophila melanogaster* and correct differentiation of retina (Boschert *et al*, 1990; Wolff e Ready, 1991; Ramos *et al*, 1993; Schneider *et al*, 1995; Reiter *et al*, 1996). The expression of this protein is essencial for the alignment of interommatidial cells that preceed the wave of mitotic cells (morphogenetic furrow). Mutants with lost of function for *rst-irreC* has almost total failure of programmed cell dead in removing surplus cells that disorganized the retina. Those surplus cells differentiate in pigmente cells giving the aspect of rough eye (Boschert *et al*, 1990; Ramos *et al.*, 1993; Reiter *et al*, 1996; Araújo *et al*, 2003).

The processes that drive compound eye development in insects have been broadly studied in *Drosophila melanogaster* in which they arise from imaginal discs. Little is known about optic lobe and retina development in other insects, most of which do not have imaginal eye discs attached to the nervous system. For this reason, a comparative analysis of eye development in the honey bee, *Apis mellifera*, not only contributes to evo-devo aspects comparing the major families of holometabolous insects, but also may elucidate questions about developmental plasticity because the compound eyes of the honeybee show strong sex and caste-specific differences.

Experimental procedures

Bees

Worker bee larvae were collected from the Experimental Apiary of Genetic Department, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP). In order to obtain controled oviposition, the queen of a colony was confined in an excluder cage during 12 hours so all eggs would have minimal difference in developmental time when collected.

Larvae from different post-embrionary phases (L₃ - PP₃), white, pink and brown-eye pupae) were removed from the comb using cirurgical clamps and placed in a petry dish. The comb were daily monitored in order to determine the precise moment of each instar and classified following methodology of Michelette & Soares (1993), Myser (1954), Nelson, (1924) and Winston (1987). As selection criteria for the spinning phase we observed the gut content from larvae with recently operculated cell. For the pre-pupae the segmentation of torax, head,

eye enlargement, apolise progression, gut and exuvial liquid were observed. The pupae were classified according to pigmentation of eye, tórax and abdômen.

Histological analysis

After classification of each phase the larvae and pupae had the cephalic capsule removed in saline Ringer and were quickly fixed in Bouin (picric acid saturated, formol 35% and acétic ácid polar in proportion of 15:5:1 respectively) for 4 hours at room temperature. To remove the fixative solution was used washes of 30 minutes each with PBS until all Bouin was removed. The dehydration was performed by ascending ethanolic series with two repeats in 100% ethanol. The cephalic capsule was diafanized in benzol/ethanol 1:1, 3 times in benzol p.a. for 15 minutes and 2 times in parafín (62°C) for 1 hour. Before inclusion the cephalic capsule was transfered to vacuum in melting parafín for 30 minutes. Serial cuts of 8µm was mounted in slides treated with albumin.

To remove the parafín the slides were first heated to 82°C for 20 minutes, 3 times in xilol followed by descending ethanolic series and stained with hematoxilin and eosin for 2 minutes each. The slides were quickly dehydrated followed by xilol/ethanol 1:1, xilol p.a. 3 times and monted with Entellan (Merck).

The slides were analysed in inverted microscope Axiovert 35 (Zeiss) and the pictures were obtained in microscope Olympus BX50 with câmera Nikon DX1200. The software used was ACT-1 (Nikon V 2.63).

RNA extraction of optic lobes, brain and retina

The extraction of RNA followed the protocol of TRIzol (Invitrogen) for small quantities. Differents quantities of optic lobes and brain were used depending on the phase of development (Tabel 1). For each phase were extracted RNA in triplicates for better representativeness.

The optic lobes and brain dissected in cold Ringer were quickly moved to 1,5 mL tubes with 500 µL TRIzol and stored at -70°C. After no more then a week, the samples at -70° were kept at room temperature for 5 min and mixed by aspiration with an esterile syringe. To the homogeneized was added 200µL of cloroform and the tubes were vigorously stired for 15 seconds and kept at room temperature for 3 minutes. The samples were centrifuged at 12000g for 15 seconds at 4°C and the upper phase was transfered to a fresh tube containing 400µL of

isopropanol with 5µg of glicogen. After 15 minutes at room temperature the samples were centrifuged (12000g at 4°C) for 15 minutes, the upper phase was removed and to the pellet was added 800µL of ethanol 75% (H₂O deionized treated with diethyl pyrocarbonate 0,1%) to washing. The sample were centrifuged to 7500g for 5 minutes at 4°C, the supernatant was removed and the pellet was dried with heating block at 55°C. Finally the pellet was resuspended with 20µL H₂O free of RNase.

To eliminate genomic DNA the samples were treated with DNase free of RNase (Promega) for 40 minutes at 37°C and then at 70°C for 15 minutes.

The RNA quantification was performed with NanoDrop spectrofotometer (ND – 1000) at 260/280nm.

cDNA first strand synthesis and PCR

The synthesis of the first strand was performed with reverse transcriptase SuperScript-II (Invitrogen). From a initial amount of 5µg of RNA Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) was added as starter following the manufacturer methodology.

Quantitative PCR (Real Time – PCR)

The cDNA profile from each development phase was used to amplify the *roughest* gene fragment. For better acuity was used the housekeeping genes RP49 and Actin to normalise the expression level. The primer efficiency of rp49, actin and *roughest* were tested by means of quantitative reaction of PCR using dilution 1:10 of cDNA and specific linear regression curves were build for each primer. With the slope value supplied by linear regression was calculated the primer efficiency with the formula: $E=10^{(-1/\text{slope})}$. The value obtained for actin was E=1.91; for rp49 E=1.98 and for primer Exon6 E=1.88.

The quantitative PCR analysis followed the reagent protocol *SYBR*[®] *Green* (Applied Biosystems). The end volume was 20µL with 10µL of “Master mix” *SYBR Green*, 0.8µL of each primer (Forward and Reverse), 7.4µL of deionized H₂O and 1µL of cDNA 1:10 diluted. For each developmental phase was performed three cDNA profiles (Biological treplica) and for each profile was performed three tecnical treplica. Both, housekeeping and *roughest*, had nine reactions for each developmental phase for better data acuity. The machine used was *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). The dissociation curve was analysed in

each reaction and the relative expression values of *roughest* were calculated according the C_T method (Pfaffl, 2001).

***In silico* analysis of *roughest* gene**

The coding sequence of Roughest protein from *Drosophila* was used to search through the *Apis mellifera* genome for structural definition of *Apis* roughest gene. The Honey Bee Genome v.4 was used to analyse the orthologue in *Apis*. The annotation of roughest gene, protein and amplified sequences was performed with aid of FlyBase (flybase.bio.indiana.edu), BLAST algorithm (*Basic Local Alignment Tool*, Altschul *et al.*, 1990) and Ártemis v.9 (sanger.ac.uk) (Rutherford *et al.*, 2000).

Annotation of roughest gene and primer building

The sequence of *Drosophila* Roughest protein (GenBank NP_525058.2) was used to identify a similar sequence (Group 2.35, GB 11991-PA) present in the databank of *Apis mellifera* v4.0 (hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee) performing BLASTP and TBLASTN algorithm (zulu.fmrp.usp.br/beelab). The CDS of *roughest* *Apis* gene was used to analyse by BLASTN against the non-redundant databank of NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) for identification of “Mutual Best Hits” and localization of possible conserved domains.

Detection of ORFs and mounting of exons was performed with Ártemis software v.9.0 using the genome nucleotide sequence of group 2.35 and *roughest* orthologue (GB 11991-RA). The consensus sequence GT-AG for splicing (Breathnach & Chambon, 1981) was considered when pairing the aminoácid sequence with the predicted protein. The exons sequences obtained were used to design specific primers.

The primers were designed using Primer3 software (fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm) and Gene Runner v.3.05 to amplify a fragment containing the downstream part of an exon with the upstream of the next exon to avoid contamination of genômico DNA (Table 2).

Normalization of cDNA profile

The single-strand cDNA profile was normalized by genes of constitutively expression” like citoplasmático actin (Official Gene Set B17861) and the ribossomal protein RP49 (GenBank

AF441189). For the actin the primers used were: ACT-Forward 5'- TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG - 3' & ACT-Reverse 5'- AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA - 3'. For the RP49 the primers were: : RP49 - Forward - 5' CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT - 3' & RP49 Reverse 5' - TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG - 3'. Both were used as normalizers of quantitative and semi-quantitative PCR and the melting temperature was 60°C.

Semi-quantitative PCR

To amplify the fragment outlined by the primers were performed PCRs from cDNA profiles of each developmental phase. The reaction followed the manufacturer instructions with 0.4pmol final of each primer, 1u of Taq (Fermentas) and 0.4pmol final of dNTP in each reaction tube. The thermal cycling program consisted of 5 minutes at 95°C followed by 30 cycles of 1 minute at 95°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C and a final extension step at 72°C for 10 min.

The amplification products were analysed by electrophoresis in 1% agarose gels, TBE buffer (Tris 89mM, Bórico acid 89mM, EDTA 2mM, pH 8.0) dyed with ethidium bromide (0.2µg/mL).

Cloning and partial sequencing of *roughest* gene of *Apis mellifera*

Quimio-competente cells

A stock culture of bacterian cells *E. Coli* (DH5α) was grown in a petri dish with LB medium for 12 hours at 37°C. A single colony was transferred to 50 mL of liquid LB medium and left for 4 hours at 37°C, 200 cycles/min. The cells were aseptically transferred to a falcon tube on ice for 10 min. The upperphase was discarded after centrifugation at 4000 rpm, 4°C for 10 min (Sorvall GS3). The pellet was resuspended in CaCl₂ 0.1M (autoclaved and filtered in 0.22µm filter). The cells were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, 4°C and resuspended in 2 mL of CaCl₂ 0.1M with 15% glicerol, aliquoted in Eppendorf tubes (250 µL) and stored at -80°C.

Transformation of competent cells

The amplified fragments using primers Exon6 of *roughest* gene were excised from agarose gel and the DNA purified with the kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE-Healthcare). The fragment was inserted in plasmid pGEM T-easy (Promega) following manufacturer instruction. With an aliquot of DH5 α cells was performed the transformation by shock termic following the procedure: 30 minutes on ice, 90 seconds at 42°C and quickly 2 minutes on ice. 500 μ L of LB medium was added and left at 37°C for 1 hour. After bacteria grow, the tube was quickly centrifuged at 4000 rpm for 1 min, the upperphase was discarded and 200 μ L was spread in a petry dish containing solid LB with ampicilin (USB, 100 μ g/mL), X-Gal (40 μ g/mL) and IPTG (96 μ g/mL). The petry dishes were maintained at 37°C for 12 hours or until visualization of White and blue colonies. One white cologne was picked and aseptically transferred to 5mL of liquid LB with ampicilin (100 μ g/mL) at 37°C for 12 hours under 200 cycles/min. The plasmidial extraction followed the manufacturer protocol (Kit GeneJet Plasmid Miniprep – Fermentas).

To verify the insertion presence in the plasmid a digestion was performed with *Eco*R1 restriction enzyme (8 μ L of plasmid for 2 hours at 37°C) and the product was analysed in 1% agarose gel dyed with ethidium bromide.

Sequencing

The plasmids with insert were submitted to PCR reaction using mix Big Dye (Cycle Sequencing Terminator Kit v3.1 – Applied Biosystems). The universal primers were M13 Forward (5'- CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3') and Reverse (5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'). The reaction followed the manufacturer conditions and the reaction program was: 5 min at 96°C, 24 times of 96°C (1 min) with 50°C (30 seconds) and 60°C (4 min) finishing on 4°C. The reaction was transferred to a fresh tube with 40 μ L of isopropanol 75%, mixed in vortex (15 seconds) and left in room temperature for 15 seconds. The reaction was centrifuged at 12000g for 20 min at room temperature. The upperphase was discarded and to the pellet was added 250 μ L of isopropanol 75%, mixed in vortex, and centrifuged at 12000g for 5 min. Again the upperphase was discarded and the tube was dried in heatblock at 55°C.

The DNA was resuspended in 12 μ L of “Template Suppression Reagent” (TSR) (ABI PRISM, Applied Biosystems), mixed in vortex for 15 seconds and transferred to sequencing

tubes. The solution underwent termic shock at 95°C for 2 min followed 2 min on ice. The reaction was applied in capilar sequencer ABI310 (Applied Biosystems). The results obtained were submitted to BLAST analysis against GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) and Official_Gene_Set (www.zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/beelab/bioinfo_blast).

Results

Development of optic lobes and eye

Because they have neuroepithelial origin we consider and define in our analysis the region that will originate the optic lobe as differentiation center (DC) and not imaginal disc as in *Drosophila*. The region that will originate the eye (retina) has ephitelial origin and here we defined as placoid.

Just at the beginning of the third instar a small disc-shaped optic lobe primordia starts developing. The DC is frontal-dorsaly located in the head of drones and workers and is the precursor of optic lobe (Fig. 1, A,B). Rounding the cephalic capsule the epidermis has thick aspect with enlargement in the future region of placoid. During the 4^o larval stage the placoid enlargement is more accentuated. The change from a ephitelial disc to a layered, flattened structure in the head occupying the periphery of the brain (Fig 1. D). However in drone seems that the DC steel in the same morphology as befor (Fig. 1 C). Together the flattening arise a new structure, the future lóbula, positionated between the brain and the differentiation center on workers. Therefore the lobula is the first structure to arise from the differentiation center. From this moment the lobula seems to differentiate “distinctly” from the rest of optic lobe. Between the “lóbula” and the DC is possible to see axons conecting both. The retinal morphogenetic field is apparent as a thickened placoid-like epithelium that can be distinguished from the surrounding epidermis. The same processe occurs in both: drones and workers (Fig.1 A-D). This process, in *Manduca*, is only seen during the feeding phase where massive cell proliferation also coincides whith wandering behavior (Monsma e Booker, 1996 a).

At the feeding stage (5^o instar), the DC underwent significative changes. Neuron precursors are active dividing to generate the globular aspect of the optic lobe primordium. Therewith is possible to see, as a hallmark of this stage, the distinguishment of the future Medulla and the future Lamina. The last one appears as an

outer upfolding of the optic lobe (Fig 2, A,B –C,D). However both will not be totally differentiated until the metamorphosis. The retinal placode remains unchanged.

After the end of feeding stage the larvae begin the cocoon spinning stage. The histological analysis shows the lamina is growing and still projecting over the Medulla. Neural tissue is forming at the downside of the future lamina coinciding (Fig.2 C,D).

Axonal projections are visible at the downside of the lamina for drones and workers. Apparently the axonal projections are connecting the epidermic placoid with the lamina. In the placoid retinal cells are taking place and seems to be forming the ommatides (Fig. 3, A,B). Interestingly the thickening of the placoid coincides with axonal projections, the formation of neural tissue inside the lamina. In *Manduca sexta* a similar pattern is also seen where the generation of cortex in the lamina is initiated with the arrival of retinal afferent nerves at the outer layer of optic lobes (Monsma e Booker, 1996 a).

At the end of the fifth instar the larvae reach the pré-pupal stage (Fig. 3 , C-F). This stage is characterized by deep morphological changes as enlargement of eyes and constriction of tórax and abdômen (Snodgrass, 1956; Michelette & Soares 1993). During this stage, that precedes the ecdysis, occur the apolysis of larval cutícula and the synthesis of pupal cuticle giving the epidermis a wrinkled appearance.

Through the pré-pupe stage cells division events in the developing visual system are primarily visible in the outer optic lobe (upfolding of the Lamina). Comparing to the previous stage the Lamina seems to be undergoing cortex enlargement. The lamina, probably, is undergoing intense growth and differentiation due to the arriving of afferent axon bundle from the retina (Fig. 3, C-F). Note the structure that will form the medulla has globular and bigger aspect when compared with others structures indicating to be the second to be formed in the optic lobe. It also seems to have an intrinsic relationship with the eye enlargement. Interesting the optic lobe development from the DC and also the retina from the placoid is the same for drones and workers despite the huge difference in size (see the bars on Fig. 3).

After separating from the cuticle in the apolysis process, the epidermis has a wrinkled appearance due to this intense cell proliferation. The ommatidia in the epidermis are visible and seems to be under differentiation (Fig. 3 A-F). After pupal molt (metamorphosis) formation of the retina and optic lobes are almost complete. The lamina reached the dorsal side of the head covering the medulla. A long distance is covered by the afferent nerves between the retina and the lamina in which seems to be the last structure to be formed in the optic lobe As the

pupal development proceeds a shortening of the afferent nerves happens. In opposite way the ommatidia elongates and become pigmented during its maturation process (Fig. 5 A and B). At the brown pupa stage intense pigmentation marks the retina (data not shown) in which practically does not undergo any change until eclosion.

Externally, at pupal stage, the bee reached the adult form having cuticle darkening and stiffening, followed by wings expansion (Truman, J.W., Riddiford, L.M. 1999). Nevertheless, inside still happening restructuration processes of musculature, gut tract and in essential organs for the adult life (Snodgrass, 1956). The figure 4 shows the final form of the Optic Lobe (older differentiation center) on adults of drone and workers after metamorphose with every structure already set in the first pupal stage (Fig. 4 A-B). In drones the retina forms a huge layer in which the axon bundle reaches the lamina that is at least 5 times bigger. Besides the size of drone is particularly bigger when comparing with workers the proportion of inner optic lobe is the same. However the lamina and retina is remarkably bigger. It seems that what makes bigger eyes in drones is closely related with the regulation of retina.

The roughest gene

In silico analysis of *roughest* orthologue in *Apis mellifera*

Beyond five conserved domains, the sequence of Roughest protein predicted in *A. Mellifera* (GB11991-PA) exhibited 65% of identity and 78% of similarity with the protein sequence of *Drosophila*. The domains are related with the superfamily of immunoglobulins designated as “IRM” (“irre recognition module”) in which include *kin of irre* (Strünkelnberg *et al*, 2001) of *Drosophila melanogaster*, Nephrin (Kestilä *et al*, 1998) and Kirrel2 (Sun *et al*, 2003) of mouse and human. It seems that such proteins interact in a homophilic and heterophilic fashion and are related with cell signaling and adhesion (Fig. 5).

The *roughest* gene of *Apis mellifera* is situated in the chromosome 2 (Group 2.35 Amel v. 4.0), has 11 exons and 10 introns, codify a CDS of 2,322 nucleotides and cover a 36,608 pb genomic region. The Artemis platform allowed identify consensus site of splicing (5'- GT - intron - AG - 3') (Breathnach and Chambon, 1981) in every exon-intron-exon junctions (Fig. 6).

The analysis with RPSBLAST algorithm found five conserved domains in the *roughest* gene. Domains one to four correspond to members of the super-family of immunoglobulins. The fifth domain is a cell adhesion molecule (CAM), frequently found in neural cell adhesion (N-CAM L1), Fasciclin II and the Hemolin protein. This family also include domains of extracellular ligands receptors of the growth factor of fibroblast II. All domains are present in the extracellular part of the protein with exception of Ig-CAM domain in wich is the transmembrane domain (Fig. 6).

By alignment analysis against SwissProt databank the transmembrane domain showed high similarity with the *Drosophila* Roughest and IRRE-like of rat, human and mouse ($E < 10^{-6}$). In *Apis* this domain has 96 aminoácids. Approximately 240 aminoácids constitute the intracellular domain, that is, 10 a.a. longer then *Drosophila* Roughest (Boschert *et al.* 1990). BLASTP analysis showed low similarity with *Drosophila* Roughest ($E = 0.35$) and was observed significant alignment only in a region of 22 a.a. long with similarity of 78%. Performing BLASTN analysis of the CDS *roughest* gene sequence against the *Apis* genome was observed alignment not only on the original genomic *scaffold* (Group 2.35) but also with a second genomic region (GroupUn. 1539). This group presents high similarity ($E = e^{-137}$). However, study performed with Artemis software showed that in the GroupUn.1539 the *roughest* gene is not totally represented. We considered the second gene might be result of a duplication where the five first exons were lost which would shortening the extracellular region, in case of expressed.

RT-PCR analysis of *roughest* gene

The *roughest* gene was, initially, noted on Artemis v.9 software for identification and mouting of exons. The information of the sequence of each exon alowed the design os primers for analysis of gene expression during larval and pupal development of workers. The primers were designed in non-conserved regions to avoid aneling and amplification of others genes e.g. IgG superfamily. In the initial analysis was used cDNA from third instar (L3) until White-eye pupe (Pw) and Brow-eye pupe (PB). In the amplification reactions the primer “Exon6” was used and confirmed the presence of a fragment of 130pb in every stages (Fig. 7). In the Pb stage and possibly PP1 was detected a second band of 500pb (round).

To validate the fragments amplified by Exon6 primer the bands were excized from gel and inserted in plasmides (Fig. 8). The plasmides were cloned and used in a PCR for sequencing with the mix Big Dye Terminator.

The obtained sequences were submitted to analysis by the BLAST algorithm against the databank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) and Official_Gene_Set (http://www.zulu.fmrp.usp.br/beelab/beelab/beelab/bioinfo_blast). The similarity of the 130pb fragment was superior to 99% for the gene GB11991-RA in the reactions forward and reverse confirming the correct amplification of *roughest* gene. The 500pb fragment found in the Brown-eye pupa (Pb) (red circle Fig. 7) was also sequenced and analysed at the same databank. Comparison of the forward and reverse sequences of the 500pb fragment with the strands forward and reverse of the 130pb (BLAST2seq) showed similarity only in the primer region. In the Official Gene Set was verified that the sequence of 500 pb has complete alignment with the GB 14295-RA (Group 1.18 – Fig 11) of *Apis mellifera* (E = 0.0). The sequence of GB 14295-RA was extracted and analysed by BLASTN against GenBank and was verified alignment with the gene CG32019-RC of *Drosophila*, a protein with no molecular function known (flybase.bio.indiana.edu/)

qRT-PCR analyse of *roughest* gene

To verify the levels of mRNA during the post-embrionary development qRT-PCR analyses were carried out using cDNA from optic lobes and brain. For this purpose the efficiency of the primer was tested in different dilutions (1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, and 1:10000) with a pool of cDNA following procedure of Pfaffl (2001) and Livak & Schmittgen (2001). The primers for actin has correlation coefficient $R = 0.99$ and Slope -3.553 indicating efficiency of 1.912. The rp49 the R value is 0.98 the Slope was -3.3636 and efficiency is 1.98. For the primer Exon6 $R = 0.99$, Slope = -3.6305 and efficiency is 1.885.

The quantification started with the third larval instar until the fifth. The actin and the rp49 were used as housekeeping genes for normalization of C_T from *roughest* gene. The arithmetic average of housekeeping genes was subtracted of C_T from the gene in study in order to obtain the ΔC_T . For normalization we used the expression of the third instar of workers. as calibrator for the relative expression $\Delta\Delta C_T$. The differences in

expression level are calculated following methodology of Livak & Schmittgen (2001) with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ values.

Two peaks of accentuated relative expression of *roughest* during the post-embryonic development were noted. The first peak in workers happens in L5F2 and the other in L5S1 – L5S2. In the feeding phase of workers the relative expression was about 400 times bigger than the average of all stages. In L5S1 and L5S2 the relative expression was about 180 and 240 times bigger, respectively. During L3 and L4 the expression was lower than the average. In advanced stages the expression of *roughest* kept on basal levels until pre-pupa 3. In Drones the pattern is very distinct. It has also a peak of expression during the feeding phase but many times lower when comparing with workers. The second peak in drones starts late in development (S3) showing different regulation and probably related with the number of cells in retina and lamina.

Discussion

Development of Optic Lobe

The visual system of an adult insect is composed by retina (the proper eye) containing photoreceptors cells and the optic lobes consisting three ganglia: lamina, medulla and lobula. Initially the outer optic primordia is composed by neuroblasts (NBs), precursors of neurons that will form the ganglia (Meinertzhagen, 1993). The early photoreceptors cell will generate afferent axons that extend until the optic lobe. In this way the development of optic lobe ganglia (lamina, medulla and lobula) must be highly coordinated with the retina.

In *Manduca sexta* the outer optic primordia is the precursor of lamina and medulla. The analogue in *Apis mellifera* is the differentiation center (DC) visible on 3rd larval stage (Fig. 3, A2). Probably formed by neuroepidermic tissue the DC has few cells undergoing mitosis (Fig 3, A1). The lobula in *Manduca* is formed by neuroblast differentiation, however from a second structure, the inner optic anlage (Monsma & Booker, 1996 a; Meinertzhagen, 1993). The lobula primordium in *Apis* arises from the differentiation center at fourth instar. During larval development this structure has not significant change. It is possible to see at the end of fifth instar that the lobula in globular aspect is similar in the adult. After metamorphosis the lobula is finally positioned adjacent to the brain.

During the fourth instar there is a lateral positioning of the differentiation center, but it is seen only in workers. The same is not true for drone where the DC remains as before. At the same phase start a thickening of epiderme (placoid on Apis) just in the region near of the DC. Also during this period a new structure starts to develop from posterior to anterior covering the DC. It was seen in *Drosophila* after the morphogenetic furrow axons from retinal clusters positive regulates the outgrowing of lamina. It appears that the same process happens in Apis (Varela, 1970). He described three types of axons influencing this process: (i) short laminar axons arrive on top of lamina; (ii) long laminar axons arriving on the inferior part of lamina and; (iii) long axons that reach the medulla (Varela, 1970; Ribi, 1979). Except for the last those axons form the first optic chiasm in the same way in *Drosophila* (Meinertzhagen, 1993). The lamina differentiation begins at the fifth instar at the same time of the first peak of *roughest* expression correlating the developing of lamina with the *Roughest* function in Apis. Besides the magnitude the peak happens at the same time for both sexes. Emerging axon bundle arrive to the lamina and trigger the end of neuroblast division and beginning of cellular differentiation. Those neuron that underwent differentiation form the lamina. Huang e Kunes (1996) showed that the hedgehog protein is expressed in the fotoreceptors, cleaved and transported through the axons acting as inductive signal for lamina maturation. During the spinning phase the lamina reach intermediate step of development with appearance of cortex which increase during the next 48 hours. During this cortex thickening happens also the second peak of *roughest* expression. Interestingly in drones there is a delay of about 24 hours on the second peak of expression. It is known the participation of *roughest* in axon addressing and we can infer his participation on cortex formation and maybe in drones the delay could be related in a wider window for neuroblast multiplication and maturation on the outer part of medulla. Varela and Ribi (1979) also correlated the lamina maturation with the axon arriving. Studies of immuno-hybridization of *Roughest* in *Drosophila* showed intense signal on eye disc and outer optic anlage the same location in the lamina of Apis (Ramos *et al.*, 1993). Similar studies in *Manduca sexta* showed that incoming axons on the outer optic anlage triggers controlled mitotic division on precursors cells accompanied by programmed cellular death on medulla e lamina (Monsma & Booker, 1996 ab;). It is clear to see the participation of *roughest* on the lamina development and retina differentiation. Those results show the high similarity of development on these three insects.

The lamina development will accomplish just after metamorphosis. But during the pre-pupa the medulla and lobula are seen as almost full differentiated. It seems that between pre-pupa

and white eyed pupae those ganglions underwent small rearrangement. From the differentiation center the first optic ganglion to form is the lobula followed by medula. The lamina is the third to form and finish its development just after metamorphosis. It is remarkable the size difference in the lamina between drones and workers. In *Manduca* those events are correlated with the increase of ecdysteroids which follows the adult development. The end of medula and lamina genesis is marked by ceasing of mitotic activity at the end of pupae in *Manduca*. In *Apis* during the pre-pupae it is possible to see a layer of mitotic cells and few in the DC.

Retina development

The retina form a regular lattice of high organized cells grouped in ommatidial units (Ready et al., 1976). The visual system of a adult insect comprises in the retina (the eye) with photoreceptor cells, the optic lobes with the three optic ganglions: lamina, medula and lobula

Different from *Drosophila* the *Manduca sexta* eyes arise from a tiny group of epidermic cells in the cephalic capsule from the last larval instar which show a morphology typical of differentiation center (Monsma e Booker, 1996; Champlin and Truman, 1998b; MacWhinnie et al., 2005). During the feeding phase e beginning of wandering was observed a massive increase of mitotic cells. By the third instar in *Apis* the epiderm adjacent of DC presents as a layer without obvious differentiation. About 24 hours later the epithelia layer start to thicken forming the placode from which the eye arises. In worker of *Apis mellifera* such thickening remains during the spinning phase where it is possible to see the axonal bundle from it. The full development of the placode is achieved by the end of pre-pupae where the metamorphosis happens. Eisen & Youssef (1980) showed that the pre-cluster of ommatides starts to differentiate at the third and fourth larval instar. At the beginning of fifth instar the clusters start to form. The full ommatide is seen only at pre-pupae in *Apis*. The axons of the nine retinal cells emerge e extend up to the lamina (Eisen & Youssef 1980). Also during the fifth instar occurs the first peak of expression of *roughest* and later the axons from the retina reach the outer part of medula triggering the development of lamina.

Molecular aspects of visual system development – the Roughest protein.

The visual system of insects is a attractive model to understand development processes specially the pattern formation. It is known that many factors and mechanisms governing such processes are shared with vertebrates like regulatory proteins (Eyeless/Pax-6, sine oculis/Six3), components of signal transduction (Notch/Delta) and molecular adhesion

proteins (irreC-rst/Dm-GRASP). This is a strong evidence, in molecular terms, of basic plans of construction of wide spread structure in the animal kingdom (Gaul & Cutforth, 1997).

In *Drosophila*, the precursors cells of the optic lobe form a placode at the posterior part of the head in the embryonic ectoderm. This placoid invaginates and eventually merge with the embryonic brain (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). Part of the control of this processes is accomplished by molecules like Wingless (Wg) and Decapentaplegic that act on the regulation and proliferation of the optic lobe precursors and differentiation (Gaul & Cutforth, 1997). If Wg and Dpp are removed the lamina and medulla fail to develop (Meinertzhagen, 1993; Gaul & Cutforth, 1997).

During the last larval instar in *Drosophila* the eye structures start to differentiate. In the eye disc the sequence of ommatidial formation starts in the posterior head after sweep of morphogenetic furrow. The photoreceptors in differentiation in the furrow secrete Hedgehog (Hh) which, probably, triggers the differentiation on the anterior cells perpetuating the furrow (Gaul & Cutforth, 1997).

For the correct establishment of neuronal connectivity and, therefore, the correct development of optic lobe the protein *Roughest* is a key. Also known as irregular chiasm-C or irre-C it is directly linked with axonal guidance. According to Ramos (1993) in *Drosophila* the product of *irre-C-rst* is required at least in three independent places: in the retina and in cell populations that determine the first and the second optic chiasma. The predicted orthologue in *Apis* has 78% of similarity and has the five immunoglobulin domains important in this protein. In *Apis* this protein is 10 residues bigger in the intra-cellular domain. The expression of this protein is essential to the correct alignment of interommatidial cells that precedes apoptosis early in the pupal phase. Loss of function of *irre-C-rst* leads to total failure of programmed cell death to remove surplus cells in the retina causing the aspect of rough eye (Wolff & Ready, 1991; Araújo *et al*, 2003). In *Apis* treatment of the juvenile hormone analogue, piriproxifen during pre-pupa caused changes in the pattern of eye formation. According to Boleli *et al* (2001) the treatment just before metamorphosis weakened the process of pigmentation and caused structural disorder. In the posterior and anterior part of eye (non pigmented band) the treatment caused rough aspect. The facets of ommatide could not be recognized leading to degeneration.

Through the comparison with hormonal titration it is seen that the expression of *roughest* in *Apis* occurs in moment of low concentration of ecdysteroids and juvenile hormone. Differently, in *Drosophila* was observed increase of *roughest* transcripts about 25% and 32%

in pupae (Octacílio-Silva S, 2008) just after beginning of ecdysis (Sliter *et al.* 1987). Both species the expression occurs in low titers of juvenile hormone. It is possible that the effects of hormone application could be linked with the breakdown of *roughest* expression causing surplus cells.

Conclusions

The development of optic lobe: lamina, medulla and lobula for both: drone and worker happens at the same time besides the remarkable size difference. During development the DC undergoes many different changes and the medulla is the first to arise. The incoming axons from the retina trigger the outer layer of medulla to differentiate in lamina accompanied by the first peak of *roughest* expression. In Drone the second peak happens 24 hours later showing different regulation in time probably related with sex-specific differentiation. After metamorphosis the lamina and retina is proportionally bigger in drones. The proportion in the size of medulla and lobula related with the head size is the same for drone and worker.

References

- Allee, P. J., Pelletier C. L., Fergusson E. K., Champlin D. T. (2006). Early events in adult eye development of the moth, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 52: 450-460.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Araújo, H., Machado, L. C. H., Octacílio-Silva, S., Mizutani, M., Silva, M. J. F., Ramos, R. G. P. (2003). Requirement of the *roughest* gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of *Drosophila* compound eye development. *Mech. Dev.* 120: 537-547.
- Autrum, H., Zwehl, V. V. (1964). Die spektrale Empfindlichkeit einzelner Sehzellen des Bienenauges. *Z. vergl. Physiol.* 48 :357-384.
- Barchuk, A. R., Cristino, A. S., Kucharski, R., Costa, L. F., Simões, Z. L. P., Maleszka, R. (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.* 7:70, doi:10.1186/1471-213X-7-70.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., Omholt, S. W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419-429.
- Boleli, I. C., Bitondi, M. M. G., Figueiredo, V. L. C., Simões, Z. L. P. (2001). Mispatterning in the ommatidia of *Apis mellifera* pupae treated with a juvenile hormone analogue. *J. Morphol.* 249: 89-99.
- Boschert, U., Ramos, R. G. P., Tix, S., Technau, G., Fischbach, K. F. (1990). Genetic and developmental analysis of *irreC*, a genetic function required for optic chiasm formation in *Drosophila*. *J. Neurogenet* 6: 153-171.
- Bownes, M., Rembold .H. (1987). The titre of juvenile hormone during the pupal and adult stages of the cycle of *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* 164:709-712.
- Breathnach, R., Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *AnnU. Rev. Biochem.* 50: 349-383.
- Campos-Ortega, J. A., Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2a edição, Springer, Berlin.
- Champlin, D. T., Truman, J. W. (1998a). Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development* 125: 269-277.
- Champlin, D. T., Truman, J. W. (1998b). Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of *Manduca sexta*. *Development* 125: 2009-2018.
- Clarkson, E., Levi-Setti, R., Horvarth, G. (2006). The eyes of trilobites: the oldest preserved visual system. *Arthropod. Struct.Dev.* 35: 247-259.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., Leopold, P. (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310: 667-670.
- Cristino, A. S., Nunes, F. M. F., Lobo, C. H., Bitondi, M. M. G., Simões, Z. L. P., Costa, L. F., Lattorff, H. M. G., Moritz, R. F. A., Evans, J. D., Hartfelder, K. (2006) Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Mol. Biol.* 15: 703-714.
- Eisen, J., Youssef, N. N. (1980). Fine structural aspects of the developing compound eye of the honey bee, *Apis mellifera* L. *J. Ultrastruct. Res.* 71: 79-94.
- Evans, J. D., Wheeler, D. E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology* 2.1, 6 pages, [http:// genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1](http://genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1).
- Friedrich M. (2003). Evolution of insect eye development: first insights from fruit fly, grasshopper and flour beetle. *Integr. Comp. Biol.* 43: 58-521.
- Friedrich M. (2006). Ancient mechanisms of visual sense organ development based on comparison of the gene networks controlling larval eye, ocellus and compound eye specification in *Drososiphila*. *Arth. Struct. and Develop.* 35:357-378.
- Gaul U., Cutforth T. (1997). The genetics of visual system development in *Drosophila*: specification, connectivity and asymmetry. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 48-54.

- Hafen, E., Dickson, B., Brunner, D., Raabe, T. (1994). Genetic dissection of signal transduction mediated by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Progr. Neurobiol.* 42: 287-92
- Hartfelder, K., Engels, W. (1998). Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Topics Dev. Biol.* 40: 45-77.
- Hartfelder, K., Steinbrück, G. (1997). Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invert. Reprod. Dev.* 31: 237-250.
- Harzsch S., Müller C. H. G., Wolf H., (2005). From variable to constant cell number: cellular characteristics of the arthropod nervous system argue against a sister-group relationship of Chelicerata and “Myriapoda” but favor the Mandibulata concept. *Dev. Genes Evol.* 215: 53-68.
- Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949.
- Horridge, G.A. (1965). Arthropoda: Receptors for light, and optic lobes. In Theodore H. B., Horridge A.: Structure and function in the nervous system of invertebrates, vol II. San Francisco: Freeman W.H. 1063-1113.
- Hsiung, F., Moses, K. (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1207-1214.
- Huang, Z., Kunes, S. (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* 86: 411-422.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Maennikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holberg, C., Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephritic syndrome. *Mol. Cell* 1: 575-582.
- Lehrer, M. (1994). Spatial vision in the honeybee: the use of different cues in different tasks. *Vision Res.* 34: 2363-2385.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Machado, R. C., Pereira, R. N. R., Costa, M. S. A., Ramos, R. G. P. (2002). “In vivo” toxicity of a truncated version of the *Drosophila* Rst-IrreC protein is dependent on the presence of a glutamine-rich region in its intracellular domain. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 74: 285-295.
- MacWhinnie, S. G. B., Allee, J. P., Nelson, C. A., Riddiford, L. M., Truman, J. W., Champlin, D. T. (2005). The role of nutrition in creation of the eye imaginal disc and initiation of metamorphosis in *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 285: 285-297.
- Meinertzhagen, I. A., Hanson, T. E. (1993). The development of the optic lobe. In Bate, M., Arias, A. M. (eds) *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 1363-1493.
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* 8: 53-62.
- Menzel, R., Mercer, A. (1987). *Neurobiology and Behavior of Honeybees*. Springer, Berlin.
- Michelette, E. R. F., Soares, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages of Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24: 431-440.
- Mirth, C., Truman, J. W., Riddiford, L. M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: 1-12.
- Monsma S. A., Booker R. (1996 a). Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. I. Patterns of proliferation and cell death. *J. Comp. Neurobiol.* 367: 10-20.
- Monsma S. A., Booker, R. (1996 b). Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth, *Manduca sexta*. II. Effects of deafferentation and developmental hormone manipulation. *J. Comp. Neurol.* 367: 21-35.
- Myser, W. C. (1954). The larval and pupal development of the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus. *Ann. Entom. Soc. Am.* 47: 683-711.

- Nelson, J. A. (1924). Morphology of the honeybee larva. J. Agric Res. 12: 1167-1214.
- Nilsson, D.-E. (1994). Eyes as optical alarm systems in fan worms and ark clams. Phil. Trans. R. Soc London - Ser B 346: 195-212.
- Nilsson, D.-E., Kelber, A. (2007). A functional analysis of compound eye evolution. Arthropod Struct. Dev. 36: 373-385.
- Nowikoff, M. (1931). Das Modell des Rhabdoms von Komplexaugen. Biol. Zentralbl. 51: 325-329.
- Octacílio-Silva, S. (2008). Estudo da regulação transcricional de Rst nas etapas finais do desenvolvimento do olho composto de *Drosophila melanogaster*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Paulus, H. F. (2000). Phylogeny of the Myriapoda-Crustacea-Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. J. Zool. Syst. Evol. Res. 38: 189-208.
- Pfaffl W.M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nuc. Ac. Res. 29: 2002-2009.
- Phillips, E.F. (1905). Structure of the compound eye of the honey bee. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 57: 123-157
- Praagh, J. P. V., Ribi, W. A., Wehrhahn, C., Wittmann, D. (1980). Drone bees fixate the queen with the dorsal frontal part of their compound eyes. J. Comp. Physiol. A 136: 263-266.
- Rachinsky, A., Hartfelder, K. (1998). *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: Comparison of six media. In Vitro Cell Dev. Biol. - Animal 34: 646-648.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis - hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. Gen. Comp. Endocr. 79:31-38.
- Ramos, R. G. P., Igloi, G. L., Bauman, U., Maier, D., Lichte, B., Schneider, T., Brandstatt, J. H., Frohlich, A., Fischbach, K.-F. (1993). The *irregular chiasm C roughest* locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death encodes a novel immunoglobulin-like protein. Gen. Dev. 7: 2533-2547.
- Ready, D. F., Hanson, T. E., Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. Dev. Biol. 53: 217-240.
- Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z., Fischbach, K. F. (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: The role of IrreC-rst protein. Development 122: 1931-1940.
- Rembold H. (1976). The role of the determinator in caste formation in the honeybee. Em Lüscher M. (ed.) Phase and Caste Determination in Insects. Pergamon, Oxford, p. 21-34.
- Ribi, W. A. (1979). The first optic ganglion of the bee. III. Regional comparison of the morphology of photoreceptor-cell axons. Cell Tissue Res. 200: 345-357.
- Ribi, W.A., Engels, E., Engels, W. (1989). Sex and caste specific eye structures in stingless bees and honey bees (Hymenoptera: Trigonidae, Apidae). Entom. Gener. 14: 233-242.
- Schmidt Capella, I.C., Hartfelder, K. (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. J. Insect Physiol. 44: 385-391.
- Schmidt Capella, I. C., Hartfelder, K. (2002). Juvenile-hormone-dependent interaction of actin and spectrin is crucial for polymorphic differentiation of the larval honey bee ovary. Cell Tissue Res. 307: 265-272
- Schneider, T., Reiter, C., Lichte, B., Nie, Z., Eule, E., Bader, B., Schimansky, T., Ramos, R.G.P., Fischbach, K.-F. (1995). Neural recognition in the optic lobe of *Drosophila*: restricted expression of the cell adhesion molecule IrreC-rst is required for normal axonal projections of columnar neurons. Neuron 15: 259-271.
- Sliter, T. J., Sedlak, F. C., Baker, F.C. Schooley, D. A. (1987). Juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*: Identification and titer determination during development. Insect Biochem. 17: 161-165.
- Snodgrass, R. E (1956). *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publ. Assoc., Ithaca and London.
- Stenkamp, D. L., Cameron, D. (2002). Cellular pattern formation in the retina: retinal regeneration as a model system. Rev. Mol. Vision 8: 280-93.

- Strübelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., Couet, H. G., Ramos, R. G. P., Fischbach, K. F. (2001). *Rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128: 4229-4239.
- Sun, C., Kilburn, D., Lukashin, A., Crowell, T., Gardner, H., Brundiers, R., Diefenbach, B., Carulli, J. P. (2003). *Kirrel2*, a novel immunoglobulin superfamily gene expressed primarily in cells of the pancreatic islets. *Genomics* 82:130-142.
- Treisman, J. E., Heberlein, U. (1998). Eye development in *Drosophila*: formation of the eye field and control of differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39:119-58
- Truman, J. W., Riddiford, L. M. (1999). The origin of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447-452.
- Varela, F. G., Porter, K. R. (1969). Fine structure of the visual system of the honeybee (*Apis mellifera*). I. The retina. *J. Ultrastruct. Res.* 29: 236-259.
- Varela F. G. (1970). Fine structure of the visual system of the honey bee (*Apis mellifera*). II. The lamina. *J. Ultrastruct. Res.* 31: 178-194.
- Vitt, H. H., Hartfelder, K. (1998). Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Morphol. Embryol.* 27: 351-354.
- Warren, J. T., Gilbert, L. I. (1986). Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 16: 65-82.
- West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford Univ. Press, New York.
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wolff, T. Ready, D. F. (1991). Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113: 825-839.
- Wolff, T. Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. *Em Bate M., Arias A. M., The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1277-1327.
- Zdarek J. Haragsim O. (1974). Action of juvenoids on metamorphosis of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Phys.* 20: 209-221.

Table 1. Quantities of optic lobes/brain and retina(OL) used in each phase of development on workers and drones.

Phase	# OL	Phase	# OL
L3	30	LS3	16
L4	30	PP1	15
LF1	23	PP2	15
LF2	20	PP3	15
LF3	20	White Pupe (Pw)	4
LS1	18	Brown Pupe (Pb)	4
LS2	16		

Table 2. Especific primers for the *roughest* gene

Primer	Sequence 5' - 3'	T.m.
Exon 6	F - 5' - ACG AGG ATT CGG AGC GAC AGG - 3'	62°C
	R - 5' - GGT GCC CGG ATG TAG ATG TTC G - 3'	62°C
Exon 5 - 6	F - 5' - AGT TCA GGC ACC AGC CGA TCT C - 3'	61°C
	R - 5' - CCT GTC GCT CCG AAT CCT CG - 3'	61°C
Exon 8 - 9	F - 5' - GCA TCA AAC AGC CAC GAC CGA G	63°C
	R - 5' - CGC CTT CAC GTC CGA CAG ATT G	63°C

Figure 1: Eye and optic lobe development at third and fourth larval instar. A) Third larval instar of Drone. **B)** Third larval instar of Worker. **C)** -Fourth larval instar of Drone and **D)** Fourth larval instar of Worker. Parafin section stained with hematoxylin and eosin. bar 100µm

Figure 2: Eye and optic lobe development at feeding phase. A) Feeding phase 2(L5F2) of Drone. B) Feeding phase 2 (L5F2) of Worker. C) (L5F3) of Drone and D) (L5F3) Worker. Parafin section stained with hematoxylin and eosin. bar 100μm.

Figure 3: Optic Lobe and eye of Drone and Worker at Spinning aphase and Pre-pupe. A) Spinning of Drone B) Spinning phase of Worker. C) Pre-pupe 1 of Drone (PP1) D) Pre-pupe 1 of Worker E) Pre-pupe 3 of Drone. F) Pre-pupe 3 of Worker. Parafin section stained with hematoxilin and eosin. bar 100µm.

Figure 4: Optic Lobe and eye of Drone and Worker A) Drone at white-eye pupa – transversal section . B) Worker at White-eye pupa – transversal section. C) Adult Drone in transversal section. D) Adult Worker in transversal section. bar 100µm.

A)

MTNVSPLASTVRPITTTTEVVYQ**RFAIEPMDQTAVIGSRVTLPCRVL**DQKGPIQWTKDDFGLGA
VRNLTGYERYAMIGSDEEGDFSLHIYPVELEDDGTYQCQASPTNDGQPALRSRFAKLSVLVPPQ
 KPKILQGDFLITTEDRELVEICVSVAGKPPAEITWIDGLGNVLHRGIKTTKELFDDGPLYTVKSV
 LRVMPRKDHDNTTFTCQSQNAADRT**PQNAKL**RVEVRYAPKVSLRIRSGLG**KNGRIVEGSELRF**
KCRAEANPPNVEYRWFINEKKVIGDYT**TEMIH**NATRD**LHDAIVKCEV**HNDVGKSEDTETLDI
 TYG**PQFRHQ**PISVETQY**GATEILQCDVDGNPTPEIRWYHEDSERQVASTPNISVVVN**HETAGRY
FCKAHVPGFQELMGYANIYIRAPPSIVSQRVQYVPDEGAVKVKCTAISVPKADSVVWSFAGREF
 NLSTNNTQFSVQEEYTVERVVSTVTLLPTSTYFGDYNCTVTNSFGTDSV**IIKLT**AHTLIPVDLQ
 LILIIGGLVVCVILIGV**IIIL**LCRDRIKQPRPRTAQ**TQETDMQETDSNADRYRES**DRSSNLSDVK
 ADIRAGSSVSNAESVTALDSEGE**GSTRGVNALALAGPVPNPLGYRYSADYTEPSFPPKNNDGSN**
 NNGYVPYVDYTRDYMPTTQGVGASRESLSRIPSGGILASKKIGLSSANLGGSTPQTTPAIDPRF
 SATYGNPYLRMSAAEQLRHAPHTAVPGVTPAPPY**TQAMRMNSLNTLNGAGPQVSTMPANV**
 CQIPRF

B)

Figure 5: Roughest in *Apis mellifera* with 774 residue predicted. The conserved immunoglobulin-domains are show in yellow, orange, green and blue. Brown-transmembrane domain and red N-terminal. B) Conserved immunoglobulin domains (RPS-blast).

Figure 6: *roughest* in *Apis mellifera* (GB11991). Bars showing primer site amplifications.

Figure 7: Agarose gel stained with ethidium bromete . Touchdown pcr with 5 cycles at 68°C (annealing), 5 cycles at 66°C, 10 cycles at 64°C and 20 cycles at 62°C with primers exon 6.

Figure 8: Agarose gel stained with ethidium bromete. Plasmidio with *roughest* region showing fragments with 130pb and 500pb in replicates. Above the 3Kb vectors.

Figure 9: Relative quantification of the *roughest* expression during development of drone and worker. Abscissa axis show the phases from third instar to pre-pupe. Samples were collected and analysed by RT-qPCR using SYBR Green (Fermentas). The relative expression was calculated by the equation $E=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001). Ct values were normalized with transcripts of ribosomal protein RP49 and actin as housekeeping genes. Standard error above the curves.

Figura 10: Hormonal titers (ecdisteride and juvenile hormone) during post-embryonic development of *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. Bars indicate the temporal relation with *roughest* transcripts. Titrers in *Drosophila* Sliter *et al.* (1987) and Bownes e Rembold (1987). Titrers in *Apis* Hartfelder e Engels (1998).

RNAi-mediated silencing of *vitellogenin* gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers

David Santos Marco Antonio ·
Karina Rosa Guidugli-Lazzarini ·
Adriana Mendes do Nascimento ·
Zilá Luz Paulino Simões · Klaus Hartfelder

Received: 28 November 2007 / Revised: 15 May 2008 / Accepted: 20 May 2008 / Published online: 11 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The switch from within-hive activities to foraging behavior is a major transition in the life cycle of a honeybee (*Apis mellifera*) worker. A prominent regulatory role in this switch has long been attributed to juvenile hormone (JH), but recent evidence also points to the yolk precursor protein vitellogenin as a major player in behavioral development. In the present study, we injected *vitellogenin* double-stranded RNA (dsVg) into newly emerged worker bees of Africanized genetic origin and introduced them together with controls into observation hives to record flight behavior. RNA interference-mediated silencing of *vitellogenin* gene function shifted the onset of long-duration flights (>10 min) to earlier in life (by 3–4 days) when

compared with sham and untreated control bees. In fact, dsVg bees were observed conducting such flights extremely precociously, when only 3 days old. Short-duration flights (<10 min), which bees usually perform for orientation and cleaning, were not affected. Additionally, we found that the JH titer in dsVg bees collected after 7 days was not significantly different from the controls. The finding that depletion of the vitellogenin titer can drive young bees to become extremely precocious foragers could imply that vitellogenin is the primary switch signal. At this young age, downregulation of *vitellogenin* gene activity apparently had little effect on the JH titer. As this unexpected finding stands in contrast with previous results on the vitellogenin/JH interaction at a later age, when bees normally become foragers, we propose a three-step sequence in the constellation of physiological parameters underlying behavioral development.

David Santos Marco Antonio and Karina Rosa Guidugli-Lazzarini contributed equally to the present study.

D. S. Marco Antonio
Departamento de Genética,
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo,
Ribeirão Preto, Brazil

K. R. Guidugli-Lazzarini · A. M. do Nascimento · Z. L. P. Simões
Departamento de Biologia,
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo,
Ribeirão Preto, Brazil

K. Hartfelder (✉)
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes
Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo,
Avenida Bandeirantes 3900,
14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil
e-mail: klaus@fmrp.usp.br

Keywords Behavioral development · *Apis mellifera* · Juvenile hormone · Vitellogenin · RNAi

Introduction

The transition from within-hive activities to foraging represents a major step in the life cycle of a honeybee worker and is accompanied by a suite of behavioral and physiological changes (Rösch 1925; Lindauer 1952; Free 1961). Although this transition typically becomes fully expressed when a worker bee is about 3 weeks old (Winston 1987), it is not strictly related to age (Robinson 1992). In temperate climates, for example, bees reared in autumn may forego for several months this transition from

intranidal activities to foraging and form a worker population that survives until the following spring. Furthermore, drastic changes in the age demography of a honeybee colony, such as the loss of a large portion of the forager or the hive bee population can either advance this transition or cause a reversal in the ontogeny of tasks performed by a bee (Rösch 1930; Robinson and Huang 1998).

This behavioral plasticity requires the presence of globally acting regulators capable of integrating the entire suite of behavioral–physiological changes. The first regulator shown to fulfill such a role was juvenile hormone (JH), which, when applied to newly emerged adult bees, induced them to forage at an earlier age (Jaycox 1976). The role of JH in the transition from a hive bee to becoming a forager and its relation to age has subsequently been dissected by analyses of JH biosynthesis dynamics and JH titer changes in natural colonies, in hives with an experimentally altered age demography (Huang and Robinson 1996), and also in allatectomized bees (Sullivan et al. 2003), all suggesting that JH plays a pacemaker role in behavioral development.

The close interaction of JH with a second major pacemaker component, the yolk protein precursor vitellogenin, was first postulated on theoretical grounds and fitted into a mathematical model termed the “double repressor hypothesis,” which proposed that vitellogenin and JH could mutually repress each other (Amdam and Omholt 2003). After the honeybee *vitellogenin* gene was cloned and sequenced (Piulachs et al. 2003), this hypothesis could be tested using RNA interference (RNAi)-mediated silencing of vitellogenin gene function (Amdam et al. 2003). And as predicted by the model, injection of *vitellogenin* double-stranded RNA (dsRNA) resulted in a stable increase in the JH titer in honeybees independent of their geographic origin and social setting (Guidugli et al. 2005).

An intrinsic and desirable property of such double repressor circuitries is that, at a critical concentration of either component, the system quickly shifts to a new state, which, in the case of the honeybee worker, makes possible a rapid hive bee-to-forager transition and subsequent fixation in the new behavioral task. As the high vitellogenin titer found in nurse bees should repress the increase of the JH titer, behavioral development would then essentially become contingent on the level of vitellogenin in the hemolymph. This apparent evolutionary co-option of a female-specific reproductive protein into the role of a systemic regulator of behavior and aging has expanded its functions into that of a pleiotropically acting major life cycle regulator in honeybees (Amdam and Page 2007). The role of vitellogenin in redirecting the behavior of a bee has recently been evidenced by Nelson et al. (2007) who showed that injection of *vitellogenin* dsRNA accelerates the transition of a hive bee to become a forager and, concomitantly, decreases its lifespan.

In the present study, we specifically investigated the effect of vitellogenin depletion on JH titer and the onset of foraging. We focused on young hive bees because previous data suggested that critical decisions for the determination of a bee's life history may be taken during the first few days of adult life (Jassim et al. 2000; Amdam et al. 2007; Nelson et al. 2007). Being the first direct correlative analysis between vitellogenin-dependent behavioral change and endogenous hormone levels, it was designed to reveal the coupling strength of the vitellogenin/JH circuitry in these young bees.

Materials and methods

Silencing of vitellogenin expression, behavioral analysis, and sampling of bees

Double-stranded honeybee vitellogenin RNA was prepared as previously described (Amdam et al. 2003) following the protocol of the Promega RiboMax™ T7 system (Promega). After phenol-chloroform extraction and heat treatment, the dsRNA was diluted with nuclease-free water to a final concentration of 5 µg/µl for injection.

Bees emerging from a donor-colony frame within a 12-h period were randomly assigned to one of three treatments. In the experimental group, newly emerged workers were injected intra-abdominally with 1 µl *vitellogenin* dsRNA (dsVg group, $N=230$ in four experiments). The second group (sham group, $N=140$ in four experiments) received a 1-µl injection of nuclease-free water to control for handling effects, which is an established protocol for vg RNAi experiments (Amdam et al. 2003; Guidugli et al. 2005). The third group of bees was left untreated (control group, $N=125$ in four experiments). Bees showing signs of hemolymph leakage after withdrawal of the injection needle were discarded. All bees were tagged with numbered Opalith plates (Graze, Germany), reserving a different color for each of the three groups.

These groups of focal bees were then introduced together (common garden setup) into an observation hive consisting of 1,000–2,000 worker bees of all age classes and an egg-laying queen. The observation hive was located in a darkened observation facility, and the bees had access to the outside via an inspection ramp. The ramp contained a section that could be closed when a marked bee departed for or returned from a flight, so that its individual number could be registered. Observations were made daily for 2 h (10:30–11:30 and 13:30–14:30) during seven to ten consecutive days. During these observations, we registered the behavior of tagged bees both inside the flight ramp and on the comb. At days 10 (experiments 1–3) or 7 (experiment 4), the observation hive was opened, and all tagged bees were sampled. Hemolymph retrieved by

capillary suction from a lateral incision in the bee's abdomen was used for protein electrophoresis and for JH quantification by radioimmunoassay. Subsequently, the intestine was removed, and the abdomen was used for RNA extraction.

The four repetitions of the experiment were all performed in the winter/spring season in São Paulo State, Brazil, which offers ideal warm and dry weather conditions for honeybee flight studies. In each experiment, we introduced a total of 100–120 bees, with a predominance of dsVg bees over the controls to compensate for the higher initial mortality rates of dsVg bees observed in preliminary trials.

Validation of knockdown phenotype by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and reverse transcriptase polymerase chain reaction

Protein analyses were performed using samples of 1 μ l hemolymph that were run on sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gels (7.5% gel), subsequently stained with Coomassie Brilliant Blue. Gels were scanned (Kodak EDAS 290) for quantification of the vitellogenin and apolipoprotein-I bands (Kodak 1D program, version 3.6.2). Apolipoprotein-I, which is expressed at constant levels throughout the adult life cycle, was used as protein loading control for normalization of vitellogenin levels in the 1- μ l hemolymph samples (Guidugli et al. 2005).

RNA was extracted from abdominal carcasses kept in Trizol reagent (Invitrogen). After treatment with RNase-free DNase (Promega), 1.5 μ g RNA were reverse transcribed using an oligo(dT)_{12–18} primer (Invitrogen) in a standard protocol for SuperScript II (Invitrogen). These first-strand complementary DNA samples were then subjected to quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) using primers specific for honeybee *vitellogenin* (AJ517411; vgF: 5'-GCAGAATA CATGGACGGTGT-3', vgR: 5'-GAACAGTCTTCG GAAGCTTG-3'). As endogenous control, we used a constitutively expressed β -actin gene of *A. mellifera* (AB023025; actF: 5'-TGCCAA CACTGTCCTTTCTG-3', actR: 5'-AGAATTGACCCAC CAATCCA-3'). Amplifications were carried out in a real-time PCR system (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) using SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems) at the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Relative copy numbers were calculated by the comparative C_T method (Pfaffl 2001; Applied Biosystems, User bulletin 2). Each sample was analyzed in triplicate.

Juvenile hormone titer analysis

For JH extraction, we followed an established protocol for honeybee hemolymph (Huang et al. 1994). Briefly, 1 ml

NaCl (0.9%) and 1 ml hexane were added to each sample (1–2 μ l hemolymph in 500 μ l acetonitrile). After vigorous mixing and phase separation by centrifugation (1,000 $\times$ g) the hexane phase was removed, and the extraction was repeated twice. The pooled hexane phases were dried, and the residue was redissolved in 50 μ l toluene. After transfer to 1 ml glass vials, the solvent was again removed by vacuum centrifugation before adding the radioimmunoassay (RIA) components.

A JH-specific antiserum generated in rabbit was diluted to 1:1,250 in phosphate buffer supplemented with bovine serum albumin (0.1%) and rabbit immunoglobulin G (0.1%). The assays were performed with [³H(N)]-juvenile hormone III (spec. activity 19.4 Ci/mmol, NEN Life Science Products), diluted in the phosphate buffer to 6,000–6,500 cpm per 50 μ l. Racemic juvenile hormone III (Fluka) was used as non-radioactive ligand. The RIA procedure followed the protocol established by (Goodman et al. 1990). Standard curves were set up to cover a 50-pg to 10-ng range and transformed into a linear log/logit regression model for calculation of the JH content of unknown samples (expressed as JH-III equivalents in pg/ μ l hemolymph).

Data analysis

Vitellogenin and JH titers were analyzed by non-parametric analysis of variance (ANOVA; Kruskal–Wallis test). Dunn's post hoc tests were performed for comparisons between groups. The results on number of flights, age at onset of potential foraging flights, and on duration of flights were analyzed by two-way ANOVA (treatment and age). In all cases, the adequacy of ANOVA assumptions was verified by Bartlett's tests.

Results

Validation of RNAi-mediated vitellogenin depletion

As an expected result of the vitellogenin dsRNA injection, *vitellogenin* transcript levels (Fig. 1a) were significantly lower than those of the control groups (Kruskal–Wallis, $H_{2,24}=13.10$, $P=0.0014$; Dunns multiple comparisons: control vs. sham $F_{1,14}=3.29$, $P>0.05$; control vs. dsVg, $F_{1,17}=11.93$, $P<0.01$; sham vs. dsVg $F_{1,17}=8.64$, $P<0.05$). This reduction in *vitellogenin* gene function resulted in a concordant reduction in vitellogenin protein. In most of the control and the sham group samples, vitellogenin bands were clearly visible, and their densitometric values (Fig. 1b) were significantly higher than those of the dsRNA-injected group (Kruskal–Wallis, $H_{2,89}=21.22$, $P<0.0001$; Dunns multiple comparisons: control vs. sham, $F_{1,53}=8.49$, $P>0.05$; control

Fig. 1 Vitellogenin transcript (a) and vitellogenin protein (b) levels in 7- to 10-day-old honeybee workers. Newly emerged workers were individually marked and intra-abdominally injected with 1 μ l (5 μ g/ μ l) *vitellogenin* dsRNA (dsVg), whereas controls were injected with 1 μ l nuclease-free water (sham) or were left untreated (control). These bees were introduced into observation hives and were sampled after 7

(experiment 4) or 10 days (experiments 1–3). Represented are mean values and their standard errors, sample size and the results of statistical analyses (Kruskal–Wallis, Dunn’s multiple comparisons, see text; different letters indicate significant differences between groups, $P < 0.05$)

vs. dsVg, $F_{1,66}=28.53$, $P < 0.001$; sham vs. dsVg, $F_{1,59}=20.03$, $P < 0.05$). In terms of mean values, the dsVg group showed an approximately 50% reduction compared to the untreated controls and a 30% reduction compared to the sham group in this major hemolymph protein.

Effect of vitellogenin knockdown on onset, number, and duration of flights

Observations on flight activity were initiated 1 day after release of the focal bees and were conducted during two 1-h periods per day. In the subsequent analyses, we separated the observed flights into two groups. Flights that lasted less than 10 min were considered as orientation or cleaning flights, whereas flights lasting more than 10 min were considered as potential foraging events. Foraging flights are generally longer than 5 min (Winston and Katz 1982), and this flight duration criterium has been used in previous studies (Giray et al. 1999). Other studies were more stringent and took repeated flights of 15 min as an indication of foraging activity (Sullivan et al. 2000). The 10-min flight criterium that we adopted here is an intermediate one, accounting for the fact that we had our focus on young bees.

The observed flight events were first analyzed separately for the four experiments. In all four experiments, the bees that had received an injection of *vitellogenin* double-stranded RNA (dsVg group) initiated flights earlier in life, generally followed by the water-injected bees (sham group) and then the untreated tagged bees (control group). It was only in one experiment (experiment 3) that the control bees and the dsVg bees overlapped in their flight activity curves. As, however, there was no statistical difference for each treatment across the four experiments (Kruskal–Wallis controls, $H_{3,40}=3.23$, $P=0.36$; sham, $H_{3,52}=0.49$, $P=0.92$; dsVg, $H_{3,65}=1.16$, $P=0.76$), we pooled the data to increase the power of statistical analyses. Figure 2a shows the

cumulative number of flights during the observation period, summing up all flights, independent of whether they were of short (<10 min) or long duration (>10 min) and also whether a bee performed more than one flight. In contrast, Fig. 2b shows the onset of long-duration flights for individual bees, and consequently, in this latter graph, each marked bee is represented only once; that is, it shows the age when she was first seen performing a flight of at least 10-min duration.

The dsVg bees differed from the sham and the control groups in both attributes, and in particular, they were seen to perform potential foraging flights already 2 days after they were introduced into the observation hives. In the sham and the control group, only very few bees showed an early onset of potential foraging flight activity, and this occurred only 4–5 days after the first long-duration flight event was registered for the vitellogenin knockdown group (Fig. 2b). The onset of long-duration flight activity for bees of the vitellogenin-depleted group differed significantly from the controls (two-way ANOVA: treatment, $F_{2,46}=6.39$, $P=0.0107$; days, $F_{7,46}=10.38$, $P=0.001$); LSD tests: dsVg vs. control, $t_{7,29}=5.45$, $P=0.0005$; dsVg vs. sham, $t_{7,39}=5.22$, $P=0.0038$; sham vs. control, $t_{7,26}=1.47$, $P=0.092$).

A similar picture emerged when we plotted all flights registered during the observation periods in the four experiments according to their respective duration (Fig. 2c). This graph shows that most flights were of short duration, lasting less than 10 min, and that all three groups were almost equally represented in this class of flights. As already evident from Fig. 2b, longer flights were only performed by dsVg bees during the first 5 days. Especially for flights that lasted 30 min and more, the predominance of dsVg bees during the entire observation period is noteworthy (12 flights vs. four for sham and two for control bees). These results corroborate those of a recently published study (Nelson et al. 2007), demonstrating in an independent

Fig. 2 Daily records of all flights, onset of long-duration flights, and duration of individually registered flights performed by focal bees kept in observation hives. **a** Cumulative numbers of flights representing all flight events registered over seven to 10 consecutive days during daily two 1-h observation periods show a slightly earlier onset of flight activity for the *vitellogenin* dsRNA-injected bees (dsVg, 47 bees total), compared to the sham-injected (43 bees) and the untreated control group (34 bees). **b** Day at which the first potential

foraging flight (flight duration, >10 min) was performed by an individual bee. For this parameter, the difference between the dsVg group (22 bees total) and controls (16 bees for sham and nine bees for untreated control) is more pronounced. **c** Plotting age vs. duration of flights performed by the three groups of focal bees in the four experiments further illustrates the earlier onset of long-term flight activity in vitellogenin-depleted bees

setup that depletion of hemolymph vitellogenin levels has a dramatic effect on a worker bee's life history, effectively turning it into an extremely precocious forager.

Effect of vitellogenin knockdown on the juvenile hormone titer

From the set of focal bees bled at termination of the last two experiments, we selected a total of 63 hemolymph samples for radioimmunoassay analyses of their JH titers. These samples were selected based on prior SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) analyses of the vitellogenin titer to make sure that the dsVg bees were authentic knockdowns. The results of the JH analyses (Fig. 3) were surprising because they did not reveal significant differences between the three groups (Kruskal–Wallis, $H_{2,66}=5.22$, $P=0.073$). A closer look at individual bees, however, showed a possible break point in the distribution of JH titer values for the dsVg bees and also for the sham group. In both of these groups, we found a considerable number of bees (eight out of 30 in dsVg and seven out of 20 in sham) presenting titers above 200 pg/μl hemolymph, whereas in the control group, only one hemolymph sample (out of 16) reached this level. This threshold level is not arbitrary but has already appeared in a previous study as a separator for dsVg bees from the control and sham bees in a vitellogenin RNAi experiment with caged workers (Guidugli et al. 2005).

Discussion

Our results confirm recently published data of an independent study (Nelson et al. 2007), revealing a very pronounced effect of vitellogenin depletion on a worker bee's propensity to initiate foraging flights. Some of the vitellogenin dsRNA-injected bees initiated long-duration flights approximately 4 days before the earliest flights were

Fig. 3 Hemolymph juvenile hormone titer of 7-day-old worker honeybees (experiment 4). Bees injected at emergence with *vitellogenin* dsRNA (dsVg), with nuclease-free water (sham), or untreated bees (control) were kept in an observation hive and were all sampled at the end of the experiment. Values shown are for individual bees; the horizontal bars representing group mean values. There were no statistical differences for the treatment, but especially the dsVg bees appear to fall into two distinct groups, bees above and below a 200-pg JH/μl threshold

observed in the control groups, and they did so possibly as soon as their flight machinery was sufficiently matured (Fielding et al. 1980; Harrison and Fewell 2002; Roberts and Elekonich 2005; Schippers et al. 2006). As foraging loads of pollen or nectar were not collected, we cannot affirm that these early long-duration flights were actually foraging flights, but the fact that several bees were seen to perform more than one long-duration flight during the same or on consecutive days suggests that these bees were actually visiting flowers (Sullivan et al. 2000). For comparison with other studies, it is important to note that we do not report in this study mean values for the onset of flight in populations of focal bees, but rather, we terminated the experiment after seven (experiment 4) or 10 days (experiments 1–3), that is, well before all bees could have initiated foraging. This end point was chosen because we were primarily interested in the early effects on behavior and physiology resulting from the depletion of vitellogenin.

The young age at onset of flight activity observed in our study is extraordinary, even for African genotype bees. It is commonly accepted that, on the one hand, African or Africanized worker bees initiate foraging earlier than European honeybees (Winston and Katz 1982) and, on the other, that an altered age demography in a colony can lead to precocious foraging (Huang and Robinson 1996; Jassim et al. 2000). But neither of such genotype nor environment effects have ever been reported to drive a worker into foraging activity as early as observed here in vitellogenin-depleted Africanized honeybees.

Even though in general terms our results confirm those obtained by Nelson et al. (2007), the onset of flight in our set of Africanized bees was earlier, in both the experimental and the control groups. Furthermore, the separation between the experimental group and the controls for the parameter onset of flight activity was wider in our study than in their study performed on honeybees kept in Davis, CA, USA. This difference may be attributed to a genotype effect evidencing a stronger penetration of African alleles in the Brazilian bee population, when compared to bee genotypes in the South of the USA, where the Africanization process has only recently begun (Whitfield et al. 2006). Other reasons for this stronger separation between the experimental and control groups could lie in the experimental design and subsequent statistical analysis. While Nelson et al. (2007) performed their study with two colonies and observed the bees and their survival for 40 days, which permitted a cumulative hazard data analysis, we ran four trials and interrupted them at 7–10 days because we were interested in vitellogenin RNAi effects on young bees. This required data analysis by two-way ANOVA. It is also important to emphasize environmental conditions; we performed our study under weather conditions that permitted unrestricted daily flight activity.

It may seem quite surprising that we did not see a stronger response in the JH titer in the dsVg group, as such a connection was clearly evident in a previous study performed on caged worker bees (Guidugli et al. 2005). It is, however, important to note that, among the marked bees assayed for their Vg and JH titers at the end of this current experiment, there were only a few ones for which we had obtained flight records. Especially the most active bees, the early fliers, could not be retrieved, and we assume that they had already died before the end point of the experiment. This could imply that the bees selected for JH analysis, based on their previously determined vitellogenin titer, were mainly from a group that behaviorally responded to a lesser extent to vitellogenin depletion than the population average. A closer look at the distribution pattern of individual JH titers, as shown in Fig. 3, indeed revealed that only few of the dsVg bees actually had JH titers above the 200 pg/μl threshold, which we typically saw in caged dsVg bees (Guidugli et al. 2005).

It is actually this unpredicted result—a strong down-regulation of vitellogenin after dsVg injection that is not firmly coupled to an upregulation of the JH titer in all of these bees—that raises the interesting question of coupling strength between these two major regulators of division of labor in worker honeybees, especially in young bees. The study by Jassim et al. (2000) had already shown that, in single-cohort colonies, up to 50% of the focal bees started to forage once they were 7–13 days old and that this was accompanied but not preceded by an increase in their hemolymph JH titer.

The emerging picture is that vitellogenin may figure as the initial factor that determines the onset of foraging, while JH would come in secondarily to definitively lock a worker's behavior and physiology into the forager state. This proposed sequence of physiological events underlying the transition from hive bee to forager explains earlier, apparently problematic findings on the association between JH and the onset of foraging. First of all, the doses of JH or JH analogs required to turn worker bees into precocious foragers are extremely high (applications of 250 μg JH-III or methoprene: Jaycox 1976; Robinson 1985, 1987; Sullivan et al. 2000) when compared with the dose of pyriproxyfen required to suppress the vitellogenin titer (Pinto et al. 2000) or to JH-III doses required for queen induction in late larval instars (Rembold et al. 1974; Copijn et al. 1979). Even though considering that pyriproxyfen is a biologically more active JH analog than methoprene (Cusson et al. 1994; Wyatt et al. 1995), these differences in dose are quite striking. Second, advances in the hive bee-to-forager transition induced by such hormone treatments were only apparent at a relatively late age, that is, bees never became foragers within the first few days of adult life. Third, a high JH titer is apparently not always required for continued foraging, as shown by JH titer analyses of

bees foraging in early spring or late fall (Huang and Robinson 1995). Unfortunately, vitellogenin titers have not been measured in these bees.

From the current results, we now propose a three-step model for behavioral development in honeybee workers. In the first step, which coincides with the maturation phase of young honeybee workers, the gradual increase of the vitellogenin titer would be required to prevent these bees from initiating foraging flights. The JH titer level should not be critical because small JH and ecdysteroid peaks were observed during this phase (Jassim et al. 2000; Hartfelder et al. 2002), and these probably promote maturation of the newly emerged bees, especially of their flight machinery (Fielding et al. 1980; Harrison and Fewell 2002; Roberts and Elekonich 2005; Schippers et al. 2006). The second phase would then cover the hive bee stage. The duration of this stage is highly plastic and appears to be primarily contingent on the repression of JH synthesis by an elevated vitellogenin titer, as predicted in the double repressor model for honeybee life cycle regulation (Amdam and Omholt 2003). When this balance is tipped by downregulation of vitellogenin synthesis (Guidugli et al. 2005), a gradual increase in the JH titer then accompanies the hive bee-to-forager transition (Fahrbach and Robinson 1996; Huang and Robinson 1996; Robinson and Huang 1998). The repression of vitellogenin synthesis by an elevated JH titer (Pinto et al. 2000) would subsequently guarantee that workers become firmly (but not irreversibly) locked into the forager state.

Logically reasoning, a second point that will have to be addressed experimentally is whether maintaining higher-than-normal vitellogenin levels would delay the onset of foraging in bees. While it is not yet feasible to analyze behavioral development in transgenic bees overexpressing *vitellogenin*, it is possible to interfere with genes involved in JH synthesis or metabolism and to see how this may affect the vitellogenin titer and behavior. One such study, where a JH esterase encoding gene was functionally silenced by RNAi, showed that the JH titer was increased, as expected, but that this only had a minor effect on the vitellogenin titer (Makert et al. 2008). Furthermore, while there is firm evidence for genotype influence on rates of behavioral development (Giray et al. 1999; Elekonich et al. 2003), it has also become clear that the absolute level of the vitellogenin titer is less critical for determining the age at first foraging than its rates of change during the first 15 days of adult life (Amdam et al. 2007). This latter study was designed to investigate coupling strength between vitellogenin and JH titers and used two strains of bees selected for differences in pollen hoarding behavior. Five-day-old bees of the strong pollen hoarding phenotype had not only a higher vitellogenin titer than those of the low pollen hoarding strain but also experienced a stronger modulation in the hemolymph titer of this protein in the

subsequent days, showed an earlier onset of foraging, and had a tendency to a decreased life span. Worker bees of the high strain also showed a higher propensity to activate their ovaries under queenless condition (Amdam et al. 2006) and exhibited a more pronounced response in the JH titer to a reduction in *vitellogenin* gene function (Amdam et al. 2007). Obviously, this suite of traits constitutes a complex syndrome within which vitellogenin and JH are important players, and what appears to be really critical is their genotypic coupling strength.

The determinants of this coupling strength are still unknown yet can become accessible via quantitative trait locus analysis of complex behavioral traits followed by identification of candidate genes on the background of the honeybee genome sequence (Hunt et al. 2007). Once such determinants come to light, it should be possible to investigate whether and how the coupling strength between vitellogenin and JH may change during the life cycle of a worker bee, as proposed above in the three-step sequence for the interaction between these two factors. It is especially in young bees (1–5 days of age) where much of the relationship between JH and vitellogenin is still unclear in terms of coupling strength of the double repressor hypothesis (Amdam and Omholt 2003). It is during this maturation phase that the vitellogenin titer increases in both queens and workers (Engels 1974). It is also the phase when the JH titer increases in queens, coinciding with the onset of mating flights (Robinson et al. 1991), and when it goes through a small peak in workers (Jassim et al. 2000), coincident with a small ecdysteroid peak (Hartfelder et al. 2002).

Currently, our understanding of signaling through vitellogenin is still limited because this protein has only recently been upgraded from a downstream factor in female reproductive physiology to a major life cycle regulator in the highly eusocial honeybees (Amdam and Omholt 2003; Amdam et al. 2006). In this context, the detection of vitellogenin expression in fat body cells surrounding the brain is of interest (Corona et al. 2007). However, whether this represents a feasible pathway for vitellogenin signaling to the neuroendocrine axis still needs corroboration from localization studies of vitellogenin receptor.

New links among vitellogenin, JH, longevity, and behavioral development are currently emerging from studies on insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS) related to longevity in queens (Corona et al. 2007) and division of labor in honeybees (Ament et al. 2008). The expression patterns observed for an insulin-like peptide (*AmILP-1*) and for two genes encoding insulin receptors (*AmInR-1* and *AmInR-2*) in brains and abdomens of honeybee workers indicate that the evolution of social behavior in corbiculate bees involved not only rewiring in the vitellogenin/JH circuitry but also the appearance of atypical IIS responses (Ament et al. 2008), when compared

to solitary insects (Tatar et al. 2003; Flatt et al. 2005). In view of our results on apparent change in coupling strength between vitellogenin and JH, which is possibly mediated by an atypical IIS signature, we fully ascribe to the conclusion of Ament et al. (2008): ‘that interactions among insulin signaling, nutrition, JH, Vg, and the environment are more complicated than had previously been imagined.’ The factor constellation during the maturation phase early in adult life, which emerged as of interest during this study, should definitely receive more attention in future more direct investigations, as it may be during this phase where much of the life history characteristics of a worker bee become established.

Acknowledgment We thank Walter Goodman (University of Wisconsin, Madison) for kindly providing the JH-specific antiserum and Gro V. Amdam (Arizona State University, Tempe, and Agricultural University of Norway, Aas) for her comments on a previous version of this manuscript. We acknowledge financial support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2004/10836-0 and 2005/03926-5). The experiments performed in the present study comply with the current laws of Brazil.

References

- Amdam GV, Omholt SW (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J Theor Biol* 223:451–464
- Amdam GV, Page RE (2007) The making of a social insect: developmental architectures of social design. *BioEssays* 29:334–343
- Amdam GV, Simoes ZLP, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol* 3:1–8
- Amdam GV, Csondes A, Fondrk MK, Page RE (2006) Complex social behaviour derived from maternal reproductive traits. *Nature* 439:76–78
- Amdam GV, Nilsen K-A, Norberg K, Fondrk MK, Hartfelder K (2007) Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. *Am Nat* 170:37–46
- Ament SA, Corona M, Pollock HS, Robinson GE (2008) Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4226–4231
- Copijn GM, Beetsma J, Wirtz P (1979) Queen differentiation and mortality after application of different juvenile hormone analogues to worker larvae of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Proc Kon Ned Akad Wetensch* 82C: 295–302
- Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7128–7133
- Cusson M, Yu CG, Carruthers K, Wyatt GR, Tobe SD, McNeill JN (1994) Regulation of vitellogenin production in armyworm moths, *Pseudaletia unipunctata*. *J Insect Physiol* 40:129–136
- Elekonich MM, Jez K, Ross AJ, Robinson GE (2003) Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 49:359–366
- Engels W (1974) Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *Am Zool* 14:1229–1237
- Fahrbach SE, Robinson GE (1996) Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Dev Neurosci* 18:102–114
- Fielding K, Hepburn HR, Chandler HD (1980) On the development of flight competence in worker honeybees. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 654:129–133
- Flatt T, Tu MP, Tatar M (2005) Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bio Essays* 27:999–1010
- Free JB (1961) Hypopharyngeal gland development and division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Proc R Entomol Soc Lond A* 36:5–8
- Giray T, Huang ZY, Guzman-Novoa E, Robinson GE (1999) Physiological correlates of genetic variation for rate of behavioral development in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behav Ecol Sociobiol* 47:17–28
- Goodman WG, Coy DC, Baker FC, Xu L, Toong YC (1990) Development and application of a radioimmunoassay for the juvenile hormones. *Insect Biochem* 20:357–364
- Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simoes ZLP, Hartfelder K (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett* 579:4961–4965
- Harrison JF, Fewell JH (2002) Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 133:323–333
- Hartfelder K, Bitondi MMG, Santana WC, Simões ZLP (2002) Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochem Mol Biol* 32: 211–216
- Huang ZY, Robinson GE (1995) Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. *J Comp Physiol B Sens Neural Behav Physiol* 165:18–28
- Huang ZY, Robinson GE (1996) Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav Ecol Sociobiol* 39: 147–158
- Huang ZY, Robinson GE, Borst DW (1994) Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 174:731–739
- Hunt GJ, Amdam GV, Schlipalius D, Emore C, Sardesai N, Williams CE, Rueppell O, Guzmán-Novoa E, Arechavaleta-Velasco M, Chandra S, Fondrk MK, Beye M, Page RE (2007) Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. *Naturwissenschaften* 94:247–267
- Jassim O, Huang ZY, Robinson GE (2000) Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *J Insect Physiol* 46: 243–249
- Jaycox ER (1976) Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera*) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenoptera: Apidae). *J Kans Entomol Soc* 49:165–170
- Lindauer M (1952) Ein Beitrag zur Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z Vergl Physiol* 34:299–345
- Makert A, Nascimento AM, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP (2008) Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L.—expression analysis and functional assays. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150:33–44
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol* 5:e62
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45

- Pinto LZ, Bitondi MMG, Simoes ZLP (2000) Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J Insect Physiol* 46:153–160
- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simoes ZLP, Belles X (2003) The vitellogenin gene of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol* 33:459–465
- Rembold H, Czoppelt C, Rao PJ (1974) Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honey bee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 20:1193–1202
- Roberts SP, Elekonich MM (2005) Muscle biochemistry and the ontogeny of flight capacity during behavioral development in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 208:4193–4198
- Robinson GE (1985) The effect of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *J Insect Physiol* 31:277–282
- Robinson GE (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav Ecol Sociobiol* 20:329–338
- Robinson GE (1992) Regulation of division of labor in social insects. *Annu Rev Entomol* 37:637–665
- Robinson GE, Huang ZY (1998) Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. *Apidologie* 29:159–170
- Robinson GE, Strambi C, Strambi A, Feldlaufer MF (1991) Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid hemolymph titers in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 37:929–935
- Rösch GA (1925) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat, I. Teil: Die Tätigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. *Z Vergl Physiol* 2:571–631
- Rösch GA (1930) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat, II. Teil: Die Tätigkeiten der Arbeitsbienen unter experimentell veränderten Bedingungen. *Z Vergl Physiol* 12:1–71
- Schippers MP, Dukas R, Smith RW, Wang J, Smolen K, McClelland GB (2006) Lifetime performance in foraging honeybees: behaviour and physiology. *J Exp Biol* 209:3828–3836
- Sullivan JP, Jassim O, Fahrbach SE, Robinson GE (2000) Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Horm Behav* 37:1–14
- Sullivan JP, Fahrbach SE, Harrison JF, Capaldi EA, Fewell JH, Robinson GE (2003) Juvenile hormone and division of labor in honey bee colonies: effects of allatectomy on flight behavior and metabolism. *J Exp Biol* 206:2287–2296
- Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299:1346–1351
- Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver DB, Tsutsui ND (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314:642–645
- Winston ML (1987) The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Winston ML, Katz SJ (1982) Foraging differences between cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. *Behav Ecol Sociobiol* 10:125–129
- Wyatt GR, Braun RP, Zang J (1995) Priming effect in gene activation by juvenile hormone in locust fat body. *Arch Insect Biochem Physiol* 32:633–640

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Suppression subtractive hybridization analysis reveals expression of conserved and novel genes in male accessory glands of the ant *Leptothorax gredleri*

Angelika Oppelt^{1*†}, Fernanda C Humann^{2†}, Marion Fuessl¹, Sergio V Azevedo³, David S Marco Antonio³, Jürgen Heinze¹, Klaus Hartfelder²

Abstract

Background: During mating, insect males eject accessory gland proteins (Acps) into the female genital tract. These substances are known to affect female post-mating behavior and physiology. In addition, they may harm the female, e.g., in reducing its lifespan. This is interpreted as a consequence of sexual antagonistic co-evolution. Whereas sexual conflict abounds in non-social species, the peculiar life history of social insects (ants, bees, wasps) with lifelong pair-bonding and no re-mating aligns the reproductive interests of the sexes. Harming the female during mating would negatively affect male fitness and sexual antagonism is therefore not expected. Indeed, mating appears to increase female longevity in at least one ant species. Acps are presumed to play a role in this phenomenon, but the underlying mechanisms are unknown. In this study, we investigated genes, which are preferentially expressed in male accessory glands of the ant *Leptothorax gredleri*, to determine which proteins might be transferred in the seminal fluid.

Results: By a suppression subtractive hybridization protocol we obtained 20 unique sequences (USs). Twelve had mutual best matches with genes predicted for *Apis mellifera* and *Nasonia vitripennis*. Functional information (Gene Ontology) was available only for seven of these, including intracellular signaling, energy-dependent transport and metabolic enzyme activities. The remaining eight USs did not match sequences from other species. Six genes were further analyzed by quantitative RT-PCR in three life cycle stages of male ants. A gene with carboxy-lyase activity and one of unpredicted function were significantly overexpressed in accessory glands of sexually mature males.

Conclusions: Our study is the first one to investigate differential gene expression in ants in a context related to mating. Our findings indicate that male accessory glands of *L. gredleri* express a series of genes that are unique to this species, possibly representing novel genes, in addition to conserved ones for which functions can be predicted. Identifying differentially expressed genes might help to better understand molecular mechanisms involved in reproductive processes in eusocial Hymenoptera. While the novel genes could account for rapidly evolving ones driven by intra-sexual conflict between males, conserved genes imply that rather beneficial traits might get fixed by a process described as inter-sexual cooperation between males and females.

* Correspondence: angelika.oppelt@biologie.uni-regensburg.de

† Contributed equally

¹Biologie I, Universität Regensburg, Universitätsstr. 31, D-93040 Regensburg, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Substances produced by the male accessory glands (MAGs) of insects and transferred into the female genital tract during mating are known to reduce pathogen transmission, to form mating plugs or spermatophores, and to be important in sperm competition. In addition, they trigger fundamental changes in female physiology, behavior, and reproduction [1-4]. The major biologically active components of MAG secretions are carbohydrates, lipids, and in particular accessory gland proteins (Acps) [1].

In *Drosophila melanogaster*, more than 100 Acps have been identified [5]. They play roles in the regulation of female receptivity [6-9], defense against bacteria [10], the activation of the female immune system [11,12], the efficiency of sperm storage [13,14], and the stimulation of ovulation and egg maturation [6,8,9]. They are also decisive for the fertilization of eggs, as shown in experiments in which the activity of sperm of infertile mutant males lacking MAGs could be restored by subsequently re-mating females with males that provided Acps but no sperm [15].

In addition to stimulating immediate female fertility, MAG products appear to negatively affect female life-span [16,17]. This reflects inter-sexual conflict [18]: the reproductive interests of males and females concerning the consequences of a mating act may differ, in particular when females later re-mate with other partners. Males prefer the female to maximize short-term investment into the offspring resulting from the present copulation, while females may benefit more from saving resources for later reproduction with other males. Sexual conflict may result in sexually antagonistic co-evolution and Acps indeed appear to evolve very rapidly, as predicted from the ensuing arms race [5,19-23].

Compared to the wealth of information on accessory gland products of drosophilids, studies on other insect species are seriously lagging behind [1]. This is particularly the case for eusocial Hymenoptera, despite the special implications that their life style and evolutionary history have on sexual conflict. In contrast to *Drosophila* and other non-social insects, eusocial Hymenoptera are characterized by life-long pair-bonding, even though the males frequently die after mating [24-26]. Investigations have shown that monogamy is the ancestral state of all truly eusocial organisms [27], and lifetime monogamy seems to be a universal precondition for the evolution of obligate eusociality [24,25]. The queens of ants, eusocial bees, and wasps indeed mate only once or a few times early in their adult lives without ever re-mating again. Sperm received during these matings is stored for months, years, or even decades, and utilized to fertilize eggs throughout the queens' lives. Furthermore, queens

first rear large numbers of sterile workers from fertilized eggs before switching to the production of female sexuals. Hence, in contrast to males of non-social insects, eusocial insect males are expected to avoid harming the female, as this would reduce the total amount of female sexuals produced and, consequently, male reproductive success. Instead, males should have evolved mechanisms that promote female performance. Even where multiple mating has evolved after the monogamy window has been passed, competition among ejaculates [28] is not expected to negatively affect female life span and future fecundity. Inter-sexual conflict might thus be replaced by "inter-sexual cooperation", though intra-sexual conflict might still evolve. Indeed, ant males appear to positively affect queen life span: regardless of being mated with a fertile or sterilized male, mated queens of *Cardiocondyla obscurior* lived considerably longer than virgin queens [29].

Like in other insects, MAG products of eusocial Hymenoptera are involved in the formation of mating plugs [30-32] and ejaculate (or eventually sperm) competition [28,33]. In addition, they presumably elicit rapid changes in the physiology and behavior of freshly mated queens, e.g., the shedding of wings, reluctance of mating again, and changes in cuticular hydrocarbons [34]. It is likely that MAG products, and in particular Acps, are also involved in the life-prolonging effects of mating [29]. Nevertheless, very little is known about Acps in eusocial Hymenoptera other than the honey bee, *Apis mellifera* [35-38]. We therefore examined, which genes are differentially expressed in the male accessory glands of the ant *Leptothorax gredleri*.

Virgin queens of *L. gredleri* attract males through "female calling", i.e., they climb up grass stems or similar, elevated positions near their maternal nests and release droplets of a sex pheromone from their poison glands [39-41]. During mating, sperm is transferred within a gelatinous substance, functionally similar to a spermatophore. The latter stays inside the female's genital tract for several hours, while the sperm is slowly transferred into the spermatheca [42]. Females have been observed to copulate with multiple males but it is unclear whether ejaculate is transferred during all these matings. Genetic analyses document single paternity of their offspring [40].

In order to obtain information on gene products specifically produced by the accessory glands of *L. gredleri* males we generated a suppression subtractive library for transcripts using a Representational Difference Analysis (RDA) protocol. Such an approach enriches tissue-specific transcripts (here: MAGs) by removing from the library sequences that are shared with control tissue (here: the body of the males after excision of MAGs).

Results

RDA library characteristics and bioinformatic analyses

To detect differentially expressed genes in *L. gredleri* MAGs, we sequenced 192 clones from the subtracted gland library, resulting in 288 sequencing reads, of which 158 reads representing 130 different clones were of appropriate quality (Phred quality ≥ 20). After quality analysis and following CAP3 assembly we obtained 12 contigs and 8 singlets as Unique Sequences (USs). The sequences were submitted to GenBank (accession numbers GT897811 until GT897966).

BLASTx analyses of the USs (Table 1) revealed significant matches (E-scores $< e^{-5}$, a cut-off level frequently used in EST projects; [43]) for 12 USs. The remaining

8USs showed no significant matches to genes of other species.

Most of the ESTs (40) clustered to a sequence corresponding to an *Apis mellifera* predicted gene similar to CG1486-PA. Based on domain predictions, the fly ortholog of this gene is annotated in Flybase as being involved in carboxylic acid metabolism. Another US represented by 12 ESTs showed similarity to a heat shock factor binding protein 1-like from *Apis mellifera*, with the corresponding CG5446-PA in *Drosophila melanogaster*. Further USs were also formed by clustering considerable numbers of ESTs (Table 1), such as US4 consisting of 28 ESTs, and US3 composed of 10 ESTs. None of these transcripts, however, presented matches when submitted to BLASTx analysis.

Table 1 EST sequences from RDA libraries of accessory glands cDNA from *Leptothorax gredleri*

Gene (predicted)	ESTs #	Base pairs	Organism	e-value	Gene Ontology attributes
<i>leukocyte-antigen-related-like</i>	2	370	<i>Apis mellifera</i>	4e ⁻³⁷	Protein tyrosine phosphatase activity, axon guidance, cell adhesion, motor axon guidance, nervous system development, oogenesis, photoreceptor cell morphogenesis, protein amino acid dephosphorylation, R7 cell development, regulation of cell shape, retinal ganglion cell axon guidance
<i>kokopelli</i>	2	263	<i>Apis mellifera</i>	1e ⁻⁴⁵	Cyclin-dependent protein kinase regulator activity
<i>ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor</i>	5	170	<i>Apis mellifera</i>	9e ⁻⁰⁹	Hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
<i>nervana 2</i>	7	215	<i>Apis mellifera</i>	4e ⁻¹⁹	Cation transmembrane transporter activity, sodium:potassium-exchanging ATPase activity
<i>CG1486</i>	40	249	<i>Apis mellifera</i>	4e ⁻¹⁷	Carboxy-lyase activity, pyridoxal phosphate binding
<i>ribosomal protein LP1</i>	1	167	<i>Apis mellifera</i>	6e ⁻⁷⁸	Structural constituent of ribosome
<i>CG6910</i>	1	197	<i>Apis mellifera</i>	2e ⁻⁰⁸	Inositol oxygenase activity, iron ion binding
<i>SJCHGC05576</i>	3	165	<i>Nasonia vitripennis</i>	1e ⁻⁰⁵	
<i>LOC100123166</i>	1	101	<i>Nasonia vitripennis</i>	4e ⁻⁰⁹	
<i>ciao-1</i>	1	184	<i>Apis mellifera</i>	7e ⁻¹⁷	
<i>CG32432</i>	1	212	<i>Apis mellifera</i>	1e ⁻⁰⁵	
<i>heat shock factor binding protein 1-like</i>	12	159	<i>Apis mellifera</i>	3e ⁻¹⁸	
US1	3	158	No match		
US2	5	146	No match		
US3	10	173	No match		
US4	28	179	No match		
US5	5	183	No match		
US6	1	167	No match		
US7	1	180	No match		
US8	1	97	No match		

Shown are the predicted gene, the number of ESTs assembled to each US, US size in bp, the respective organism, followed by the respective similarity index (e-value) and corresponding Gene Ontology terms obtained from Flybase <http://flybase.bio.indiana.edu/>.

In functional terms, the searches for orthologs revealed that, seven of the *L. gredleri* USs corresponded to functionally defined genes (Table 1), with best hits to predicted *A. mellifera* proteins. By judging from Gene Ontology attributes, two are expected to be involved in energy-dependent transport processes, such as the ATP synthase gamma chain and Nervana 2, a sodium/potassium-transporting ATPase subunit. The Leukocyte-antigen-related-like protein may function as a protein tyrosine phosphatase, while the *kokopelli* gene has a cyclin-dependent protein kinase regulator activity and is involved in male germ-line stem cell division. The final two sequences with predicted molecular functions are CG6910-PA, with inositol oxygenase activity, and an *Apis mellifera* ribosomal protein LP1 (RpLP1) given as being a structural constituent of ribosomes.

Still unknown are biological processes or molecular functions for the five remaining sequences with BLASTx matches. SJCHGC05576 and LOC100123166 are both predicted proteins of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*, and Ciao-1 and CG32432-PA and heat shock factor binding protein 1-like are predicted proteins for *A. mellifera*. Neither of these had matches with *Drosophila* genes.

Quantitative RT-PCR analysis of RDA library genes

The RDA method is applicable to systems where genomic information is either completely lacking or still in an incipient stage. RDAs are able to detect both known and so far unknown transcripts, including regulatory RNAs. However, being a high throughput approach, transcripts indicated by RDA as differentially expressed should be further analyzed by specific gene-expression analyses, such as quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Thus, we designed gene-specific primers for 19 of the 20 RDA products. One product contained repeats, and so it was not considered suitable for primer design. For six of the 19 products we obtained primers, shown in

Table 2, that reliably amplified specific products and, thus, were suitable for qRT-PCR. These were primers for the genes *leukocyte-antigen-related-like* (*leukocyte*) and *CG1486*, representing two genes with BLASTx matches and predicted functions, for *ciao-1* and *CG32432*, being genes with matches but of unknown function, and the final two being for US3 and US7, representing no-match sequences.

For five of the six genes we could show that their mean transcript levels are at least two-times higher in the *L. gredleri* MAGs relative to body carcasses, this holding for all three of the analyzed male life cycle stages, except for *ciao-1* in the males running outside the nest that were sexually mature (males outside nests) samples (Figure 1). For the sixth gene, US7, overexpression was not validated. This may, thus, represent false positive RDA identification, represented by a single sequencing read (Table 1).

When testing for statistical significance of differential expression by randomization tests built into REST software we could show significant overexpression in two genes. *CG1486*, a gene with predicted carboxy-lyase activity, was not only represented by the highest number of ESTs (Table 1), but was also confirmed as significantly overexpressed in MAGs of dark-pigmented male pupae (male pupae; $P = 0.010$) and sexually mature males (males outside nests; $P = 0.015$). The other gene, *CG32432*, was shown to be significantly overexpressed in sexually mature males ($P = 0.037$) (Figure 1). For all of these five genes biological variation in expression levels was considerable, a problem frequently encountered in qRT-PCR analyses, even with highly controlled cell cultures [44].

Discussion and conclusions

Using the RDA method we successfully identified a set of 20 genes as being differentially expressed in MAGs of the ant *L. gredleri*. Unfortunately, a fully sequenced ant

Table 2 qRT-PCR primers sequences with their target genes (when known)

Target genes for qRT-PCR		
<i>leukocyte-antigen-related-like</i>	LgCon1F LgCon1R	5' TTCGTGCGGTTCTGCTTACC 3' 5' GCATCATCGCAGAATACCGGTC 3'
<i>CG1486</i>	LgCon12F LgCon12R	5' GAAGCGGAAGATGTGGC 3' 5' GCCAGCTCTAACCGAAAC 3'
<i>ciao-1</i>	S3B06-F S3B06-R	5' CCTAATGATATCGTCACCGC 3' 5' GGAATATAAACCTGGGAACG 3'
<i>CG32432</i>	S8H10-F S8H10-R	5' GATCGATTTCGAGCAGAGACA 3' 5' TGTTTATCGGGAATCGTTTC 3'
US3 - no match	LgCon9F LgCon9R	5'CTCATCCCTGGGACTTGAC 3' 5'GTGGACCCCGAGAAATAGA 3'
US7 - no match	S6F05-F S6F05-R	5' GTTACGCTTTACGCAACGAG 3' 5' CTTTCATTCCACGGCTCATC 3'
elf-1 alpha	LG-ELF1aF LG-ELF1aR	5' CATGATACCCGGTACCTCG 3' 5' CCAGCATGTTGTCTCCGTG 3'

Figure 1 Gene expression in male accessory glands. Relative expression of *leukocyte-antigen-related-like*, *CG1486*, *ciao-1*, *CG32432*, *US3* and *US7* transcripts in male accessory glands of the ant *Leptothorax gredleri* relative to body carcasses. The y-axis, drawn through 1, corresponds to the expression level in the body carcass (control tissue) of the respective life cycle stage, these being late male pupae, males inside nests and males outside nests. Shown are fold change expression $\pm$ SEM for five biological replicates. Statistically significant differences (REST randomization significance test, $P < 0.05$) are indicated by asterisks.

genome is not yet available, so an annotation against a genome was not feasible. Such an annotation would be needed to identify proteins that are secreted into the lumen of *L. gredleri* MAGs, as their RNAs should have hydrophobic amino-terminal signal sequences [45]. For example, Swanson et al. [22] found that 24% of the 212 identified genes in their study of *Drosophila* male reproductive proteins have such a putative signal sequence.

All best hit matches were against *A. mellifera* or *N. vitripennis* predicted genes, emphasizing the importance of these hymenopteran reference genomes in future gene expression studies in eusocial insects. Nevertheless, most of our ESTs represented functionally undefined genes or ones without matches to known genes. At first sight, this might indicate rapid evolution and species specificity in MAG secretion products, similar to what has been shown for MAGs of *Drosophila* [22], where about 50% of the *Drosophila* Acps have no homologs outside the drosophilid species complex. When comparing the genes predicted to be differentially expressed in MAGs of *L. gredleri* with those identified in a proteome analysis of honey bee seminal fluid [38] we did not find any matching gene products for the set with GeneOntology functional attributes. This finding would also be in favor of a rapid evolution hypothesis for MAG products. Queens of *Leptothorax* are predominantly singly-mated [40,46], but

occasional multiple mating might introduce intra-sexual conflict and thus increase the evolutionary tempo of seminal fluid proteins. In eusocial species with multiple mating, the beneficial effect of seminal fluid on sperm survival is reduced when seminal fluid is mixed with alien sperm [28]. However, this may actually serve the interests of the queen rather than inflicting damage. Furthermore, the queen appears to be in control of ejaculate competition, since the negative impact of seminal fluid on foreign sperm can be neutralized by secretions from the queen sperm-storage organ [28]. In this case, intra-sexual conflict seems to be controlled by inter-sexual cooperation.

Concerning our studies, nothing is as yet known on the molecular nature of MAG secretions of other ant species, and with *Apis mellifera* and *Nasonia vitripennis* being the closest species for genomic comparisons, the percentage of functionally undefined genes and of no-match ESTs might simply reflect the large phylogenetic distance separating ants, bees, and parasitic wasps. Speculating about the speed of the evolution of *L. gredleri* Acps would, at this point, be premature, especially since, 2D-electrophoreses of Acps suggest that they are conserved in *L. gredleri* and related taxa relative to, e.g., muscle proteins (M. Fuessl, A. Oppelt, J. Heinze, unpublished).

Furthermore, not all seminal fluid genes can be subject to rapid evolution, because successful reproduction must be assured. In a cross-species comparison of *Drosophila* MAG protein encoding genes, Mueller et al. [23] found not only rapidly evolving but also conserved genes, and functionally similar proteins may be represented and relevant in the seminal fluid of other animals [4]. Members of protein classes conserved across organisms in seminal fluids may reflect their general importance in reproductive physiology [4] and might therefore be beneficial for both males and females. In this context, immune defense proteins are of special interest. MAGs secrete proteins of antimicrobial activity [10] and proteins, which regulate the expression of genes with antimicrobial activity in females after sperm transfer [11,12,47]. Such Acps might successively protect sperm from microbial attack in the reproductive tracts of both sexes, as well as coat eggs when they are laid. A *L. gredleri* EST, whose ortholog *CG6910* is known to be upregulated in *D. melanogaster* females after mating [47], might play such a role. The *Drosophila* gene is annotated as possibly showing oxidoreductase activity and being downregulated after bacterial infection. For the elucidation of its function in ants, it should be of interest to see whether the gene similar to *CG6910* is also differentially expressed in virgin and mated *L. gredleri* queens. Females are not 'silent partners' when it comes to seminal fluids and it is always an interplay of male and female factors that coordinates the gametes for fertilization [1,28,48].

The CG32432 protein predicted in the honey bee genome as a *Drosophila* ortholog with undefined function was found to be significantly overexpressed in sexually mature *L. gredleri* males, and one gene similar to CG1486-PA was found to be overexpressed in two male life cycle stages. This latter protein is predicted to have a carboxy-lyase activity and might be involved in carboxylic acid metabolism, catalyzing the non-hydrolytic addition or removal of a carboxyl group to or from a compound. Carboxylic acids are widespread in nature, giving rise to fatty acids. Fatty acids, such as palmitic-, linoleic-, oleic-, and stearic-acids, have been described as components of the mating plug in the bumblebee *Bombus terrestris*, which form a physical barrier [30] and prevent re-mating [31]. Mating plugs were also found in fire ants [32], queenless *Dinoponera* ants [49], attine ants [50], stingless bees [51], and in the honey bee. In the latter, however, they do not play a function as a plug, but rather as a mating sign that may even promote multiple matings [52]. In *L. gredleri*, the existence of a spermatophore that could be comparable to a mating plug was already shown [42]. The overexpression of a gene with carboxy-lyase activity in the late pupal stage, when the accessory glands are

already formed, and in sexually mature males found outside the nest supports the idea that accessory gland products are crucial for spermatophore formation in this species.

Taken together, our current study represents a first step addressing at a molecular level the reproductive interplay between *L. gredleri* males and their mates. MAG products identified in this study may play different roles, either as conserved or as species-specific proteins.

Understanding the molecular underpinnings of differences in reproductive strategies among non-social and eusocial species, and in the latter among monogamous (the majority of ants bees and wasps) and polygamous ones (e.g. the honey bees) will still require sequencing of MAG products in a range of species. Nevertheless, we believe that at this interface of "molecular communication" between the sexes, much can be gained towards comprehending the evolution of eusociality at the passage through the monogamy window [25,28], with intersexual conflict being replaced by inter-sexual cooperation.

Methods

Colony collection and male dissection

Colonies of *Leptothorax gredleri* Mayr 1855 (Hymenoptera: Formicidae) were collected from nest-sites at the edge of an abandoned army drill ground in Erlangen, Germany (49° 35' 09" N, 11° 02' 02" E). Each single colony was transferred into a three-chamber plastic box with a cavity between two microscope slides serving as a nest. Colonies were kept under standard rearing conditions [53,54] until they produced sexuals.

Males were dissected in chilled Beadle solution (128.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, and 2.3 mM CaCl₂; [55]). The accessory glands were separated and the seminal ducts were removed. The intestine was removed to avoid contamination of libraries with microorganismal RNA and then the rest of the body served as reference tissue. Glands and the remaining body carcass were stored separately in RNeasy lysis buffer (Qiagen) for subsequent RNA extraction. For library preparations, 40 pairs of glands were pooled for a single sample, to be subtracted against the carcasses of 20 bodies.

For qRT-PCR analyses we dissected male pupae ready to eclose, when they are already dark pigmented (male pupae), newly eclosed males collected from within the nest (males inside nests), and males running outside the nest that were sexually mature (males outside nests). Each sample consisted of at least 20 pairs of glands, to be compared against corresponding body carcasses. As the real time RT-PCR analyses were carried out as quintuplicates, this represented biological material of more than 100 males per life cycle stage.

Representational difference analysis

RNA of both the glands and the remaining body from males (collected from within nests) was extracted with TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's standard protocol. We used 2 µg of each RNA sample to generate the cDNA library. Reverse transcription and long distance PCR were carried out by employing the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech), resulting in double-stranded cDNA.

For suppression subtractive hybridization we employed a cDNA RDA [56] adapted for applications in insects [57]. This strategy removes transcripts shared by the driver and tester populations and enriches the tester library for differentially expressed genes. An accessory gland library was generated using cDNA of accessory glands as the tester population. The latter was hybridized against cDNA of the remaining body carcass as the driver population. Double-stranded cDNAs (1 µg) were restriction digested with *Mbo*I (New England BioLabs), ligated to R-adapters [57], and PCR amplified following the protocol of Hubank and Schatz [58] to generate the respective cDNA representations. Enrichment of differentially expressed transcripts was achieved in two successive rounds of PCR amplifications that employed different adapters (J and N) and sequential subtractive hybridizations of the tester to an excess of driver cDNA, first in a 1:100 and then in a 1:800 ratio [58]. After each of these successive steps, cDNAs were purified (Illustra GFX PCR purification kit, GE).

cDNA from the accessory gland library after the second round of selection was used for ligation into pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega) and transformation of *E. coli* DH5α chemocompetent cells. The cells were reared on solid LB containing ampicillin, X-Gal and IPTG. Selected clones were grown in liquid LB medium containing ampicillin. For the sequencing, the cells were lysed and the plasmids extracted and sequenced using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) with M13 primers on an ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystems) automated gene analyzer.

Bioinformatic analysis

By means of the E-Gene annotation pipeline [59], sequencing reads were first filtered to detect and remove ribosomal RNAs and mitochondrial DNA. Subsequently, vector sequences were trimmed using Crossmatch. Read quality was checked and reads were assembled by the Phred-Phrap program module. Reads that had passed the quality check were next submitted to CAP3 assembly [60] to obtain USs. All contigs, and singlets were dynamically translated and compared by BLASTx to a non-redundant (nr) database (GenBank). ESTs with similarities to genes of known function in other

organisms were clustered using Gene Ontology (GO) terms [61] attributed to their respective *Drosophila* orthologs. GO attributes were retrieved from the Flybase server <http://flybase.org>.

Differential gene expression analysis by quantitative RT-PCR

For real time qRT-PCR analysis, gene-specific primers were designed for a set of selected USs using Gene Runner version 3.05 and Primer3 softwares.

As reference gene we chose elongation factor 1-alpha (*elf1-α*), a recommended control gene for honey bee qRT-PCR studies [62]. To obtain an *L. gredleri* sequence for *elf1-α* we aligned the corresponding sequences of *Leptothorax muscorum* (a direct sister species to *L. gredleri*) and *Temnothorax rugatulus* (a more distantly related ant species) (GenBank accession numbers ABK54792.1 and ABK54711.1, respectively) and designed primers to a conserved region. An *L. gredleri* *elf1-α* fragment was cloned and sequenced, and qRT-PCR suitable primers were designed (Table 2). For the qRT-PCR analyses, we used male pupae, males inside nests and males outside nests. Each sample consisted of a least 20 male bodies or glands. RNA of the glands and remaining bodies carcasses was extracted using TRIzol. The RNA samples were treated with 0.1 U DNaseI (Invitrogen) for 40 min to eliminate possible DNA contamination. First strand cDNA was produced using a SuperScript II (Invitrogen) protocol at 42°C for 50 min and 70°C for 15 min.

Quality and annealing temperatures of the gene-specific primers were tested in a temperature-gradient PCR protocol run in a PTC200 thermal cycler (MJ Research). Product length varied from 305 bp for *elf1-α* to 98 bp for the shortest of the *L. gredleri* singlets.

Subsequently, a dilution series was analyzed for each primer pair using a composite cDNA sample from bodies and glands of all stages in order to obtain standard curves for determining primer efficiencies. These and subsequent qRT-PCR amplifications were performed by using a SYBR Green (Applied Biosystems) protocol in an ABI Prism 7500 system (Applied Biosystems). The amplification protocol was 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Subsequently, dissociation curves were acquired to check melting peak quality. For each life-cycle time point we ran five biological replicates, each assayed in technical triplicates, both for accessory glands and body carcasses.

Threshold cycle (Ct) values for each technical replicate were used to calculate $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values [63] using the means of the five body carcass replicates of each life cycle stage for normalization of the respective gland samples. For statistical analysis, Ct values were used as

input to randomization tests implemented in Relative Expression Software Tool (REST - [64]). *P* values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Acknowledgements

We thank Alexandra Schrempf and Andreas Trindl for helpful advice, as well as the multiuser sequencing and real-time PCR facility of the Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP for technical support. This study was supported by DFG (He 1623/19) and by a bilateral CAPES/DAAD grant (PROBRAL project 261/07). FCH and SVA are sponsored by FAPESP and DSMA by CNPq doctoral fellowships.

Author details

¹Biologie I, Universität Regensburg, Universitätsstr. 31, D-93040 Regensburg, Germany. ²Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, Brazil. ³Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, Brazil.

Authors' contributions

JH and KH conceived the study. KH, JH and AO designed the study. AO and MF collected and reared the males, dissected them and extracted the RNA. FCH and AO conducted the RDA, cloned and sequenced the fragments and conducted the bioinformatics analysis. SVA and AO designed the primers, MF, AO, FCH, SVA and DSMA tested the primers and conducted qRT-PCR. FCH analyzed the qRT-PCR results. AO, FCH, KH, and JH wrote the manuscript. AO and FCH contributed equally to the study. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 4 May 2010 Accepted: 8 September 2010

Published: 8 September 2010

References

- Gillott C: Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology* 2003, **48**:163-184.
- Wolfner MF: The gifts that keep on giving: Physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity* 2002, **88**:85-93.
- Poiani A: Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2006, **60**:289-310.
- Ram KR, Wolfner MF: Sustained post-mating response in *Drosophila melanogaster* requires multiple seminal fluid proteins. *PLoS Genetics* 2007, **3**:2428-2438.
- Ram KR, Wolfner MF: Seminal influences: *Drosophila* Acp's and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology* 2007, **47**:427-445.
- Chen PS, Stumm-Zollinger E, Aigaki T, Balmer J, Bienz M, Böhlen P: A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1988, **54**:291-298.
- Kalb JM, Dibeneditto AJ, Wolfner MF: Probing the function of *Drosophila melanogaster* accessory glands by directed cell ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993, **90**:8093-8097.
- Chapman T, Bangham J, Vinti G, Seifried B, Lung O, Wolfner MF, Smith HK, Partridge L: The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: Female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2003, **100**:9923-9928.
- Liu H, Kubli E: Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2003, **100**:9929-9933.
- Lung O, Kuo L, Wolfner MF: *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *Journal of Insect Physiology* 2001, **47**:617-622.
- McGraw LA, Gibson G, Clark AG, Wolfner MF: Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 2004, **14**:1509-1514.
- Peng J, Zipperlen P, Kubli E: *Drosophila* sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Current Biology* 2005, **15**:1690-1694.
- Neubaum DM, Wolfner MF: Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics* 1999, **153**:845-857.
- Tram U, Wolfner MF: Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1999, **153**:837-844.
- Xue L, Noll M: *Drosophila* female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000, **97**:3272-3275.
- Chapman T, Liddle LF, Kalb JM, Wolfner MF, Partridge L: Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 1995, **373**:241-244.
- Lung O, Tram U, Finnerty CM, Eipper-Mains MA, Kalb JM, Wolfner MF: The *Drosophila melanogaster* seminal fluid protein Acp62F is a protease inhibitor that is toxic upon ectopic expression. *Genetics* 2002, **160**:211-224.
- Chapman T, Arnqvist G, Bangham J, Rowe L: Sexual conflict. *Trends in Ecology & Evolution* 2003, **18**:41-47.
- Rice WR, Holland B: The enemies within: Intergenomic conflict, interlocus contest evolution (ICE), and the intraspecific Red Queen. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 1997, **41**:1-10.
- Clark AG, Begun DJ, Prout T: Female x male interactions in *Drosophila* sperm competition. *Science* 1999, **283**:217-220.
- Rice WR: Dangerous liaisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000, **97**:12953-12955.
- Swanson WJ, Clark AG, Waldrip-Dail HM, Wolfner MF, Aquadro CF: Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001, **98**:7375-7379.
- Mueller JL, Ram KR, McGraw LA, Qazi MCB, Siggia ED, Clark AG, Aquadro CF, Wolfner MF: Cross-species comparison of *Drosophila* male accessory gland protein genes. *Genetics* 2005, **171**:131-143.
- Boomsma JJ: Kin selection versus sexual selection: why the ends do not meet. *Current Biology* 2007, **17**:R673-R678.
- Boomsma JJ: Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 2009, **364**:3191-3207.
- Boomsma JJ, Baer B, Heinze J: The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology* 2005, **50**:395-420.
- Hughes WHO, Oldroyd BP, Beekman M, Ratnieks FLW: Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science* 2008, **320**:1213-1216.
- den Boer SPA, Baer B, Boomsma JJ: Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. *Science* 2010, **327**:1506-1509.
- Schrempf A, Heinze J, Cremer S: Sexual cooperation: Mating increases longevity in ant queens. *Current Biology* 2005, **15**:267-270.
- Baer B, Maile R, Schmid-Hempel P, Morgan ED, Jones GR: Chemistry of a mating plug in Bumblebees. *Journal of Chemical Ecology* 2000, **26**:1869-1875.
- Baer B, Morgan ED, Schmid-Hempel P: A nonspecific fatty acid within the Bumblebee mating plug prevents females from remating. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001, **98**:3926-3928.
- Mikheyev AS: Evidence for mating plugs in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Insectes Sociaux* 2003, **50**:401-402.
- den Boer SPA, Boomsma JJ, Baer B: Seminal fluid enhances sperm viability in the leafcutter ant *Atta colombica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2008, **62**:1843-1849.
- Oppelt A, Heinze J: Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. *Journal of Insect Physiology* 2009, **55**:624-628.
- Collins AM, Caperna TJ, Williams V, Garrett WM, Evans JD: Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Molecular Biology* 2006, **15**:541-549.
- Frattini-Colonello NA, Hartfelder K: Differential gene expression profiling in mucus glands of honey bee (*Apis mellifera*) drones during sexual maturation. *Apidologie* 2009, **40**:481-495.
- Frattini-Colonello NA, Hartfelder K: She's my girl - male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees. *Apidologie* 2005, **36**:231-244.

38. Baer B, Heazlewood J, Taylor NL, Eubel H, Millar AH: **The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*.** *Proteomics* 2009, **9**:2085-2097.
39. Heinze J, Lipski N, Hölldobler B: **Reproductive competition in colonies of the ant *Leptothorax gredleri*.** *Ethology* 1992, **90**:265-278.
40. Oberstadt B, Heinze J: **Mating biology and population structure of the ant, *Leptothorax gredleri*.** *Insectes Sociaux* 2003, **50**:340-345.
41. Oppelt A, Spitzenpfeil N, Kroiss J, Heinze J: **The significance of intercolonial variation of cuticular hydrocarbons for inbreeding avoidance in ant sexuals.** *Animal Behaviour* 2008, **76**:1029-1034.
42. Oppelt A, Heinze J: **Dynamics of sperm transfer in the ant *Leptothorax gredleri*.** *Naturwissenschaften* 2007, **94**:781-786.
43. Nunes FMF, Valente V, Sousa JF, Cunha MAV, Pinheiro DG, Maia RM, Araujo DD, Costa MCR, Martins WK, Carvalho AF, Monesi N, Nascimento AM, Peixoto PMV, Silva MFR, Ramos RGP, Reis LFL, Dias-Neto E, Souza SJ, Simpson AJG, Zago MA, Soares AEE, Bitondi MMG, Espreafico EM, Espindola FS, Paco-Larson ML, Simoes ZLP, Hartfelder K, Silva WA Jr: **The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome.** *BMC Genomics* 2004, **5**:e84.
44. Willems E, Leyns L, Vandesompele J: **Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates.** *Analytical Biochemistry* 2008, **379**:127-129.
45. Harwood R: **Protein transfer across membranes: the role of signal sequences and signal peptidase activity.** In *The enzymology of post-translational modification of proteins*. Edited by: Freedman RB, Hawkins HC. London: Academic Press; 1980:3-52.
46. Hammond RL, Bourke AFG, Bruford MW: **Mating frequency and mating system of the polygynous ant, *Leptothorax acervorum*.** *Molecular Ecology* 2001, **10**:2719-2728.
47. Lawniczak MKN, Begun DJ: **A genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females.** *Genome* 2004, **47**:900-910.
48. den Boer SPA, Boomsma JJ: **Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage.** *Journal of Insect Physiology* 2009, **55**:538-543.
49. Monnin T, Peeters C: **Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*.** *Animal Behavior* 1998, **55**:299-306.
50. Baer B, Boomsma JJ: **Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants.** *Behavioral Ecology* 2004, **15**:426-432.
51. Kerr WE, Zucchi R, Nakadaira JT, Butolo JE: **Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae).** *Journal of New York Entomological Society* 1962, **70**:265-276.
52. Woyciechowski M, Kabat L, Król E: **The function of the mating signs in honeybees, *Apis mellifera* L.: new evidence.** *Animal Behaviour* 1994, **47**:733-735.
53. Buschinger A: **Experimente und Beobachtungen zur Gründung und Entwicklung neuer Sozietäten der sklavenhaltenden Ameise *Harpagoxenus sublaevis* (Nyl.).** *Insectes Sociaux* 1974, **21**:381-406.
54. Heinze J, Ortius D: **Social organization of *Leptothorax acervorum* from Alaska (Hymenoptera: Formicidae).** *Psyche (Cambridge)* 1991, **98**:227-240.
55. Darrouzet E, Huignard J, Chevrier C: **Effect of differential host exposure on reproduction in the solitary ectoparasitoid *Eupelmus vuilleti*.** *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2002, **103**:73-81.
56. Pastorian K, Hawel III L, Byus CV: **Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs.** *Analytical Biochemistry* 2000, **283**:89-98.
57. Judice CC, Carazzole MF, Festa F, Sogayar MC, Hartfelder K, Pereira GAG: **Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*.** *Insect Molecular Biology* 2006, **15**:33-44.
58. Hubank M, Schatz DG: **Representational difference analysis of cDNA.** In *Functional Genomics*. Edited by: Hunt SP, Livesey FJ. Oxford, New York: University Oxford Press; 2000:45-80.
59. Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FTG, Ahagon PH, Rainone F, Gruber A: **EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis.** *Bioinformatics* 2005, **21**:2812-1813.
60. Huang X, Madan A: **CAP3: A DNA sequencing assembly program.** *Genome Research* 1999, **9**:868-877.
61. The Gene Ontology Consortium: **Gene Ontology: tool for the unification of biology.** *Nature Genetic* 2000, **25**:25-29.
62. Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simoes ZLP: **Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR.** *Apidologie* 2008, **39**:378-385.
63. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**:e45.
64. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: **Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.** *Nucleic Acids Research* 2002, **30**:1-10.

doi:10.1186/1471-2148-10-273

Cite this article as: Oppelt et al.: Suppression subtractive hybridization analysis reveals expression of conserved and novel genes in male accessory glands of the ant *Leptothorax gredleri*. *BMC Evolutionary Biology* 2010 **10**:273.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit