

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DANIELLE LUNA SOARES LUCENA

Análise do perfil transcriptômico e da morfologia ovariana de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) e as estratégias reprodutivas das abelhas eussociais

Ribeirão Preto
2022

DANIELLE LUNA SOARES LUCENA

Análise do perfil transcriptômico e da morfologia ovariana de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) e as estratégias reprodutivas das abelhas eussociais

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, obtido no Programa de Pós-Graduação em Genética.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto

2022

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 à fonte.

Luna-Lucena, Danielle Soares

Análise do perfil transcriptômico e da morfologia ovariana de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) e as estratégias reprodutivas das abelhas eussociais. Ribeirão Preto, 2022.

xiii+164+8 p.

Tese de Doutorado, apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino

1. *Scaptotrigona bipunctata*; 2. reprodução; 3. ovários; 4. corpo gorduroso; 5. Expressão diferencial; 6. RNA-seq; 7. abelhas sem ferrão.

Nome: LUNA-LUCENA, Danielle Soares.

Título da tese: Análise do perfil transcriptômico e da morfologia ovariana de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier) e as estratégias reprodutivas das abelhas eussociais.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento _____

Dedico esse trabalho à minha mãe,
Cácia Luna.
Tudo que eu sonhei ser um dia foi por
amor a você.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho e por todo suporte que tive no decorrer destes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho, pela bolsa concedida (Processo: 2017/01643-3) e pelos financiamentos concedidos à Profa. Dra. Zilá Simões, que beneficiaram este trabalho (Processos: FAPESP Nº 2016/06657-0 e FAPESP Nº 2019/02374-1).

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil pela concessão de bolsa no primeiro ano desse estudo (Processo: 141229/2017-9). Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões pela oportunidade e paciência. Por ter me apresentado com muito entusiasmo à área da morfologia que durante esses anos se tornou objeto de minha paixão. Por todos os ensinamentos durante essa trajetória. Pelas boas conversas sobre as coisas da vida e pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética desta Universidade, que contribuíram diretamente para minha formação acadêmica por meio das disciplinas oferecidas, bem como, aos secretários Susie Nalon e Gustavo Medeiros, por serem sempre gentis e eficientes.

À especialista do LMMC - FMRP, Elizabete Milani por toda dedicação e amor com o qual faz seu trabalho, pelo auxílio na microscopia realizada nessa tese. Agradeço também pela amizade e todo carinho demonstrado a mim. Você é uma das pessoas mais gentis que pude conhecer.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ramos (Departamento de BIOCEL, FMRP-USP), pelos meses que passei em seu laboratório (Genética Molecular do Desenvolvimento) para aprender a imunohistoquímica que foi realizada nessa tese.

Ao Lactad, na pessoa da Dr. Sandra Krauchenco, pela oportunidade de estágio na área de Bioinformática. Ao Bioinformata Osvaldo Reis que me orientou durante o estágio, bem como nas diversas dúvidas que surgiram em meu aprendizado nessa área durante todos esses anos

de doutoramento. Obrigada pela amizade, paciência, incentivo e sugestões de como melhorar as análises.

À Profa. Dra. Anete Lourenço pelo auxílio em algumas dissecções que foram feitas para a construção das bibliotecas de mRNA. Ao Prof. Dr. David de Jong por sua revisão no *abstract* dessa tese. Ao Prof. Dr. Francis Nunes pela disponibilidade em conversar e esclarecer algumas dúvidas quando elas surgiram, e por disponibilizar o *primer* de vg para validação dos dados de expressão desse gene. À Dr. Flávia Freitas por suas sugestões na primeira versão do meu projeto de doutorado.

Ao técnico Jairo, que auxiliou nas coletas das rainhas que foram necessárias para esse estudo. À dona Maria, que cuida da limpeza do prédio e faz o nosso dia mais divertido com o seu bom humor.

Ao especialista Pedro Prado, por nos dá suporte organizando computadores mais potentes para que nosso trabalho com os dados do sequenciamento se torne facilitado. Ao Prof. Dr. Daniel Guariz por cuidar do acesso e organização do servidor do laboratório LBDA.

À Dra. Vera Figueiredo, por seu carinho e amizade, por ser sensível e se importar com o outro. Obrigada por tudo Verinha!

À querida Profa. Marcia Bitondi pelas palavras carinhosas e reconfortantes. Por seus conselhos que me ajudaram a me sentir forte quando eu precisei.

Aos amigos e parceiros de morfolgia, Franciene Rabico e Felipe Valer pelo companheirismo nessa parte. Obrigada ao Felipe por sua ajuda também na obtenção de algumas imagens e confecção das pranchas do capítulo 1.

Aos amigos de laboratório (LBDA) Fabiano, Fábio, as Fernandas Dalarmi e Sanches, Luana, Thiago e Patrick por tornarem o laboratório um ambiente harmonioso e saudável.

Ao Dr. Fabiano Abreu, por revisar meus textos e sempre contribuir com suas sugestões. À Mestra Luana, por revisar a parte da bioinformática do capítulo 1 e contribuir com suas correções. A ambos, por me ajudarem a relembrar a parte de bancada, quando foi preciso fazê-la.

Aos amigos de todas as horas, Luana e Fabiano. Obrigado pelo carinho, incentivo e amizade. A Luana é uma amizade antiga, desde a época do mestrado em São Carlos - UFSCAR, o Fabiano é um presente que o doutorado me deu!

Ao Thiago Depintor (Tiaguinho), que se mostrou um amigo incrível em momentos que precisei.

Aos amigos Ane, Alana, Caleb, Fabiano, Fábio e Maryan pelas boas lembranças que vocês representam. Por mesmo estando longe se fazerem presentes.

Aos meus sogros Luzia Dantas de Araújo Lucena e José Batista de Lucena, às tias Lucinete Dantas e Linete Dantas por todo incentivo, ajuda e orações. Vocês fazem parte desse trabalho pelo apoio incondicional que nos foi dado.

Ao querido Prof. Marco Del Lama, que me ensinou a dar os primeiros passos na área da pesquisa, que com sua personalidade forte e inesquecível me conduziu com sucesso pelos anos de mestrado. Obrigada por me apresentar à genética de Ribeirão Preto como uma possibilidade para o doutorado e por todas as vezes que me escreveu durante esses anos para me apoiar. Em fim, obrigada por seus conselhos e ensinamentos, eles me ajudaram chegar até aqui.

À Silvia Del Lama, Katia Ferreira e Isabel Godoy pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Almeida e ao especialista José Amilcar por toda ajuda no início desse projeto com a identificação das espécies de *Scaptotrigona* presente no Meliponário da FMRP. Ao Eduardo Almeida, por seus conselhos acertados e incentivo para que meu doutorado fosse realizado na Genética da FMRP sob orientação da professora Zilá. Obrigada por ter se mostrado uma pessoa amiga, a qual Daercio e eu sempre pudemos contar.

Aos médicos Jader Formiga e Adilson Faccio, por conduzirem com tanta eficiência o tratamento da minha mãe e assim ajudarem para que essa tese fosse concluída.

À todas as Lunetes da família, Inalda Luna, Ivanira Luna, Elinete Luna e Sheila Luna, por toda torcida e orações.

À minha querida mãe Cáscia Luna, exemplo de força e resiliência. Obrigada por estar lutando com tanta coragem para continuar aqui comigo. Obrigada por tanto amor demonstrado a mim por todos esses anos. Nossa relação de amor e cumplicidade é para toda a vida. Te amo.

Ao Dr. Daercio Lucena por suas várias leituras a esse trabalho, correções e relevantes contribuições. Obrigada por toda dedicação com que cuidou dos detalhes para que esse trabalho de tese ficasse apresentável, com formatação de referências, formatação geral, confecção das pranchas do capítulo 2, entre outros detalhes, que por estar cansada devo ter

esquecido! Agradeço também, ao querido esposo Daercio Lucena, para este, tive dificuldades de encontrar as palavras certas para agradecer. Obrigada por esses quatorze anos de companheirismo, por ainda conseguirmos sonhar os mesmos sonhos. Pelas caminhadas em volta do lago da USP, que tem sido nosso refúgio e nossa terapia por todo esse tempo. Por ser meu Amigo, meu MasterChef e meu Amor. Obrigada por nesses últimos anos ter aguentado firme ao meu lado, por me colocar no colo todas as vezes que pensei que não aguentaria as “surpresas” que a vida nos reserva. Obrigada por seu amor, paciência, persistência e dedicação.

Essa conquista é nossa!

Continuo a lhe dedicar:

*“Se você vier pro que der e vier comigo
Eu lhe prometo o sol... se hoje o sol sair
ou a chuva... se a chuva cair
Se você vier até onde a gente chegar
Numa praça na beira do mar
Num pedaço de qualquer lugar....”*

Todas as notas para você. *Dia Branco – Geraldo Azevedo.*

Ao meu filhinho de quatro patas, Lukinho, que entrou em nossas vidas e transformou a nossa casa em uma festa.

Ao Autor da minha fé.

RESUMO

LUNA-LUCENA, D. S. *Análise do perfil transcriptômico e da morfologia ovariana de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) e as estratégias reprodutivas das abelhas eussociais.* 2022. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

As abelhas sem ferrão formam um amplo espectro de espécies eussociais com uma considerável diversidade de comportamentos reprodutivos. Esses comportamentos têm sido extensivamente estudados, no entanto, do ponto de vista molecular, o processo de ativação e inativação dos ovários nessas espécies ainda permanecem pouco conhecidos. Para lançar luz sobre o processo da oogênese em *Scaptotrigona bipunctata*, nós realizamos uma abordagem integrativa, fazendo uso integrado de dados de RNA-seq de ovários e corpo gorduroso, combinados à análises morfológicas de ovários de rainhas e operárias em diferentes estágios do desenvolvimento adulto. No primeiro capítulo, detalhamos o processo reprodutivo em operárias de *S. bipunctata*. Descrevemos em detalhes a morfologia ovariana, definimos o local das células-tronco da linhagem germinativa através da imunolocalização de Vasa e caracterizamos ainda os diferentes estágios da oogênese observados ao longo dos ovários dessa casta. Com base no estudo morfológico e com auxílio de marcadores moleculares presentes nos transcriptomas de ovários de operárias de *S. bipunctata*, descrevemos também, pela primeira vez em abelhas nativas sem ferrão, alguns tipos celulares que são reconhecidos há muito tempo como relevantes para manutenção e diferenciação das células-tronco da linhagem germinativa e essenciais para o progresso da oogênese em outros organismos estudados. Nesse capítulo, investigamos e discutimos ainda o padrão de expressão de alguns genes em operárias de *S. bipunctata*, que são considerados marcadores do estado ativado e inativado dos ovários em outros insetos, tendo como base análises de transcriptomas de ovário e corpo gorduroso. No segundo capítulo foi dada ênfase sobre os resultados dos transcriptomas como um todo. Comparamos o perfil de expressão dos ovários e do corpo gorduroso em diferentes fases do desenvolvimento adulto de rainhas e operárias de *S. bipunctata* e estabelecemos o perfil de expressão gênica durante o processo de ativação e inativação dos ovários nas diferentes castas dessa espécie. Os resultados demonstraram que no processo reprodutivo, a casta é um fator secundário. O perfil transcricional ovariano que as operárias apresentam por volta dos sete dias de idade imita o perfil transcricional dos

ovários de uma rainha acasalada e em postura. Dessa forma, podemos sugerir que operárias de *S. bipunctata* poderiam ser consideradas “pseudo-rainhas”, que se diferenciam das rainhas verdadeiras por exercerem diversas tarefas e não somente a reprodução. Em relação ao perfil transcricional do corpo gorduroso, observamos que esse tecido separa as castas, rainhas acasaladas e virgens se agrupam. Esse agrupamento foi marcado pela alta expressão de genes que confere proteção as células e tecidos do corpo contra toxinas, xenobióticos e danos oxidativos, o que pode explicar a longevidade que rainhas exibem em relação as operárias. Dentro da casta operária, o perfil transcricional do corpo gorduroso marca o envelhecimento, com operárias forrageiras apresentando o perfil transcricional mais distinto. Por fim, quando corpo gorduroso e ovários foram comparados em cada fenótipo estudado, observamos que o perfil transcricional dos ovários e do corpo gorduroso de operárias forrageiras convergem para níveis de expressão semelhantes. Esse resultado é explicado pela degeneração dos ovários que ocorre nessa fase, demonstrando uma perda da identidade celular dos ovários durante o envelhecimento. Esse estudo é pioneiro para abelhas sem ferrão por usar uma abordagem que integra a morfologia do órgão reprodutivo com dados transcriptômicos. Os resultados obtidos trazem dados inéditos sobre a morfologia ovariana de abelhas e revelam os mecanismos moleculares envolvidos na ativação dos ovários de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Ademais, através dos transcriptomas de corpo gorduroso, identificamos genes envolvidos na diferenciação de casta nessa espécie

Palavras-chave: *Scaptotrigona bipunctata*, reprodução, ovários, corpo gorduroso, expressão diferencial, RNA-seq, abelhas sem ferrão.

ABSTRACT

LUNA-LUCENA, D. S. *Analysis of the transcriptome profile and ovarian morphology of *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) and reproductive strategies of eusocial bees.* 2022. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The stingless bees constitute a wide spectrum of eusocial species with considerable diversity of reproductive behaviors. These behaviors have been extensively studied; however, from a molecular perspective, the process of ovary activation and inactivation in these species is still little known. To shed light on the oogenesis process in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata*, we conducted an integrative study combining RNA-seq data obtained from ovary and fat bodies with morphological analyses of the ovaries of queens and workers sampled at various stages of adult development. First, we examined the reproductive process in *S. bipunctata* workers. This included ovarian morphology, defining the location of germline stem cells through immunolocalization of Vasa protein, and characterization of the stages of oogenesis along the ovarioles of this caste. Based on the morphology and on molecular markers present in the ovary transcriptomes of *S. bipunctata* workers, we describe, for the first time for native stingless bees, specific types of cells that are involved in maintenance and differentiation of germline stem cells. These cells have been found to be essential for oogenesis in other organisms. We also examined the expression patterns of genes in *S. bipunctata* workers that are considered markers of active and inactive states of ovaries in other insect species, based on analyses of ovary and fat body transcriptomes. In the second part of the study, we focused on the transcriptomes as a whole. We compared expression profiles of ovaries and fat bodies at various stages of adult development of queens and workers of *S. bipunctata* and determined the gene expression profiles during ovary activation and inactivation for these two castes. Our results indicate that in the reproductive process, caste is a secondary factor. The ovarian transcriptional profile exhibited by workers around the seventh day is similar to that of an egg-laying mated queen. Therefore, workers of this species could be considered “pseudo-queens”, differing from true queens by their roles in tasks other than reproduction. Castes can be separated based on the transcriptional profile of the fat body, which groups together mated and virgin queens. This grouping is characterized by a high level of expression of genes involved in cell and tissue protection against toxins,

xenobiotics, and oxidative damage, which may help explain the greater longevity of queens compared to workers. Within the worker caste, the fat body transcriptional profile is affected by ageing, with foraging workers exhibiting the most distinct transcriptional profile. When transcriptional profiles of ovary and fat bodies of foraging workers were compared, we noticed that they converged to similar expression levels. This is apparently due to ovary degeneration in this life stage, with loss of cellular identity of the ovaries as a function of ageing. This study is the first that integrates reproductive organ morphology and transcriptome data in stingless bees. Our results bring new data on the ovarian morphology and reveal molecular mechanisms involved in *S. bipunctata* queen and worker ovary activation. Furthermore, based on the fat body transcriptional profile we identified genes that are involved in caste differentiation in this species.

Keywords: *Scaptotrigona bipunctata*, reproduction, ovary, fat body, differential gene expression, RNA-seq, stingless bees

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

Figura 1.	Morfologia dos ovários de operárias de <i>S. bipunctata</i> com potencial reprodutivo	32
Figura 2.	Detalhes morfológicos da região anterior dos ovariolos de operárias de <i>S. bipunctata</i> , recém-emergidas e com sete dias de idade	33
Figura 3.	Detalhes morfológicos da região anterior e posterior de ovariolos de operárias de <i>S. bipunctata</i>	36
Figura 4.	Morfologia dos ovários de operárias forrageiras de <i>S. bipunctata</i>	39
Figura 5.	Musculatura do ovário de operárias jovens de <i>S. bipunctata</i> , com potencial reprodutivo	40
Figura 6.	Estágios da oogênese em operárias de <i>S. bipunctata</i> a partir da determinação do ovócito	43
Figura 7.	Expressão de <i>vasa</i> em ovários de <i>S. bipunctata</i>	46

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Figura 1.	Visão geral da morfologia ovariana de rainhas de <i>S. bipunctata</i>	100
Figura 2.	Análise de componentes principais mostra a similaridade transcricional entre as amostras	102
Figura 3.	<i>Heatmap</i> representa a análise da distância euclidiana do perfil transcricional das amostras de ovários nas diferentes castas (rainhas e operárias) e nas diferentes fases do desenvolvimento adulto	103
Figura 4.	<i>Heatmap</i> representa a análise da distância euclidiana do perfil transcricional das amostras de corpo gorduroso nas diferentes castas (rainhas e operárias) e nas diferentes fases do desenvolvimento adulto	104
Figura 5.	<i>Scatter plot</i> de genes diferencialmente expressos identificados na comparação par a par nas bibliotecas de ovários de <i>S. bipunctata</i>	106
Figura 6.	<i>Scatter plot</i> dos genes diferencialmente expressos identificados na comparação par a par nas bibliotecas de corpo gorduroso de <i>S. bipunctata</i>	108
Figura 7.	Número de genes regulados na mesma direção (altamente expresso) compartilhados entre os fenótipos e exclusivos de fenótipos	110
Figura 8.	Perfil de expressão de cento e setenta e sete genes da família citocromo P450 no corpo gorduroso (FB) de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	111
Figura 9.	Perfil de expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo no corpo gorduroso de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	112
Figura 10.	Perfil de expressão da via dos ecdisteróides em ovários de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	114
Figura 11.	Número de genes preferencialmente expresso em cada fenótipo	116
Figura 12.	Processos biológicos (GO) enriquecidos no corpo gorduroso de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	119
Figura 13.	<i>Scatter plot</i> dos genes diferencialmente expressos entre corpo gorduroso e ovários de um mesmo fenótipo	121

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Marcadores moleculares da atividade dos ovários e manutenção do nicho das células-tronco da linhagem germinativa, descritos em <i>D. melanogaster</i> e ocorrências em <i>A. mellifera</i> e <i>S. bipunctata</i>	37
Tabela 2.	Estágios da oogênese em operárias de <i>S. bipunctata</i> nas idades recém-emergida e sete dias	42
Tabela 3.	Expressão diferencial dos genes <i>anarchy</i> , <i>vasa</i> e <i>vitelogenina</i> nos ovários e no corpo gorduroso em três fases do desenvolvimento adulto de <i>S. bipunctata</i>	45

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Descrição das amostras de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i> utilizadas para sequenciamento e análise	100
Tabela 2.	Visão geral da anotação funcional das sequencias obtidas da montagem final do transcriptoma referência de <i>S. bipunctata</i>	101
Tabela 3.	Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de hormônio juvenil e gene de resposta a esse hormônio nos ovários de <i>S. bipunctata</i>	115
Tabela 4.	Processos biológicos enriquecidos nos ovários de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 1.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Coleta das amostras.....	27
3.2 Classificação das operárias adultas de <i>S. bipunctata</i> com base na morfologia dos ovários.....	27
3.3 Preparação dos ovários para a imunohistoquímica.....	28
3.4 Bioinformática.....	29
3.4.1 Transcriptomas consultados.....	29
3.4.2 Relação de ortologia e validação dos dados de expressão.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Estrutura dos ovários de operárias de <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	31
4.2 Filamento terminal, germário e vitelário de operárias recém-emergidas e com sete dias.....	31
4.2.1 Filamento terminal.....	31
4.2.2 Germário.....	32
4.2.3 Vitelário.....	38
4.3 Estrutura dos ovários de operárias forrageiras.....	38
4.4 Ativação dos ovários e estágios da oogênese/maturação dos ovócitos em operárias jovens de <i>S. bipunctata</i>	41
4.5 Alteração na expressão de <i>anarchy</i> , <i>vitelogenina</i> e <i>vasa</i> em três fases do desenvolvimento adulto de operárias de <i>S. bipunctata</i>	44
4.6 Expressão de <i>Vasa</i> em ovários de <i>S. bipunctata</i>	45
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1 Oogênese em ovários de operárias de <i>S. bipunctata</i>	47
5.1.1 Potencial reprodutivo.....	47
5.1.2 Local das células germinativas e imunolocalização de <i>vasa</i>	48
5.1.3 Células somáticas no germário de <i>S. bipunctata</i> e os marcadores moleculares específicos dessas células.....	51
5.1.4 Expressão de <i>Vasa</i> em células do polo posterior do ovócito.....	53

5.1.5 Senescência reprodutiva em operárias de <i>S. bipunctata</i>	55
5.1.6 Marcadores moleculares do estado reprodutivo em operárias de <i>S. bipunctata</i>	59
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS.....	67
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	81
CAPÍTULO 2.....	88
1. INTRODUÇÃO	89
2. OBJETIVOS.....	92
2.1 Objetivo geral	92
2.2 Objetivos específicos.....	92
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
3.1 Coleta do material biológico	93
3.2 Escolha das fases do desenvolvimento (fenótipo) para o sequenciamento dos transcriptomas de operárias com base na morfologia dos ovários.....	93
3.3 Obtenção de amostras de rainhas de <i>S. bipunctata</i> para o sequenciamento do transcriptoma com base na morfologia dos ovários.....	93
3.4 Extração do RNA total	94
3.5 Construção das bibliotecas para o sequenciamento	95
3.6 Bioinformática	96
3.6.1 Qualidade das <i>reads</i>	96
3.6.2 Montagem do transcriptoma referência	96
3.6.3 Identificação de regiões codificantes	97
3.6.4 Retirada dos transcritos contaminantes e qualidade da montagem.....	97
3.6.5 Anotação funcional.....	98
3.6.6 Expressão diferencial e análise de enriquecimento.....	98
3.6.7 Busca por genes específicos de ovários e corpo gorduroso.....	98
3.6.8 Construção dos gráficos.....	99
4. RESULTADOS	99
4.1 Caracterização das mostras que compõem o transcriptoma referência de <i>S. bipunctata</i>	99
4.2 Montagem e anotação do transcriptoma referência.....	101
4.3 Visão geral do padrão de expressão dos transcriptomas.....	102
4.4 Semelhança e diferenças entre os perfis transcricionais de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	102
4.4.1 Perfil transcricional dos ovários.....	102
4.4.2 Perfil transcricional do corpo gorduroso.....	103

4.5 Análise par a par das bibliotecas de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	105
4.6 Número de genes com padrão de expressão compartilhado e exclusivo de fenótipos...	107
4.7 Genes de vias metabólicas relacionados à reprodução.....	112
4.7.1 Genes da via dos ecdisteróides nos ovários de <i>S. bipunctata</i>	112
4.7.2 Via de síntese e degradação do hormônio juvenil nos ovários de <i>S. bipunctata</i>	113
4.8 Termos enriquecidos (GO) em bibliotecas de ovários e corpo gorduroso.....	116
4.9 Número de genes diferencialmente expresso entre corpo gorduroso e ovários de um mesmo fenótipo.....	120
5. DISCUSSÃO.....	122
5.1 Similaridades e diferenças entre os perfis transcricionais globais de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de <i>S. bipunctata</i>	122
5.2 Genes diferencialmente expressos, identificação e classificação.....	123
5.2.1 Ovários.....	123
5.2.2 Corpo gorduroso.....	127
5.3 Comparação entre corpo gorduroso e ovários, o que esses dados nos revelam?	132
5.4 Via dos ecdisteróides (20E)	133
5.5 Relação entre vitelogenina e hormônio juvenil em <i>S. bipunctata</i>	134
6. CONCLUSÃO	136
7. CONCLUSÃO GERAL DA TESE.....	139
8. REFERÊNCIAS.....	140
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	159

1. INTRODUÇÃO GERAL

O modo de vida eussocial apresenta particularidades que são fascinantes do ponto de vista evolutivo. Uma delas é o fato de que larvas diploides podem dar origem a fêmeas adultas com desenvolvimento de fenótipos completamente distintos. O caso mais extremo desse polifenismo é observado nos ovários das castas de espécies do gênero *Apis*, representantes do grupo Apini, caracterizados por apresentar comportamento altamente eussocial. As diferenças encontradas nos ovários de espécies deste grupo são estabelecidas durante o desenvolvimento larval, mais precisamente durante o quinto ínstar (Hartfelder & Steinbrück, 1997). Diferenças nos níveis de hormônio juvenil (JH) entre as castas, baixos em operárias e altos em rainhas, protegem os ovários das rainhas de eventos de morte celular. Como consequência, o número de ovariolos presentes nas rainhas (120-200 ovariolos) é muito maior do que o observado nas operárias (2-12 ovariolos) (Rachinsky *et al.*, 1990; Rembold, 1987; Hartfelder & Steinbrück, 1997; Schmidt-Capella & Hartfelder, 1998). Essa característica é em parte responsável por garantir a hegemonia reprodutiva da rainha. Nas abelhas altamente eussociais, nem sempre a diferença na estrutura dos ovários é tão marcante entre as castas. Nos Meliponini, por exemplo, rainhas e operárias apresentam quatro ovariolos por ovário (Cruz-Landim *et al.*, 1998, Santos & Cruz-Landim, 2002; Martins & Serrão, 2004). Dessa forma, as diferenças no número de ovariolos, tão marcantes e característicos das castas em Apini, não são observadas nos Meliponini.

As abelhas do grupo Meliponini, popularmente conhecidas como abelhas nativas indígenas sem ferrão, formam um amplo espectro de espécies eussociais caracterizadas por uma alta diversidade comportamental, ecológica e reprodutiva (Camargo & Pedro, 1992; Michener, 2007; Melo, 2020). Do ponto de vista reprodutivo, o grupo Meliponini pode ser considerado uma rica fonte de conhecimento capaz de nos ajudar a entender a extraordinária diversidade que o estilo de vida eussocial pode apresentar.

A diversidade de comportamento reprodutivo apresentada por operárias em Meliponini reúne desde espécies que sempre ativam os ovários, como no caso de *Scaptotrigona postica* (Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1979; Santos & Cruz-Landim, 2002), a espécies em que o estado de esterilidade é permanente, como o observado em *Frieseomelitta varia* (Boleli *et al.*, 1999) e *Tetragonula carbonaria* (Bueno *et al.*, 2020). No espectro das espécies

em que operárias ativam seus ovários, há ainda variações dessa condição. Há casos, por exemplo, em que as operárias ativam seus ovários apenas em algumas situações, ou seja, a esterilidade é facultativa, como o observado em *Leurotrigona muelleri* (Terada, 1974), e em outras em que as operárias ativam os ovários e produzem ovócitos que chegam ao final do desenvolvimento, porém, nunca são ovipositados, mesmo na situação em que a rainha é retirada da colônia, como o observado em *Trigona cilipes* (Silva-Matos *et al.*, 2006).

No grupo das operárias que sempre ativam os ovários existem ainda algumas particularidades como a postura de ovos não reprodutivos, os chamados ovos tróficos. Esses ovos seriam inviáveis por apresentar ausência do núcleo, além de uma morfologia diferenciada se comparado aos ovos reprodutivos (Akahira *et al.*, 1970; Koedam *et al.*, 2001; Larceda & Simões, 2006).

Nesse trabalho, estudamos alguns parâmetros envolvidos no processo de oogênese de *S. bipunctata*, com especial atenção àqueles relativos à expressão gênica diferencial entre as castas. Para isso, os resultados de análises transcriptômicas de ovários e corpo gorduroso (RNA-seq) foram integrados às observações da morfologia dos órgãos reprodutivos de ambas as castas durante o processo de ativação dos ovários na fase adulta.

Scaptotrigona bipunctata foi escolhida para esse estudo por três razões principais. (1) Trata-se de uma espécie altamente eussocial, ou seja, a determinação de casta se dá no início do desenvolvimento e essa determinação é dita irreversível (casta – fixa), tal como ocorre em *A. mellifera*. A eussocialidade de casta-fixa ocorre apenas nesses dois grupos de abelhas: Apini e Meliponini (Almeida & Porto, 2014). (2) Com base em nossos resultados morfológicos, observamos que as operárias de *S. bipunctata* ativam seus ovários mesmo na presença da rainha, comportamento descrito para várias espécies desse grupo (os vários comportamentos reprodutivos que operárias do grupo Meliponini apresentam foi revisado recentemente, ver Luna-Lucena *et al.*, 2019). Dessa forma, o comportamento reprodutivo das operárias de *S. bipunctata* difere e muito do que é observado em operárias de *A. mellifera*. Nessa última, a reprodução das operárias é controlada pela rainha. A reprodução por parte das operárias só ocorre na ausência ou senescência da rainha, nessa condição as operárias de *A. mellifera* ativam os ovários e produzem ovos haplóides que se desenvolvem em machos (Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015). Exceção para essa regra em *A. mellifera* é vista apenas em linhagens

anarquistas (Oldroyd *et al.*, 1994; Barron & Oldroyd, 2001). (3) Finalmente, por esse estudo permitir produzir conhecimento do ponto de vista molecular para as espécies nativas sem ferrão, que em comparação a *A. mellifera*, ainda são bastante limitados. Esse tipo de conhecimento é o passo inicial para propor estratégias de manejo e conservação das espécies nativas. Além disso, o conhecimento gerado poderá ser usado em pesquisas comparativas que buscam compreender a evolução dos comportamentos eussociais nesses grupos de abelhas, tema de constante debate e de interesse amplo na comunidade científica.

Os resultados dessa tese de doutorado estão organizados em dois capítulos. O primeiro tem como foco principal detalhar o processo reprodutivo em operárias da espécie *S. bipunctata*, por meio da morfologia ovariana e dados transcriptômicos parciais. No segundo capítulo é dada ênfase sobre os resultados dos transcriptomas como um todo. Comparamos o perfil de expressão dos ovários e do corpo gorduroso em diferentes fases do desenvolvimento adulto de rainhas e operárias de *S. bipunctata*, com o objetivo de estabelecer o perfil de expressão gênica durante o processo de ativação e inativação dos ovários nas diferentes castas dessa espécie.

2. REFERÊNCIAS

- Akahira Y, Sakagami SF, Zucchi R. 1970. Die Nähreier von Arbeiterinnen einer stachellosen Biene, *Trigona (Scaptotrigona) postica*, die von der Königin kurz vor der eigenen Eiablage gefressen warden. *Sonderdruck aus Zoologischer Anzeiger* 185: 85–93.
- Almeida EAB, Porto DS. 2014. Investigating eusociality in bees while trusting uncertainty. *Sociobiology* 61: 355–368.
- Barron AB, Oldroyd BP. 2001. Social regulation of ovary activation in ‘anarchistic’ honeybees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49: 214–219.
- Beig D. 1972. The production of males in queen right colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apicultural Research* 11: 33–39.
- Boleli IC, Simões ZLP, Gentile-Bitondi MM. 1999. Cell death in the ovaries cause permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. *Journal of Morphology* 242: 271–282.
- Bueno FGB, Gloag R, Latty T, Ronai I. 2020. Irreversible sterility of workers and high-volume egg production by queens in the stingless bee *Tetragonula carbonaria*. *Journal of Experimental Biology* 223: jeb230599.
- Camargo JMF, Pedro SRM. 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* 23: 509–522.
- Cruz-Landim C, Reginato, RD, Imperatriz-Fonseca VL. 1998. Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queens, with comments on ovary development and caste differentiation. *Papéis Avulsos de Zoologia* 40: 289–296.
- Hartfelder K, Steinbrück G. 1997. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invertebrate Reproduction and Development* 31: 237–250.
- Koedam D, Velthuis HHW, Dohmen MR, Imperatriz Fonseca VL. 2001. The behaviour of laying workers and the morphology and viability of their eggs in *Melipona bicolor bicolor*. *Physiological Entomology* 26: 254–259
- Lacerda LM, Simões ZLP. 2006. Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados. *Iheringia* 96: 89–93.

- Luna-Lucena D, Rabico F, Simoes ZLP. 2019. Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Current Opinion in Insect Science* 31: 20–28.
- Martins GF, Serrão JE. 2004. A comparative study of the ovaries in some Brazilian bees (Hymenoptera; Apoidea). *Papéis Avulsos de Zoologia* 44: 45–53.
- Melo GAR. 2020. “Stingless bees (Meliponini)”, in Encyclopedia of Social Insects, ed. C. K. Starr (Springer, Berlin).
- Michener CD. 2007. The Bees of the World. John Hopkins University Press.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM, Crozler RH. 1994. Anarchy in the beehive. *Nature* 371: 749.
- Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. 1990. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology* 79: 31–38.
- Rembold H. 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry* 17: 1003–1006.
- Ronai I, Barton DA, Oldroyd BP, Vergoz V. 2015. Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death. *Journal of Insect Physiology* 81: 36–41.
- Santos TCA, Cruz-Landim C. 2002. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 703–714.
- Schmidt-Capella IC, Hartfelder K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology* 44: 385–391.
- Silva-Matos EV, Noll FB, Mateus S, Zucchi R. 2006. Non-ovipositing nurse workers with developed ovaries in *Trigona cilipes cilipes* (Hymenoptera, Meliponini). *Journal of Morphological Sciences* 23: 343–347.
- Staurengo da Cunha MA. 1979. Ovarian development in *Scaptotrigona postica* Latr. 1807 (Hym.: Apidae) II. A quantitative study. *Insectes Sociaux* 26: 196–203.
- Tanaka ED, Hartfelder K. 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Structure and Development* 33: 431–442.

Terada Y. 1974. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia varia* (Hym. Apidae). Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

CAPÍTULO 1

Integrando morfologia ovariana e dados transcriptômicos
para lançar luz sobre o processo da oogênese em
Scaptotrigona bipunctata (Lepelletier)

1. INTRODUÇÃO

A eussocialidade é um evento raro, mas bem sucedido. Embora essa organização seja altamente coesiva, cada grupo nessa sociedade desempenha um papel específico, como exemplo, o trabalho reprodutivo. Este, de responsabilidade do indivíduo fértil da colônia, a rainha. As fêmeas não reprodutoras, as operárias, realizam todo o cuidado parental, como a construção do ninho, aprovisionamento, defesa e cuidado com a cria, atividades que desempenham ao longo de suas vidas em sincronia com a idade (Wilson, 1971; 1990). Nas abelhas altamente eussociais das tribos Apini e Meliponini, a casta operária pode ser estéril ou ter sua capacidade reprodutiva reduzida se comparada às rainhas (ver Luna-Lucena *et al.*, 2019). Em *Apis mellifera*, os ovários das operárias sofrem redução de até 90% no número dos ovários, unidades funcionais dos ovários, e apresentam um encurtamento estrutural na região do germário, local dos *clusters* de cistócitos (Hartfelder & Steinbrück, 1997). Em *Scaptotrigona postica*, tanto rainhas como operárias, apresentam apenas quatro ovários por ovário, porém, eles são comparativamente mais curtos nas operárias (Santos & Cruz-Landim, 2002). O receptáculo seminal (espermateca) em operárias dessas espécies é apenas vestigial, o que impede o armazenamento de esperma nessa casta. Apesar de estudos filogenéticos mais recentes apontarem para o surgimento independente da eussocialidade nas linhagens dos Apini e Meliponini (Danforth *et al.*, 2013; Bossert *et al.*, 2019; outras interpretações sobre as relações filogenéticas das abelhas corbiculadas são discutidas por Porto & Almeida, 2021), um mecanismo comum parece reger a capacidade reprodutiva das operárias, denominado morte celular programada (PCD). Esse mecanismo ocorre em ambas as castas, mas se apresenta com mais intensidade na casta operária (Hartfelder & Steinbrück, 1997; Santos & Cruz-Landim, 2002; Schmidt Capella & Hartfelder, 1998). Em *A. mellifera*, esse mecanismo atua nos estágios iniciais do desenvolvimento, sendo desencadeado por estímulos nutricionais que resultam em diferenças hormonais entre as castas (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990). O resultado mais visível desse desenvolvimento diferencial é o dimorfismo dos ovários de rainhas e operárias (Hartfelder *et al.*, 2018).

As operárias de espécies altamente eussociais têm capacidade reprodutiva limitada, mas podem ter sucesso no progresso da oogênese. Em *A. mellifera*, as operárias podem reproduzir na ausência da rainha e do seu ferômonio (*queen mandibular pheromone* – QMP)

(Winston, 1987; Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015), ou até mesmo, na presença de uma rainha fértil. Essa última situação é rara e representada por operárias denominadas *anarchists* (Oldroyd *et al.*, 1994). Na comparação entre o fenótipo anarquista e as operárias selvagens, foi identificado o gene *anarchy* como um forte candidato a regular o estado reprodutivo dos ovários em operárias adultas (Thompson *et al.*, 2006; Cardoen *et al.*, 2011; Ronai *et al.*, 2016). A expressão de *anarchy* é aumentada em ovários de operárias que estão sob a influência de uma rainha, o que sugere a relação desse gene com o mecanismo de morte celular programada. Além disso, foi verificado que *anarchy* pode alterar a expressão de *buffy* (Ronai *et al.*, 2016), gene conhecido como um dos reguladores da morte celular (Tanner *et al.*, 2011; Dallacqua & Bitondi, 2014). Outro gene que diferencia operárias selvagens do fenótipo anarquista é *vitelogenina*, gene que marca o status reprodutivo nas fêmeas de insetos (Engels, 1974; Scott *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2009; Tokar *et al.*, 2014). Esse gene se mostrou altamente expresso no abdômen de operárias que escapam do controle da rainha se comparado às operárias selvagens (Thompson *et al.*, 2008). *Vasa*, gene conhecido como marcador da linhagem germinativa (Fujiwara, 1994), tem o seu papel na diferenciação de casta em espécies eussociais (Warner *et al.*, 2019), bem como, é capaz de diferenciar o status reprodutivo quando operárias com ovários inativados e ativados são comparadas, apresentando maior expressão em operárias reprodutivas (Cardoen *et al.*, 2011).

As abelhas sem ferrão (Meliponini) é um grupo diverso com cerca de 550 espécies e representa um dos pináculos da eussocialidade (Ascher & Pickering, 2018; Melo, 2020). Em relação ao comportamento reprodutivo de suas operárias, a ativação dos ovários e a postura de ovos por essa casta é a regra e não exceção como caracterizado em *A. mellifera* (Hartfelder *et al.*, 2018; Gruter, 2018; Luna-Lucena *et al.*, 2019). Muitos trabalhos comportamentais foram publicados em relação ao processo de provisionamento das células de cria e eventos de oviposição — POP (*e.g.*, Sakagami, 1982; Zucchi *et al.*, 1999; Tóth *et al.*, 2004). No entanto, o conhecimento sobre a oogênese e os mecanismos moleculares que atuam na ativação e inativação dos ovários de rainhas e operárias dessas espécies ainda são escassos. Um esforço inicial em relação a esses aspectos foi feito para a espécie *Melipona quadrifasciata* (Tanaka *et al.*, 2009; Tanaka & Hartfelder, 2009). Esses estudos descreveram como os ovários dessa espécie estão organizados estruturalmente em rainhas e operárias e

documentaram etapas da oogênese. A hibridização *in situ* em ovariolos de *M. quadrifasciata* mostrou a expressão de *vasa* em rainhas (Tanaka & Hartfelder, 2009). Até o momento, a espécie do gênero *Scaptotrigona* mais bem estudada quanto a aspectos morfológicos dos ovários e o comportamento de suas operárias é *S. postica*. Com base na proximidade filogenética entre as espécies, supõe-se que as operárias de *S. bipunctata* compartilham muitas das características reprodutivas descritas para a espécie *S. postica*, a exemplo da morfologia dos ovários e do comportamento reprodutivo (Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1979; Santos & Cruz-Landim, 2002; Cruz-Landim, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo desse estudo foi investigar a oogênese e os mecanismos moleculares envolvidos na ativação e inativação dos ovários de uma espécie de abelha nativa sem ferrão, *Scaptotrigona bipunctata*.

2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, o presente estudo objetivou:

- Estudar a morfologia dos ovários de operárias de *S. bipunctata* em três fases do desenvolvimento adulto: operárias recém-emergidas, operárias com sete dias de idade (nutridoras) e operárias forrageiras;
- Determinar como está organizado estruturalmente os ovários de operárias de *S. bipunctata*;
- Investigar em que fase do desenvolvimento adulto as operárias de *S. bipunctata* ativam os ovários e quando o potencial reprodutivo finda nessa casta;
- Investigar o número de operárias que ativam os ovários em uma colônia e classificar os diferentes estágios da oogênese (grau de ativação dos ovários) em operárias de *S. bipunctata*;
- Investigar a localização das células germinativas nos ovários de operárias com potencial reprodutivo, através da imunolocalização de *Vasa* nos ovariolos dessa casta;

- Resgatar os valores de expressão de *vitelogenina*, *anarchy* e *vasa* dos transcriptomas produzidos de ovários e corpo gorduroso de *S. bipunctata* para verificar se esses genes são marcadores do estado reprodutivo de operárias dessa espécie, assim como ocorre em *A. mellifera* e outras fêmeas reprodutivas de insetos;
- Validar a expressão de *vasa* detectada nos transcriptomas de ovário de *S. bipunctata* através da imunohistoquímica;
- Validar a expressão de *vg* detectada nos transcriptomas de corpo gorduroso através de PCR convencional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Fêmeas de *Scaptotrigona bipunctata* foram obtidas de uma colônia da região sudeste do Brasil (Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, coordenadas geográficas: 21°10'12.2''S 47°51'34.2''W).

3.2 Classificação das operárias adultas de *S. bipunctata* com base na morfologia dos ovários

A identificação e classificação da fase da vida adulta em que as operárias de *S. bipunctata* ativam seus ovários foi baseada em um estudo prévio (dados não mostrados) onde abelhas recém-emergidas (<24h) e com 3, 5, 7, 9, 14 e 20 dias de idade tiveram seus ovários dissecados e classificados quanto à ativação. Nessa análise, um conjunto de células de cria com indivíduos próximos a eclodir foram retirados da colônia e mantidos em incubadora a 28°C. No dia seguinte à incubação, um conjunto de fêmeas com no máximo 24h de idade tiveram sua morfologia ovariana investigada quanto a presença de ovócitos, e o restante das fêmeas recém-emergidas recebeu uma marca de tinta indelével no tórax (Posca Posta, Japão) e foi devolvido a sua colônia de origem para análises posteriores, como planejado. Nas idades citadas previamente, as operárias foram coletadas, seus ovários foram dissecados em solução salina fisiológica e fixados por 20 minutos em paraformaldeído 4%, em PBS 1X. Os núcleos foram marcados com DAPI (Sigma, concentração 1:2000) e os filamentos de F-actina foram marcados com Faloidina (Alexa Fluor™, 488 Phalloidin, concentração 1:300), conforme

descrito em Ramos *et al.* (2010), exceto pela concentração da Faloidina. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica TCS SP5. Após análises das imagens, as fases de vida adulta escolhidas para a continuação do estudo foram: operárias recém-emergidas (W_NEW), por estarem no início da ativação dos ovários e operárias nutridoras com sete dias (W_SEV), nessa idade foi observado um grande número de ovócitos em desenvolvimento. Além dessas duas idades mencionadas, foram utilizados também ovários de operárias forrageiras. Foram consideradas operárias forrageiras as que retornavam ao ninho com pólen na corbícula (W_FOR). Para investigar se todas operárias de *S. bipunctata* ativam seus ovários, nós investigamos a morfologia ovariana de 84 operárias com sete dias de idade. Das 84 operárias investigadas, todas apresentavam ovários ativos, com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Esses dados foram usados para a caracterização dos diferentes estágios da oogênese em operárias de *S. bipunctata*.

3.3 Preparação dos ovários para a imunohistoquímica

O protocolo usado para imunohistoquímica tomou como base o proposto por Valer *et al.* (2018), com algumas modificações. Foram dissecados ovários de operárias recém-emergidas e com sete dias. Ovários de *Drosophila melanogaster* foram usados como controle. O anticorpo usado foi produzido contra *D. melanogaster* (*vasa*, AB_760351 – *Developmental Studies Hybridoma Bank* - Aruna *et al.*, 2009). Os ovários foram dissecados com auxílio de pinças e estereomicroscópio em solução tampão PBS 1X gelado. A membrana peritoneal foi retirada e os ovaríolos foram individualizados. O material foi fixado em paraformaldeído 4% diluído em PBS 1X e deixado sob agitação por 20 minutos. Após essa etapa foram realizadas 5 lavagens com PBT (PBS 1X + 0,4% Triton X-100) para permeabilização. As lavagens seguiram intervalos de sete minutos. Todo o procedimento foi feito em banho de gelo. A seguir, o material foi incubado com anticorpo primário anti-*vasa*, diluído em PBS 1:50 e deixado a temperatura ambiente por três horas sob agitação. Em seguida os ovaríolos foram lavados por cinco vezes com PBS 1X, com intervalos de cinco minutos, seguidas de duas lavagens com PBT 0,2%, com intervalos de cinco minutos, sendo o material incubado com anticorpo secundário (Alexa Fluor 594 Anti-Rat, *Thermo Fisher Scientific*), diluído em PBT 0,2% (1:500) e deixado *overnight* a 4°C sob agitação. Após o término dessa etapa os ovaríolos

foram novamente lavados com PBS 1X por cinco vezes de cinco minutos. Em seguida, DAPI (Sigma, concentração 1:2000) foi usado para marcação dos núcleos e Faloidina (Alexa Fluor™, 488 Phalloidin, concentração 1:300) para marcação dos filamentos de F-actina. As amostras foram montadas em lâminas histológicas fazendo uso de meio de montagem comercial (SlowFade™). As imagens foram obtidas em microscópio confocal Leica TCS SP5.

3.4 Bioinformática

3.4.1 Transcriptomas consultados

O transcriptoma de *S. bipunctata* usado para a consulta consiste de três amostras biológicas independentes (triplicatas) para cada órgão e tecido (ovário e corpo gorduroso) e fases do desenvolvimento adulto de operárias dessa espécie (operárias recém-emergidas, com sete dias e forrageiras). A montagem do transcriptoma foi realizado seguindo o proposto por Morandi *et al.* (2018). Para análise de expressão diferencial foi usado o pacote DESeq2/BIOCONDUCTOR v3.12 (Love *et al.*, 2014) implementado em R. Para considerar genes diferencialmente expressos entre dois grupos de amostras, foram utilizados os seguintes critérios: (1) p-valor ajustado, $p_{adj} \leq 0,05$ e (2) \log_2 Fold-Change (\log_2FC) $< -1,0$ ou $> 1,0$.

3.4.2 Relação de ortologia e validação dos dados de expressão

A relação de ortologia entre as espécies *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata* foi inferida por alinhamentos BLASTP recíproco seguindo os parâmetros descrito por Bataglia *et al.* (2021). As sequências de aminoácidos dos genes: *wnt6*, *engrailed*, *traffic jam*, *vasa*, *corolla*, *bag of marbles*, *Orc1*, *wnt2*, *wnt4*, *patched*, *failed axons*, *Pdk1*, *GstS1*, *zfh1*, *broad*, *upd1*, *sli* e *CG46339*, citados na literatura como marcadores de tipos celulares específicos nos ovários de *D. melanogaster*, a exemplo de: células-tronco da linhagem germinativa (do inglês, *germline stem cells*: GSCs) e sua progênie, células-tronco foliculares (do inglês, *follicle stem cells*: FSCs), células pré-foliculares (do inglês, *prefollicle cells*: pFCs), células cap (do inglês, *cap cells*: CC), células de escolta (do inglês, *escort cells*: ECs), células polares, assim denominadas por estarem no polo posterior do ovócito (do inglês, *polar cells*:

PC) e células do pedúnculo (do inglês, *stalk cell*: stalk) (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015; Panchal *et al.*, 2017; Jevitt *et al.*, 2020; Rust *et al.*, 2021; Slaidina *et al.*, 2021), foram recuperadas em formato FASTA do banco de dados *flybase* (<https://flybase.org/>). A sequência de genes citados na literatura como importantes para a formação do plasma germinativo em *D. melanogaster*, a exemplo de *vasa*, *tudor*, *aubergine*, *pumilio*, *nanos*, *piwi*, *armitage*, *maelstrom*, *bruno*, *cappucino*, *cyclin B*, *germ cell less*, *mago nashi*, *oo18 RNA-binding*, *pipsqueak*, *spire*, *staufen*, *valois*, *cup* e o domínio LOTUS de *oskar*, também foram recuperadas (Voronina *et al.*, 2011; Trcek & Lehmann, 2019; Whittle & Extavour, 2019). As sequências FASTA foram usadas como *input* para alinhamentos do tipo BLASTP contra a base de dados do GenBank-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para recuperar os ortólogos desses genes em *A. mellifera*, que representa a espécie de abelha com o genoma mais bem anotado. Em seguida, as sequências de aminoácidos de cada um desses genes encontrados para *A. mellifera* foram utilizadas para a busca de ortólogos correspondentes em *S. bipunctata*. Para essa última espécie, as sequências dos genes foram recuperadas por meio de alinhamentos (tBLASTn) contra um banco de dados interno do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA), em que os transcriptomas de *S. bipunctata* estão depositados. Em seguida, utilizando os identificadores (IDs) dos genes obtidos, foi recuperada a sequência de aminoácido no formato FASTA de cada gene de interesse. Para validação desses resultados, as sequências de aminoácidos de *S. bipunctata* foram usadas como *input* para alinhamentos do tipo BLASTP contra a base de dados do GenBank-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a relação de ortologia entre *A. mellifera* e *S. bipunctata* foi confirmada. Após a confirmação dos ortólogos em *S. bipunctata*, os identificadores desses genes foram pesquisados nas tabelas de expressão resultante da análise realizada com DESeq2, para checar se estavam presentes nos transcriptomas de ovários de operárias. Os genes discutidos como marcadores do estado reprodutivo das operárias de *S. bipunctata*, como *anarchy*, *vitelogenina* e *vasa*, foram obtidos da mesma forma. Esses últimos genes tiveram seus valores de expressão ($\log_2\text{FoldChange} - \log_2\text{FC}$) e o valor de p ajustado (padj) consultados nos transcriptomas de ovários e corpo gorduroso de operárias de *S. bipunctata* nas diferentes fases do desenvolvimento adulto aqui estudadas: recém-emergidas, sete dias de idade e forrageiras. A expressão de *vitelogenina* detectada no transcriptoma de corpo gorduroso de

operárias de *S. bipunctata* foi validada por RT-PCR (Material Suplementar, Figura S1). A expressão do gene *vasa* no transcriptoma de ovários das operárias foi validada por meio da imunohistoquímica como descrito previamente.

4. RESULTADOS

4.1 Estrutura dos ovários de operárias de *Scaptotrigona bipunctata*

O sistema reprodutivo de operárias de *S. bipunctata* é composto por um par de ovários simétricos, com quatro ovaríolos por ovário (Figura 1. A, D). As estruturas que podem ser reconhecidas nos ovários das operárias de *S. bipunctata*, à exemplo de cada ovócito acompanhado por sua própria câmara nutridora (Figura 1. B, D, E), permite classificá-los como meroístico politrófico (Bilinsk, 1998). Ao emergirem das células de cria as operárias apresentam ovaríolos ativados, com três regiões claramente distintas: filamento terminal (Figura 1. C, seta), germário (Figura 1. C, cabeça de seta amarela) e vitelário (Figura 1. B). Tais regiões também podem ser observadas em operárias com sete dias (Figura 1. F, D, E). De maneira geral, a morfologia apresentada pelas operárias dessa espécie se assemelha ao descrito por Santos & Cruz-Landim (2002) para *S. postica*, exceto pela presença em *S. bipunctata* de um filamento terminal longo e outras particularidades que apresentaremos nesse estudo e que representam novidades até o momento não descritas para abelhas.

4.2 Filamento terminal, germário e vitelário de operárias recém-emergidas e com sete dias

4.2.1 Filamento terminal

Detalhes da região anterior dos ovaríolos mostram que o filamento terminal de operárias *S. bipunctata* é constituído por uma única fileira de células com núcleos arredondados (Figura 2. D-F, seta a direita em D) e na região posterior, próximo ao local de transição entre filamento terminal e germário é formado por duas fileiras de células com núcleos maiores (Figura 2. D-F, cabeça de seta em D). Operárias recém-emergidas (W_NEW) (Figura 1. C, C') e operárias com sete dias (W_SEV) (Figura 1. F, F') apresentam a mesma morfologia do filamento terminal. Essa organização morfológica também foi descrita por Cruz-Landim (2009, ver Figura 1.20 D) para rainhas virgens de *S. postica*.

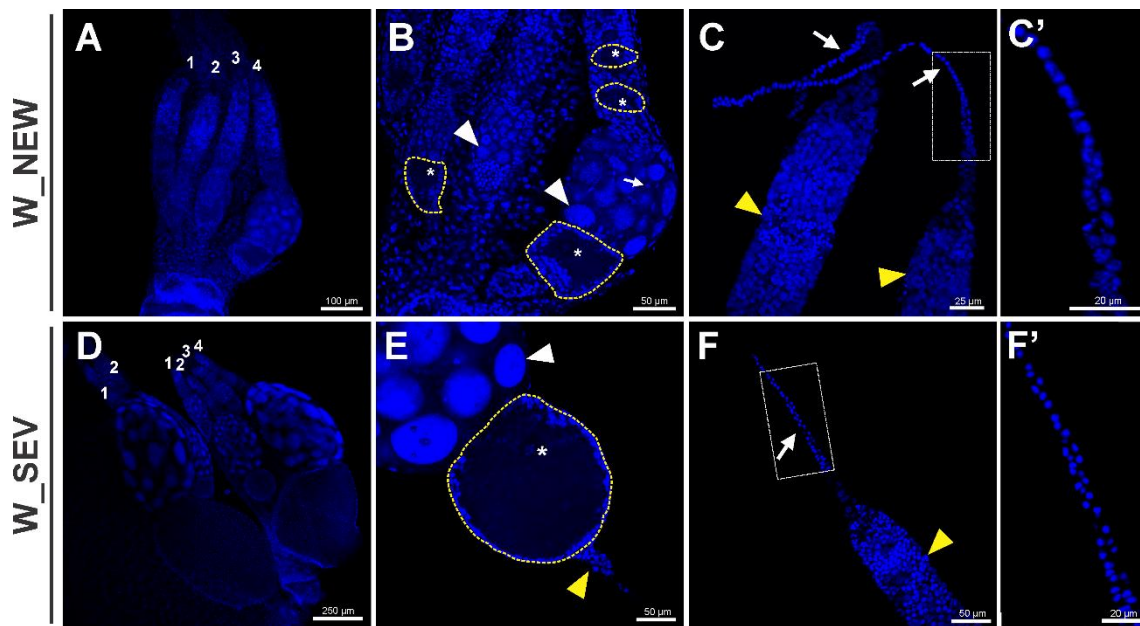


Figura 1. Morfologia dos ovários de operárias de *S. bipunctata* com potencial reprodutivo. (A) Visão geral do ovário de uma operária recém-emergida (W_NEW), os quatro ovaríolos por ovário estão indicados (números 1 a 4). (B) Detalhes mostram ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento: núcleo (*), câmaras nutridoras (cabeça de seta branca), especificação do ovócito na região mais anterior do germário e câmaras ovocíticas presentes no vitelário estão indicados (círculo tracejado). (C) Filamento terminal (seta) e germário (cabeça de seta amarela). (C') Detalhes do inserto apontado em (C), mostra a organização das células do filamento terminal. (D) Visão geral dos ovários de uma operária com sete dias (W_SEV). Ovaríolos com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento estão indicados (por números). Em (E) é possível observar câmara nutridora (cabeça de seta branca), câmara ovocítica envolta por células foliculares (círculo tracejado) e núcleo do ovócito (*). (F) Filamento terminal (seta) e germário (cabeça de seta amarela). (F') Detalhes do inserto indicado em (F), mostra a organização das células do filamento terminal nas operárias com sete dias. Núcleos corados com DAPI. Obtenção das imagens: microscópio Leica SP5 confocal.

4.2.2 Germário

Na área de transição entre o filamento terminal e o germário anterior (região 1 do germário) de operárias recém-emergida (Figura 2. A-C) e com sete dias (Figura 2. D-I) pode ser observado células com características de células-tronco da linhagem germinativa (GSCs) e os cistoblastos (CB). Essas células possuem núcleos maiores e uma estrutura arredondada enriquecida com F-actina que lembra um *spectrosome*, uma versão esférica do fusoma (Figura 2. B,C em W_NEW), (Figura 2. E,F; Material Suplementar, Figura S2. B,C em W_SEV), estrutura específica da linhagem germinativa (Lin *et al.*, 1994; Lighthouse *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2010).

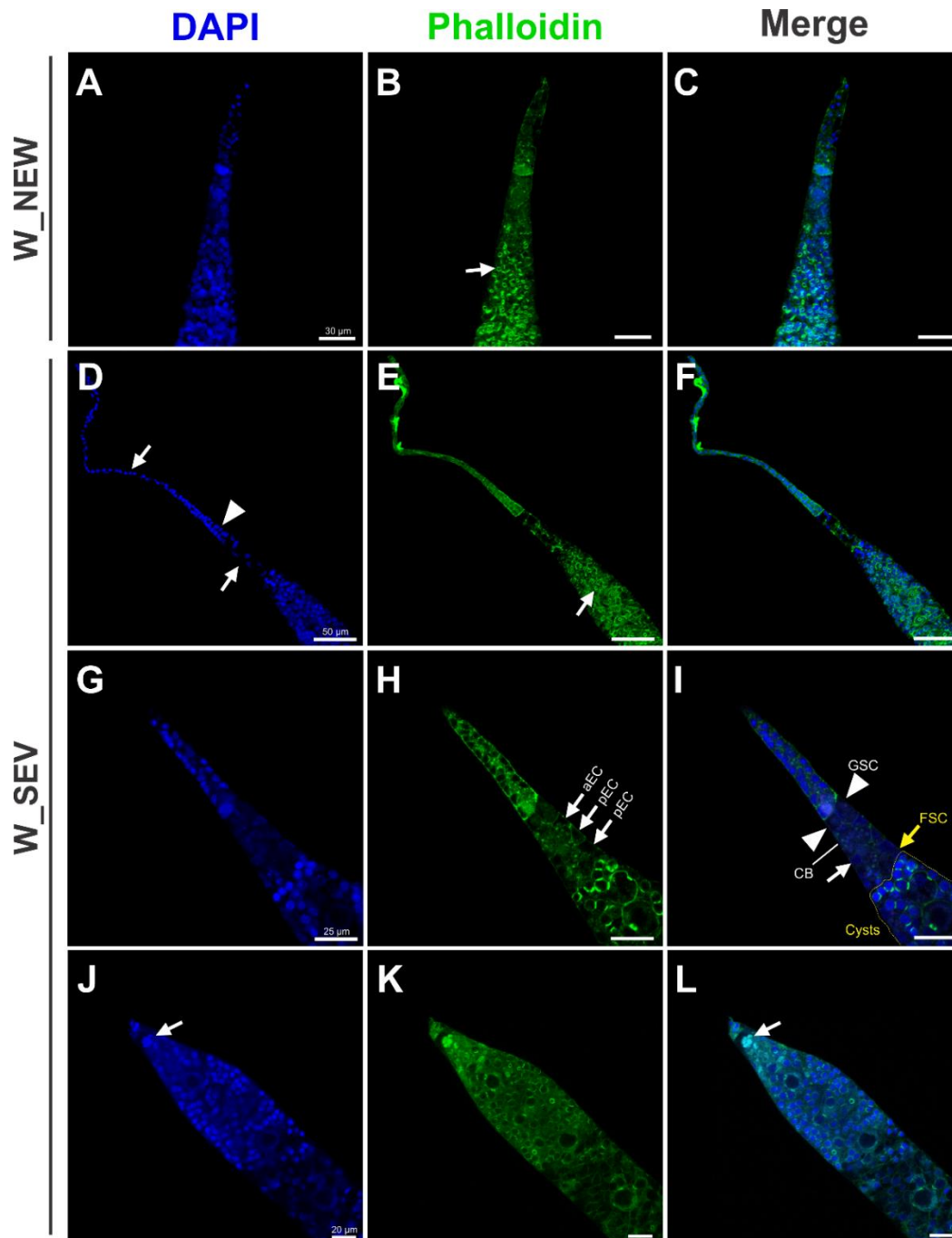


Figura 2. Detalhes morfológicos da região anterior dos ovaríolos de operárias de *S. bipunctata*, recém-emergidas (W_NEW) e com sete dias de idade (W_SEV). (A, C) Região com grandes núcleos (azul – Dapi) no germário anterior marca o local das células-tronco da linhagem germinativa (GSCs). (B, C) Forma que o fusoma pode se apresentar. A parte mais anterior do ovaríolo possui uma forma arredondada (pontos enriquecidos com F-actina – verde), seta em (B) mostra a transformação do fusoma em canais em anel. (D–F) Organização do filamento terminal e germário anterior de W_SEV. (D), seta à esquerda aponta o local das GSCs e sua progênie no germário, cabeça de seta indica a fileira dupla de células do filamento terminal, seta à direita indica a fileira única de células que compõe o filamento terminal. (E, F) A marcação dos filamentos de F-actina mostra um fusoma ramificado localizado acima do local do aparecimento dos canais em anel, este último indicado por seta em (E). (G–I) Detalhes do germário em que as GSCs, cistoblasto (CB) e células de escolta/escort (ECs) estão visíveis. (H) setas indicam a forma triangular das células de escolta anterior (aEC) e posteriores (pEC). (I) estão indicados as células-tronco da linhagem germinativa (GSCs), cistoblasto (CB), célula de escolta (EC, seta branca) e célula-tronco folicular (FSC), localizada abaixo das pEC. Ainda em (I) é possível observar o local da formação do cisto (tracejado em amarelo). (J–L) conjunto de células *cap* são indicados por setas, na região mais anterior do germário. Núcleos celulares foram corados com DAPI e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina. Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

Essa estrutura também está presente nas células do filamento terminal (Figura 2. H,I; Figura 3. E,F). Ainda nessa região, descrevemos pela primeira vez a presença dos seguintes tipos celulares: células *cap* (CC) e células de escolta (ECs). Essas últimas podem ser divididas em células de escolta anteriores (aEC) e posteriores (pEC). Células CC e as células de escolta (aEC e pEC), estão presentes no germário anterior de *Drosophila melanogaster* e são importantes para a manutenção do nicho das células-tronco da linhagem germinativa (Margolis & Spradling, 1995; Decotto & Spradling, 2005; Panchal *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2020). Uma análise da mesma região dos ovários das operárias de *S. bipunctata* mostrou estrutura semelhante e a presença dos mesmos tipos celulares (CC Figura 2. J-L, seta em J,L; ECs Figura 2. G-I setas em H, seta branca em I). Na Figura 2 (G-I) é possível observar que a célula de escolta anterior (aEC) ancora uma célula-tronco da linhagem germinativa (GSC) (cabeça de seta) similar ao que foi descrito por Wang & Page-McCaw (2018) nos ovários de *D. melanogaster*. É bem provável que as células-tronco foliculares (FSCs) se encontrem logo abaixo das células de escolta posteriores (pEC) indicada na Figura 2 (G e I, seta amarela em I). Essas células em *D. melanogaster* produzem as células pré-foliculares (pFCs) que mais tarde se diferenciam em células polares (PC), células do pedúnculo (*stalk*), e nas diferentes populações de células foliculares do corpo principal (Margolis & Spradling, 1995; Horne-Badovinac & Bilder, 2005; Rust *et al.*, 2021). Recentemente, foi verificado que as FSCs também produzem as ECs (Reilein *et al.*, 2017), e que a diferenciação das FSCs em EC ou pFCs está sob a influência da atividade das vias *JAK-STAT* e *Wnt* (Melamed & Kalderon, 2020). Na morfologia apresentada nesse estudo, também há uma sugestão da presença de uma célula recentemente descrita em *D. melanogaster* por Panchal *et al.* (2017), denominada célula de transição (do inglês, *transition cell*: TC) (Figura 3. A-C), que marca a transição entre germário e filamento terminal e expressa *traffic jam*. Detalhes dessa célula podem ser visualizados na Figura 3. D-F (cabeça de seta).

Clusters de cistócitos podem ser observados no germário (região 2a), logo após o local em que as CC, GSCs, CB, e ECs foram descritas (para localização ver Figura 2), se estendendo até a região intermediária do germário (2b). Nessas regiões, tanto em operárias recém-emergidas (Figura 2. A-C, seta em B), quanto em operárias com sete dias (Figura 2. D-F, seta em E; Figura 3. A-C, seta em B) podem ser observados os canais em anel resultantes

de citocineses incompletas, características desse processo (Mahajan-Miklos & Cooley, 1994; Eastin *et al.*, 2020). Os canais em anel permitem conexões intercelulares estáveis e permitem o fluxo de RNAs e proteínas dos trofócitos, ou células nutridoras (do inglês: *nurses cells*) para o ovócito em desenvolvimento (Mahajan-Miklos & Cooley, 1994). Na Figura 2. G-I, área marcada em amarelo delimita a formação do cisto e a especificação de dois pró-ovócitos, uma dessas células será o futuro ovócito, enquanto as outras células se diferenciarão em células nutridoras/trofócitos.

Na região 2b ocorre a encapsulação do cisto por células pré-foliculares (pFCs) (Figura 3. G-I, setas em I), esse evento da oogênese em *D. melanogaster* é descrito como crucial e defeitos nessa etapa causa esterilidade (Chanet & Huynh, 2020). Na região final do germário (região 3) é possível observar que o ovócito assume uma localização abaixo das células nutridoras (posterior), o que sugere o início da formação do eixo ântero-posterior da câmara de ovos (Figura 3. G-I, seta em H). Na Figura 3 também podem ser visualizadas outras células derivadas das pFCs a exemplo das células polares (PC) (Figura 3. J-L, setas em J,L) e células do pedúnculo (*stalk*) (Figura 3. G-L, cabeça de seta), que em *D. melanogaster* separam cistos adjacentes e marcam o estabelecimento do eixo ântero-posterior do ovócito (Horne-Badovinac & Bilder, 2005; Grammont & Irvine, 2002). Tanto as células polares, como as células do pedúnculo localizadas entre as câmaras de ovos representam novidades morfológicas para os ovários das abelhas.

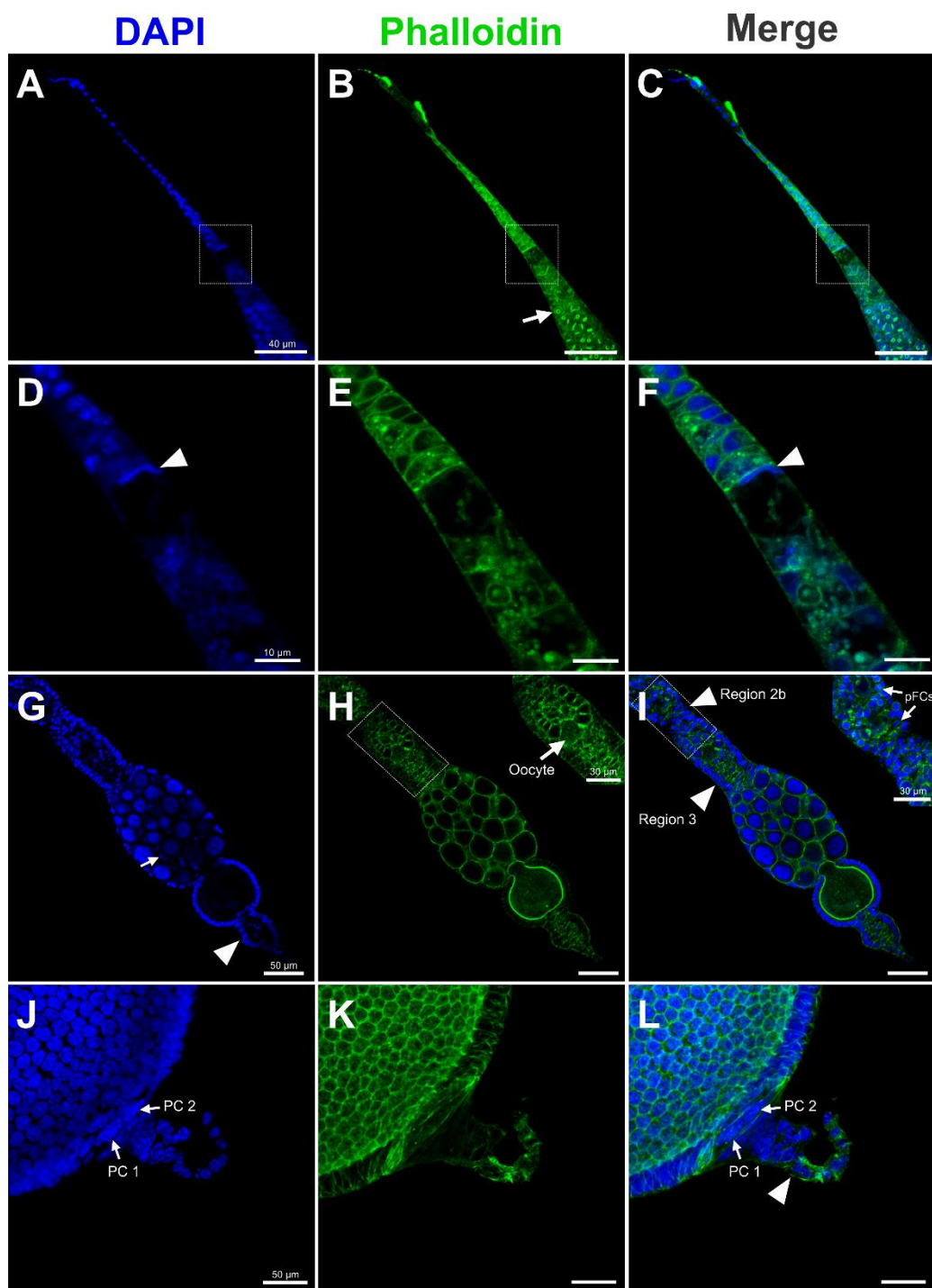


Figura 3. Detalhes morfológicos da região anterior e posterior de ovaríolos de operárias de *S. bipunctata*. (A-C) Quadrado tracejado indica a demarcação da área de transição entre filamento terminal e germário anterior, em (B) seta aponta os canais em anel. (D-F) Detalhes da região do inserto de (A-C), a célula de transição (*transition cell*) é indicada por uma cabeça de seta. (G-I) Região 2b e 3 do germário e região do vitelário. (G, I) Se observa as células somáticas (*stretched cell*) que se intercalam entre as células trofocíticas da câmara nutridora na região do vitelário, seta em (G). (H) Início da formação de uma câmara de ovos, o inserto em (H), mostra que o ovócito já assumiu uma posição posterior (seta). (I) Região 2b (cabeça de seta), no inserto setas apontam as células pré-foliculares. (I, L) Células do pedunculo (*stalk cell*) estão apontadas por cabeça de seta. (J-L) Polo posterior de um ovócito em estágio de vitelogênese. (J, L) Células polares (polar cells) PC1 e PC2 estão indicadas por setas. Núcleos celulares foram corados com DAPI e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina. Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

Para alcançar um melhor entendimento dos achados relativos à morfologia dos ovários e provável associação com a capacidade reprodutiva da espécie, fizemos uma busca por gene ortólogos nos transcriptomas de ovários de operárias de *S. bipunctata*. Dessa maneira, recuperamos aqueles descritos em *D. melanogaster* como marcadores dos seguintes tipos celulares: CC, GSCs, CB, EC, FSCs, pFCs, PC e células do pedúnculo. Tais ortólogos também foram identificados no genoma de *A. mellifera* (Tabela 1). Esses marcadores foram obtidos principalmente ao consultar atlas de ovário de fêmeas adultas de *D. melanogaster* publicados recentemente empregando a metodologia *single-cell* (ver referências na Tabela 1).

Tabela 1. Marcadores moleculares da atividade dos ovários e manutenção do nicho das células-tronco da linhagem germinativa, descritos em *D. melanogaster* e ocorrências em *A. mellifera* e *S. bipunctata*. (CC) células *cap*, (GSC) células-tronco da linhagem germinativa, (ECs) células de escolta (*escort cells*), (pFCs) células pré-foliculares, (PC) células polares (*polar cell*), (*Stalk*) células do pedúnculo, (FSCs) células-tronco foliculares (*follicle stem cells*). Genes marcadores estão abreviados como a seguir: *Wnt oncogene analog 6* (DWnt6/Wnt6*); *engrailed* (en); *traffic Jam* (tj); *vasa* (vas); *Origin recognition complex subunit 1* (Orc1); *bag of marbles* (bam); *Wnt oncogene analog 2* (DWnt2/Wnt7*); *Wnt oncogene analog 4* (DWnt4/Wnt9*); *patched* (ptc); *failed axons* (fax); *Phosphoinositide-dependent kinase 1* (Pdk1); *Glutathione S transferase S1* (GstS1); *Zn finger homeodomain 1* (zfh1); *broad* (br); *unpaired 1* (upd1); *slit* (sli).

Estrutura	Genes marcadores	<i>D. melanogaster</i> FlyBase ID	Refs.	<i>A. mellifera</i> GenBank ID	<i>S. bipunctata</i> ID transcriptomas de ovários
CCs	¹ DWnt6/Wnt6*	FBgn0031902	1, 2	XP_396945.4	TRINITY_DN3248_c1_g1
	en	FBgn0000577	2, 3	XP_026300726.1	TRINITY_DN4583_c0_g3
	tj	FBgn0000964	3, 4, 5	XP_006570975.1	TRINITY_DN423_c1_g2
GSCs	vas	FBgn0283442	2, 3	NP_001035345.1	TRINITY_DN3107_c1_g1
	Orc1	FBgn0286788	6	XP_392056.5	TRINITY_GG_1753_c1_g2
	corolla	FBgn0267967	3	ausente	ausente
	bam	FBgn0000158	3, 7	ausente	ausente
EC	DWnt2/Wnt7*	FBgn0004360	8	XP_016767924.1	TRINITY_DN848_c0_g2
	DWnt4/Wnt9*	FBgn0010453	3	ausente	ausente
	ptc	FBgn0003892	3, 6	XP_026296486.1	TRINITY_DN10727_c0_g2
	fax	FBgn0014163	3	XP_393141.2	TRINITY_DN2597_c4_g1
	Pdk1	FBgn0020386	3	XP_026299487.1	TRINITY_GG_1857_c10_g1
	GstS1	FBgn0010226	3	XP_026295805.1	TRINITY_DN4830_c0_g1
pFCs	zfh1	FBgn0004606	3	XP_016767323.1	TRINITY_GG_40_c12_g1
	br	FBgn0283451	3	NP_001035356.1	TRINITY_GG_2877_c1_g1
PC	upd1	FBgn0004956	3	ausente	ausente
	slit (sli)	FBgn0264089	7	XP_006561500.1	TRINITY_DN304_c2_g1
Stalk	CG46339	FBgn0285963	3	XP_006565538.1	TRINITY_DN971_c1_g1
FSCs	² GstS1, zfh1, DWnt4/Wnt9*		3		

¹Genes *Wnt* iniciados com D (DWnt) representam a forma como esses genes são denominados em *D. melanogaster*. Os *Wnt* com asterístico (Wnt*) são os ortólogos correspondentes em vertebrados (Murat *et al.*, 2010). ²Marcadores com sobreposição e já mencionados anteriormente na tabela. Referências: 1. Wang & Page-McCaw (2018); 2. Slaidina *et al.* (2020); 3. Rust *et al.* (2021); 4. Li *et al.* (2003); 5. Panchal *et al.* (2017); 6. Slaidina *et al.* (2021); 7. Jevitt *et al.* (2020); 8. Wang *et al.* (2015).

4.2.3 Vitelário

O vitelário pode ser visualizado na primeira constrição formada no ovaríolo, logo após região 3 do germário. Tal constrição representa a primeira câmara de ovos totalmente formada e com os compartimentos diferenciados, câmara nutridora e câmara ovocítica rodeada por uma camada de células foliculares (Figura 1. B; Figura 3. G-I). Em operárias de *S. bipunctata* também foi possível identificar células somáticas (do inglês: *stretched cell*) intercaladas entre as células trofocíticas da câmara nutridora (Figura 1. B, seta; Figura 3. G,I, seta em G). Essas células também ocupam essa posição nos ovários de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* (Ramamurty, 1977; Tanaka & Hartfelder, 2004; Tanaka *et al.*, 2009). Em *D. melanogaster* as células *stretched* orquestram eventos de morte celular das células nutridoras durante o desenvolvimento do ovócito (Lebo & McCall, 2021). Operárias recém-emergidas (0-24h) já apresentam em seu vitelário ovócitos em estágio pré-vitelogênicos (Figura 1. B). Em operárias com sete dias podem ser visualizados ovócitos em estágio de pré-vitelogênese, vitelogênese e corionogênese (Figura 1. D).

4.3 Estrutura dos ovários de operárias forrageiras

Para esse estudo foram consideradas abelhas forrageiras as que retornavam ao ninho com pólen na corbícula. A musculatura dos ovários de operárias forrageiras de *S. bipunctata* se apresenta desorganizada (Figura 4), quando comparada com a das abelhas jovens (Figura 5).

A túnica própria/bainha epitelial que individualiza os ovaríolos se encontra alterada a partir do germário médio e vitelário, nesse ponto não se observa mais a individualização dos ovaríolos (Figura 4. D-F, germário remanescente delimitado em amarelo). Fato comprovado também pela impossibilidade de dissociação dos ovaríolos ao dissecar o material, o que demonstra que a bainha epitelial está ausente. Além disso, a bainha peritonal falha em cobrir todo o ovário. Essas alterações na musculatura dos ovários podem ser observadas ao visualizar os filamentos de F – actina que apresentam padrões diferentes em ovários de operárias jovens (Figura 5. B, C; E, F) e operárias forrageiras (Figura 4. B, C; E, F; H, I; K, L).

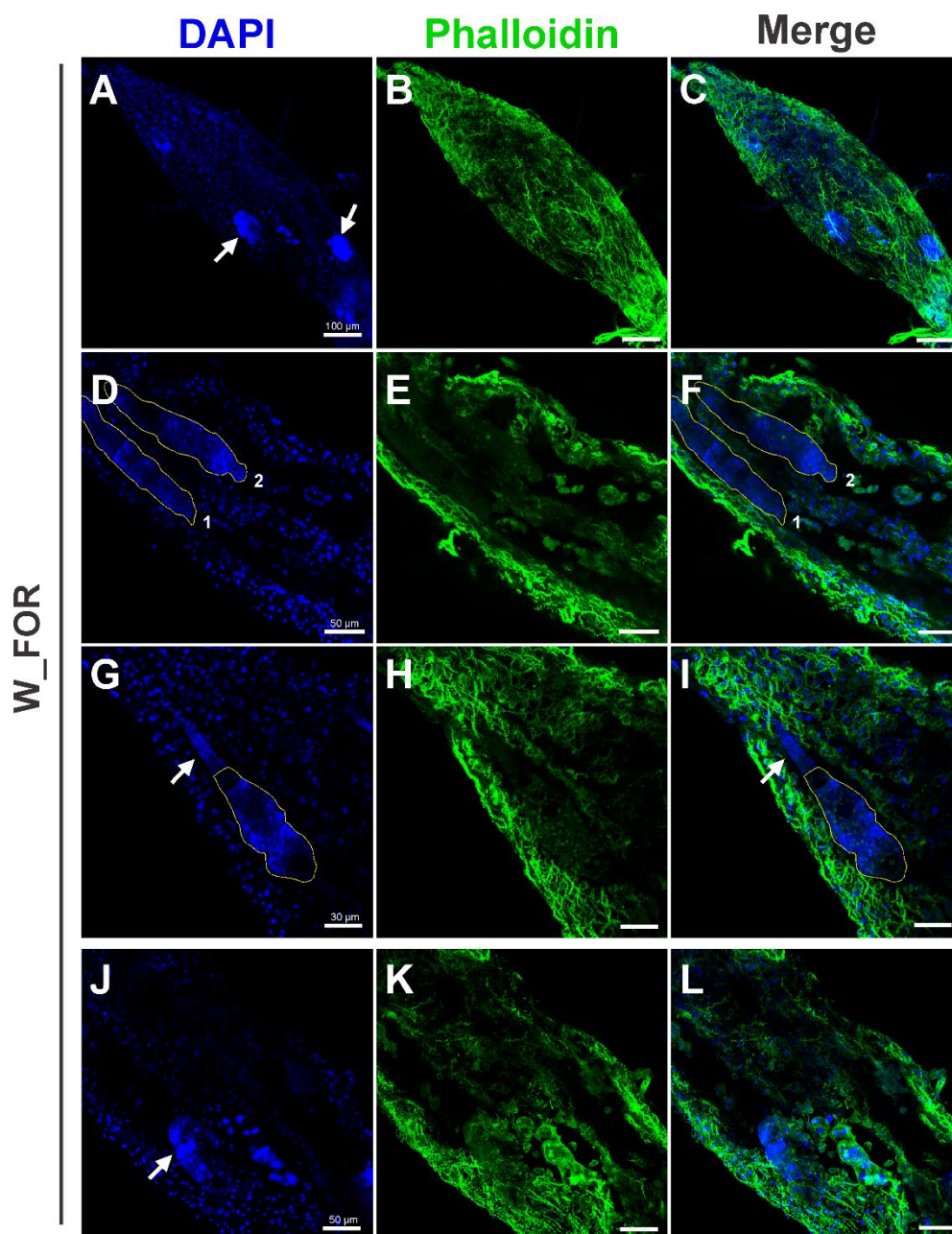


Figura 4. Morfologia dos ovários de operárias forrageiras. As imagens (A-L) mostram a desorganização/degeneração da morfologia ovariana de operárias forrageiras de *S. bipunctata*. (A-C) Visão geral do ovário de operárias nessa fase de vida, em (A) ovócitos com sinais claros de degeneração (reabsorção) estão indicados por setas. (D-F) Ovaríolos indicados por 1 e 2 ainda podem ser identificados, mas claramente em degeneração. O tracejado em amarelo delimita a parte anterior desses ovaríolos. A região posterior não pode ser identificada. (G,I) Ovaríolo (delimitado em amarelo) mostra a região do germário em que a formação do *cluster* de citócitos teve início, canais em anel ainda podem ser observados (corados pela Faloidina) dentro da área delimitada. Ainda em (G,I) resquícios do filamento terminal (seta). (J-L) parte posterior do ovário, região próxima ao oviduto totalmente degenerada. (J,L) Núcleos apoptóticos visualizados na marcados por DAPI, estão indicados por setas. (B, C, E, F, H, I, K, L) O padrão dos filamentos de F-actina mostra a degeneração/desorganização sofrida pela musculatura ovariana das operárias forrageiras. Núcleos foram corados com DAPI e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina. Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

Nessas últimas, a morfologia dos ovários evidencia que operárias forrageiras de *S. bipunctata* podem perder ovaríolos inteiros, visto que entre as abelhas analisadas foram encontrados ovários com apenas dois ovaríolos, estes parcialmente destruídos (Figura 4. D-F; Material Suplementar, Figura S2. D-F). A degeneração dos ovários provavelmente ocorre da parte posterior (Figura 4. J-L) (próximo ao oviduto) para a anterior (Figura 4. D-F; Material Suplementar, Figura S2. D-F) (filamento terminal). Nessa fase do desenvolvimento adulto, também é possível observar a degeneração dos ovócitos em diferentes locais do ovário, desde o germário até o oviduto (Figura 4. A-C, seta em A; J-L, seta em J; Material Suplementar, Figura S2. G-I, setas em G,I). Apesar de em algumas abelhas forrageiras o germário (delimitado em amarelo) e o filamento terminal (seta) aparentarem uma certa preservação (Figura 4. G-I), nenhuma operária forrageira analisada apresenta câmara de ovos desenvolvida.

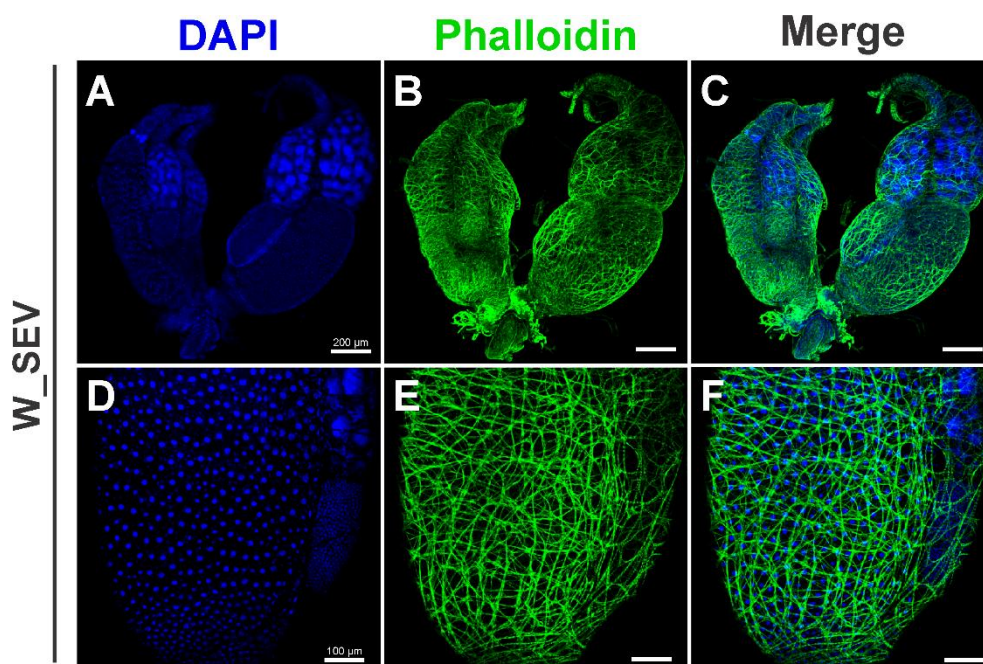


Figura 5. Musculatura do ovário de operárias jovens, com potencial reprodutivo. (A-F) Ovários de operárias com sete dias (W_SEV) sem a individualização dos ovaríolos, ou seja, sem a remoção da bainha peritonial. Essa visão geral dos ovários mostra câmaras nutridoras e ovocíticas normais. (B, C, E, F) o padrão dos filamentos de F-actina revela uma musculatura organizada (íntegra) que reveste todo o ovário. Núcleos celulares foram corados com DAPI e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina. Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

4.4 Ativação dos ovários e estágios da oogênese/maturação dos ovócitos em operárias jovens de *S. bipunctata*

Para operárias de *S. postica*, espécie filogeneticamente relacionada a espécie-alvo desse estudo, a literatura relata que todas as operárias da colônia possuem ovários ativos (Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1979). Para confirmar se essa é uma característica do gênero *Scaptotrigona*, os ovários de 84 operárias de *S. bipunctata* com sete dias foram investigados. Essa idade foi escolhida por ser considerada a fase do desenvolvimento adulto em que as operárias apresentam um maior número de ovócitos em desenvolvimento. Nossos resultados demonstraram que todas as 84 operárias investigadas apresentavam ovários ativos, similares aos observados nas Figuras 1. D e 5. A-C.

Com base nessas observações, a oogênese em ovários de operárias de *S. bipunctata* foi dividida em doze estágios (Tabela 2), sendo essa classificação realizada tomando como base os trabalhos de Wilson *et al.* (2011) para *A. mellifera*; e Horne-Badovinac & Bilder (2005) e Wineland *et al.* (2018) para *D. melanogaster*.

Em ovariolos de operárias recém-emergidas foram observados os estágios 1 a 6 da oogênese. Em operárias com sete dias foram identificados os estágios 1 a 12. Vale ressaltar, que em um único ovário de operárias com sete dias foi possível verificar dez ovócitos em desenvolvimento, a maioria em estágio pré-vitelogênico e vitelogênico (Figura 6F).

Tabela 2. Estágios da oogênese em operárias de *Scaptotrigona bipunctata* nas idades recém-emergida e sete dias.

Estágio da oogênese	Característica	Localização no ovário	Fase
Estágios S1-S2	- Divisões das células-tronco da linhagem germinativa (GSC) (Figura 2. A-I); - Presença de fusoma/ <i>spectrosome</i> (Figura 2. B, C, E, F; Figura 3. E, F; Figura S2. B, C); - Divisão inicial do citoblasto (CB) (Figura 2. G-I);	Germário anterior Região 1	Proliferativa, Diferenciação, e Manutenção do nicho das GSC
	- Formação do <i>cluster</i> de citócitos; - Presença dos canais em anel (Figura 2. A-C, seta em B; D-F, seta em E; Figura 3. A-C, seta em B); - Visualização de células candidatas a pró-ovócitos (Figura 2. G-I, delimitação em amarelo em I);	Germário anterior Região 2a/b	
	- Diferenciação do ovócito; - O ovócito se apresenta maior que os demais citócitos com um núcleo central e é envolvido por células pré-foliculares (Figura 3. G-I);	Germário médio Região 2b	
Estágio S3	- O ovócito assume uma posição posterior na recém formada câmara de ovos. (Figura 3. G-I, seta em H); - Nesse estágio é possível verificar a presença das células do pedúnculo (<i>stalk</i>) separando cistos adjacentes (Figura 3. G-I, cabeça de seta);	Germário posterior/final Região 3	Marca a transição do germário para o vitelário
Estágio S4	-Câmara nutridora e câmara ovocítica totalmente diferenciadas circundadas por células foliculares; (Figura 6. A); - O núcleo do ovócito ocupa praticamente toda a câmara ovocítica (Figura 6. A, núcleo indicado por *);	Vitelário	Pré-Vitelogênese
Estágio S5	- Entre a câmara nutridora e o ovócito existe uma leve constrição (Figura 1. B; Figura 3. G-I); - Os núcleos das células nutridoras iniciam a poliploidização;		
Estágio S6	- O ovócito é menor que a câmara nutridora; - O núcleo do ovócito começa assumir uma posição ântero-dorsal (Figura 6. B);		
Estágio S7	- O ovócito e a câmara nutridora possuem praticamente o mesmo tamanho; - O formato do ovócito é arredondado (Figura 6. C);		
Estágio S8	- Nessa fase há um intenso fluxo de material da câmara nutridora para o ovócito (Figura 6. D linha tracejada); - O núcleo assume sua posição definitiva, marcando o futuro lado dorsal do embrião (Figura 6. D, E). As células foliculares da membrana ovocítica se apresentam modificadas (Figura 6. D). Detalhes podem ser vistos em uma resolução maior (Figura 6. E);		Vitelogênese
Estágio S9	- O ovócito é maior que a câmara nutridora que o acompanha; - O formato do ovócito se torna alongado (Figura 6. F);		
Estágio S10	- A câmara nutridora tem o seu tamanho reduzido e apresenta um intenso processo de morte celular, que pode ser visualizado na marcação com DAPI (núcleos em degeneração) (Figura 6. G cabeça de seta); - O ovócito se expande, dobra de tamanho e se torna mais elíptico (Figura 6. G)		
Estágios S11-12	- O ovócito atinge o último estágio de maturação; - Câmara nutridora desintegra. O <i>dumping</i> está completo (Figura 6. H, cabeça de seta); - Ocorre a deposição do córion (corionogênese) (ver Figura 6. H, I).		Corionogênese

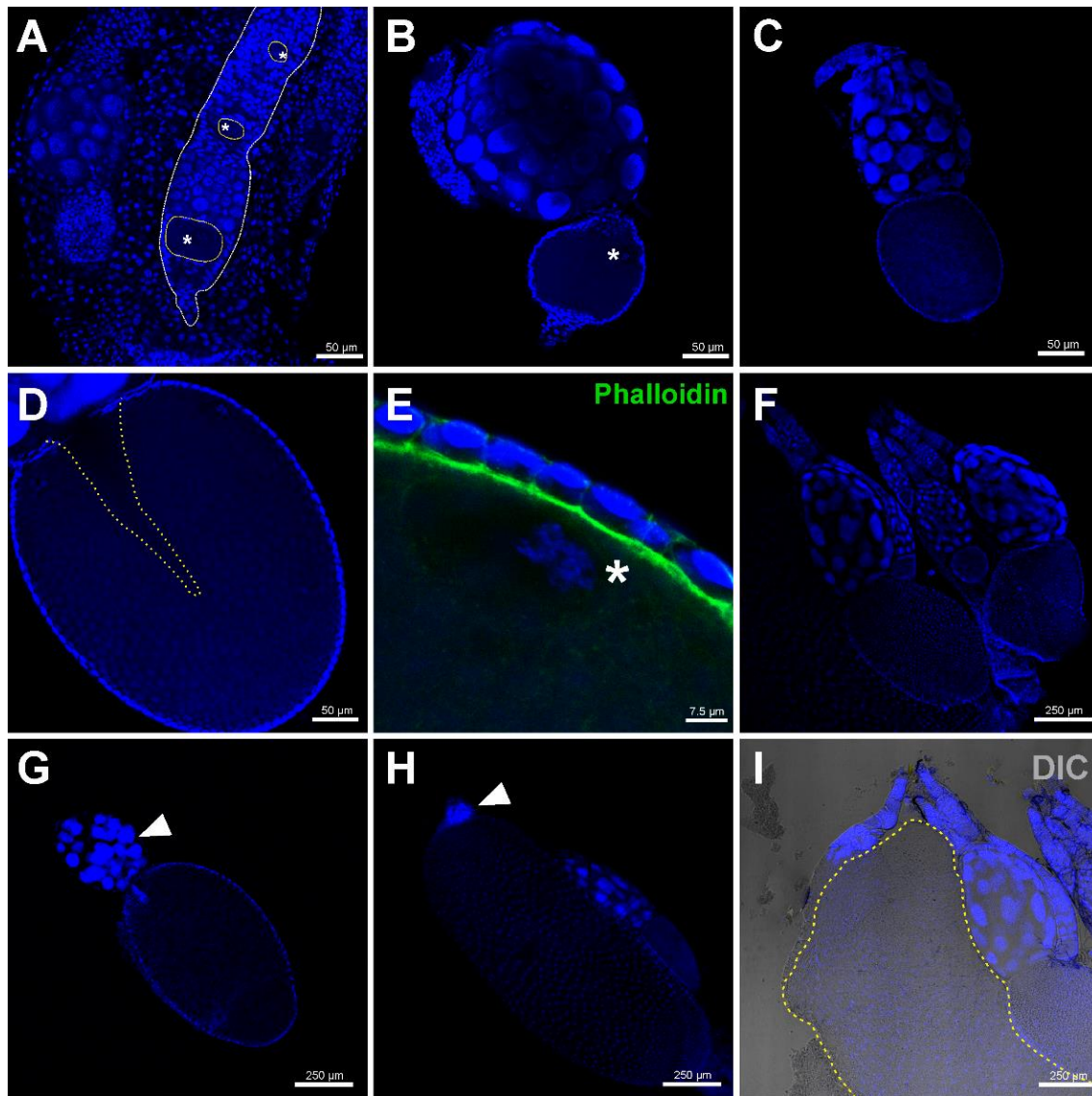


Figura 6. Estágios da oogênese em operárias de *S. bipunctata* a partir da determinação do ovócito. (A) ovaríolo delimitado em amarelo mostra na parte mais anterior (germário) *clusters* de cystócitos em que o ovócito já foi especificado, núcleos dos ovócitos estão indicados por asterisco, tais ovócitos se encontram em estágio S2-S3, em S3 é possível observar que o ovócito se posiciona na parte posterior e é separada da câmara de ovos mais desenvolvida pelas células *stalk*, localizadas na região 3 do germário, marcando a passagem do germário para o vitelário. Ainda em (A), no início do vitelário (parte posterior do ovaríolo), pode ser visualizada um ovócito em estágio 4 (S4), nesse estágio é possível verificar uma diferenciação completa da câmara nutridora e da câmara ovocítica, a camada de células foliculares está presente e circunda a câmara de ovos (ainda de maneira irregular). (B) Estágio 6 (S6) o ovócito é menor que a câmara nutridora que o acompanha. (C) No estágio 7 (S7) câmara nutridora e ovocítica apresentam praticamente os mesmos tamanhos e o formato do ovócito é mais arredondado. (D) No estágio S8 o ovócito recebe um intenso fluxo de material da câmara nutridora, que servirá para etapas subsequentes do desenvolvimento, a entrada desse fluxo é indicada por pontilhado amarelo. As células foliculares que circundam o ovócito se encontram modificadas, detalhes podem ser visto em (E), uma ampliação de (D), o núcleo é evidenciado por asterisco. (F) No estágio S9 o ovócito é maior que a câmara nutridora e apresenta um formato elíptico (ver ovócito a esquerda em F). (G) No estágio S10, o ovócito é maior que a câmara nutridora, essa última estrutura passa por um intenso processo de degeneração, que pode ser visualizado por seus núcleos apoptóticos indicados por cabeça de seta. (H, I) Representam os últimos estágios da oogênese, S11 e S12, as células nutridoras completam sua degeneração (seta em H), ovócito sem as células nutridoras, tracejado em (I), tais ovócitos chegam a etapa da corionogênese. Núcleos celulares foram corados com DAPI e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina. Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

4.5 Alteração na expressão de *anarchy*, *vitelogenina* e *vasa* em três fases do desenvolvimento adulto de operárias de *S. bipunctata*

Os valores de expressão dos genes *anarchy* e *vasa* foram resgatados dos transcriptomas de ovários e a expressão de *vitelogenina* (*vg*) dos transcriptomas de corpo gorduroso de operárias adultas. Os genes foram considerados diferencialmente expressos observando os seguintes critérios: (1) $p_{\text{adj}} \leq 0,05$ e (2) $\log_2\text{FC} < -1,0$ ou $> 1,0$.

Para as comparações par-a-par, foram realizados três pareamentos para as bibliotecas de ovários: (1) ovários de operárias forrageiras (OV_FOR) *versus* ovários de operárias com sete dias (OV_SEV); (2) OV_FOR *versus* ovários de operárias recém-emergidas (OV_NEW); (3) OV_NEW *versus* OV_SEV. Para *anarchy*, foi encontrado uma maior expressão em ovários de operárias forrageiras. O gene *vasa* se mostrou altamente expresso em ovários de operárias recém-emergidas e nutridoras com sete dias de idade, nessas últimas operárias foi observado o maior valor de expressão desse gene. Os valores de p_{adj} e $\log_2\text{FC}$ estão detalhados na Tabela S1 do Material Suplementar.

Os mesmos pareamentos foram checados nas bibliotecas de corpo gorduroso de operárias para verificar a expressão de *vg*. (1) Corpo gorduroso de operárias forrageiras (FB_FOR) *versus* corpo gorduroso de operárias com sete dias (FB_SEV); (2) FB_FOR *versus* corpo gorduroso de operárias recém-emergidas (FB_NEW); (3) (FB_NEW) *versus* (FB_SEV). Foi verificado que *vg* é altamente expresso no corpo gorduroso de operárias nutridoras com sete dias, independente da comparação realizada. Os valores $\log_2\text{FC}$ e p_{adj} podem ser consultados na Tabela S1 do Material Suplementar. Na Tabela 3, pode ser observado um resumo da expressão diferencial dos genes alvo desse estudo nos ovários (OV) e no corpo gorduroso (FB) nos diferentes estágios do desenvolvimento adulto (W_NEW, W_SEV e W_FOR) que foram estudados.

Tabela 3. Expressão diferencial dos genes *anarchy*, *vasa* e *vitelogenina* nos ovários e no corpo gorduroso em três fases do desenvolvimento adulto de *S. bipunctata*. W_NEW (operárias recém-emergidas), W_SEV (operárias nutridoras com sete dias) e W_FOR (operárias forrageiras). Sinal de (+) gene regulado de forma positiva, sinal de (-) gene regulado de forma negativa. Genes com valores de $\log_2FC < -1,0$ ou $>1,0$ e $p_{adj} \leq 0,05$ foram considerados altamente expressos.

Expressão Gênica			Gene	Órgão/Tecido
-	-	+	<i>anarchy</i>	Ovário
+	+	-	<i>vasa</i>	Ovário
-	+	-	<i>vg</i>	Corpo gorduroso
W_NEW	W_SEV	W_FOR		

4.6 Expressão de Vasa em ovários de *S. bipunctata*

Como *vasa* foi altamente expresso em ovários de operárias recém-emergidas e nutridoras com sete dias, essas fases foram escolhidas para análise por imunofluorescência. A localização da proteína confirma a presença de Vasa nos ovariolos de operárias de *S. bipunctata*. Nossos resultados mostram a expressão de Vasa no filamento terminal, em células do germário anterior e em locais de formação de *clusters* de cistócitos. Vasa também foi detectada em células foliculares presentes no polo posterior do ovócito, nas células do pedúnculo (Figura 7). As regiões citadas em que a expressão de Vasa foi detectada são locais em que células da linhagem germinativa estão presentes, com exceção da marcação observada nas células do pedúnculo. Em nossos ensaios, ovariolos de *D. melanogaster* foram usados como controle e foi encontrado um padrão canônico da expressão de Vasa em ovários dessa espécie (Material Suplementar Figura S3) (Findley *et al.*, 2003).

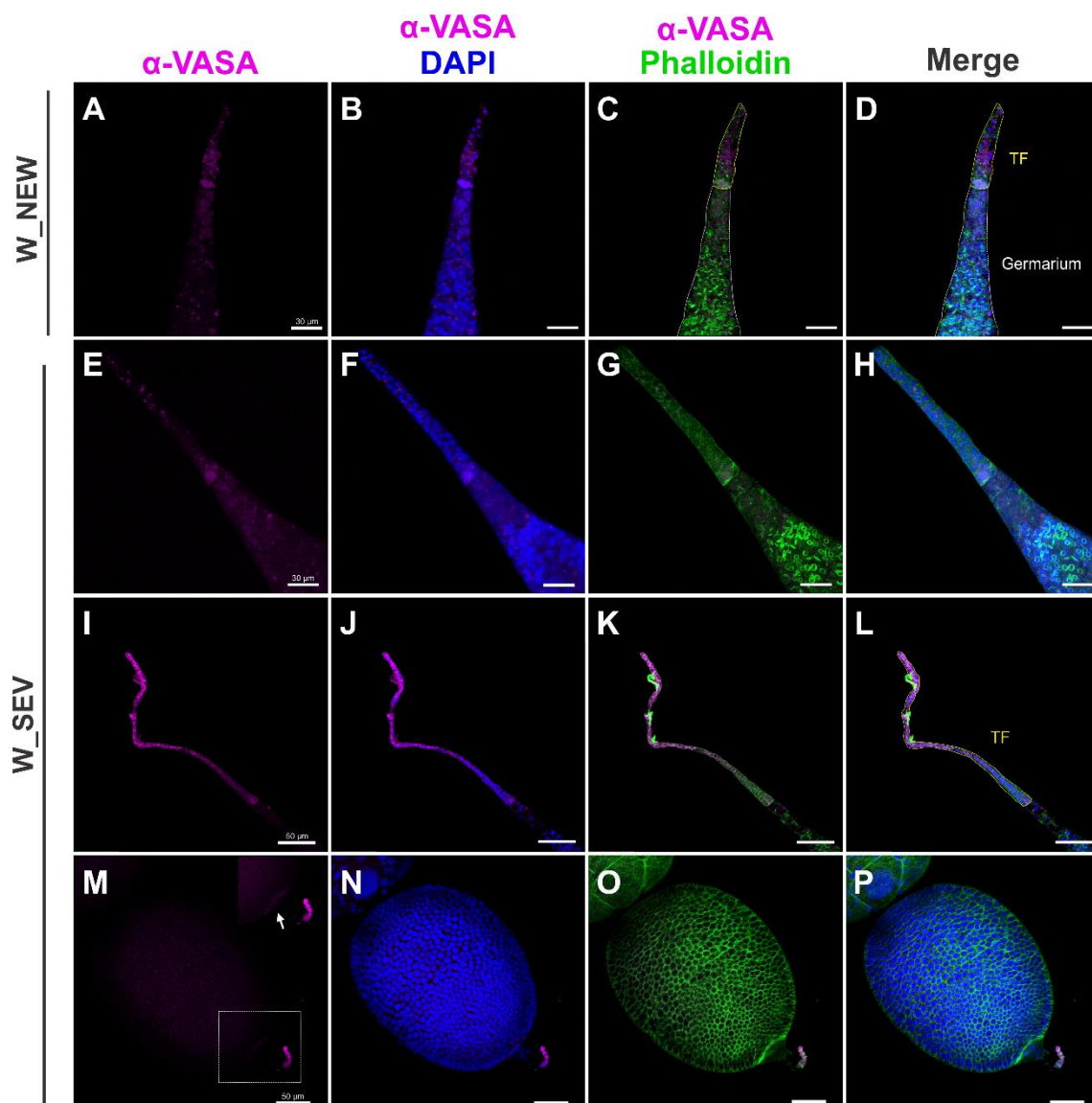


Figura 7. Expressão de Vasa em ovários de *S. bipunctata*. (A-L) Vasa foi localizada no filamento terminal (TF) e no germário anterior (Germarium), se mostrando expressa em locais de células germinativas indiferenciadas (GSCs) e em locais em que as GSCs iniciam sua diferenciação, nas duas idades estudadas (W_NEW e W_SEV). (M-P) A expressão de Vasa no ovócito está restrita ao polo posterior, presente nas células foliculares (região delimitada por pontilhado branco em M). Inseto de (M) indicado por seta, mostra a modificação da região posterior do ovócito e sugere a formação de um possível citoplasma polar. Proteína Vasa (rosa), Faloidina/Rodamina (verde) e DAPI (azul). Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

Sabemos que na oogênese de *D. melanogaster* e *Nasonia vitripennis*, eventos importantes acontecem no polo posterior dos ovócitos em estágios intermediários e finais do desenvolvimento, como a formação do plasma germinativo. Nossos resultados até o momento em operárias de *S. bipunctata*, demonstram uma modificação da região posterior do ovócito e a expressão de Vasa nas células foliculares no pedúnculo do folículo. Tais resultados sugerem que algo especial em relação ao desenvolvimento está acontecendo nessa

região. Com objetivo de obter mais detalhes sobre a expressão de Vasa nesse local, nós investigamos a presença dessa proteína em ovócitos de rainhas de *S. bipunctata*. Vasa também se expressa nas células foliculares do polo posterior de ovócitos dessa casta (para detalhes ver Material Suplementar, Figura S4). Além disso, recuperamos no transcriptoma de ovários de *S. bipunctata* genes que participam da formação do plasma germinativo em *D. melanogaster* (ver Tabela S2). Esses resultados serão discutidos adiante.

5. DISCUSSÃO

5.1 Oogênese em ovários de operárias de *S. bipunctata*

5.1.1 Potencial reprodutivo

O sucesso das espécies eussociais está relacionado à divisão do trabalho reprodutivo. Nessas sociedades a rainha é a casta fértil e as operárias são consideradas estéreis (Wilson, 1971). No entanto, a esterilidade irreversível é uma característica rara nas abelhas eussociais. Até o momento, essa condição foi registrada apenas em *Tetragonula carbonaria* (Bueno *et al.*, 2020) e *Frieseomelitta varia* (Boleli *et al.*, 1999). As abelhas sem ferrão constituem um grupo chave para o estudo dos mais variados aspectos reprodutivos por pelo menos dois motivos: (i) serem um dos pináculos da eussocialidade (Melo, 2020) (ii) e por apresentarem uma considerável diversidade em relação às estratégias reprodutivas, reunindo espécies em que as operárias competem com a rainha pela produção dos machos de uma colônia, espécies em que a presença da rainha funciona como um sinalizador impedindo a reprodução da casta operária, até espécies com esterilidade permanente. Esses diferentes comportamentos reprodutivos das abelhas sem ferrão foram recentemente revisados por Luna-Lucena *et al.* (2019). Essas espécies apresentam particularidades que são inerentes à sua história de vida. Esses traços de vida afetam a oogênese nas operárias permitindo ou não o seu progresso ou induzindo sua interrupção.

No presente trabalho, propomos pela primeira vez, a integração de dados de morfologia e dados de transcriptoma para discutir a capacidade reprodutiva das abelhas nativas sem ferrão. Além disso, estão descritos aqui pela primeira vez, achados morfológicos ainda não descritos para *S. bipunctata*. Nesse estudo, com foco nas operárias de *S. bipunctata*, foi possível observar que a rainha não impede o desenvolvimento dos ovários de suas

operárias. Dessa forma, operárias de *S. bipunctata* se assemelha a operárias de *S. postica* (Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1979) e *M. quadrifasciata* (Tanaka *et al.*, 2009) e diferem de *A. mellifera*. Nessa última espécie a presença da rainha e de seu feromônio mandibular (QMP) bloqueia a oogênese das operárias adultas (Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015).

Em *S. bipunctata* as fases recém-emergida e nutridora com sete dias constituem os estágios do desenvolvimento adulto cujo potencial reprodutivo das operárias é evidenciado. As operárias emergem de suas células de cria com ovócitos em fase de pré-vitelogênese. Essa predisposição em iniciar tão precocemente a oogênese é uma característica compartilhada com outras operárias do grupo Meliponini (Tanaka *et al.*, 2009; Santos & Cruz-Landim, 2002). Em operárias com sete dias de *S. bipunctata*, observamos todos os estágios da oogênese (Tabela 2). Alguns eventos observados nessa fase são indícios da viabilidade dos ovócitos produzidos por essas operárias, como o fluxo de material das células nutridoras para o ovócito (Figura 6. D), a integridade do citoesqueleto de F-actina na monocamada de células foliculares, que reveste o ovócito em desenvolvimento, (Figura 3. J-L, Figura 7. N-P), bem como, a característica posição do núcleo do ovócito, na região anterior nos estágios finais da oogênese (Figura 6. D-E), que em *D. melanogaster* representa um passo essencial na determinação da polaridade dorso-ventral do futuro embrião (Yadav & Sarkar, 2016; Bernard *et al.*, 2018). Esses claros sinais de progresso da oogênese observados em todas as operárias analisadas, demonstram que operárias de *S. bipunctata* podem ter sucesso reprodutivo.

5.1.2 Local das células germinativas e imunolocalização de *vasa*

A produção de ovócitos e a sua maturação é suportada por células-tronco da linhagem germinativa e somáticas. Em *D. melanogaster*, o nicho das células germinativas está bem definido, bem como os mecanismos regulatórios envolvidos na proliferação e manutenção dessas células (Merkle *et al.*, 2020). Em abelhas, apesar de *A. mellifera* ter recebido uma atenção especial nos últimos anos, detalhes da anatomia e fisiologia do sistema reprodutor ainda precisam ser esclarecidos. Acredita-se que o filamento terminal é o local de abrigo das células-tronco da linhagem germinativa. Entretanto, devido ao insucesso no emprego de marcadores que poderiam auxiliar no reconhecimento dessas células, a exemplo de *Vasa*, o local das células-tronco da linhagem germinativa é uma questão em aberto (Gutzeit *et al.*,

1993; Tanaka & Hartfelder, 2004; Cruz-landim, 2009; Lago *et al.*, 2020). Nossos resultados mostram Vasa no filamento terminal e na região anterior do germário dos ovaríolos de *S. bipunctata* (Figura 7). Esses resultados serão discutidos com detalhes mais adiante.

Nas abelhas o filamento terminal é, de fato, uma região especial. A princípio, a única função atribuída a ele foi a de suspensor dos ovários na cavidade abdominal (Cruz-Landim *et al.*, 2006; Cruz-Landim, 2009). Entretanto, como sugerido por Cruz-Landim (2009) a função do filamento terminal em abelhas deve ser mais complexa. Em *S. bipunctata* os ovários estão presos na cavidade abdominal por estruturas que se assemelham à traquéias (Material Suplementar, Figura S5). Nas dissecções que foram realizadas nesse estudo, foi possível observar que em *S. bipunctata* o filamento terminal fica protegido e não exposto. Essa região do ovário fica enrolado dentro da bainha peritonial e apenas quando os ovaríolos são dissociados um dos outros, ou seja, quando a bainha peritonial é rompida, é que o filamento terminal se revela. Esse fato, pode ter levado Santos & Cruz-Landim (2002) assumirem que operárias de *S. postica* não possuíam um filamento terminal longo.

A outra questão interessante em relação ao filamento terminal em abelhas eussociais é a diferença de seu comprimento quando as castas são comparadas. Em rainhas, que é o indivíduo fértil da colônia, portanto, com alta taxa de postura, essa região do ovário é muito mais longa que em operárias (Tanaka *et al.*, 2009). Essa diferença no comprimento do filamento terminal entre as castas levanta a possibilidade dessa região constituir um estoque de células-tronco da linhagem germinativa. Os estudos morfológicos realizados em ovários de abelhas eussociais relatam a presença de poucas células-tronco da linhagem germinativa (GSCs)/cistoblastos no germário, como observado em *A. mellifera* por Hartfelder & Tanaka (2004). Cruz-Landim (2009) descreve de 2 a 3 para *A. mellifera* e *S. postica*. No entanto, pela quantidade de ovos postos por dia nessas espécies, somado ao fato da longevidade que as rainhas de espécies eussociais podem atingir, acredita-se que um número maior de GSCs seria necessário para suportar a atividade reprodutiva (Gutzeit *et al.*, 1993; Tanaka & Hartfelder, 2004). Outra questão a ser considerada é que as diferenças no comprimento do filamento terminal entre as castas nos meliponini começam a ser estabelecidas no final do desenvolvimento larval (Cruz-Landim *et al.*, 2006), o que pode ser influenciado, em parte, pela dieta. Em *S. postica*, a diferenciação de casta é trófica, portanto, a quantidade de alimento

é um fator decisivo (Camargo, 1972). Rainhas recebem mais alimento que as operárias e raramente é visto eventos de morte celular na parte apical dos ovários. O contrário é observado nas operárias (Santos & Cruz-Landim, 2002; Cruz-Landim *et al.*, 2006; Cruz-Landim, 2009). Em outros organismos a nutrição é uma questão chave para o sucesso da oogênese. Em *Drosophila melanogaster* por exemplo, a dieta influencia na proliferação, divisão e diferenciação das GSCs (Drummond-Barbosa & Spradling, 2001; Lin & Hsu, 2020). Em *Caenorhabditis elegans* a zona proliferativa, local das GSCs e células progenitoras, se apresentam em maior ou menor dependendo do status nutricional (Korta *et al.*, 2012; Hubbard & Schedl, 2019).

Nossos resultados mostram *vasa* altamente expresso em bibliotecas de ovários de operárias de *S. bipunctata*, nas recém-emergidas e nutridoras com sete dias. Nessas idades, a morfologia do ovário mostrou que é possível reconhecer diferentes estágios da oogênese. Somada a essa informação, foi possível observar Vasa localizada no filamento terminal e germário anterior nos ovários de operárias dessas mesmas fases de vida adulta. Nesse experimento foi usado como controle ovários de *D. melanogaster* que mostrou o padrão canônico de expressão de Vasa (Findley *et al.*, 2003). A principal semelhança encontrada em relação a localização dessa proteína entre essas espécies distantemente relacionadas foi a marcação de Vasa em locais que abrigam as células-tronco da linhagem germinativa e sua progênie, demonstrando mais uma vez que Vasa é marcador da linhagem germinativa na maioria dos Metazoários estudados (Raz, 2000; Yajima & Wessel, 2011). Em *A. mellifera*, até o momento, não houve sucesso no emprego de anticorpos anti-vasa para demonstrar a presença dessa proteína nos ovários dessa espécie e assim lançar luz sobre essa questão (Gutzeit *et al.*, 1993; Dearden, 2006). Diante desse obstáculo, dois trabalhos usaram *vasa* mRNA por meio da hibridização *in situ* objetivando diferenciar células germinativas e somáticas nos ovários de *A. mellifera* (Dearden, 2006; Tanaka & Hartfelder, 2009). Dearden (2006) encontrou *vasa* expresso nas câmaras nutridora e ovocítica em rainhas de *A. mellifera*, nessa casta não foi observada, pelo autor, expressão de *vasa* no filamento terminal e germário anterior, provável local células-tronco da linhagem germinativa. Além disso, ao analisar operárias de *A. mellifera*, o autor verificou um padrão similar ao encontrado em rainhas na expressão de *vasa*, no entanto, nas operárias, *vasa* também se mostrou presente no

filamento terminal e germário. Esse resultado levou o autor a concluir que a expressão de *vasa* no filamento terminal em abelhas melíferas é casta específica. Anos depois, Tanaka & Hartfelder (2009), também por meio da hibridização *in situ* de *vasa* obtiveram marcação do filamento terminal de rainhas de *A. mellifera* e *M. quadriafasciata*, no entanto, os autores descrevem a observação de um sinal difuso e não constante, o que deixou a questão do local das GSCs em aberto. Apesar dos resultados serem discrepantes em alguns momentos, esses estudos, bem como outros mais antigos, já apontavam o filamento terminal como local das células-tronco da linhagem germinativa nas abelhas (Gutzeit *et al.*, 1993; Tanaka & Hartfelder, 2004). Gutzeit *et al.* (1993) sugerem que nesse local também estão presentes as células tronco que darão origem as células da linhagem somática. Esse autor defende a ideia de uma única origem para células-tronco da linhagem germinativa e somáticas em *A. mellifera*, em contraste ao observado em *D. melanogaster*.

A análise da morfologia dos ovários de *S. bipunctata*, bem como, a expressão de Vasa no filamento terminal, e a presença de pontos enriquecidos com F-actina, que indica a presença de estruturas específicas da linhagem germinativa (versão esférica do fusoma) (Cuevas & Spradling, 1998; Villa-Fombuena *et al.*, 2021), atestam que as células-tronco da linhagem germinativa estão nessa região em ovariolos de *S. bipunctata*.

5.1.3 Células somáticas no germário de *S. bipunctata* e os marcadores moleculares específicos dessas células

Células somáticas com funções indispensáveis na oogênese de *D. melanogaster* foram também identificadas através da morfologia no germário de *S. bipunctata* (ver Figuras 2 e 3). Os marcadores moleculares específicos desses tipos celulares que compõem o nicho das células-tronco da linhagem germinativa (GSCs) e suportam a proliferação, manutenção e diferenciação das GSCs e o progresso da oogênese em *D. melanogaster*, foram procurados e encontrados nos transcriptomas de ovários de operárias de *S. bipunctata*: *Wnt6*, *engrailed* e o fator de transcrição *traffic jam*, genes expressos nas células *cap* em *D. melanogaster*. Esse último, *traffic jam*, controla a especificação das células *cap* e a arquitetura do nicho das GSCs (Panchal *et al.*, 2017). A expressão de *Wnt6* nas células *cap* é importante para a sobrevivência das células de escolta anteriores (aECs) que juntamente com as células *cap* ancoram/envolvem

as GSCs. A célula aEC é uma célula crítica para o nicho das GSCs, quando *Wnt6* é silenciado nas células *cap* em adultos de *D. melanogaster*, as aEC morrem resultando em uma perda de sinalização de *decapentaplegic* (*dpp*) e as GSCs são perdidas (Wang & Page-McCaw, 2018). Os genes específicos (*Wnt2*, *ptc*, *fax*, *pdk1* e *GstS1*) (Wang *et al.*, 2015; Rust *et al.*, 2021, Slaidina *et al.*, 2021), com exceção de *Wnt4*, expressos nas populações de células de escolta de *D. melanogaster*, também foram todos encontrados em *S. bipunctata*. Estudos têm mostrado que *Wnt4* e *Wnt2* possuem função redundante (Wang *et al.*, 2015; Waghmare *et al.*, 2020), o que pode explicar a ausência de *Wnt4* nos transcriptomas de *S. bipunctata*. Os genes *Wnt4/Wnt2* expressos nas células de escolta promovem a diferenciação das células-tronco da linhagem germinativa. Essa diferenciação mediada por *Wnt4/Wnt2* se dá, em parte, por manter o estado redox ao sustentar a expressão de genes da família das *Glutathione-S-transferases*, GST (Wang *et al.*, 2015). As GSTs são da família de enzimas metabólicas eucarióticas que estão principalmente envolvidas na desintoxicação celular. *GstS1* uma representante dessa família, é encontrada nas células de escolta de *D. melanogaster* (Rust *et al.*, 2021), bem como nos transcriptomas de ovário de *S. bipunctata*, em todas as idades analisadas, apresentando maior expressão em fêmeas com potencial reprodutivo (W_SEV e W_NEW). Os marcadores de GSCs e sua progênie como *vasa* e *Orc1* (Rust *et al.*, 2021; Slaidina *et al.*, 2021), também estão presentes. É importante ressaltar que a maior expressão de *Vasa* detectada nos ovários de fêmeas com potencial reprodutivo (W_NEW e W_SEV) foi observada em células germinativas indiferenciadas, presentes no filamento terminal e em células germinativas em início de diferenciação, presentes no germário anterior (Figura 7), o que demonstra que em *S. bipunctata* a expressão de *Vasa* está relacionada aos estágios iniciais da oogênese. Resultados similares foram encontrados na oogênese e na espermatogênese de outros organismos (Xu *et al.*, 2005; Maurizii *et al.*, 2009). O gene *bag of marbles* (*bam*) e *corolla* estão ausentes no transcriptoma de ovário de *S. bipunctata*. Em *D. melanogaster* esses genes têm papel na diferenciação da progênie das GSCs (McKearin & Ohlstein, 1995; Collins *et al.*, 2014). A ausência de *bam* em *A. mellifera* já havia sido relatada (Cristino *et al.*, 2006), apesar dessa espécie possuir o *miR-306* (Macedo *et al.*, 2016), um dos reguladores de *bam* no processo de espermatogênese em *D. melanogaster* (Eun *et al.*, 2013). Em *Tribolium castaneum*, *bam* também está ausente (Richards *et al.*, 2008). Recentemente, Bubnell *et al.*

(2021) demonstraram que *bam* não conserva sua função como crucial para a diferenciação das GSCs em espécies filogeneticamente relacionadas dentro do gênero *Drosophila*. Isso demonstra que no decorrer do processo evolutivo alguns eventos importantes para o desenvolvimento podem ser desempenhados por fatores (marcadores moleculares) linhagem específicos.

Os marcadores moleculares das células-tronco foliculares (FSCs) (*GstS1*, *zfh1*, *Wnt4*), células pré-foliculares (*zfh1* e *br*), células polares (*sl1*) e do pedúnculo (*CG46339*), também foram encontrados nas bibliotecas de ovários de *S. bipunctata*. No germário de *D. melanogaster* as células-tronco foliculares, que dão origem às células pré-foliculares se localizam abaixo das células de escolta posteriores (pEC). Ainda nessa espécie, foi observado que em situação de fome as células pEC podem se transformar em FSCs (Rust *et al.*, 2021), demonstrando a íntima relação entre esses dois tipos celulares. Além disso, Reilein *et al.* (2017) demonstrou em um estudo sobre o número de FSCs e o comportamento dessas células em ovários de *D. melanogaster*, que as FSCs são a fonte das células de escolta (ECs). Os trabalhos recentes empregando a metodologia *single-cell* demonstram que o perfil transcricional das células de escolta posteriores é similar ao perfil transcricional das células-troncos foliculares e das células pré-foliculares (Rust *et al.*, 2021; Slaidina *et al.*, 2021) e que essa similaridade é justificada por uma origem comum no desenvolvimento das células de escolta e das células-tronco foliculares (Rust *et al.*, 2021; Slaidina *et al.*, 2020; Reilein *et al.*, 2021). Em *S. bipunctata* a morfologia apresentada por essas células (ECs e FSCs) e a proximidade física em que elas se encontram (Figura 2. H, I), indicam que o germário é o local das células-tronco foliculares (FSCs) nessa espécie. Dessa forma, há uma conservação em relação ao local dessas células entre *S. bipunctata* e *D. melanogaster*.

5.1.4 Expressão de Vasa em células do polo posterior do ovócito

A presença de Vasa nas células do pedúnculo em ovócitos de *S. bipunctata* é uma surpresa. No entanto, a expressão dessa proteína nesse local pode ser explicada em parte pela proximidade física das células do pedúnculo com as células de origem germinativa. Seguindo o eixo ântero-posterior (A/P) do ovaríolo, essas células em específico, estavam em contato direto com o polo posterior de um ovócito em estágio adiantado de desenvolvimento e na

parte mais posterior estavam em contato com as células da câmara nutridora de um ovócito que já havia sido ovipositado. É importante destacar que nem todas as células do pedúnculo nos ovariolos de *S. bipunctata* expressam Vasa. Em câmara de ovos recém-formadas a proteína não foi detectada. A expressão de Vasa nessa região só foi observada em ovócitos em estágios adiantados da oogênese (vitelogênese) e também quando foi possível observar o início da formação de um citoplasma diferenciado no polo posterior do ovócito (Figura 7. M-P, seta em M; Material Suplementar, Figura S6, seta em região enriquecida com F-actina). Na espécie *Podarcis sicula* foi sugerido que a fusão de células foliculares modificadas, localizadas no polo posterior de ovócitos em vitelogênese, pode levar essas células a adquirir uma função germinativa e sintetizar *vasa* (Maurizii *et al.*, 2009). *Vasa* também se mostra expresso em populações de células com potencial multipotente em outros organismos (Gustafson & Wessel, 2010).

A expressão de Vasa em células somáticas detectada no polo posterior do ovócito não é uma característica apenas de operárias de *S. bipunctata*. Em rainhas, ovócitos mais desenvolvidos que se localizam próximo ao oviduto expressam Vasa em uma população de células foliculares presente no polo posterior (Material Suplementar, Figura S4. B,C,I). Nessa casta, uma estrutura que delimita o polo posterior do ovócito também expressa Vasa (Material Suplementar, Figura S4. D-F). Essa estrutura se assemelha ao citoplasma polar que observamos em início de formação nas operárias com ovócitos em vitelogênese. É provável que tal estrutura delimite o local do plasma germinativo. Cruz-landim (2009) sugeriu a presença de um plasma germinativo para outras abelhas sem ferrão, *S. postica* e *M. quadrifasciata*. Essa autora observou ainda que durante a embriogênese de *M. quadrifasciata*, algumas células se isolam precocemente no polo posterior do embrião, o que demonstra a possibilidade da ocorrência de células polares nessa espécie de Meliponini. Nossos resultados e de Cruz-Landim (2009) diferem do que se sabe em *A. mellifera*. Nessa espécie, até o momento, não há relatos da presença de um plasma germinativo no polo posterior do ovócito. O surgimento da linhagem germinativa em *A. mellifera* se dá por indução, sinalização célula-a-célula em estágio tardio da embriogênese (Dearden, 2006). O fato é que na ordem Hymenoptera, parece não existir uma conservação no modo de surgimento da linhagem germinativa. *Apis mellifera* representa o modo de indução, mas *Nasonia vitripennis* representa

um exemplo em que esse mecanismo se dá por herança com a presença de um plasma germinativo/oosoma (Lynch *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2019).

Nos transcriptomas de ovários de *S. bipunctata* nós encontramos a presença de genes reconhecidamente envolvidos na formação do plasma germinativo em *D. melanogaster* (Voronina *et al.*, 2011, Trcek & Lehmann, 2019, Whittle & Extavour, 2019), por exemplo, *vasa*, *tudor*, *aubergine*, *pumilio*, *nanos*, *piwi*, *armitage*, *maelstrom*, *bruno*, *cappucino*, *cyclin B*, *germ cell less*, *mago nashi*, *oo18 RNA-binding*, *pipsqueak*, *spire*, *staufen*, *valois* e *cup* (ver Material Suplementar, Tabela S2, com os identificadores de cada gene em *D. melanogaster* e *S. bipunctata*). Em relação ao gene *oskar*, que em *D. melanogaster* tem papel central na formação do plasma germinativo, apenas o domínio LOTUS, também conhecido como OST-HTH/LOTUS pertencente a esse gene, mostrou similaridade com a sequência TRINITY_DN684_c0_g1_i6 presente em nossos transcriptomas. Esse domínio é compartilhado com outras proteínas relacionadas a linhagem germinativa como TDRD5 e TDRD7 (Patil *et al.*, 2014; Jeske *et al.*, 2017). O domínio OSK não foi encontrado. Uma maior conservação do domínio LOTUS do gene *oskar* entre insetos holometábolos e hemimetábolos foi demonstrado por Blondel *et al.* (2021). Estudos recentes têm mostrado que o domínio LOTUS de *oskar* interage fisicamente com Vasa para regular a atividade dessa helicase e mediar sua localização no plasma germinativo (Anantharaman *et al.*, 2010; Jeske *et al.*, 2017). Dessa forma, a presença de LOTUS nos transcriptomas de ovários pode ser um ponto de partida para a investigação e caracterização de um possível regulador principal na formação do plasma germinativo em *S. bipunctata*.

5.1.5 Senescência reprodutiva em operárias de *S. bipunctata*

As operárias de espécies eussociais apresentam polietismo etário, ou seja, de acordo com suas idades, desempenham diferentes tarefas sendo a última delas a atividade de forrageamento. Essa atividade é acompanhada por diversas transformações, desde uma dieta diferenciada (rica em carboidrato e baixo teor proteico) até transformações profundas em sua anatomia e fisiologia e conseqüentemente no perfil de expressão gênica. Essas diferenças são observáveis na comparação entre operárias que desenvolvem tarefas intranidais, consideradas mais jovens

e operárias forrageiras, as mais velhas da colônia (Winston, 1987; Page & Peng, 2001; Ament *et al.*, 2010; Seehuus *et al.*, 2013).

Em nosso estudo com operárias de *S. bipunctata* foi possível demonstrar através da morfologia dos ovários que a atividade de forrageamento nessa espécie está intimamente relacionada à perda da fertilidade, de modo irreversível (Figura 4). O número de ovariolos por ovário nessa espécie é quatro, tanto para rainha quanto para operárias. No momento da diferenciação de casta em *S. postica*, espécie pertencente ao mesmo gênero que *S. bipunctata*, não é observado redução no número de ovariolos entre as castas (Santos & Cruz-Landim, 2002). Diferentemente do que ocorre em *A. mellifera* que operárias perdem até 90% das unidades funcionais do ovário (Hartfelder & Steinbrück, 1997). Nossas análises morfológicas em operárias forrageiras de *S. bipunctata* demonstraram que dos quatro ovariolos que deveriam estar presentes nos ovários, foram encontrados apenas dois ovariolos, mesmo assim, incompletos. A perda de ovariolos na fase adulta também foi descrita para algumas espécies do gênero *Apis* (Ronai *et al.*, 2017). A degeneração que ocorre nessas abelhas, difere da descrita em nosso estudo com *S. bipunctata*. Em *Apis*, a degeneração afeta ovariolos específicos ao invés de todo o ovário como demonstrado por nós (Figura 4. D-F; Material Suplementar, Figura S2. D-F). A degeneração dos ovários em operárias forrageiras de *S. bipunctata* tem início na parte posterior, próximo ao oviduto. Foi observado que algumas operárias forrageiras apresentam resquício de filamento terminal e germário anterior indicando que é provável que exista uma tentativa de preservar o local das células-tronco da linhagem germinativas (Figura 4. G,I). Nós hipotetizamos, que a perda das unidades funcionais dos ovários em operárias adultas de *S. bipunctata* ocorre por eventos de morte celular, que ocasiona a degeneração de todo o órgão. Esses eventos são desencadeados por sinais nutricionais, que podem levar a baixos títulos de hormônio juvenil na hemolinfa (HJ) dessas operárias. Cardoso-Júnior *et al.* (2017) observaram baixos títulos de HJ em operárias forrageiras de uma abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*, quando comparadas com operárias nutridoras. Os resultados de Cardoso-Júnior e colaboradores corroboram os nossos resultados. Além disso, o gene codificador da esterase do hormônio juvenil (*jhe*), enzima envolvida na degradação desse hormônio foi encontrado em nossas bibliotecas de ovários e apresenta alta expressão em ovários de forrageiras ($\log_2FC = 2,56$ $p_{\text{adj}} = 0,014$), quando esse

fenótipo é comparado com operárias nutridoras. Esses resultados indicam que o HJ pode estar envolvido na reprodução de *S. bipunctata*. Dessa forma, é provável que em operárias forrageiras da tribo Meliponini, os baixos títulos de HJ estejam desempenhando papel similar a sua ação nos estágios iniciais do desenvolvimento de *A. mellifera* (quinto ínstar larval). Em *A. mellifera*, a dieta diferencial oferecida à rainhas e operárias tem influência nas taxas de morte celular programada (PCD) nos ovários dessa espécie. O fator crítico que acentua a PCD nos ovários de operárias de *A. mellifera* é o título de HJ na hemolinfa. Se comparado à rainhas, os níveis de HJ na hemolinfa de operárias são baixos, sendo um dos fatores que contribui para diferenciação de casta nessa espécie e elimina boa parte do potencial reprodutivo das operárias através da perda dos ovários (Rembold, 1987; Rachinsky *et al.*, 1990; Hartfelder & Engels, 1998; Hartfelder & Steinbrück, 1997; Schmidt Capella & Hartfelder, 1998, Hartfelder *et al.*, 2018). Em resumo, os baixos títulos de HJ na hemolinfa de *A. mellifera* (estágios larvais) e provavelmente em *S. bipunctata* (operárias forrageiras), tornam os ovários das operárias desprotegidos da morte celular. Em *A. mellifera* a consequência desse baixo título de HJ é a redução do potencial reprodutivo e nas operárias em *S. bipunctata* é a degeneração de todo o órgão.

A morfologia dos ovários das operárias forrageiras de *S. bipunctata* demonstra ainda que ovócitos podem estar presentes no germário ou na região que seria o vitelário (posterior), porém, esses ovócitos mostram sinais de degeneração evidenciando que a oogênese foi interrompida (Material Suplementar, Figura 1. G-I). Cruz-Landim *et al.* (2006) citam a presença de ovócitos degenerados em operárias forrageiras de *S. postica*, e compararam esse processo ao que ocorre em rainhas confinadas. É importante destacar que a degeneração de ovócitos em desenvolvimento nos ovários de operárias forrageiras de *S. bipunctata* pode ocorrer desde o germário (Material Suplementar, Figura 2. G-I, seta à direita em G e I), início do vitelário (Figura 4. A, seta à esquerda) e em ovócitos que estão próximo ao oviduto (Figura 4. A, seta à direita). Ou seja, ovócitos em diferentes estágios do desenvolvimento são perdidos. Em *D. melanogaster* a perda de ovócitos geralmente ocorre em estágios iniciais, na região 2a/b do germário (*first checkpoint*) e em estágios intermediários (*second checkpoint*) (Drummond-Barbosa & Spradling, 2001; Pritchett *et al.*, 2009). É provável que a mudança na dieta que ocorre em operárias forrageiras, se comparada às que realizam tarefas intranidais, seja o fator

responsável pela degeneração observada em ovócitos de operárias forrageiras de *S. bipunctata*, uma vez que a fisiologia dessas operárias muda devido o processo de senescência. Recentemente foi demonstrado que operárias malnutridas de *A. mellifera* envelhecem precocemente (Martelli *et al.*, 2022), demonstrando a íntima relação entre esses dois fatores, dieta e envelhecimento.

Uma dieta pobre em proteína afeta a oogênese promovendo a parada desse processo em *D. melanogaster* (Drummond-Barbosa & Spradling 2001; Jenkins *et al.*, 2013). Em *S. postica*, foi demonstrado que operárias que estão desenvolvendo atividades dentro da colônia se alimentam com uma dieta rica em pólen (proteína), similar à alimentação de rainhas dessa espécie. O contrário é observado em operárias que realizavam atividade de forrageamento, nessas abelhas foi verificado ausência de pólen no trato digestivo indicando que a alimentação rica em proteína cessa nessa fase (Zerbo *et al.*, 2001). Muito provavelmente, a mudança de uma dieta rica em proteína para uma dieta rica em carboidratos na fase de forrageira é também uma característica de operárias de *S. bipunctata*. As diferentes dietas que as operárias de espécies eussociais são expostas em suas diferentes fases de vida adulta podem ajudar a explicar os resultados observados na morfologia ovariana que foi apresentada nesse estudo. Em *S. bipunctata*, operárias que trabalham dentro da colônia são capazes de progredir nos diferentes estágios da oogênese. Como citado anteriormente, foi observado em ovários de operárias *nurse* até dez ovócitos em desenvolvimento. Esses resultados são indícios que essas operárias possuem uma dieta capaz de sustentar a oogênese em seus ovários. Contrastante a ovários de operárias forrageiras, que demonstram claros sinais de interrupção da oogênese. Os sinais nutricionais são responsáveis por regular a oogênese em taxa sociais como vespas e aranhas (Salomon *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2009; O' Donnell *et al.*, 2018), e em organismos não sociais, à exemplo de *C. elegans* (Korta *et al.*, 2012; Hubbard & Schedl, 2019), *D. melanogaster* (Drummond-Barbosa & Spradling, 2001; Pritchett *et al.*, 2009) e abelhas solitárias (Cane, 2016; Cane *et al.*, 2017). Dessa forma, esse mecanismo é conservado entre espécies filogeneticamente não relacionadas e deve ser o responsável em regular a oogênese em operárias eussociais que não são impedidas de reproduzir por suas rainhas, como é o caso de operárias de *S. bipunctata*, e da maioria das espécies do grupo Meliponini. Por último, outro claro sinal da inviabilidade dos ovários das operárias forrageiras de *S. bipunctata* é a

desorganização/degeneração da musculatura ovariana (membrana peritonal e a túnica própria). Nós verificamos que operárias forrageiras (Figura 4) e operárias jovens (Figura 5) diferem e muito quanto a esse aspecto. Em *D. melanogaster* a musculatura desorganizada/degenerada é observada em fêmeas estéreis (Valer *et al.*, 2018). Nessas moscas, a integridade da membrana peritonal é crucial para o movimento do ovócito ao longo do trato reprodutivo, para dar a forma elíptica que os ovos devem obter e para a oviposição (Middleton *et al.*, 2006). Essas etapas da oogênese são críticas para a fertilidade e mais recentemente foi verificado que estão sob influência da sinalização do hormônio juvenil. É importante ressaltar que a sinalização de HJ é principalmente ativada nas células musculares ovarianas (Luo *et al.*, 2021). Reforçando a nossa hipótese de que os baixos títulos de HJ em forrageiras de *S. bipunctata* tem impactos em sua fertilidade.

5.1.6 Marcadores moleculares do estado reprodutivo em operárias de *S. bipunctata*

Nesse estudo três genes candidatos: *vitelogenina*, *anarchy* e *vasa*, foram escolhidos para verificar se a sua expressão marca o estado reprodutivo dos ovários de operárias de *S. bipunctata*. A escolha desses genes foi realizada com base na literatura de *A. mellifera* e insetos no geral (Engels, 1974; Fujiwara, 1994; Scott *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2009; Cardoen *et al.*, 2011; Tokar *et al.*, 2014; Ronai *et al.*, 2016; Warner *et al.*, 2019).

Vitelogenina (vg)

Alta expressão de *vg* foi detectada no corpo gorduroso de operárias com sete dias de *S. bipunctata*, nessa fase do desenvolvimento adulto, os ovários estão ativados e com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Em operárias recém-emergidas que apresentam em seus ovários ovócitos em estágio de pré-vitelogênese, *vg* se mostrou regulado de forma negativa. De modo similar, o corpo gorduroso de operárias forrageiras apresenta regulação negativa de *vg*, de acordo com o esperado. Em todas as três comparações realizadas: (1) FB_FOR *versus* FB_SEV (FC -7,635 = pjad 7,59E-10); (2) FB_FOR *versus* FB_NEW (expressão não significativa); (3) FB_NEW *versus* FB_SEV (FC -9,957 = pjad 9,44E-186), *vg* se mostrou altamente expresso quando a vitelogênese era visível nos ovaríolos das operárias,

ou seja, na fase de nutridora com sete dias (W_SEV) (Figura 1. D e Figura 5). A maior expressão de *vg* encontrada por nós nessa fase coincide com o estágio do desenvolvimento adulto que foi encontrada a presença da proteína (Vg) na hemolinfa de outras operárias de abelhas sem ferrão, *S. postica*, *M. quadrifasciata* e *M. scutellaris* (Engels & Engels, 1977; Dallacqua *et al.*, 2007). Coincide também com o aparecimento de Vg na hemolinfa de rainhas dessas espécies (5-7 dias) (Engels & Engels, 1977).

Em relação a expressão de *vg* no corpo gorduroso de operárias de *S. postica* e *M. scutellaris*, apesar do reconhecido potencial reprodutivo dessas abelhas (Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1979; Alves *et al.*, 2009), Dallacqua *et al.* (2007) observaram uma expressão constitutiva de *vg* durante todo o desenvolvimento pupal e estágios de vida adulta, demonstrando que *vg* não marca o estado reprodutivo dessas operárias. Esses resultados diferem dos obtidos nesse estudo para operárias de *S. bipunctata*. Nossos dados também diferem dos relatados para operárias de *A. mellifera*. A expressão de *vg* em operárias de *A. mellifera* tem início na fase de adulto farato (ver Figura 6 - Barchuk *et al.*, 2002). Além disso, *vg* se mostra expresso em operárias nutridoras, mesmo na presença da rainha (Piulachs *et al.*, 2003; Corona *et al.*, 2007), quando se espera que as operárias não ativem seus ovários. A expressão de *vg* na fase de nutridora em operárias de *A. mellifera*, sugere que a vitelogenina desempenha papéis outros não relacionados à reprodução como, por exemplo, a divisão de trabalho na colônia, exercendo a função de regulador do comportamento social (Amdam & Omholt, 2003; Guidugli *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2007; Marco Antonio *et al.*, 2008). Voltando a falar de *vg* sob um enfoque reprodutivo, a alta expressão desse gene em operárias nutridoras de *S. bipunctata*, se assemelha ainda a operárias de espécies primitivamente eussociais, *Bombus terrestris* e *Lasioglossum laevisimum* (Harrison *et al.*, 2015; Jedlička *et al.*, 2016; Lockett *et al.*, 2016; Awde *et al.*, 2020), nas quais um alto grau de ativação dos ovários está relacionado a uma alta expressão de *vg*. Além de se assemelhar a rainhas de diferentes espécies, como *A. mellifera*, altamente eussocial (Corona *et al.*, 2007; Warner *et al.*, 2019) e as primitivamente eussociais, *Bombus terrestris* (Harrison *et al.*, 2015; Jedlička *et al.*, 2016) e *Lasioglossum laevisimum* (Awde *et al.*, 2020) e ainda, a fêmeas reprodutivas de insetos não sociais (Ma *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2020; Agostini *et al.*, 2021). A similaridade em relação à expressão de *vg* entre operárias de *S. bipunctata* e as diferentes

espécies e castas (rainhas e operárias) mencionadas anteriormente, se dá pelo fato dessas fêmeas compartilharem uma fisiologia direcionada para a reprodução. Diante do exposto, nossos resultados evidenciam que a alta expressão de *vg* no corpo gorduroso de operárias nutridoras de *S. bipunctata*, fase em que a vitelogênese é visível em seus ovários, está relacionada à função ancestral dessa molécula, proteína do vitelo, absorvida por ovócitos em desenvolvimento (Byrne & Gruber, 1989; Fleig, 1995) e dessa forma, ligada ao processo reprodutivo. Portanto, *vg* pode ser considerado um excelente marcador do estado reprodutivo nessa espécie.

Anarchy

O gene *anarchy* é conhecido por atuar no processo de morte celular programada (PCD) (Ronai *et al.*, 2016). Tal processo é um mecanismo conservado que regula a oogenese em diversos taxa de vertebrados a invertebrados (Tilly, 2001). O ortólogo de *anarchy* em *D. melanogaster* codifica uma proteína de membrana peroxissomal (PMP34). Em relação à oogenese em abelhas, *anarchy* foi investigado por Ronai *et al.* (2016) como um possível preditor do estado reprodutivo dos ovários em operárias adultas de *A. mellifera*. Esses autores verificaram que *anarchy* foi capaz de indicar o estado inativo dos ovários de operárias de *A. mellifera* com 88.2% de acurácia. Esses autores investigaram a expressão desse gene em operárias que estavam na presença (ovários inativos) e na ausência da rainha (ovários ativos). Essas duas condições (ausência e presença da rainha) têm sido muito estudadas em *A. mellifera* devido aos efeitos do feromônio produzido pela rainha sobre os ovários das operárias, que causa degeneração de ovócitos desenvolvidos ou em desenvolvimento (Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015). Dentro do exposto, elegemos *anarchy* para verificar se este se confirma como um marcador do estado reprodutivo também em operárias de *S. bipunctata*.

O gene *anarchy* foi encontrado diferencialmente expresso em: (1) OV_FOR *versus* OV_SEV e (2) OV_FOR *versus* OV_NEW. Esse gene apresenta maior expressão nas bibliotecas de ovários de operárias forrageiras. Os valores log₂FC 1,248 (pajd = 0,0007) e log₂FC 1,729 (pajd = 2,27E-06) correspondem às comparações (1) e (2) respectivamente. Em *S. bipunctata* foi demonstrado através da morfologia ovariana que a fase do desenvolvimento adulto em que as operárias exercem a função de forrageamento representa

o momento de perda do potencial reprodutivo devido às alterações sofridas nos ovários dessas operárias. Essas alterações incluem tanto a reabsorção de ovócitos, quanto a degeneração dos ovários. Dessa forma, era esperado que esse gene se apresentasse mais expresso em ovários de operárias forrageiras.

Em operárias nutridoras de *A. mellifera* que apresentam ovários inativos por estarem na presença da rainha e de seu feromônio foi verificado através hibridização *in situ* que os transcritos de *anarchy* estão associados a ovócitos em degeneração. Quando *anarchy* foi investigado como preditor do estado dos ovários em *A. mellifera*, foi postulado por Ronai *et al.* (2016) que esse gene estava envolvido na regulação da esterilidade da casta operária. Essa teoria foi proposta pelo fato de rainhas dessa espécie apresentarem uma expressão constante de *anarchy* nos ovários. Na comparação entre rainhas virgens e acasaladas de *A. mellifera* não foi detectado diferenças de expressão de *anarchy*. Esses resultados levaram os autores a considerar o padrão de expressão de *anarchy* exclusivo da casta operária e dessa forma, um dos genes mais promissores a regular a esterilidade dessa casta. No entanto, mais recentemente um trabalho do mesmo grupo de pesquisa demonstrou que *anarchy* também apresenta alta expressão em ovários de rainhas engaioladas (Aamidor *et al.*, 2022), muito provavelmente devido à degeneração de ovócitos que ocorre nessa condição (Cruz-Landim *et al.*, 2006).

As análises dos transcriptomas de ovários de *S. bipunctata* também demonstram que a alta expressão de *anarchy* não está restrita à casta operária. Em rainhas virgens de *S. bipunctata*, *anarchy* também se encontra altamente expresso. Esse resultado pode ser explicado por eventos de morte celular programada que pode estar ocorrendo nessa fase, se assemelhando ao observado nos ovários de rainhas virgens de *A. mellifera*. Nessa última espécie, foi verificado que o início da oogênese é acompanhado de morte celular na região de formação de *clusters* de cistócitos no germário anterior (Tanaka *et al.*, 2004; ver Figura 1. G).

Em resumo, *anarchy* tem o seu papel na interrupção da oogênese por estar associado ao processo de morte celular, mais precisamente relacionado à degeneração de ovócitos e cistócitos iniciais. Em *S. bipunctata*, além de marcar o estado inativo dos ovários de rainhas virgens, esse gene também é capaz de indicar um ovário inativado de operárias como visto em operárias de *A. mellifera*. O bloqueio da oogênese em operárias de *A. mellifera* ocorre quando essas operárias são jovens e realizam atividades intranidais (cuidadoras) e é

influenciado pela presença da rainha e de seu feromônio (Tanaka *et al.*, 2004; Ronai *et al.*, 2015; Ronai *et al.*, 2016). Se nos referirmos a casta operária dessas diferentes espécies eussociais podemos dizer que *anarchy* atua de forma semelhante nas operárias de *S. bipunctata* e *A. mellifera*. No entanto, essa atuação ocorre em momentos diferentes do desenvolvimento adulto e pode ser explicada pelo comportamento reprodutivo dessas diferentes espécies.

Vasa

Vasa tem seu papel reconhecido em muitos aspectos do desenvolvimento da linhagem germinativa, que inclui especificação, proliferação e manutenção dessa linhagem celular. Sua função é excepcionalmente conservada de invertebrados a vertebrados (Raz, 2000; Yajima & Wessel, 2011). Nesse estudo, *vasa* se mostrou altamente expresso em ovários de operárias, que possui potencial reprodutivo (W_NEW e W_SEV), verificável a partir dos valores de expressão das seguintes comparações: (1) OV_FOR *versus* OV_SEV (log2FC 2,728 = pjad 9,25E-25, altamente expresso em OV_SEV); (2) OV_FOR *versus* OV_NEW (log2FC 1,495 = pjad 1,10E-13, altamente expresso em OV_NEW); (3) OV_NEW *versus* OV_SEV (log2FC -1,242 = pjad 1,48E-08, altamente expresso em OV_SEV). Essas operárias (W_NEW e W_SEV) apresentam ovários íntegros, musculatura ovariana preservada e ovócitos em diferentes estágios da oogênese. Ainda em relação a esses valores de log2FC, é possível observar que operárias com sete dias (W_SEV) apresentam maior expressão de *vasa* se comparada as outras fases de vida adulta estudadas (W_NEW e W_FOR). Nessa fase do desenvolvimento adulto foi observado uma elevada quantidade de ovócitos em desenvolvimento, dessa forma, o processo de diferenciação, proliferação e manutenção da linhagem germinativa deve ser mais intenso quando essas operárias se encontram na fase de nutridoras, com sete dias de idade. Frente aos resultados apresentados, *vasa* se mostra um excelente marcador do potencial reprodutivo de operárias de *S. bipunctata*. Não há na literatura nenhum estudo com foco sobre os dados de expressão em larga escala (RNA-seq) do tecido ovariano especificamente, que use como amostras operárias eussociais em pontos-chaves do desenvolvimento, ou seja, operárias recém-emergidas, com sete dias e forrageiras, o que permitiria uma avaliação prévia sobre um possível padrão de expressão de *vasa* nas operárias em diferentes fases do desenvolvimento adulto neste órgão. No estudo de Tanaka

& Hartfelder (2009), a presença de *vasa* foi detectada em ovários de rainhas e operárias adultas de *A. mellifera* por meio de RT-PCR. As operárias estudadas por Tanaka & Hartfelder (2009) estavam na ausência da rainha, condição que favorece a ativação dos ovários. Segundo Cardoen *et al.* (2011), *vasa* foi detectado como altamente expresso em operárias com ovários ativos em *A. mellifera*, quando operárias órfãs com ovários ativos e inativos foram comparadas. Cardoen *et al.* (2011) utilizou o corpo inteiro de operárias de *A. mellifera* nas duas condições citadas anteriormente e os dados de expressão gênica foram obtidos através de microarranjos de DNA. Em um estudo mais recente fazendo uso de RNA-seq de corpo inteiro e abdômen de rainhas de duas espécies eussociais (*A. mellifera* e *Monomorium pharaonis* – formiga), foi verificado alta expressão de *vasa* no abdômem em ambas fêmeas férteis dessas espécies (Warner *et al.*, 2019). Os resultados do presente estudo com operárias de *S. bipunctata* corroboram com aqueles obtidos por Warner *et al.* (2019) e demonstram uma fisiologia reprodutiva conservada entre três diferentes origens da eussocialidade (*A. mellifera* – Apini, *S. bipunctata* – Meliponini e *Monomorium pharaonis* - Formicidae) (Rasmussen & Cameron, 2010; Peters *et al.*, 2017; Bossert *et al.*, 2019; outras interpretações sobre as relações filogenéticas das abelhas corbiculadas são discutidas por Porto & Almeida, 2021).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, detalhamos a morfologia ovariana, fases da oogênese e os mecanismos moleculares envolvidos na ativação e inativação dos ovários de *S. bipunctata*. Para tal, estudamos a morfologia dos ovários de operárias dessa espécie em três fases do desenvolvimento adulto: operárias recém-emergidas, nutridoras com sete dias de idade e operárias forrageiras. Procuramos determinar (i) como está estruturalmente organizado o ovário dessa casta; (ii) em que fase do desenvolvimento adulto as operárias de *S. bipunctata* ativam os ovários; e (iii) quando o potencial reprodutivo dessa casta é cessado. Nossos resultados demonstraram que todas as operárias de *S. bipunctata* ativam seus ovários. Tais operárias emergem de suas células de cria com ovócitos em estágio de pré-vitelogênese. Nessa espécie, operárias recém-emergidas e com sete dias representam a fase do desenvolvimento adulto em que o potencial reprodutivo é evidenciado. A perda do potencial reprodutivo em

operárias de *S. bipunctata* está ligado ao processo de senescência, observado em ovários de operárias forrageiras. Esse fenótipo revela degeneração da musculatura ovariana, perda de ovários e ovócitos em reabsorção. Os fenótipos mais extremos observados em operárias forrageiras revelam a degeneração de todo o órgão. Nós também investigamos o número de operárias que ativam os ovários em uma colônia e classificamos os estágios da oogênese em *S. bipunctata*. Além disso, investigamos a distinção entre células germinativas e somáticas nos ovários de operárias com potencial reprodutivo, através da imunolocalização de Vasa nos ovários dessas dessa casta. A imunolocalização de Vasa permitiu observar que o filamento terminal e o germário anterior constituem locais de abrigo das células-tronco da linhagem germinativas em operárias de *S. bipunctata*. A marcação de Vasa, observada em populações de células foliculares no polo posterior de ovócitos de rainhas e operárias de *S. bipunctata*, bem como, a presença de genes reconhecidamente envolvidos na formação de um plasma germinativo nos transcriptomas de ovário dessa espécie, levanta a possibilidade da presença dessa região em ovócitos de *S. bipunctata*. Essa questão precisa ser melhor investigada em experimentos futuros. Por fim, através da análise de transcriptomas de ovários e corpo gorduroso resgatamos os valores de expressão de *vitelogenina*, *anarchy* e *vasa* para verificar se esses genes são marcadores do estado reprodutivo de operárias de *S. bipunctata*, assim como ocorre em *A. mellifera* e outras fêmeas de insetos sociais e não sociais. Em nossas análises, os três genes citados foram capazes de caracterizar ovários ativos e inativos de operárias de *S. bipunctata*. O gene *vitelogenina* é expresso no corpo gorduroso de operárias com sete dias e marca o momento em que os ovários dessas operárias estão em estado de vitelogênese, demonstrando que *vg* conserva sua função reprodutiva em *S. bipunctata*. O gene *anarchy* foi altamente expresso em ovários de operárias forrageiras, marcando o estado inativo desse ovário. O gene *vasa* identificou ovários com potencial reprodutivo, se apresentando mais expresso em ovários de operárias com sete dias, seguido de ovários de operárias recém-emergidas. Com base no estudo morfológico e com auxílio de marcadores moleculares presentes nos transcriptomas de ovários de operárias dessa espécie, nós também descrevemos os seguintes tipos celulares: *transition*, *cap*, *escort*, *polar*, *stalk* e células-tronco foliculares. Essas células são reconhecidamente importantes para manutenção e diferenciação das células-

tronco da linhagem germinativas e para o progresso da oogênese em *D. melanogaster*, e pela primeira vez, são também documentadas em abelhas nativas sem ferrão.

7. REFERÊNCIAS

- Aamidor SE, Cardoso-Júnior CAM, Harianto J, Nowell CJ, Cole L, Oldroyd BP, Ronai I. 2022. Reproductive plasticity and oogenesis in the queen honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 136: 104347.
- Agostini JC, Costa CP, Ferreira JT, *et al.* 2021. Vitellogenin of the solitary bees *Centris tarsata* and *Centris analis* (Hymenoptera: Apoidea): cDNA structural analysis and gene expression. *Apidologie* 52: 292–307.
- Alves DA, Imperatriz-Fonseca VL, Franco TM, Santos-Filho PS, Nogueira-Neto P, Billen J, Wenseleers T. 2009. The queen is dead—long live the workers: intraspecific parasitism by workers in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Molecular Ecology* 18: 4102–4111.
- Amdam GV, Simões ZL, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW. 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* 3: 1.
- Ament SA, Wang Y, Robinson GE. 2010. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews* 2: 566–576.
- Anantharaman V, Zhang D, Aravind L. 2010. OST-HTH: a novel pre-dicted RNA-binding domain. *Biology Direct* 5: 13.
- Aruna S, Flores HA, Barbash DA. 2009. Reduced fertility of *Drosophila melanogaster* hybrid male rescue (Hmr) mutant females is partially complemented by Hmr orthologs from sibling species. *Genetics* 181: 1437–1450.
- Ascher JS, Pickering J. 2020. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Disponível em: http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species. [Acessado em junho, 2022].
- Awde DN, Skandalis A, Richards MH. 2020. Vitellogenin expression corresponds with reproductive status and caste in a primitively eusocial bee. *Journal of Insect Physiology* 127: 104113.

- Barchuk AR, Bitondi MM, Simões ZL. 2002. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* 2: 1.
- Bataglia L, Simões ZLP, Nunes FMF. 2021. Active genic machinery for epigenetic RNA modifications in bees. *Insect Molecular Biology* 30: 566–579.
- Beig D. 1972. The production of males in queen right colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apicultural Research* 11: 33–39.
- Bernad F, Jean-Antonie L, Guichet A. 2018. Nucleus positioning within *Drosophila* egg chamber. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 82: 25–33.
- Bilinski SM. 1998. Introductory remarks. *Folia Histochemica Cytobiologica* 36: 143–145.
- Blondel L, Besse S, Rivard EL, Ylla G, Extavour CG. 2021. Evolution of a cytoplasmic determinant: evidence for the biochemical basis of functional evolution of the novel germ line regulator Oskar. *Molecular Biology and Evolution* 38: 5491–5513.
- Boleli IC, Simões ZLP, Gentile-Bitondi MM. 1999. Cell death in the ovaries cause permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. *Journal of Morphology* 242: 271–282.
- Bossert S, Murray EA, Almeida EAB, Brady SG, Blaimer BB, Danforth BN. 2019. Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 130: 121–131.
- Bubnell JE, Ulbing CKS, Fernandez-Begne P, Aquadro CF. 2021. Functional divergence of the *bag of marbles* gene in the *Drosophila melanogaster* species group. *BioRxiv*. doi.org/10.1101/2021.06.25.449946. (acessado em 05/2022).
- Bueno FGB, Gloag R, Latty T, Ronai I 2020. Irreversible sterility of workers and high-volume egg production by queens in the stingless bee *Tetragonula carbonaria*. *Journal of Experimental Biology* 28: jeb230599.
- Byrne BM, Gruber M, Ab G. 1989. The evolution of egg yolk proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 53: 33–69.
- Camargo CA. 1972. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia* 32: 133–138.

- Cane JH, Dobson HEM, Boyer B. 2017. Timing and size of daily pollen meals eaten by adult females of a solitary bee (*Nomia melanderi*) (Apiformes: Halictidae). *Apidologie* 48: 17–30.
- Cane JH. 2016. Adult pollen diet essential for egg maturation by a solitary *Osmia* bee. *Journal of Insect Physiology* 95: 105–109.
- Cardoen D, Wenseleers T, Ernst UR, *et al.* 2011. Genome-wide analysis of alternative reproductive phenotypes in honey bee workers. *Molecular Ecology* 20: 4070–4084.
- Cardoso-Júnior CAM, Silva RP, Borges NA, de Carvalho WJ, Walter SL, Simões ZLP, Bitondi MMG, Ueira Vieira C, Bonetti AM, Hartfelder K. 2017. Methyl farnesoate epoxidase (mfe) gene expression and juvenile hormone titers in the life cycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Journal of Insect Physiology* 101: 185–194.
- Chanet S, Huynh JR. 2020. Collective cell sorting requires contractile cortical waves in germline cells. *Current Biology* 30: 4213–4226.
- Collins KA, Unruh JR, Slaughter BD, Yu Z, Lake CM, Nielsen RJ, Box KS, Miller DE, Blumenstiel JP, Perera AG, Malanowski KE, Hawley RS. 2014. Corolla is a novel protein that contributes to the architecture of the synaptonemal complex of *Drosophila*. *Genetics* 198: 219–28.
- Corona M, Verlade RA, Remolina S, *et al.* 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 7128–7133.
- Cristino AS, Nascimento AM, Costa Lda F, Simões ZL. 2006. A comparative analysis of highly conserved sex-determining genes between *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research* 31: 154–168.
- Cruz-Landim C, Patrício K, Antonialli Jr WF. 2006. Cell death and ovarian development in highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): caste differentiation and worker egg laying. *Journal of Morphological Sciences* 23: 27–42.
- Cruz-Landim C. 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. UNESP: São Paulo.

- Dallacqua RP, Bitondi MMG. 2014. Dimorphic ovary differentiation in honeybee (*Apis mellifera*) larvae involves caste-specific expression of homologs of Ark and Buffy cell death genes. *PLoSOne*. **9**: e98088.
- Dallacqua RP, Simões ZLP, Bitondi MMG. 2007. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Sociaux* **54**: 70–76.
- Danforth BN, Cardinal S, Praz C, Almeida EA, Michez D. 2013. The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology* **58**: 57–78.
- de Cuevas M, Spradling AC. 1998. Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* **125**: 2781–2789.
- Dearden PK. 2006. Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); Vasa and Nanos expression. *BMC Developmental Biology* **6**: 1–14.
- Decotto E, Spradling AC. 2005. The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Developmental Cell* **9**: 501–510.
- do Carmo Zerbo A, Silva de Moraes RL, Brochetto-Braga MR. 2001. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae [correction of Apidia], Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology – B Biochemistry and Molecular Biology* **129**: 139–47.
- Drummond-Barbosa D, Spradling AC. 2001. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology* **231**: 265–278.
- Eastin KJ, Huang AP, Ferree PM. 2020. A novel pattern of germ cell divisions in the production of hymenopteran insect eggs. *Biology Letters* **16**: 20200137.
- Engels W, Engels E. 1977. Vitellogenin und Fertilität bei Stachellosen Bienen. *Insectes Sociaux* **24**: 71–94.
- Engels W. 1974. Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *American Zoologist* **14**: 1229–1237.

- Eun SH, Stoiber PM, Wright HJ, McMurdie KE, Choi CH, Gan Q, *et al.* 2013. MicroRNAs downregulate Bag of marbles to ensure proper terminal differentiation in the *Drosophila* male germline. *Development* **140**: 23–30.
- Findley SD, Tamanaha M, Clegg NJ, Ruohola-Baker H. 2003. Maelstrom, a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development* **130**: 859–871.
- Fleig R. 1995. Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **24**: 427–433.
- Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, *et al.* 1994. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 12258–12262.
- Grammont M, Irvine KD. 2002. Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis. *Development* **129**: 5131–5140.
- Grüter C. 2018. Repeated switches from cooperative to selfish worker oviposition during stingless bee evolution. *Journal of Evolutionary Biology* **31**: 1843–1851.
- Grüter C. 2020. Stingless Bees: their behavior, ecology and evolution. Switzerland, AG: Springer Nature.
- Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simões ZL, Hartfelder K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters* **579**: 4961–4965.
- Gustafson EA, Wessel GM. 2010. Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays* **32**: 626–37.
- Gutzeit HO, Zissler D, Fleig R. 1993. Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. *Roux's Archives of Developmental Biology* **202**: 181–191.
- Harrison MC, Hammond RL, Mallon EB. 2015. Reproductive workers show queenlike gene expression in an intermediately eusocial insect, the buff-tailed bumble bee *Bombus terrestris*. *Molecular Ecology* **24**: 3043–63.

- Hartfelder K, Engels W. 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* 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. *Invertebrate Reproduction and Development* 31: 237–250.
- Hartfelder K, Tiberio GJ, Lago DC, Dallacqua RP, Bitondi MG. 2018. The ovary and its genes-developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 49: 49–70.
- Hayashi Y, Yoshinari Y, Kobayashi S, Niwa R. 2020. The regulation of *Drosophila* ovarian stem cell niches by signaling crosstalk. *Current Opinion in Insect Science* 37: 23–29.
- Horne-Badovinac S, Bilder D. 2005. Mass Transit: Epithelial Morphogenesis in the *Drosophila* Egg Chamber. *Developmental Dynamics* 232: 559–574.
- Hu K, Tian P, Tang Y, Yang L, Qiu L, He H, Ding W, Li Z, Li Y. 2019. Molecular characterization of Vitellogenin and its receptor in *Sogatella furcifera*, and their function in oocyte maturation. *Frontiers in Physiology* 10: 1532.
- Hubbard EJA, Schedl T. 2019. Biology of the *Caenorhabditis elegans* germline stem cell system. *Genetics* 213: 1145–1188.
- Jedlička P, Ernst UR, Votavová A, Hanus R, Valterová I. 2016. Gene expression dynamics in major endocrine regulatory pathways along the transition from solitary to social life in a bumblebee, *Bombus terrestris*. *Frontiers in Physiology* 7: 574.
- Jenkins VK, Timmons AK, McCall K. 2013. Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. *Trends in Cell Biology* 23: 567–574.
- Jeske M, Müller CW, Ephrussi A. 2017. The LOTUS domain is a conserved DEAD-box RNA helicase regulator essential for the recruitment of Vasa to the germ plasm and nuage. *Genes and Development* 31: 939–952.
- Jevitt A, Chatterjee D, Xie G, et al. 2020. A single-cell atlas of adult *Drosophila* ovary identifies transcriptional programs and somatic cell lineage regulating oogenesis. *PLoS Biology* 18: e3000538.

- Korta DZ, Tuck S, Hubbard EJ. 2012. S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Development* 139: 859–870.
- Lago DC, Martins JR, Dallacqua RP, et al. 2020. Testis development and spermatogenesis in drones of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 51: 935–955.
- Lebo DPV, McCall K. 2021. Murder on the ovarian express: a tale of non-autonomous cell death in the *Drosophila* ovary. *Cells* 10: 1454.
- Li MA, Alls JD, Avancini RM, Koo K, Godt D. 2003. The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* 5: 994–1000.
- Lighthouse DV, Buszczak M, Spradling AC. 2008. New components of the *Drosophila* fusome suggest it plays novel roles in signaling and transport. *Developmental Biology* 317: 59–71.
- Lin H, Yue L, Spradling AC. 1994. The *Drosophila* fusome, a germ line-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* 120: 947–956.
- Lin KY, Hsu HJ. 2020. Regulation of adult female germline stem cells by nutrient-responsive signaling. *Current Opinion in Insect Science* 37: 16–22.
- Lockett GA, Almond EJ, Huggins TJ, Parker JD, Bourke AF. 2016. Gene expression differences in relation to age and social environment in queen and worker bumble bees. *Experimental Gerontology* 77: 52–61.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550.
- Luna-Lucena D, Rabico F, Simoes ZLP. 2019. Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Current Opinion in Insect Science* 31: 20–28.
- Luo W, Liu S, Zhang W, Yang L, Huang J, Zhou S, Feng Q, Palli SR, Wang J, Roth S, Li S. 2021. Juvenile hormone signaling promotes ovulation and maintains egg shape by inducing expression of extracellular matrix genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118: e2104461118.
- Lynch JA, Ozüak O, Khila A, Abouheif E, Desplan C, Roth S. 2011. The phylogenetic origin of oskar coincided with the origin of maternally provisioned germ plasm and pole cells at the base of the Holometabola. *PLoS Genet.* 7: e1002029.

- Ma L, Zhang W, Liu C, Chen L, Xu Y, Xiao H, Liang G. 2018. Methoprene-tolerant (Met) is indispensable for larval metamorphosis and female reproduction in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in Physiology* 9: 1601.
- Macedo LM, Nunes FM, Freitas FC, Pires CV, Tanaka ED, Martins JR, Piulachs MD, Cristino AS, Pinheiro DG, Simões ZL. 2016. MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Molecular Biology* 25: 216–26.
- Mahajan-Miklos S, Cooley L. 1994. Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology* 165: 336–351.
- Marco Antonio DS, Guidugli-Lazzarini KR, do Nascimento AM, Simões ZL, Hartfelder K. 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 95: 953–961.
- Margolis J, Spradling A. 1995. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 121: 3797–3807.
- Martelli F, Falcon T, Pinheiro DG, Simões ZLP, Nunes FF. 2022. Worker bees (*Apis mellifera*) deprived of pollen in the first week of adulthood exhibit signs of premature aging. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 103774.
- Maurizii MG, Cavaliere V, Gamberi C, Lasko P, Gargiulo G, Taddei C. 2009. Vasa protein is localized in the germ cells and in the oocyte-associated pyriform follicle cells during early oogenesis in the lizard *Podarcis sicula*. *Development Genes and Evolution* 129: 361–367.
- McKearin D, Ohlstein B. 1995. A role for the *Drosophila* bag-of-marbles protein in the differentiation of cystoblasts from germline stem cells. *Development* 121: 2937–2947.
- Melamed D, Kalderon D. 2020. Opposing JAK-STAT and Wnt signaling gradients define a stem cell domain by regulating differentiation at two borders. *eLife* 9: e61204.
- Melo GAR. 2020. Stingless bees (Meliponini). In: Starr CK (ed) Encyclopedia of social insects. Berlin: Springer International.

- Merkle JA, Wittes J, Schupbach T. 2020. Chapter Three - Signaling between somatic follicle cells and the germline patterns the egg and embryo of *Drosophila*. *Current Topics in Developmental Biology* 140: 55–86.
- Middleton CA, Nongthomba U, Parry K, Sweeney ST, Sparrow JC, Elliott CJ. 2006. Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biology* 4: 17.
- Morandin C, Pulliainen U, Bos N, Schultner E. 2018. De novo transcriptome assembly and its annotation for the black ant *Formica fusca* at the larval stage. *Scientific Data* 5: 180282.
- Murat S, Hopfen C, McGregor AP. 2010. The function and evolution of Wnt genes in arthropods. *Arthropod Structure and Development* 39: 446–452.
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5: e62.
- O'Donnell S, Fiocca K, Campbell M, Bulova S, Zelanko P, Velinsky D. 2018. Adult nutrition and reproductive physiology: a stable isotope analysis in a eusocial paper wasp (*Mischocyttarus mastigophorus*, Hymenoptera: Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 72: 86.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM, Crozler RH. 1994. Anarchy in the beehive. *Nature* 371: 749.
- Page RE Jr, Peng CY. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* 36: 695–711.
- Panchal T, Chen X, Alchits E, Oh Y, Poon J, Kouptsova J, Laski FA, Godt D. 2017. Specification and spatial arrangement of cells in the germline stem cell niche of the *Drosophila* ovary depend on the Maf transcription factor Traffic jam. *PLoS Genetics* 13: e1006790.
- Patil VS, Anand A, Chakrabarti A, Kai T. 2014. The Tudor domain protein Tapas, a homolog of the vertebrate Tdrd7, functions in the piRNA pathway to regulate retrotransposons in germline of *Drosophila melanogaster*. *BMC Biology* 12: 1–15.
- Peters RS, Krogmann L, Mayer C, Donath A, Gunkel S, Meusemann K, et al. 2017. Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology* 27: 1013–1018.

- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simões ZLP, Bellés X. 2003. The vitellogenin of the honeybee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 33: 459–465.
- Porto DS, Almeida EAB. 2021. Corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae): exploring the limits of morphological data to solve a hard phylogenetic problem. *Insect Systematics and Diversity*. 5: 2.
- Pritchett TL, Tanner EA, McCall K. 2009. Cracking open cell death in the *Drosophila* ovary. *Apoptosis* 14: 969–979.
- Qian HY, Zhang X, Zhao GD, Guo HM, Li G, Xu AY. 2020. Effects of pyriproxyfen exposure on reproduction and gene expressions in silkworm, *Bombyx mori*. *Insects* 11: 467.
- Quan H, Arsala D, Lynch JA. 2019. Transcriptomic and functional analysis of the oosome, a unique form of germ plasm in the wasp *Nasonia vitripennis*. *BMC Biology* 17: 78.
- Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. 1990. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology* 79: 31–38.
- Ramamurty PS. 1977. Unusual intertrophocytic position of follicle cells in the nurse chamber of the honeybee queen ovary (*Apis mellifica*). *Apidologie* 8: 205–216.
- Ramos RGP, Machado LCH, Moda LMR. 2010. Fluorescent visualization of macromolecules in *Drosophila* whole mounts. New York, NY: Humana Press.
- Rasmussen C, Cameron SA. 2009. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*. 99: 206–232.
- Raz E. 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology* 1: REVIEWS1017.
- Reginato RD, Cruz-Landim C. 2001. Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during the life of the larvae. *Invertebrate Reproduction and Development* 39: 127–134.

- Reilein A, Kogan HV, Misner R, Park KS, Kalderon D. 2021. Adult stem cells and niche cells segregate gradually from common precursors that build the adult *Drosophila* ovary during pupal development. *eLife* 10: e69749.
- Reilein A, Melamed D, Park KS, Berg A, Cimetta E, Tandon N, Vunjak-Novakovic G, Finkelstein S, Kalderon D. 2017. Alternative direct stem cell derivatives defined by stem cell location and graded Wnt signalling. *Nature Cell Biology* 19: 433–444.
- Rembold H. 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry* 17: 1003–1006.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown S, Denell R, Beeman RW, *et al.* 2008. The Genome of the Model Beetle and Pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452: 949–955.
- Ronai I, Allsopp MH, Tan K, Dong S, Liu X, Vergoz V, Oldroyd BP. 2017. The dynamic association between ovariole loss and sterility in adult honeybee workers. *Proceedings of the Royal Society B* 284: 0162693.
- Ronai I, Barton DA, Oldroyd BP, Vergoz V. 2015. Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death. *Journal of Insect Physiology* 81: 36–41.
- Ronai I, Oldroyd BP, Barton DA, Cabanes G, Lim J, Vergoz V. 2016. Anarchy is a molecular signature of worker sterility in the honey bee. *Molecular Biology and Evolution* 33: 134–142.
- Rust K, Byrnes LE, Yu KS, *et al.* 2021. A single-cell atlas and lineage analysis of the adult *Drosophila* ovary. *Nature Communications* 12: 5951.
- Sakagami SF. 1982. Social Insects. New York: Academic Press.
- Salomon M, Mayntz D, Lubin Y. 2008. Colony nutrition skews reproduction in a social spider. *Behavioral Ecology* 19: 605–611.
- Santos TCA, Cruz-Landim C. 2002. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 703–714.
- Schmidt Capella IC, Hartfelder K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology* 44: 385–391.

- Scott MP, Panaitof SC, Carleton KL. 2005. Quantification of vitellogenin-mRNA during maturation and breeding of a burying beetle. *Journal of Insect Physiology* 51: 323–331.
- Seehuus SC, Taylor S, Petersen K, Aamodt RM. 2013. Somatic maintenance resources in the honeybee worker fat body are distributed to withstand the most life-threatening challenges at each life stage. *PLoS One* 8: e69870.
- Slaidina M, Banisch TU, Gupta S, Lehmann R. 2020. A single-cell atlas of the developing *Drosophila* ovary identifies follicle stem cell progenitors. *Genes Development* 34: 239–249.
- Slaidina M, Gupta S, Banisch TU, Lehmann R. 2021. A single-cell atlas reveals unanticipated cell type complexity in *Drosophila* ovaries. *BMC Genome Research* 31: 1938–1951.
- Staurengo da Cunha MA. 1979. Ovarian development in *Scaptotrigona postica* Latr. 1807 (Hym.: Apidae) II. A quantitative study. *Insectes Sociaux* 26: 196–203.
- Tanaka ED, Hartfelder K. 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Structure and Development* 33: 431–442.
- Tanaka ED, Hartfelder K. 2009. Sequence and expression pattern of the germ line marker vasa in honey bees and stingless bees. *Genetics and Molecular Biology* 32: 582–593.
- Tanaka ED, Santana WC, Hartfelder K. 2009. Ovariole structure and oogenesis in queens and workers of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) kept under different social conditions. *Apidologie* 40: 163–177.
- Tanner EA, Blute TA, Brachmann CB, McCall K. 2011. Bcl-2 proteins and autophagy regulate mitochondrial dynamics during programmed cell death in the *Drosophila* ovary. *Development* 138: 327–338.
- Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP. 2006. Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees. *Insect Molecular Biology* 15: 537–644.

- Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP. 2008. Genome-wide analysis of genes related to ovary activation in worker honey bees. *Insect Molecular Biology* 17: 657–665.
- Tilly JL. 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 838–848.
- Tokar DR, Veleta KA, Canzano J, Hahn DA, Hatle JD. 2014. Vitellogenin RNAi halts ovarian growth and diverts reproductive proteins and lipids in young grasshoppers. *Integrative and Comparative Biology* 54: 931–941.
- Toth AL, Bilof KBJ, Henshaw MT, Hunt JH, Robinson GE. 2009. Lipid stores, ovary development, and brain gene expression in *Polistes metricus* females. *Insectes Sociaux* 56: 77–84.
- Tóth E, Queller DC, Dollin A, Strassmann JE. 2004. Conflict over male parentage in stingless bees. *Insectes Sociaux* 51: 1–11.
- Trcek T, Lehmann R. 2019. Germ granules in *Drosophila*. *Traffic* 20: 650–660.
- Valer FB, Machado MCR, Silva-Junior RMP, Ramos RGP. 2018. Expression of Hbs, Kirre, and Rst during *Drosophila* ovarian development. *Genesis* 56: e23242.
- Villa-Fombuena G, Lobo-Pecellín M, Marín-Menguiano M, Rojas-Ríos P, González-Reyes A. 2021. Live imaging of the *Drosophila* ovarian niche shows spectrosome and centrosome dynamics during asymmetric germline stem cell division. *Development* 148: dev199716.
- Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I. 2011. RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a002774.
- Waghmare I, Wang X, Page-McCaw. 2020. Dally-like protein sequesters multiple Wnt ligands in the *Drosophila* germarium. *Developmental Biology* 464: 88–102.
- Wang S, Gao Y, Song X, et al. 2015. Wnt signaling-mediated redox regulation maintains the germ line stem cell differentiation niche. *eLife* 4: e08174.
- Wang X, Page-McCaw A. 2018. Wnt6 maintains anterior escort cells as an integral component of the germline stem cell niche. *Development* 145: dev158527.

- Warner MR, Qiu L, Holmes MJ, Mikheyev AS, Linksvayer TA. 2019. Convergent eusocial evolution is based on a shared reproductive groundplan plus lineage-specific plastic genes. *Nature Communications* 10: 2651.
- Whittle CA, Extavour CG. 2019. Contrasting patterns of molecular evolution in metazoan germ line genes. *BMC Evolutionary Biology* 19: 53.
- Wilson EO. 1971. The insect societies. Cambridge: Harvard University Press.
- Wilson EO. 1990. Success and dominance in ecosystems: the case of the social insects. Oldendorf/Luhe, Germany: Ecology Institute.
- Wilson MJ, Abbott H, Dearden PK. 2011. The evolution of oocyte patterning in insects: multiple cell-signaling pathways are active during honeybee oogenesis and are likely to play a role in axis patterning. *Evolution and Development* 13: 127–137.
- Wineland DM, Kelsch DJ, Tootle TL. 2018. Multiple pools of nuclear actin. *The Anatomical Record* 301: 2014–2036.
- Winston ML. 1987. The Biology of the Honey Bee. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
- Xu H, Gui J, Hong Y. 2005. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Developmental Dynamics* 233: 872–882.
- Yadav R, Sarkar S. 2016. *Drosophila* glob1 is required for the maintenance of cytoskeletal integrity during oogenesis. *Developmental Dynamics* 245: 1048–1065.
- Yajima M, Wessel GM. 2011. The multiple hats of Vasa: its functions in the germline and in cell cycle progression. *Molecular Reproduction and Development* 78: 861–867.
- Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. 2010. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001313.
- Zucchi R, Silva-Matos EV, Nogueira-Ferreira FH, Azevedo GG. 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless - nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sociobiology* 34: 65–86.

MATERIAL SUPLEMENTAR

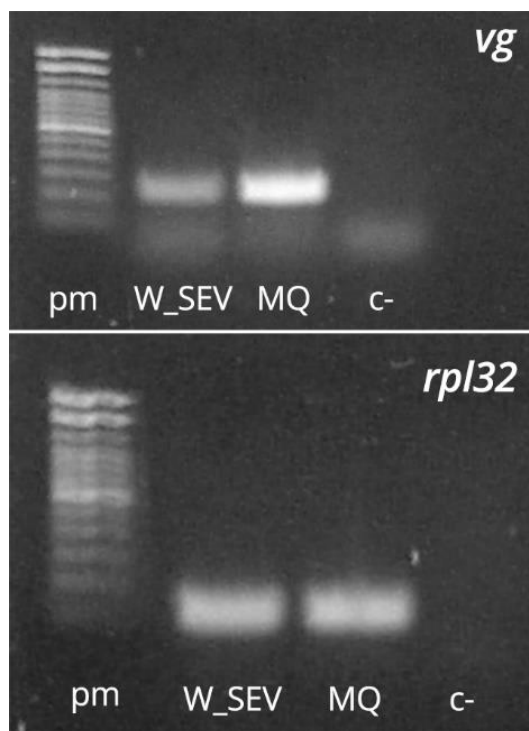


Figura S1. Gel de agarose 1,5% corado com UniSafe Dye® (20,000X - Uniscience) mostra a amplificação do fragmento de *vitelogenina* (*vg*) e do gene codificador da proteína ribossomal RpL32 (*rpl32*). As bandas ilustradas na imagem representam a amplificação a partir de amostras de cDNA (RT-PCR convencional) de corpo gorduroso. Da esquerda para a direita (*pm*) peso molecular, (*W_SEV*) corpo gorduroso de operárias com sete dias, (*MQ*) corpo gorduroso de rainha acasalada, (*c-*) controle negativo da PCR sem adição de cDNA. Os dois genes foram amplificados a 60°C (temperatura de anelamento).

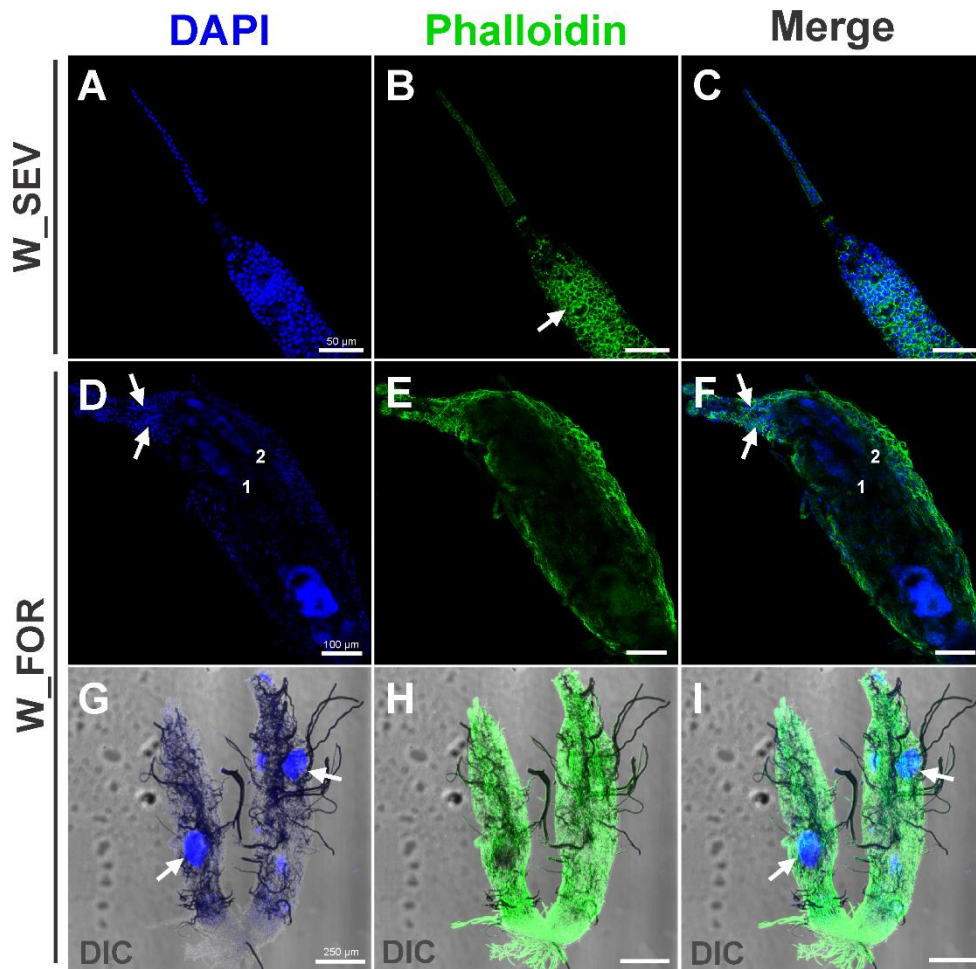


Figura S2. Ovários de operárias nutridoras com sete dias e forrageiras de *S. bipunctata*. (A-C) Ovaríolos de operária com sete dias, em (B, C) os canais em anel podem ser visualizados, em (B) a estrutura é indicada por seta. Ainda em (B), acima da região indicada por seta a versão esférica do fusoma (pontos enriquecidos com F-actina, spectrosome) pode ser observada. (D-I) Ovários de operárias forrageiras mostra toda a região do vitelário degenerada. (D, I) Na região anterior dois ovaríolos em degeneração são indicados por números (1 e 2). As setas apontam para o filamento terminal desses ovaríolos que se mostram aparentemente íntegros, localizados dentro da membrana peritonial. (G-I) Revela que ovócitos em diferentes regiões do ovaríolo são reabsorvidos nessa fase do desenvolvimento adulto. (G,I) Ovócitos em reabsorção são indicados por setas. Núcleos celulares foram corados com DAPI e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina. Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

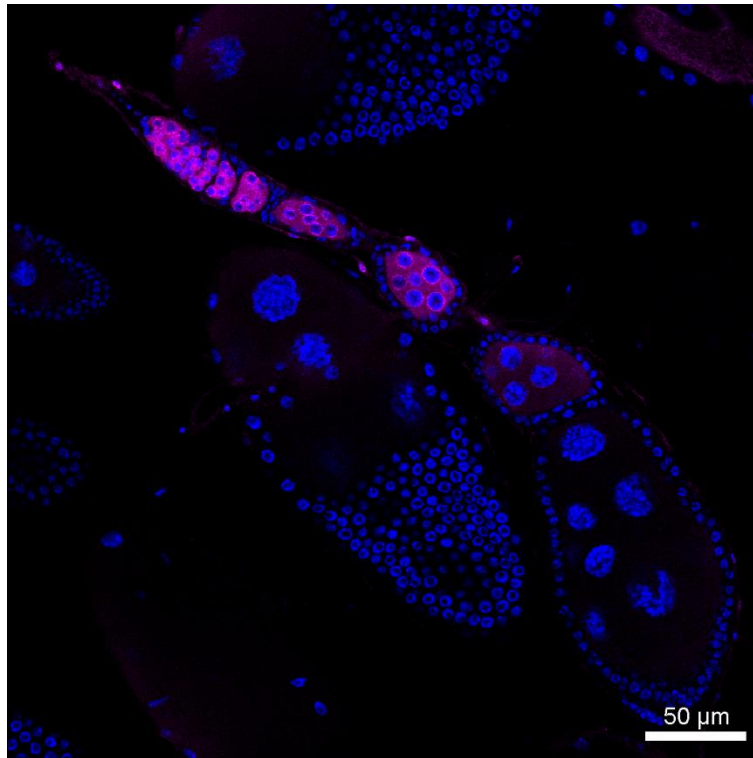


Figura S3. Ovaríolos de *Drosophila melanogaster*. Vasa (rosa) foi localizada no germário e em câmaras nutridoras, condizente com os dados da literatura sobre a expressão dessa molécula em ovários de *D. melanogaster*. DAPI (azul). Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

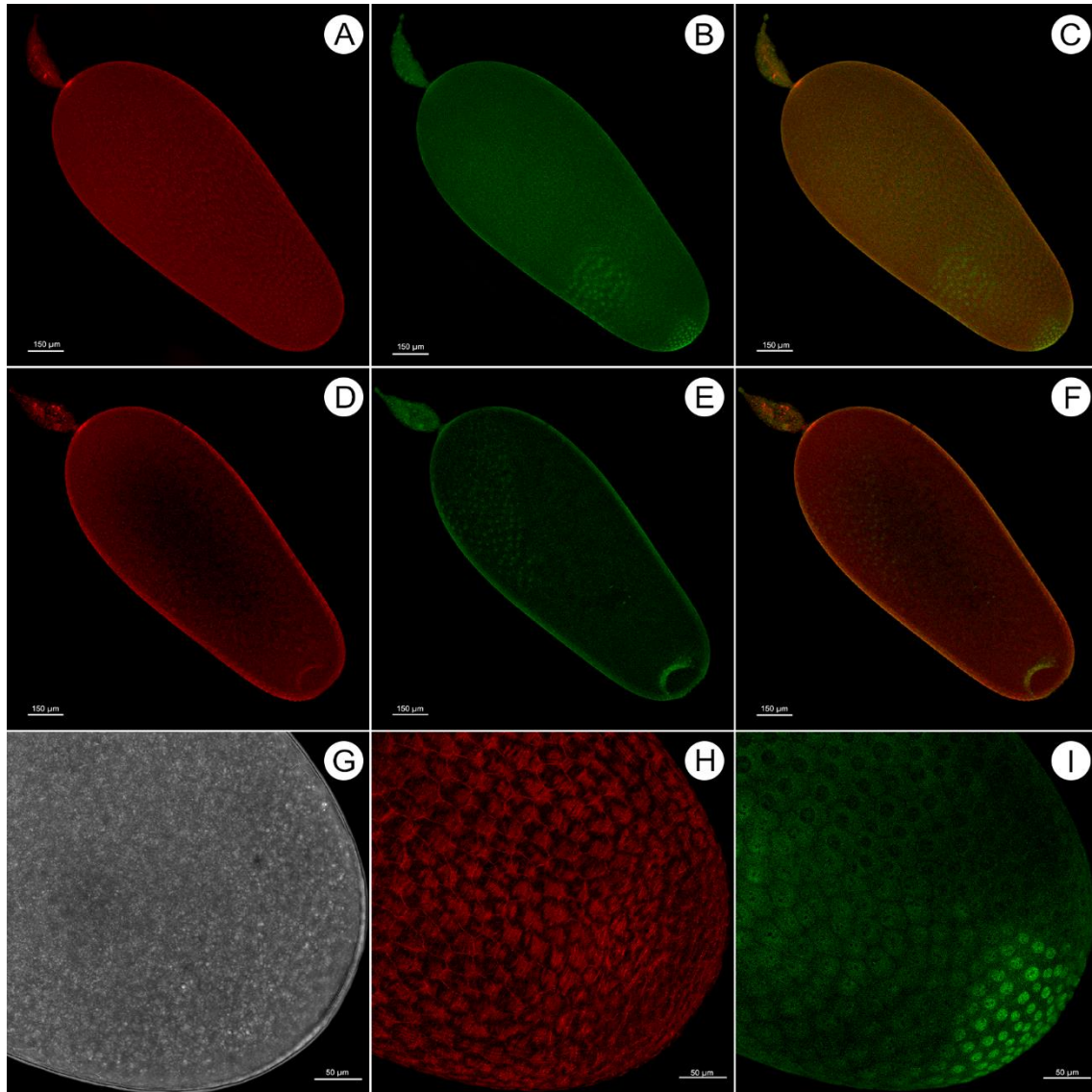


Figura S4. Expressão de Vasa em ovócitos de rainhas de *S. bipunctata*, em estágios finais da oogênese. (A) Na marcação que evidencia os filamentos de actina é possível observar detalhes do córion do ovócito. (B e C) Vasa foi localizada na câmara nutridora em degeneração e em células foliculares no polo posterior do ovócito. (D, E, e F) Nesse ovócito, Vasa se expressa na câmara nutridora e em uma estrutura em forma de arco que delimita o polo posterior do ovócito. (G, H e I) detalhes do polo posterior do ovócito são mostrados, em (I) Vasa está presente em uma população de células foliculares no polo posterior. Filamentos de F-actina (vermelho-corada com Faloidina/Rodamina), Proteína Vasa (verde). Obtenção das imagens: microscópio confocal Leica SP5.

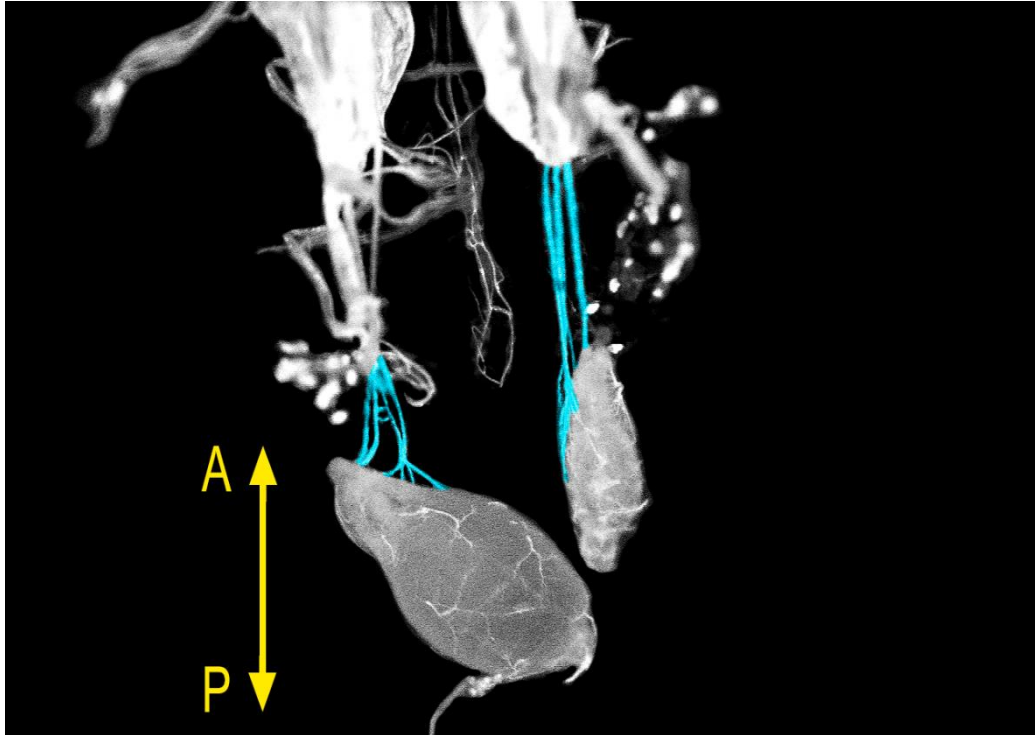


Figura S5. Ovários de operárias de *S. bipunctata*. Na dissecação é possível observar que os ovários estão fixos à parede abdominal por traqueias, indicadas em azul, e não pelo filamento terminal, o qual se encontra enrolado/dobrado dentro da bainha peritoneal. Seta indica a orientação do eixo ântero-posterior.

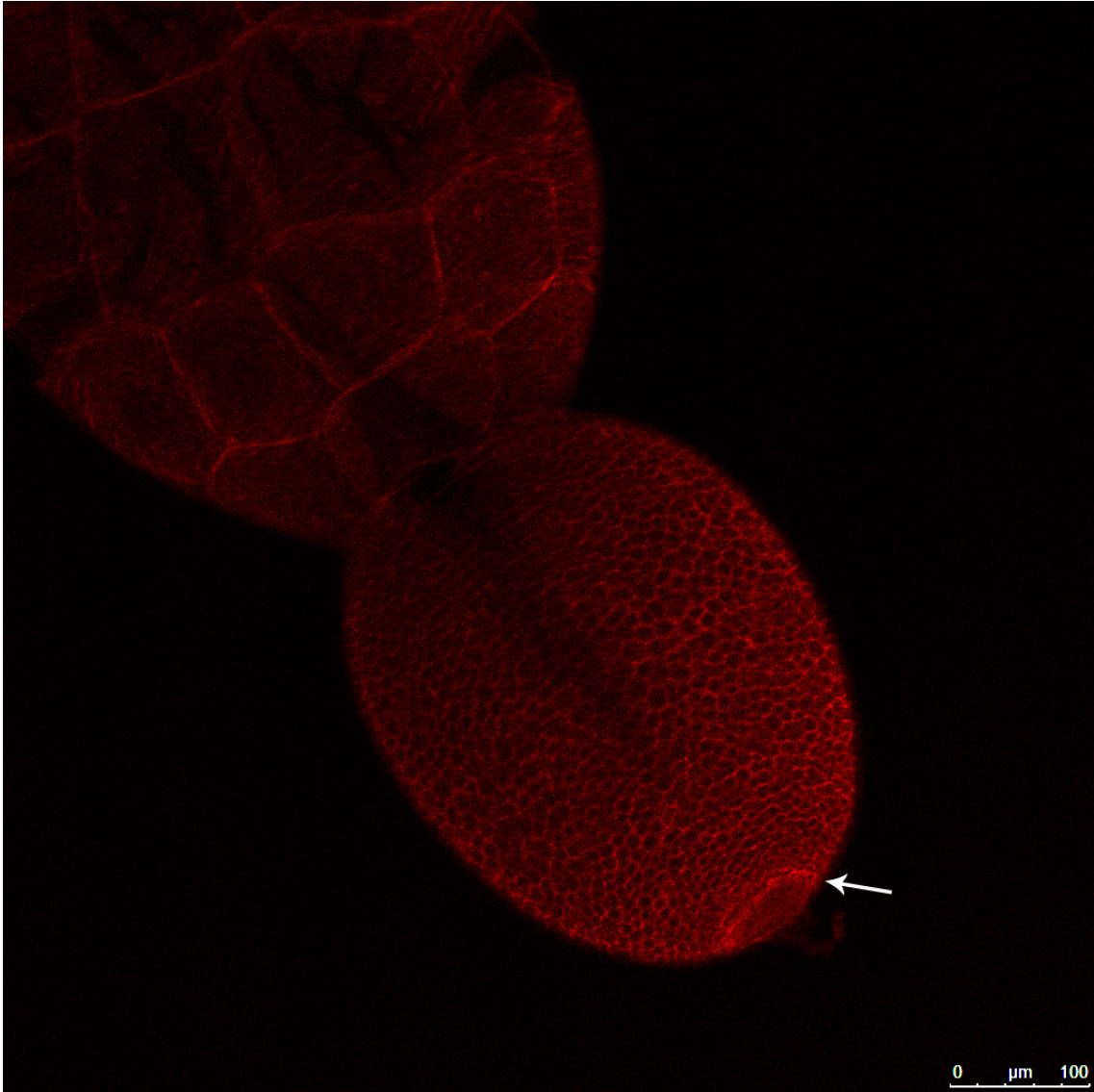


Figura S6. Formação de um citoplasma diferenciado em ovócito de operária com sete dias. Região enriquecida com F-actin na região posterior do ovócito é indicado por seta. Filamentos de F-actina foram corados com Faloidina/Rodamina (vermelho). Obtenção das imagens: microscópio Leica confocal SP5.

Tabela S1. Expressão diferencial dos genes candidatos desse estudo – *anarchy*, *vasa* e *vitelogenina* (vg). Ovário (OV), corpo gorduroso (FB). Asterisco indica valores de expressão não significativos (pajd ≤ 0.05). Valores negativos de log2FC representam genes altamente expressos em operárias recém-emergidas (W_NEW) ou operárias com sete dias de idade. A alta expressão também é indicada por seta para cima na última coluna da tabela (↑).

Órgão/ Tecido	Gene ID		log2FC	pajd	Alta expressão
OV	<i>anarchy</i> TRINITY_DN2600_c0_g1	W_FOR vs W_NEW	1,729194	2,27E-06	W_FOR↑
		W_FOR vs W_SEV	1,248194	0,000751	W_FOR↑
		W_NEW vs W_SEV	*	*	*
	<i>vasa</i> TRINITY_DN3107_c1_g1	W_FOR vs W_NEW	-1,495051	1,10E-13	W_NEW↑
		W_FOR vs W_SEV	-2,728897	9,25E-25	W_SEV↑
		W_NEW vs W_SEV	-1,242530	1,48E-08	W_SEV↑
FB	vg TRINITY_DN1099_c0_g1	W_FOR vs W_NEW	*	*	*
		W_FOR vs W_SEV	-7,635583	7,59E-10	W_SEV↑
		W_NEW vs W_SEV	-9,957476	9,44E-186	W_SEV↑

Tabela S2. Genes relacionados à determinação e especificação da linhagem germinativa em *Drosophila melanogaster* e seus ortólogos nas espécies *S. bipunctata*.

Gene	Sigla	Espécie/ID	
		<i>D. melanogaster</i>	<i>S. bipunctata</i>
<i>oskar</i>	osk	FBgn0003015	Ausente
<i>armitage</i>	armi	FBgn0041164	TRINITY_DN27206_c0_g1
<i>bruno</i>	bru	FBgn0000114	TRINITY_DN31885_c2_g1
<i>cappucino</i>	capu	FBgn0000256	TRINITY_DN31377_c2_g1
<i>cyclin B</i>	cycB	FBgn0000405	TRINITY_DN25910_c0_g1
<i>germ cell less</i>	glc	FBgn0005695	TRINITY_DN31639_c4_g1
<i>mago nashi</i>	mago	FBgn0002736	TRINITY_DN30396_c0_g2
<i>oo18 RNA-binding protein</i>	orb	FBgn0004882	TRINITY_DN28624_c0_g1
<i>pipsqueak</i>	psp	FBgn0263102	TRINITY_DN29223_c4_g1
<i>spire</i>	spir	FBgn0003475	TRINITY_DN31672_c5_g1
<i>staufen</i>	stau	FBgn0003520	TRINITY_DN27963_c2_g1
<i>tudor</i>	tud	FBgn0003891	TRINITY_DN28604_c0_g1
<i>valois</i>	vls	FBgn0003978	TRINITY_DN26709_c6_g2
<i>cup</i>	cup	FBgn0000392	TRINITY_DN27013_c4_g1
<i>nanos</i>	nos	FBgn0002962	TRINITY_DN28231_c0_g1
<i>P-element induced wimpy testis</i>	piwi	FBgn0004872	TRINITY_DN27118_c4_g1
<i>pumilio</i>	pum	FBgn0003165	TRINITY_DN31199_c1_g2
<i>vasa</i>	vasa	FBgn0283442	TRINITY_DN25887_c0_g1
<i>aubergine</i>	aub	FBgn0000146	TRINITY_GG_714_c13_g1
<i>maelstrom</i>	mael	FBgn0016034	TRINITY_DN2690_c0_g1

CAPÍTULO 2

Expressão gênica diferencial durante o processo de
ativação dos ovários de rainhas e operárias de
Scaptotrigona bipunctata (Lepeletier) revelada por análise
comparativa dos transcriptomas de ovário e corpo
gorduroso

1. INTRODUÇÃO

As diferenças morfológicas observadas nos órgãos reprodutivos das espécies eussociais e o processo de ativação dos ovários em ambas as castas têm fascinado e atraído atenção de pesquisadores evolucionistas. Recentemente, esforços têm sido feitos no sentido de se compreender os mecanismos envolvidos na ativação e inativação dos ovários das diferentes castas sob o ponto de vista molecular (Grozinger *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008; Cardoen *et al.*, 2011). Esses estudos fizeram uso de *microarray* e focaram em diferentes partes do corpo como: cérebro, abdômen inteiro e até mesmo corpo inteiro. Outros três estudos recentes buscaram responder questões relacionadas à reprodução de espécies em Apini fazendo uso da análise de expressão em larga escala (RNA-seq) com foco nos ovários (Niu *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2021). Em abelhas, estudos transcriptômicos específicos de ovários ainda são raros.

As análises do padrão de expressão gênica em larga escala (RNA-seq) têm se tornado uma importante ferramenta dos estudos modernos. Cada vez mais tem se consolidado a interpretação de que a expressão gênica de tecidos e órgãos específicos é a melhor abordagem (Hartfelder *et al.*, 2018; Cockrum *et al.*, 2020). Isso se deve ao fato conhecido de que o perfil de expressão do corpo inteiro reúne inúmeras vias reguladoras ainda desconhecidas, o que pode significar análises muito complexas e resultados de difícil interpretação. Além disso, a mistura de tecidos e órgãos pode confundir a especificidade de um conjunto de genes e dessa forma tais transcriptomas devem ser interpretados com cautela (Cockrum *et al.*, 2020). Em um estudo recente, Bresnahan *et al.* (2022) demonstraram a enorme variação existente com relação ao perfil transcricional que diferentes tecidos podem apresentar. Esses autores estudaram abelhas de inverno e dois fenótipos de abelhas na estação do verão, abelhas nutridoras e forrageiras. Os autores verificaram que abelhas de inverno têm seu perfil de expressão similar a operárias nutridoras, e diferem de operárias forrageiras, caso o tecido analisado seja o corpo gorduroso. Se o tecido em questão for músculos usados para o vôo, as abelhas de inverno apresentam um perfil transcricional similar às abelhas forrageiras, e diferem do perfil de expressão de operárias nutridoras. As conclusões do estudo de Bresnahan *et al.* (2022) reforçam a relevância de estudos transcriptômicos tecido-específicos para

responder questões específicas sobre determinados processos biológicos durante fases do desenvolvimento dos insetos.

Em *A. mellifera*, uma das espécies de abelhas mais bem estudadas até o momento, a atividade ovariana das operárias é regulada pelo mecanismo de morte celular programada (do inglês *Programmed Cell Death*: PCD) (Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015; Ronai *et al.*, 2016a; 2016b; 2017). Estudos apontam para um sofisticado mecanismo de controle por parte da rainha que se dá através de feromônios. Dentre os feromônios produzidos, o feromônio mandibular ou QMP (*Queen Mandibular Pheromone*) produzido por uma rainha fértil e exalado na colônia é interpretado como um sinal químico restritivo, capaz de disparar processo de PCD nos ovários das operárias adultas. Como consequência, os ovários das operárias sofrem degeneração de oócitos desenvolvidos ou em desenvolvimento, o que resulta no bloqueio da oogênese, impedindo a produção de ovos haploides (Hoover *et al.*, 2003; Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015). No entanto, em condições de orfandade da colônia, algumas operárias livres da influência da rainha ativam seus ovários e realizam a postura de ovos. O resultado do estímulo presença/ausência da rainha pode ser detectado tanto pela morfologia dos ovários (Tanaka & Hartfelder, 2004; Ronai *et al.*, 2015), quanto por vias moleculares (Cardoen *et al.*, 2012; Duncan *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2016). Apesar desse sofisticado mecanismo de controle, uma porcentagem relativamente alta de operárias (cerca de 5 a 10%) ativam seus ovários, mesmo na presença de uma rainha. Essas fêmeas são chamadas de “operárias anarquistas” (Oldroyd *et al.*, 1994; Barron & Oldroyd, 2001). Como citado por Hartfelder *et al.* (2018), apesar das operárias anarquistas constituírem exceção no gênero *Apis*, esse comportamento de atividade de postura na presença da rainha está presente na maioria das espécies do grupo das abelhas sem ferrão (Meliponini).

Não há informação disponível na literatura sobre o desenvolvimento e características do processo reprodutivo para a espécie *Scaptotrigona bipunctata*. Com base na proximidade filogenética, supõe-se que rainhas e operárias de *S. bipunctata*, espécie alvo do presente estudo, compartilham muitas das características descritas para a espécie *S. postica*. Tais características incluem: (1) fatores envolvidos na determinação de casta, (2) morfologia dos ovários e (3) comportamento reprodutivo da casta operária (Camargo, 1972; Beig, 1972; Staurengo da Cunha, 1979; Hartfelder & Rembold, 1991; Santos & Cruz-Landim, 2002; Cruz-Landim,

2009). A determinação de casta em *S. postica* se dá especialmente por via trófica, influenciada apenas pela quantidade de alimento (Camargo, 1972; Hartfelder & Rembold, 1991). Rainhas e operárias apresentam o mesmo número de ovários por ovário, diferindo apenas quanto ao tamanho relativo dessa estrutura (Cruz-Landim *et al.*, 1998; Santos & Cruz-Landim, 2002). As operárias de *S. postica* apresentam ovários ativos e podem realizar a postura de dois tipos de ovos: os tróficos que servem de alimento para a rainha e os funcionais que se desenvolvem em machos (Sakagami & Zucchi, 1963; Beig, 1972; Lacerda & Simões, 2006). Alguns trabalhos levantam ainda a possibilidade dos ovos tróficos serem imaturos e não possuírem envoltório nuclear, o que explicaria sua inviabilidade (Akahira *et al.*, 1970; Cruz-Landim & Höfling, 1971), com possíveis implicações sobre um sistema regulador da reprodução altamente sofisticado.

Como brevemente explanado, as pesquisas envolvendo desenvolvimento, capacidade reprodutiva e as bases genéticas que regem a diferenciação de castas e ativação dos ovários de abelhas nativas sem ferrão (Meliponini) e abelhas melíferas (Apini) se encontram em fases muito distintas de desenvolvimento, com a última em estágio muito mais avançado. Comparativamente, poucos estudos foram dedicados a elucidar do ponto de vista molecular a diferenciação de casta em abelhas nativas sem ferrão. A maioria dos estudos existentes foram realizados para espécies do gênero *Melipona* (Kerr, 1974; Judice *et al.*, 2004; 2006; Teles *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2015; Cardoso-Júnior *et al.*, 2017; Schumann *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2021; Borges *et al.*, 2021). Esse número é ainda menor quando nos referimos a estudos que integram a morfologia dos ovários (oogênese) com os mecanismos moleculares envolvidos na ativação e inativação dos ovários em abelhas adultas de ambas as castas. Uma notável exceção que segue nessa direção é o trabalho realizado por Tanaka & Hartfelder (2009), com rainhas virgens e acasaladas da espécie *M. quadrifasciata*. Nesse estudo, por meio da hibridização *in situ*, os autores descreveram o padrão da expressão de *vasa* em ovários dessa casta.

Nesse contexto, o presente estudo fez uso de sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq), visando identificar perfis transcricionais de ovários e corpo gorduroso envolvidos na ativação e inativação dos ovários de rainhas e operárias em *S. bipunctata*. Em combinação com os dados de sequenciamento, fizemos também uso de uma abordagem integrativa desses

resultados com a morfologia dos órgãos reprodutivos. Com base no comportamento reprodutivo das espécies de Meliponini estudadas até o momento, nós testaremos a seguinte hipótese: “Rainhas acasaladas e operárias com sete dias convergem para um perfil transcricional semelhante”. Partimos da interpretação que o compartilhamento desse perfil transcricional se dá por um estado fisiológico voltado para a reprodução.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer o perfil de expressão gênica durante o processo de ativação e inativação dos ovários de rainhas e operárias de *Scaptotrigona bipunctata*, por meio da análise do RNA-seq de ovários e corpo gorduroso em diferentes fases do desenvolvimento adulto.

2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, objetivamos com a presente pesquisa:

- Estudar e caracterizar a morfologia dos ovários de rainhas e operárias de *S. bipunctata* em diferentes estágios do desenvolvimento adulto (rainhas: virgens recém-emergidas e acasaladas; operárias: recém-emergidas, com sete dias e forrageiras).
- Produzir transcriptomas de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata* nos mesmos estágios do desenvolvimento adulto que foi realizada a morfologia ovariana (rainhas: virgens recém-emergidas e acasaladas; operárias: recém-emergidas, com sete dias e forrageiras).
- Realizar a montagem e análise de um transcriptoma referência para os dados de *S. bipunctata* através das abordagens *de novo* e *guiada*.
- Identificar os agrupamentos recuperados para transcriptomas de ovários e de corpo gorduroso através da análise da expressão diferencial global dos transcritos considerando os diferentes fenótipos estudados.
- Identificar por meio da análise de expressão diferencial conjuntos de genes relacionados aos ovários ativos, inativos e genes presentes em ovários com potencial para ativação.

- Estudar o perfil de expressão de genes centrais presentes em vias metabólicas relacionadas à reprodução, a exemplo de ecdisteróides e hormônio juvenil, nas castas rainha e operária de *S. bipunctata*.
- Inferir através do número de genes diferencialmente expressos entre ovários e corpo gorduroso e do número de genes exclusivo de ovário e corpo gorduroso de um mesmo fenótipo, qual das castas possui uma maior especificidade entre o órgão e o tecido analisado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material biológico

Para a realização desse projeto, as amostras de *S. bipunctata* foram obtidas da colônia 1273, do Meliponário Experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – (USP), Ribeirão Preto, São Paulo.

3.2 Escolha das fases do desenvolvimento (fenótipo) para o sequenciamento dos transcriptomas de operárias com base na morfologia dos ovários

A escolha das fases do desenvolvimento adulto que iriam compor os transcriptomas foi realizada após a classificação dos ovários de operárias adultas de *S. bipunctata* descrita no capítulo 1. O procedimento da coleta se deu de igual forma. Foram dissecados ovários e corpo gorduroso de operárias nos seguintes estágios do desenvolvimento adulto: recém-emergidas (ovários ativados), sete dias de vida (ovários ativados) e operárias forrageiras (ovários inativos). As coletas foram realizadas entre os meses de setembro a novembro de 2017.

3.3 Obtenção de amostras de rainhas de *S. bipunctata* para o sequenciamento do transcriptoma com base na morfologia dos ovários

As coletas das amostras de rainhas de *S. bipunctata* para o sequenciamento foram realizadas da seguinte forma: a colônia 1273 foi inspecionada durante os anos de 2017 a 2019, à procura por realeiras (células que são produzidas as rainhas). Como nosso objetivo foi obter rainhas naturais, essas procuras eram necessárias. Ao encontrar uma célula real, acompanhamos seu desenvolvimento no ninho por cerca de 60 dias. Quando a célula apresentava características

que indicavam que a nova rainha iria emergir, tal célula era retirada da colônia e colocada em estufa com temperatura (29°C) e umidade (80%) controladas. Logo que esse indivíduo emergia, ovário e corpo gorduroso eram dissecados e armazenados em freezer a -80°C para posterior preparação e envio para o sequenciamento. Esse procedimento foi repetido por três vezes para que fossem obtidas rainhas naturais, filhas de uma mesma rainha, e que a condição rainha virgem recém-emergida (<24 horas) fosse atendida. Esse fenótipo representa um ovário inativo de rainha.

Um procedimento específico foi necessário para obter as amostras de rainhas acasaladas da mesma colônia em que foram coletas as amostras de operárias e rainhas virgens. A colônia 1273 foi dividida para formar uma mini-colônia. Dessa forma, a colônia 1273 seria o ninho mãe e, a mini-colônia, o ninho filho, composto por algumas centenas de operárias. Essa colônia menor servia para abrigar células de rainhas próximas a emergirem, provenientes da colônia mãe. Quando uma rainha virgem emergia, ela tomava posse do ninho, acasalava e iniciava postura. Quando essa rainha apresentava um ritmo frequente de postura de ovos, nós a sacrificávamos e seus ovários e corpo gorduroso eram dissecados e armazenados para o sequenciamento a -80°C. Dessa forma, (i) a procura por realeiras na colônia mãe (ninho maior), (ii) a espera para que o indivíduo em desenvolvimento na realeira emergisse, (iii) acasalasse e (iv) realizasse postura, se repetiu por três vezes. Seguindo essa sequência as amostras de rainhas acasaladas em postura foram obtidas em triplicatas para o sequenciamento. As amostras de rainhas acasaladas representam a condição ovário ativo.

A coleta de todo material para os transcriptomas desse estudo foi realizado de setembro a fevereiro dos anos 2017–2019. As estações primavera e verão representam as estações de riqueza de alimento e conseqüentemente de maior produção de cria. Representam também, as estações mais seguras para manipular as colônias. Nas estações outono e inverno, além do clima desfavorável para o manejo dessas espécies, existe o risco de ataques de parasitas que chegam a dizimar colônias inteiras.

3.4 Extração do RNA total

A extração de RNA dos tecidos coletados foi realizada com TRIzol (Invitrogen). Para o procedimento da extração foram seguidas as recomendações do fabricante. O RNA de cada

amostra foi analisado quanto a pureza e concentração em *NanoDrop*[®] *ND-1000* (NanoDrop Technologies) através da absorvância óptica (260/280nm). Após esse procedimento, as amostras de RNA (2 µg por amostra) foram enviadas a uma *Facility* (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida, LaCTAD, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil) para análise de qualidade das amostras, usando um Bioanalyzer 2100 e preparo das bibliotecas. O número de ovários e corpo gorduroso que foram dissecados para esse estudo estão indicados nas tabelas S1 e S2 (Material Suplementar).

3.5 Construção das bibliotecas para o sequenciamento

Para a casta operária, um total de dezoito bibliotecas de mRNA foram construídas, nove de ovários e nove de corpo gorduroso. Essas bibliotecas representam três fases distintas do desenvolvimento adulto e refletem transições importantes em relação a divisão de trabalho dentro da colônia (operárias recém-emergidas, com sete dias e forrageiras). Cada fase do desenvolvimento adulto amostrada é composta de três réplicas biológicas para cada tecido/órgão estudado. As amostras biológicas são formadas por *pool* de ovários e de corpo gorduroso (para detalhes do desenho experimental desse estudo consulte a Tabela 1). O sequenciamento foi realizado em 2018, em duas *lanes*, objetivando uma maior cobertura.

No total, doze bibliotecas de mRNA foram construídas para as amostras de rainhas, seis de ovários e seis de corpo gorduroso. Essas bibliotecas representam dois grupos distintos, rainhas virgens recém-emergidas (<24h) e rainhas acasaladas em postura. Cada grupo é composto de três réplicas biológicas para cada tecido/órgão estudado. Para essa casta não foi necessário fazer *pool* para obter a quantidade de RNA necessária para o sequenciamento (2 µg por amostra). O sequenciamento foi realizado em novembro de 2020. As doze amostras foram sequenciadas em duas *lanes*. Todas as bibliotecas desse estudo foram construídas por sequenciamento do tipo *Paired-End* (2 x 100 bp read length), fazendo uso da plataforma NGS Illumina HiSeq2500 e preparadas conforme o seguinte protocolo: TruSeq Stranded mRNA guide 15031047 E.

3.6 Bioinformática

3.6.1 Qualidade das *reads*

O software TRIM-GALORE (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) foi usado para remover bases com baixa qualidade e possíveis sequências de adaptadores. Após essa etapa, a qualidade das sequências foi avaliada através do *software* FASTQC v.0.11.9 (Andrews, 2010). Devido a qualidade das bibliotecas nenhum par de *reads* precisou ser descartado.

3.6.2 Montagem do transcriptoma referência

A montagem de um transcriptoma referência foi realizada usando *reads* processadas de bibliotecas de ovário e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Tal montagem foi realizada por meio de duas abordagens, seguindo o proposto por Morandin *et al.* (2018). Primeiro, foi realizada uma montagem “*de novo*” indicado quando o genoma da espécie em estudo não está disponível. A montagem *de novo* do transcriptoma referência foi realizada com o *software* TRINITY v2.11.0 (Grabherr *et al.*, 2011), como recomendado por Haas *et al.* (2013). O Trinity compreende os seguintes pacotes: **Inchworm**, que reconstrói os *contigs* de transcritos lineares com base nos *k-mers*, mas ainda não são representativos do transcriptoma como um todo; **Chrysalis**, que reúne os *contigs* obtidos no Inchworm em grupos construindo grafos de Brujin para cada *cluster* de *contigs*; e **Butterfly**, que trabalha com os grafos de Brujin, cortando as regiões sem suporte, reorganizando os grafos e fornecendo sequência linear de cada isoforma ou parólogo presente no transcriptoma (Grabherr *et al.*, 2011). Segundo, foi realizada uma montagem guiada por genoma com o *software* TRINITY v2.11.0. O genoma de *Frieseomelitta varia* v1.2, recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (de Paula Freitas *et al.*, 2020), disponível em (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_011392965.1/) foi utilizado como referência para a essa montagem. Atualmente, existem três espécies do grupo Meliponini com o genoma publicado (*Melipona quadrifasciata* - Kapheim *et al.*, 2015; *F. varia* - de Paula Freitas *et al.*, 2020 e *Heterotrigona itama* – Wee *et al.*, 2020). No entanto, segundo a filogenia proposta por Rasmussen & Cameron (2010), *F. varia* é filogeneticamente mais proximamente relacionada à *S. bipunctata*. Dessa forma, *F. varia* foi a espécie escolhida para

a montagem guiada. Nessa abordagem as *reads* processadas foram mapeadas no genoma de *F. varia* usando o software STAR v2.7.7a (Dobin *et al.*, 2013) Os alinhamentos foram armazenados no formato BAM e executados no TRINITY seguindo o *pipeline* descrito em <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/Genome-Guided-Trinity-Transcriptome-Assembly>. Após a realização das montagens individuais, os arquivos FASTA da montagem *de novo* e da montagem guiada foram combinados em um único arquivo.

3.6.3 Identificação de regiões codificantes

A busca por regiões codificadoras na montagem concatenada foi realizada fazendo uso do *software* TRANSDECODER v 5.5.0 (disponível em <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/releases>) que se utiliza de vários critérios para encontrar potenciais regiões codificadoras (*Orfs* completas ou parciais). Após essa etapa, a redundância dos transcritos foi reduzida com o *software* CD-HIT (Weizhong & Adam, 2006) que *clusteriza* regiões altamente semelhantes e retém uma única sequência de cada *cluster*. Para essa etapa, foi permitido o agrupamento de sequências que possuíam 99% de similaridade.

3.6.4 Retirada dos transcritos contaminantes e qualidade da montagem

Para eliminar possíveis transcritos contaminantes de outros organismos na montagem, foi utilizado o software MMSEQS2 (Steinegger & Soeding, 2017), com o comando *Taxonomy* e o banco de dados Uniref90 para identificar a taxonomia dos transcritos. Em seguida, foram filtrados e retirados da montagem todos os transcritos que pertenciam a Viridiplantae, Fungi, Bactéria e Viruses. Para avaliar a qualidade e a completude da montagem do transcriptoma de referência, foi utilizado o software BUSCO v5.3 (Simão *et al.*, 2015; Waterhouse *et al.*, 2017). Essa ferramenta de avaliação reporta quanto da montagem está completa (C), “fragmentada” (F) ou ausente (M). Foi usado como referência linhagens de Hymenoptera selecionados do OrthoDB v10 (Kriventseva *et al.*, 2019).

3.6.5 Anotação funcional

A anotação funcional foi realizada utilizando o software TRINOTATE v3.2.2 (Bryant *et al.*, 2017). Foram utilizados os bancos de dados Swiss-Prot, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Nr (banco de dados de proteínas, não redundante) Nt (banco de dados de nucleotídeos, não redundante) e PFAM-A (banco de famílias de proteínas). Além desses, foi utilizado o *software* tmHMM v2 (Krogh *et al.*, 2001) para anotação de domínios transmembrana e SIGNALP v5 (Almagro *et al.*, 2019) para anotação de peptídeo sinal. Fazendo uso do *pipeline* descrito na página do programa disponível em (<https://trinotate.github.io>), vários outros bancos de anotação também foram consultados (*Gene Ontology* - GO, *evolutionary genealogy of genes* - eggNOG, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - KEGG). Os resultados da anotação do transcriptoma referência foram carregados no banco de dados SQLite v3.35.5 (<http://www.sqlite.org>). O valor máximo de *e-value* utilizado para relatar o melhor alinhamento e anotação associada foi $1e^{-3}$.

3.6.6 Expressão diferencial e análise de enriquecimento

A abundância de transcritos foi estimada com o *software* KALLISTO v0.46 (Bray *et al.*, 2016). Para análise de genes diferencialmente expressos foi feito uso do pacote DESeq2/BIOCONDUCTOR v3.12 (Love *et al.*, 2014) implementado em R. Para considerar genes diferencialmente expressos entre dois grupos de amostras, foram utilizados os seguintes critérios: (1) $\text{padj} \leq 0,05$ e (2) $\log_2 \text{fold change} < -1,0$ ou $> 1,0$. Uma análise de enriquecimento foi realizada com objetivo de verificar quais processos biológicos (GO) estavam enriquecidos entre os conjuntos de genes que foram diferencialmente expressos. Para essa análise foi utilizado o pacote Goseq – BIOCONDUCTOR v3.12 (Young *et al.*, 2010) e $\text{FDR} \leq 0,05$.

3.6.7 Busca por genes específicos de ovários e corpo gorduroso

Foi realizada uma busca por genes específicos de ovários (OV) e corpo gorduroso (FB) em cada fenótipo estudado, rainha acasalada (MQ), rainha virgem (VQ), operária forrageira (W_FOR), operária recém-emergida (W_NEW) e operária com sete dias (W_SEV). Para tal, duas abordagens foram utilizadas: (i) para obter genes diferencialmente expressos entre OV e

FB de um mesmo fenótipo, os dados foram filtrados por (1) $p_{adj} \leq 0,05$ e (2) \log_2 fold change $< - 1,0$ ou $> 1,0$; e (ii) após filtragem inicial dos dados, as colunas das tabelas de expressão obtidas na análise do DESeq2 foram filtradas por valores de expressão. Nessa etapa fizemos um corte extremo. Foram considerados genes específicos de ovários apenas aqueles que na comparação com o corpo gorduroso apresentaram um valor de expressão de zero nesse último tecido. Para encontrar os genes específicos do corpo gorduroso o mesmo procedimento foi realizado. Dessa forma, foi possível contabilizar o número de genes exclusivos de ovários e corpo gorduroso em cada fenótipo.

3.6.8 Construção dos gráficos

Os gráficos apresentados nesse estudo foram gerados utilizando *in-house scripts* desenvolvidos nas linguagens Python e R fazendo uso das bibliotecas Matplotlib v3.5.2 e ggplot2 v3.3.5. Os genes altamente expressos em cada fenótipo, bem como, os preferencialmente expresso em cada fenótipo, foram representados em diagramas de venn com auxílio da ferramenta online Venn diagrams (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das mostras que compõem o transcriptoma referência de *S. bipunctata*

O transcriptoma referência desse estudo é composto de 30 bibliotecas de mRNA distribuídas conforme a Tabela 1. As amostras utilizadas correspondem a ovários e corpo gorduroso de rainhas virgens e acasaladas, operárias recém-emergidas, com sete dias e forrageiras. As diferentes amostras foram obtidas com base na morfologia dos ovários. Na Tabela 1, pode ser encontrado uma breve descrição da morfologia avariana e os estágio da oogênese que essas amostras representam. Na Figura 1 pode ser visualizada a morfologia geral dos ovários de rainhas virgens e acasaladas usadas nesse estudo. Os outros fenótipos utilizados para a produção dos transcriptomas W_NEW, W_SEV e W_FOR tiveram sua morfologia descrita no capítulo 1.

Tabela 1. Descrição das amostras de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata* utilizadas para sequenciamento e análise.

Casta	Amostra(Sigla)	Tecido/Órgão Nº de amostras biológicas		Descrição com base na morfologia dos ovários
		Ovário	Corpo gorduroso	
Rainha	Rainha Virgem (VQ)< 24h	3 amostras biológicas	3 amostras biológicas	Rainhas virgens recém-emergidas. Presença de de cystócitos no germário. Ausência de ovócitos no vitelário. Nessa fase do desenvolvimento adulto, o vitelário ainda se encontra sem diferenciação (ovário inativo).
	Rainha acasalada (MQ)	3 amostras biológicas	3 amostras biológicas	Rainhas em postura. Nessas amostras todos os estágios da oogênese foram identificados (ovário ativo).
Operária	Recém-emergida (W_NEW) < 24h	3 amostras biológicas compostas de pool de ovários	3 amostras biológicas composta de pool de corpo gorduroso	Operárias recém-emergidas. Nessas amostras ovócitos em estágio pré-vitelogênico já são observados na região do vitelário (ovário ativo).
	Operárias com sete dias (W_SEV)	3 amostras biológicas composta de pool de ovários	3 amostras biológicas composta de pool de corpo gorduroso	Operárias com sete dias. Nessas amostras todos os estágios da oogênese foram identificados (ovário ativo).
	Operárias forrageiras (W_FOR). Foram consideradas operárias forrageiras as que retornavam ao ninho com pólen na corbícula.	3 amostras biológicas composta de pool de ovários	3 amostras biológicas composta de pool de corpo gorduroso	Operárias forrageiras. Essas amostras apresentam uma morfologia ovariana alterada. Musculatura ovariana desorganizada, ovócitos em degeneração, perda de ovaríolos e degeneração de todo o órgão (ovário inativo).

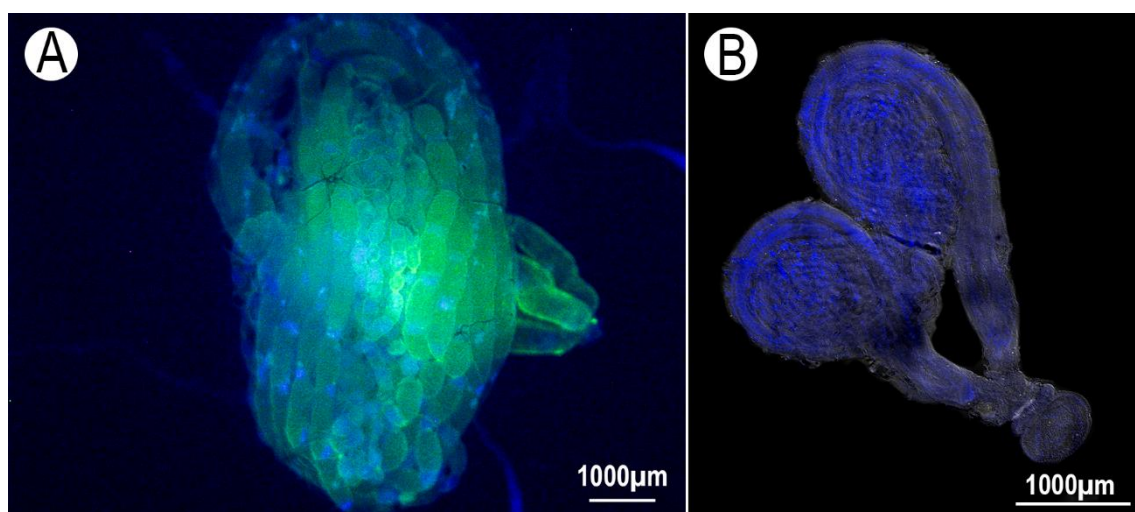


Figura 1. Visão geral da morfologia ovariana de rainhas de *S. bipunctata*. (A) Ovário direito de rainha acasalada em postura, vários ovócitos em desenvolvimento podem ser visualizados. (B) Ovários de rainha virgem sem a presença de ovócitos ou sinais de ativação. Região do vitelário indiferenciada. Os ovaríolos se mostram finos (inativos), bem diferente do fenótipo observado em (A). Núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) e filamentos de F-actina com Faloidina/Rodamina (verde na imagem A). A imagem A foi obtida em microscópio de microdissecção a laser, modelo Leica LMD6500. A imagem B foi obtida em microscópio confocal Leica SP5.

4.2 Montagem e anotação do transcriptoma referência

A montagem do transcriptoma referência foi realizada a partir de 634.713.645 *reads* processadas. As métricas das montagens de *novo e* guiada (genoma referência) podem ser visualizadas em Tabela S3 (Material Suplementar). As bibliotecas resultantes das montagens individuais foram combinadas resultando em 448.380 transcritos e 287.184 “genes”. Buscas por regiões codificantes foram realizadas na montagem combinada. A análise de busca realizada pelo TRANSDECODER retornou 246.863 potenciais regiões codificadoras, pertencentes a 157.815 transcritos e 55.533 genes. Com objetivo de reduzir a redundância dos transcritos na montagem final, as potenciais regiões codificadoras com similaridade maior que 99% foram agrupadas na análise com o CD-HIT. Dessa forma, foram retidas nesse estágio um total de 83.630 regiões codificantes, 78.507 transcritos e 50.171 genes. A análise realizada fazendo uso do MMSEQS2 permitiu a identificação e retirada de transcritos contaminantes. A filtragem dos dados para retirada dos contaminantes retornou um transcriptoma composto de 60.571 potenciais regiões codificantes, pertencentes a 55.758 transcritos e 32.215 “genes”. A estatística da montagem final do transcriptoma referência de *S. bipunctata* pode ser visualizada na Tabela S3 (Material Suplementar). A qualidade da montagem acessada através da ferramenta BUSCO identificou 5.822 (C: 92.2%) transcritos completos, 39 (F: 0.7%) “fragmentados” e 130 (M: 2.1%) não foram encontrados. Um resumo das informações da anotação funcional das sequências obtidas após a consulta aos bancos de dados SwissProt, NR, Gene Ontology, Pfam, e KEGG podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Visão geral da anotação funcional das sequências obtidas da montagem final do transcriptoma referência de *S. bipunctata*.

Banco de dados	Nº de sequências
Swiss-Prot -BLASTX	12.349
Swiss-Prot -BLASTP	10.021
NR-BLASTX	11.919
NR-BLASTP	10.023
Gene ontology-BLASTX	35.458
Gene ontology-BLASTP	29.705
KEGG	30.518
Pfam	10.089

4.3 Visão geral do padrão de expressão dos transcriptomas

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 2) mostra a qualidade do experimento realizado, demonstrando a separação das amostras de ovários e corpo gorduroso e o agrupamento das triplicatas biológicas de forma coerente sem discrepâncias significativas (*outliers*). Isso evidencia que as réplicas biológicas das diferentes amostras (Rainhas: acasalada MQ e virgem VQ, operárias: recém-emergidas W_NEW, com sete dias W_SEV, e forrageiras W_FOR) tiveram boa repetibilidade. Essa informação também pode ser visualizada nos *heatmaps* das Figuras 3 e 4.

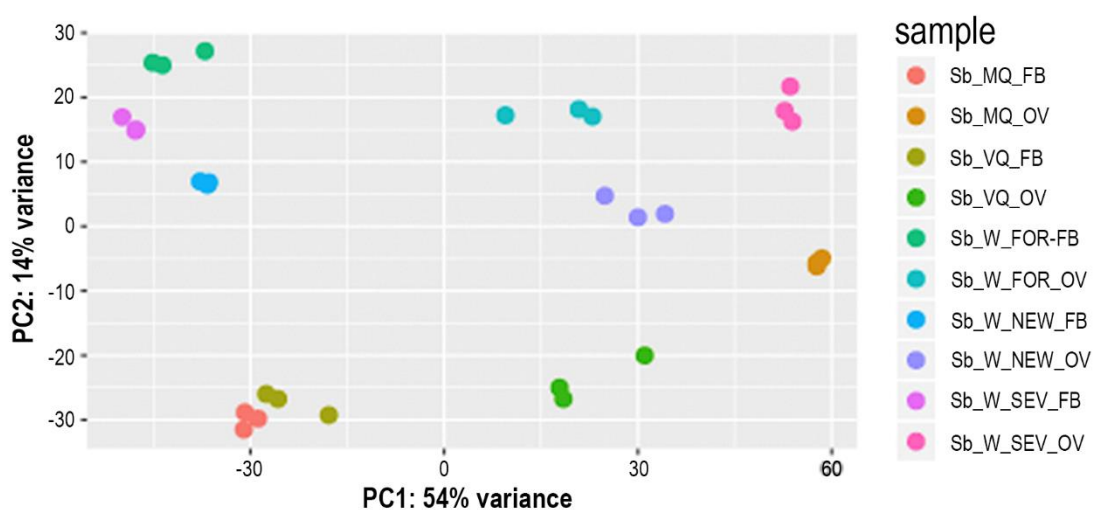


Figura 2. Análise de componentes principais mostra a similaridade transcricional entre as amostras. Cada ponto representa uma amostra de RNA-Seq. Amostras com perfil similar de expressão são agrupadas. Esse agrupamento pode ser observado em todas as réplicas biológicas desse experimento. As diferentes amostras do experimento são identificadas por cores diferentes. (MQ_FB) corpo gorduroso de rainha acasalada, (MQ_OV) ovário de rainha acasalada, (VQ_FB) corpo gorduroso de rainha virgem, (VQ_OV) ovário de rainha virgem, (W_FOR_FB) corpo gorduroso de operária forrageira, (W_FOR_OV) ovário de operárias forrageiras, (W_NEW_FB) corpo gorduroso de operária recém-emergida, (W_NEW_OV) ovário de operária recém-emergida, (W_SEV_FB) corpo gorduroso de operária com sete dias, (W_SEV_OV) ovário de operária com sete dias.

4.4 Semelhança e diferenças entre os perfis transcricionais de rainhas e operárias de *S. bipunctata*

4.4.1 Perfil transcricional dos ovários

Na figura 3, a análise da distância euclidiana mostra a relação entre o perfil transcricional global das amostras de ovários entre e dentro das castas nas diferentes fases do desenvolvimento adulto. Essa *clusterização* dos dados nos permite verificar que as amostras de ovários de rainhas e operárias se agrupam, a exemplo das amostras de ovários de rainha acasalada (MQ) e operária com sete dias (W_SEV). O outro agrupamento formado é entre

ovários de rainhas virgens (VQ), operárias recém-emergidas (W_NEW) e forrageiras (W_FOR), com W_FOR mostrando uma maior similaridade ao perfil transcricional de W_NEW se comparado a VQ.

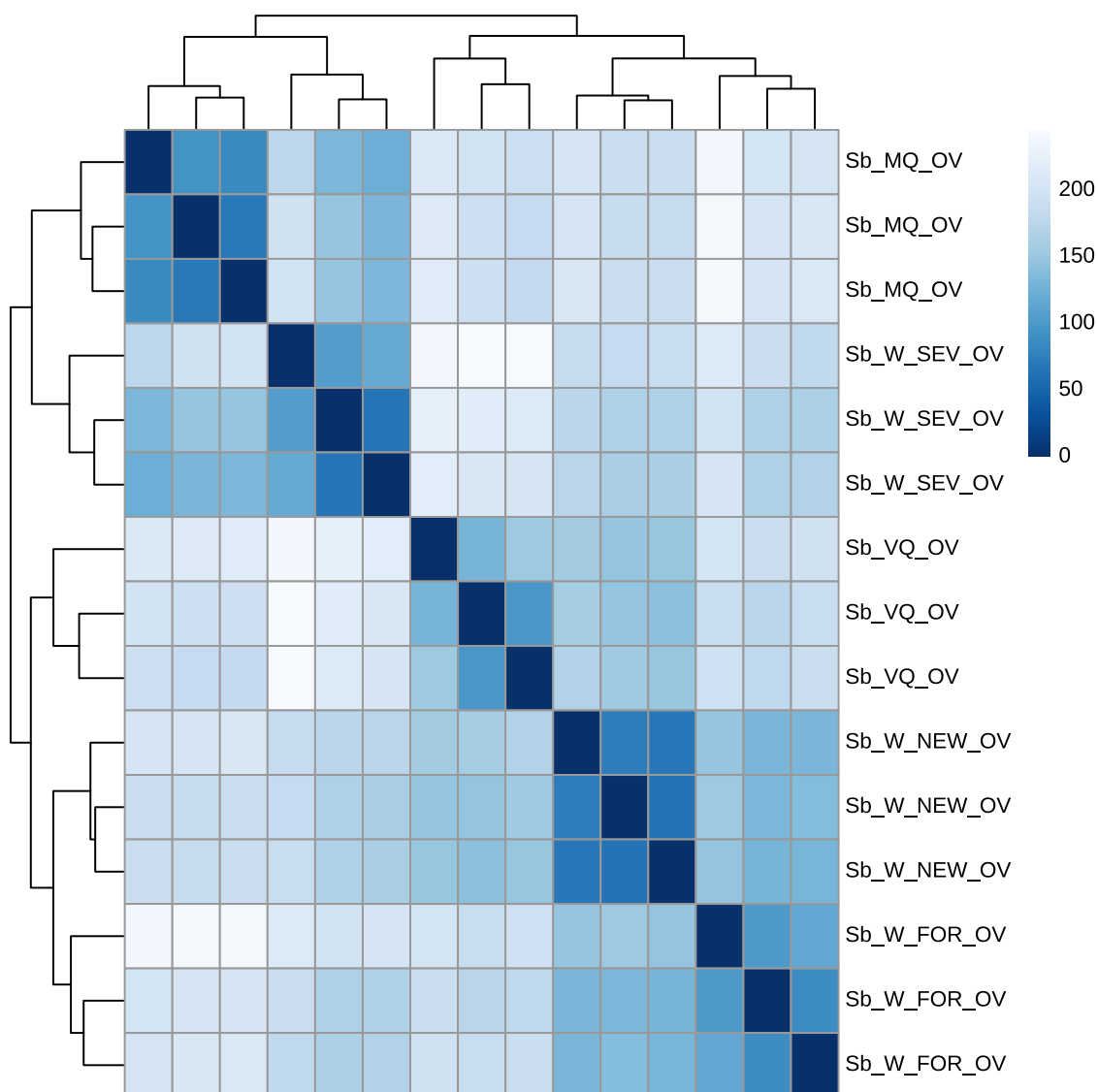


Figura 3. *Heatmap* representa a análise da distância euclidiana do perfil transcricional das amostras de ovários nas diferentes castas (rainhas e operárias) e nas diferentes fases do desenvolvimento adulto. Tons mais escuros em azul mostram uma menor diferença entre os transcriptomas. A linha diagonal representa a comparação de uma amostra com ela mesma. (MQ_OV) ovário de rainha acasalada, (W_SEV_OV) ovário de operária com sete dias, (VQ_OV) ovário de rainha virgem, (W_NEW_OV) ovário de operária recém-emergida e (W_FOR_OV) ovário de operária forrageiras. Cada fenótipo possui três réplicas biológicas independentes.

4.4.2 Perfil transcricional do corpo gorduroso

Em relação ao perfil transcricional do corpo gorduroso (Figura 4), podemos observar que rainhas acasaladas (MQ) e rainhas virgens (VQ) se agrupam, o outro agrupamento

visualizado é formado por operárias recém-emergidas, com sete dias e forrageiras (W_NEW, W_SEV e W_FOR). Ainda em relação à figura 4, o agrupamento dos dados nos permite observar que dentro da casta operária os perfis transcricionais que mais se assemelham são os de operárias recém-emergidas e com sete dias. O perfil transcricional de operárias forrageiras é o mais contrastante nesse agrupamento.

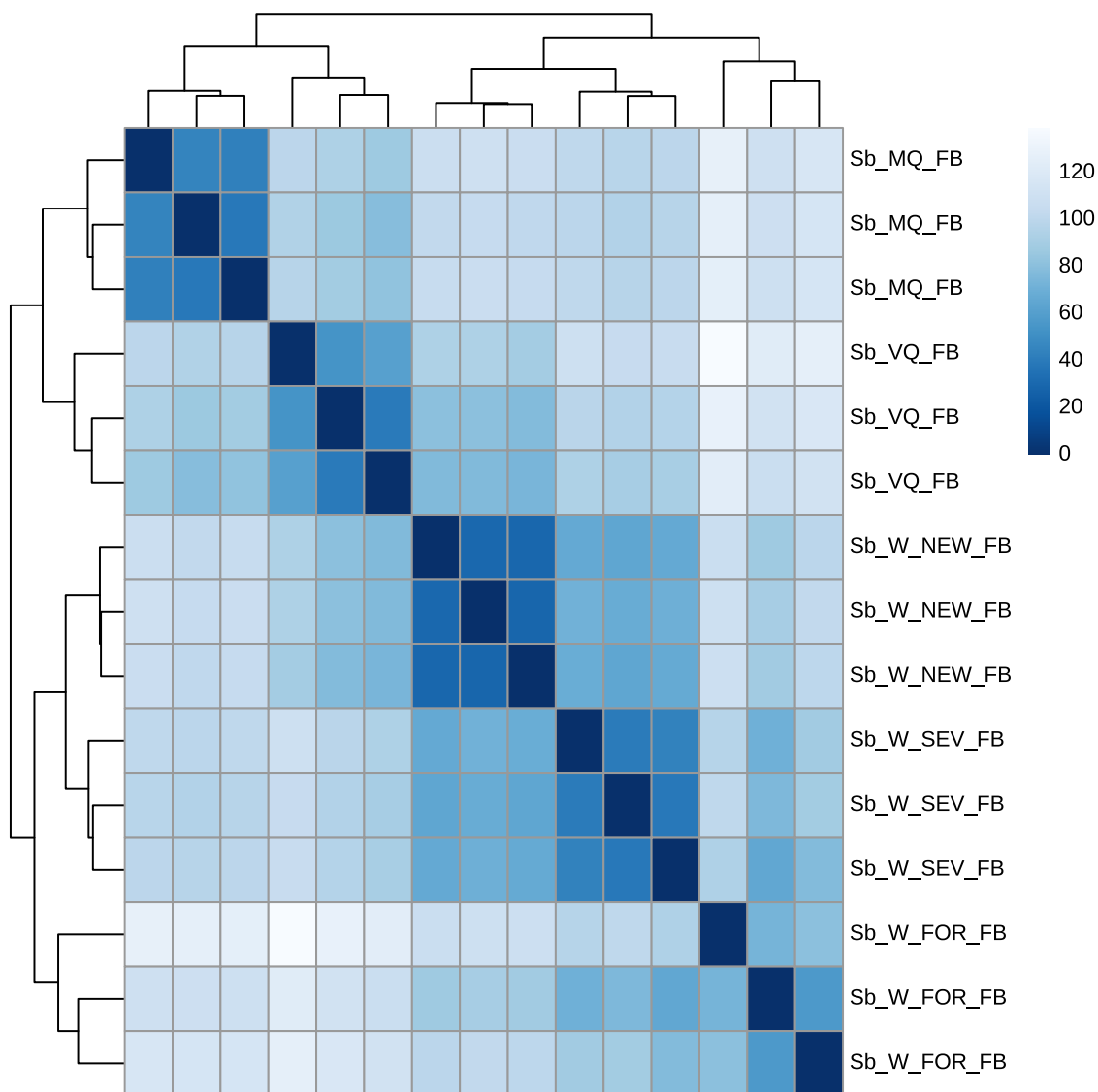


Figura 4. *Heatmap* representa a análise da distância euclidiana do perfil transcricional das amostras de corpo gorduroso nas diferentes castas (rainhas e operárias) e nas diferentes fases do desenvolvimento adulto. Tons mais escuros em azul mostram uma menor diferença entre os transcriptomas. A linha diagonal representa a comparação de uma amostra com ela mesma. (MQ_FB) corpo gorduroso de rainha acasalada, (VQ_FB) corpo gorduroso de rainha virgem, (W_NEW_FB) corpo gorduroso operária recém-emergida, (W_SEV_FB) corpo gorduroso de operária com sete dias, (W_FOR_FB) corpo gorduroso de operária forrageira. Cada fenótipo possui três réplicas biológicas independentes.

4.5 Análise par a par das bibliotecas de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*

Comparações par a par das bibliotecas de ovários e corpo gorduroso foram realizadas para identificar o número de genes diferencialmente expressos entre e dentro das castas nos diferentes estágios do desenvolvimento adulto aqui estudados. Os genes diferencialmente expressos foram filtrados por $p_{adj} \leq 0,05$ e $\log_2FC < -1,0$ ou $> 1,0$. No total, 20 comparações foram realizadas. Dez comparações para bibliotecas de ovários e dez comparações para bibliotecas de corpo gorduroso. As comparações foram realizadas entre os seguintes fenótipos: (1) rainhas acasaladas (MQ) *versus* rainhas virgens (VQ), (2) MQ *vs* operárias forrageiras (W_FOR), (3) MQ *vs* operárias recém-emergidas (W_NEW), (4) MQ *vs* operárias com sete dias (W_SEV), (5) rainhas virgens (VQ) *vs* W_FOR, (6) VQ *vs* W_NEW, (7) VQ *vs* W_SEV, (8) W_FOR *vs* W_NEW, (9) W_FOR *vs* W_SEV, (10) W_NEW *vs* W_SEV.

Nas bibliotecas de ovários, o maior número de genes diferencialmente expressos foi observado quando rainhas acasaladas (MQ) foram comparadas aos fenótipos, W_NEW (8.145), W_FOR (8.114) e VQ (6.349), ou quando operárias com sete dias (W_SEV) foram comparadas a VQ (7.342), W_NEW (7.278) e W_FOR (6.624). Os menores números de genes diferencialmente expressos foram observados entre as comparações de rainhas acasaladas (MQ) *vs* operárias com sete dias (W_SEV), rainhas virgens (VQ) *vs* operárias recém-emergidas (W_NEW), e entre W_FOR *vs* W_NEW, 3.746, 4.037 e 4.265 respectivamente. Na Figura 5, podem ser consultadas outras comparações e o número de genes altamente expressos em cada fenótipo das bibliotecas de ovários.

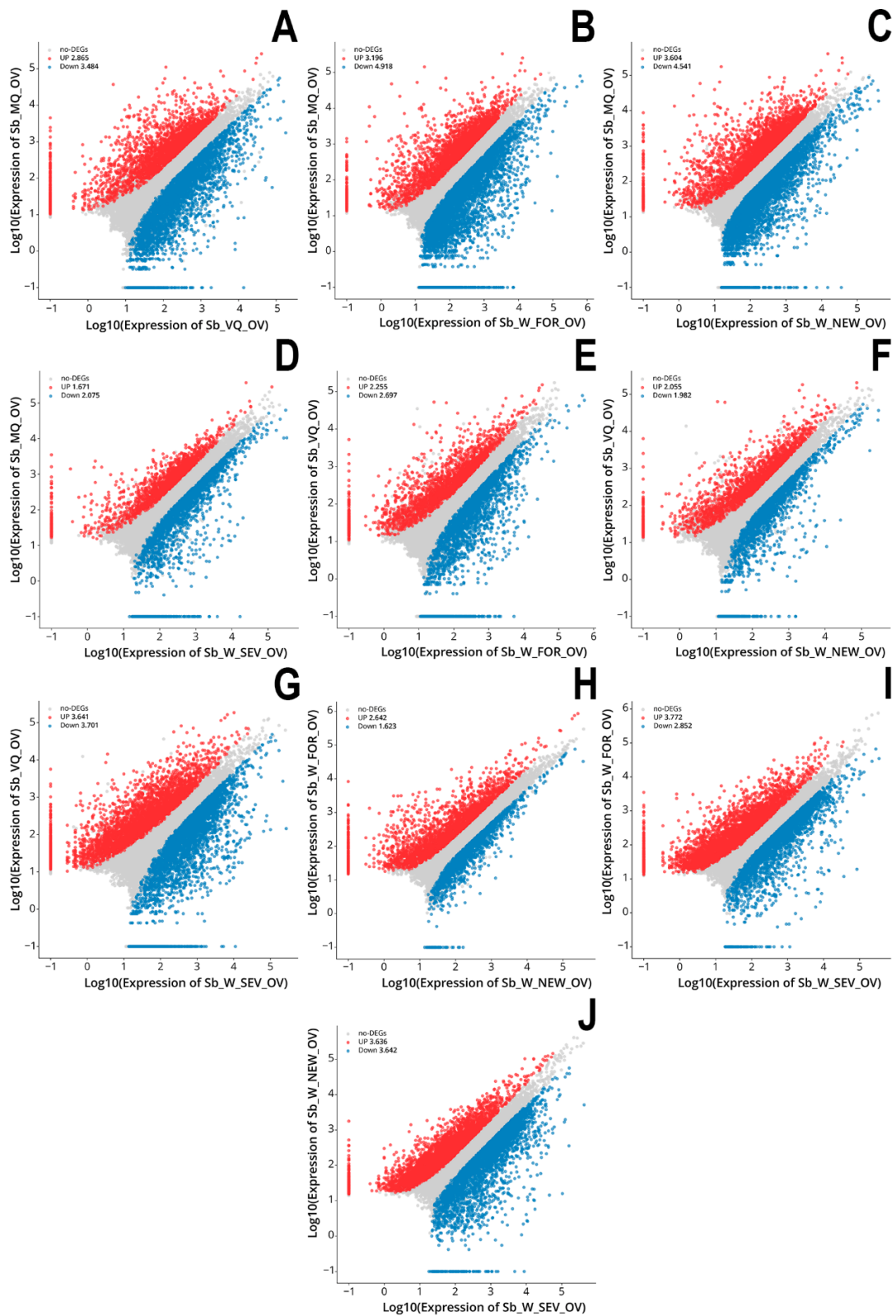


Figura 5. Scatter plot de genes diferencialmente expressos identificados na comparação par a par nas bibliotecas de ovários de *S. bipunctata*. Pontos em vermelho representam genes regulados de forma positiva e pontos em azul regulados de forma negativa. Pontos em cinza significam genes sem diferença de expressão. (A) ovários de rainhas acasalada (MQ) versus ovários de rainhas vírgens (VQ). (B) Ovários de MQ vs ovários de operárias forrageiras (W_FOR). (C) Ovários de MQ vs ovários de operárias recém-emergidas (W_NEW). (D) Ovários de MQ vs ovários de operárias com sete dias (W_SEV). (E) Ovários de rainhas vírgens (VQ) vs ovários de W_FOR. (F) Ovários de VQ vs ovários de W_NEW. (G) Ovários de VQ vs ovários de W_SEV. (H) Ovários W_FOR vs ovários de W_NEW. (I) Ovários de W_FOR vs ovários de W_SEV. (J) Ovários de W_NEW vs ovários de W_SEV.

Em relação às bibliotecas de corpo gorduroso, um maior número de genes diferencialmente expresso foi observado quando as diferentes castas foram comparadas a exemplo de MQ *vs* W_NEW (5.583), MQ *vs* W_FOR (5.172), VQ *vs* W_FOR (5.655). Quando as comparações são feitas dentro das castas, um menor número de genes diferencialmente expresso é observado, MQ *vs* VQ (2.947), W_FOR *vs* W_SEV (1.997), W_NEW *vs* W_SEV (2.463). Na Figura 6, podem ser visualizados outros resultados em relação ao número de genes diferencialmente expressos, bem como, o número de genes altamente expresso em cada fenótipo estudado nas bibliotecas de corpo gorduroso.

Nas Figuras S1 à S4 (Material Suplementar) podem ser consultados os genes que possuem as maiores variações no nível de expressão quando duas comparações são realizadas, considerando tanto ovários (Figuras S1 e S2, Material Suplementar) quanto corpo gorduroso (Figuras S3 e S4, Material Suplementar). A descrição desses genes segundo Swiss-Prot podem ser consultados nas Tabelas S4 à S13 (Material Suplementar). No total 400 genes estão representados nessas figuras e tabelas.

4.6 Número de genes com padrão de expressão compartilhado e exclusivo de fenótipos

Diagramas de Venn foram construídos para os dados de ovário e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Nessa análise apenas os genes altamente expressos em cada fenótipo foram considerados. A Figura 7-A e B, mostra o número de genes regulados na mesma direção compartilhados entre e dentro das castas e nas diferentes fases do desenvolvimento adulto. Nessa imagem também é possível visualizar o número de genes com padrão de expressão exclusivo de cada fenótipo (MQ, VQ, W_NEW, W_SEV e W_FOR).

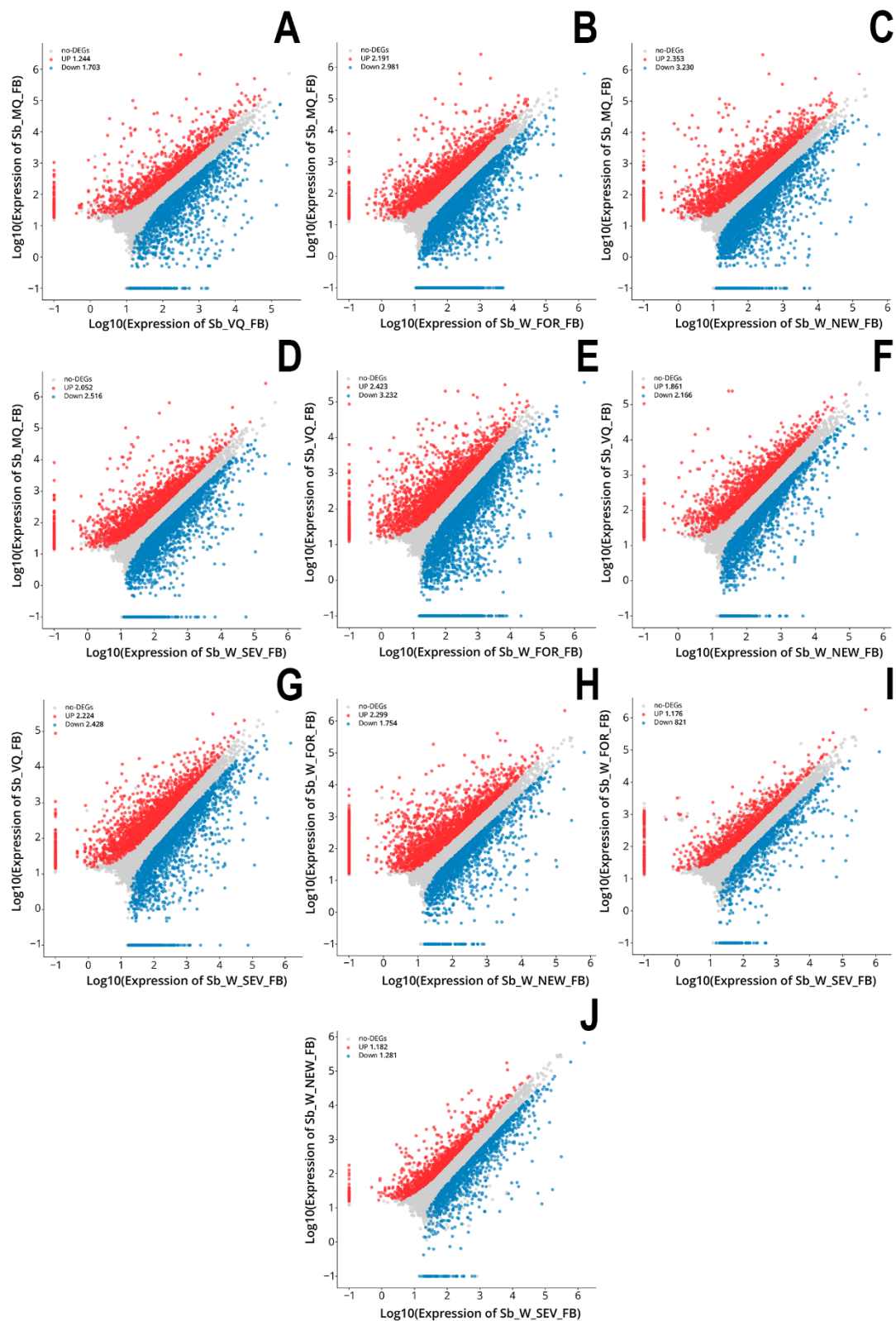


Figura 6. Scatter plot dos genes diferencialmente expressos identificados na comparação par a par nas bibliotecas de corpo gorduroso de *S. bipunctata*. Pontos em vermelho representam genes regulado de forma positiva e pontos em azul regulados de forma negativa. Pontos em cinza significam genes sem diferença de expressão. (A) corpo gorduroso de rainhas acasaladas (MQ) versus corpo gorduroso de rainhas virgens (VQ). (B) Corpo gorduroso MQ vs corpo gorduroso de operárias forrageiras (W_FOR). (C) Corpo gorduroso de MQ vs corpo gorduroso de operárias recém-emergidas (W_NEW). (D) Corpo gorduroso de MQ vs corpo gorduroso de operárias com sete dias (W_SEV). (E) Corpo gorduroso de rainhas virgens (VQ) vs corpo gorduroso de W_FOR. (F) Corpo gorduroso de VQ vs corpo gorduroso de W_NEW. (G) Corpo gorduroso de VQ vs corpo gorduroso de W_SEV. (H) Corpo gorduroso W_FOR vs corpo gorduroso de W_NEW. (I) Corpo gorduroso de W_FOR vs corpo gorduroso de W_SEV. (J) Corpo gorduroso de W_NEW vs corpo gorduroso de W_SEV.

Nos ovários os maiores número de genes altamente expressos foram compartilhados pelos fenótipos MQ e W_SEV (1.515) e entre VQ, W_FOR, W_NEW (1.450). Refletindo os agrupamentos obtidos na análise da distância euclidiana (Figura 3). A seguir, descrevemos alguns genes que foram compartilhados ou exclusivos de fenótipos.

Rainha acasala, W_SEV, W_NEW e VQ compartilham 78 genes, entre eles estão: *star*, *aubergine* e *Cdc2-related kinase*. Rainha acasalada, W_SEV e W_NEW compartilham a alta expressão de 295 genes a exemplo de: *argonaute 3*, *cappuccino*, *vasa* e *nanos*. Os fenótipos MQ e W_SEV que compartilham o maior número de genes, apresentam alta expressão de *maelstrom*, *luna*, (também conhecido como *krueppel-like factor luna*), *yellow-g*, *yellow-g2*; *axin*, *pangolin*, *dishevelled*, *armadillo*. Outro compartilhamento que vale apenas mencionar é entre VQ, W_NEW e W_FOR. Esses fenótipos compartilham a alta expressão de *yellow-x1*, *yellow-b* e *yellow-e3*. Ovários de W_FOR apresentam uma expressão específica de 1.508 genes, entre eles podemos citar *major royal jelly protein 1* e *yellow-f*. Mais detalhes sobre os genes presente na Figura 7. A, será dado no decorrer do texto ao discutir algumas vias relacionadas a reprodução.

Nas bibliotecas de corpo gordoroso os maiores números de genes regulados na mesma direção foram observados entre W_NEW, W_SEV e W_FOR (1.079) e entre MQ e VQ (918). Esse resultado reflete o obtido Figura 4. Um número elevado de genes anotados como Cytochromo P450 foi observado nesse tecido (Figura 8). As P450 apresentam alta expressão tanto em rainhas quanto em operárias, com um maior número observado nessas últimas. Operárias recém-emergidas, W_SEV e W_FOR, compartilham uma expressão específica de 20 enzimas P450. Dentro da casta operária, as forrageiras são as que apresentam uma maior quantidade de genes codificadores dessas enzimas com alta expressão. Rainha virgem é o fenótipo que têm o menor número de P450 altamente expressa. Na Figura 8 estão representados 177 genes da família P450, com exceção das envolvidas na síntese de ecdisteróides e hormônio juvenil.

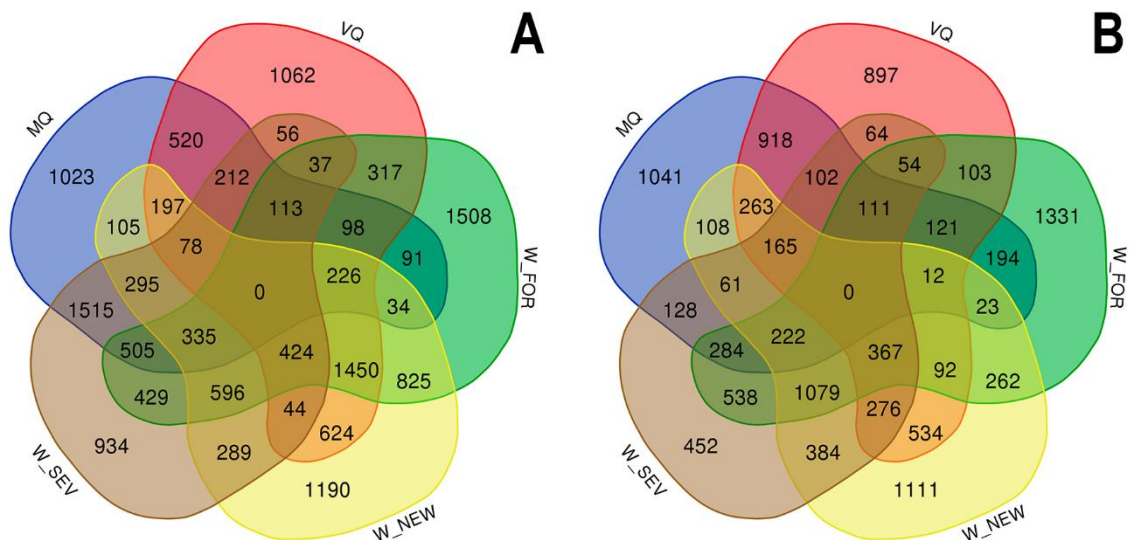


Figura 7. Números de genes regulados na mesma direção (altamente expresso) compartilhados entre os fenótipos e exclusivos de fenótipos. (A) ovários e (B) corpo gorduroso. Rainha acasalada (MQ), Rainha virgem (VQ), operária forrageira (W_FOR), operária recém-emergida (W_NEW), operária com sete dias (W_SEV).

As forrageiras também expressam de forma específicas várias proteínas ribossômicas como pode ser visto nos *heatmaps* que foram construídos (Figuras S3 e S4, e Tabela S9, S11 e S12, Material Suplementar), o que diferencia esse fenótipo dos demais. Rainhas acasaladas e VQ compartilham uma expressão específica de genes como *Multidrug resistance protein pgp-1*, *Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B*, e *Oxidation resistance protein 1*. Rainha acasaladas e W_SEV compartilham uma expressão específica de 128 genes, dentre estes podemos citar *vitellogenin*.

Nesse tecido também encontramos diferencialmente expressos genes envolvidos no gerenciamento de danos oxidativos, à exemplo de *Glutathione S transferases* (GSTs), *Superoxide dismutases* (SODs) e *Peroxiredoxins* (Prxs) (Figura 9). Rainhas acasaladas possuem alta expressão dos genes da família GSTs. As SODs são mais expressas em W_SEV e as Prxs em VQ. De modo geral, MQ apresenta um maior número de genes de resposta ao estresse oxidativo altamente expressos.

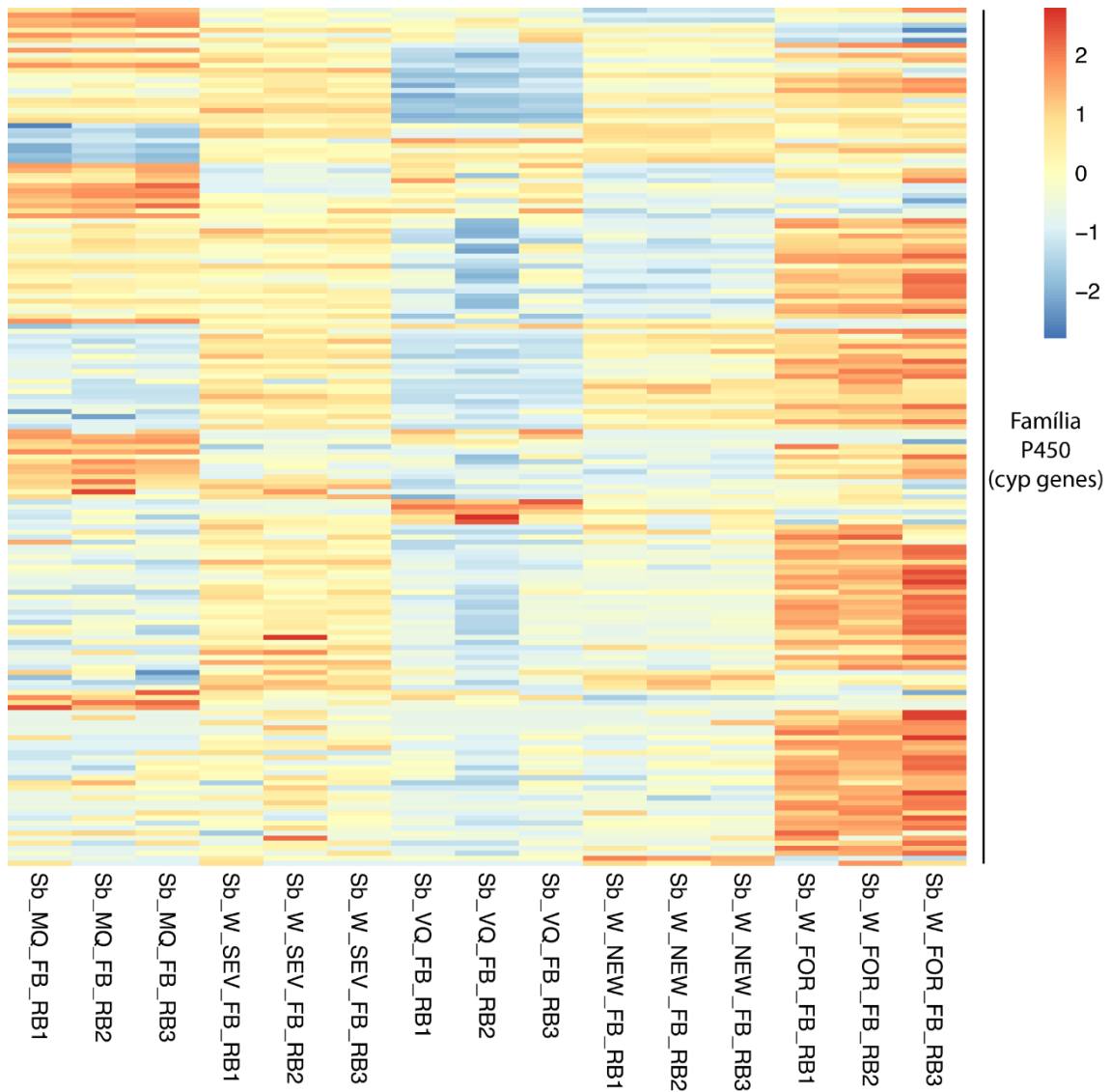


Figura 8. Perfil de expressão de cento e setenta e sete genes da família citocromo P450 no corpo gorduroso (FB) de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra se refere às réplicas biológicas de cada fenótipo. Operária forrageira (W_FOR), operária recém-emergida (W_NEW), Rainha virgem (VQ), operária com sete dias (W_SEV), Rainha acasalada (MQ).

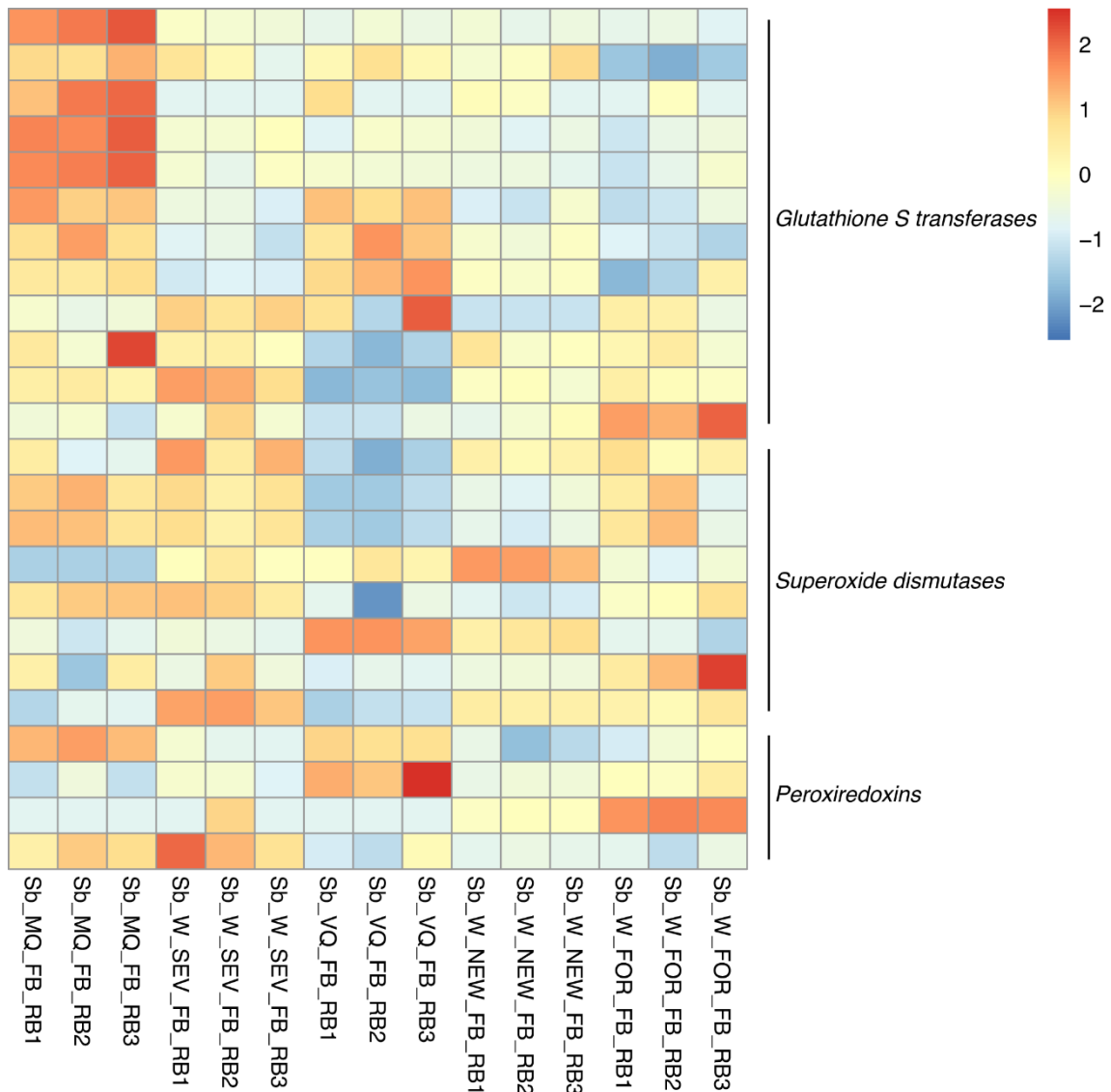


Figura 9. Perfil de expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo no corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Nesse *heatmap* são apresentados doze genes *glutathione S transferases*, oito genes *superoxide dismutases* e quatro genes *peroxiredoxins*. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra se refere às réplicas biológicas de cada fenótipo. Operária forrageira (W_FOR), operária recém-emergida (W_NEW), Rainha virgem (VQ), operária com sete dias (W_SEV), Rainha acasalada (MQ).

4.7 Genes de vias metabólicas relacionados à reprodução

Os genes centrais das vias de ecdisteróides e hormônio juvenil, consideradas importantes para reprodução em insetos, foram encontrados no transcriptoma referência de *S. bipunctata*. Esses genes tiveram seus valores de expressão consultados e serão apresentados a seguir.

4.7.1 Genes da via dos ecdisteróides nos ovários de *S. bipunctata*

A via dos ecdisteróides envolve os genes *neverland* (*nvd*), *spook/Cyp307a1* (*spo*), *phantom/Cyp306a1* (*phm*), *disembodied/Cyp302a1* (*dib*), *shadow* (*sad*), *shade/Cyp314a1* (*shd*)

e *Cyp18a1*. Todos os genes citados, com exceção de *Cyp18a1*, estão envolvidos na síntese de ecdisteróides, *Cyp18a1* é a enzima de degradação desse hormônio. Todos esses genes estão presentes no transcriptoma de ovário de *S. bipunctata*. O gene *shade/Cyp314a1*, que é responsável pela conversão da ecdisona em 20-hidroxiecdisona (forma ativa), foi encontrado nos transcriptomas e está completo na montagem. No entanto, no processo de montagem esse gene foi fusionado a outro gene, o que tornou seu tamanho em pares de bases (pb) muito grande. Para evitar resultados irrealistas, o valor de expressão desse gene não foi considerado. Na Figura 10 é possível observar que a maioria dos genes da via dos ecdisteróides se apresenta altamente expresso em MQ, VQ, W_SEV, W_NEW. Em rainhas acasaladas, todos os seis genes da via estão altamente expressos. Rainhas virgens e W_SEW possuem alta expressão de 5 genes da via. Em W_NEW foram observados quatro genes altamente expressos. Operárias forrageiras são as que possuem uma menor atividade da via dos ecdisteróides, apenas *shadow* e *spook* apresentaram alta expressão nesse fenótipo.

4.7.2 Via de síntese e degradação do hormônio juvenil nos ovários de *S. bipunctata*

As enzimas *juvenile hormone acid methyltransferase* (*jhamt*) e *methyl farnesoate epoxidase* (*mfe/P450-15a1*) envolvidas nos passos finais da síntese de hormônio juvenil, bem como, as envolvidas na degradação desse hormônio *juvenile hormone esterase* (*jhe*) e *juvenile hormone epoxide hydrolase* (*jheh*), foram encontradas nas bibliotecas de ovários de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Além dos genes citados, nós também encontramos o gene *Double sex- and mab-3-related transcription factor A2* (DMRT A2). Esse gene foi encontrado nas gônadas de *A. mellifera* e descrito como um gene de resposta ao hormônio juvenil (Lago *et al.*, 2022). Na Tabela 3 é possível visualizar o padrão de expressão desses genes nas bibliotecas de ovários de *S. bipunctata*.

Observamos que VQ e W_NEW apresentam alta expressão de *mfe*. Rainhas virgens apresentam alta expressão dessa enzima em todas as comparações realizadas. Em W_NEW *mfe* se mostra altamente expressa quando esse fenótipo é comparado a W_FOR. A outra enzima de síntese de HJ, *jhamt*, se mostra altamente expressa em W_NEW quando este fenótipo é comparado com MQ, W_SEV e W_FOR. Operárias forrageiras (W_FOR) apresentam alta expressão de *jhamt* em uma única comparação (MQ vs W_FOR).

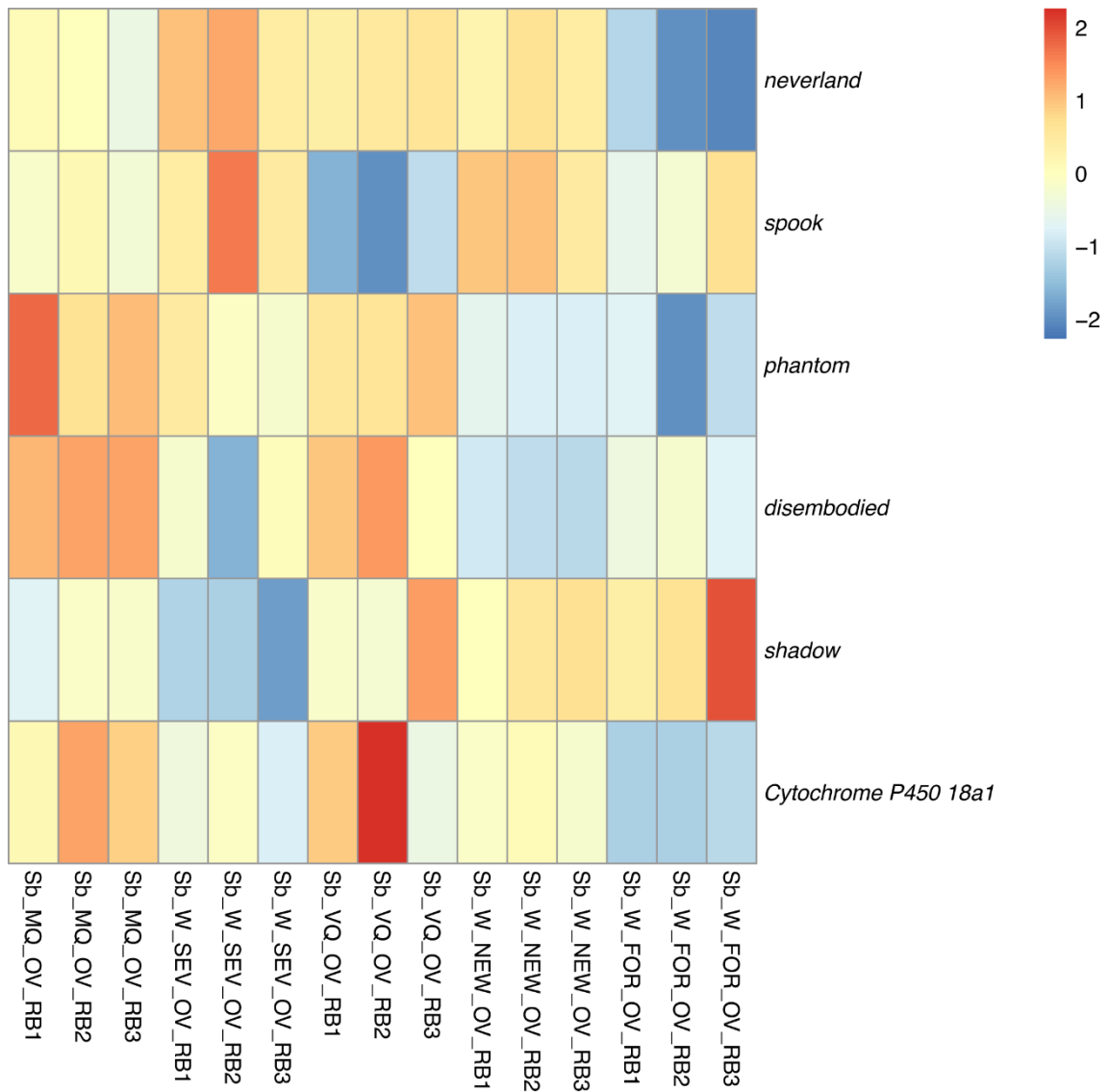


Figura 10. Perfil de expressão da via dos ecdisteróides em ovários de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra se refere às réplicas biológicas de cada fenótipo. Operária forrageira (W_FOR), operária recém-emergida (W_NEW), Rainha virgem (VQ), operária com sete dias (W_SEV), Rainha acasalada (MQ).

Tabela 3. Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de hormônio juvenil e gene de resposta a esse hormônio nos ovários de *S. bipunctata*. Para cada gene dez comparações par a par são apresentadas. Setas para cima (↑) do lado do fenótipo representa alta expressão nesse mesmo fenótipo. Expressão não significativa está representada por negrito. (*mfe*) *methyl farnesoate epoxidase*, (*jhamt*) *juvenile hormone acid methyltransferase*, (*jhe*) *juvenile hormone esterase*, *juvenile hormone epoxide hydrolase* e (*DMRT A2*) *Double sex- and mab-3-related transcription factor A2*. (MQ vs VQ) ovários de rainhas acasaladas versus ovários de rainhas virgens. (MQ vs W_FOR) ovários de rainhas acasaladas vs ovários de operárias forrageiras. (MQ vs W_NEW) ovários de rainhas acasaladas vs ovários de operárias recém-emergidas. (MQ vs W_SEV) ovários de rainhas acasaladas vs ovários de operárias com sete dias. (VQ vs W_FOR) ovários de rainhas virgens vs ovários de operárias forrageiras. (VQ vs NEW) ovários de rainhas virgens vs ovários de operárias recém-emergidas. (VQ vs W_SEV)-ovários de rainhas virgens vs ovários de operárias com sete dias. (W_FOR vs W_NEW) ovários de operárias forrageiras vs ovários de operárias recém-emergidas. (W_FOR vs W_SEV) ovários de operárias forrageiras vs ovários de operárias com sete dias. (W_NEW vs W_SEV) ovários de operárias recém-emergidas vs ovários de operárias com sete dias.

Gene	Comparação par a par entre os diferentes fenótipos									
<i>mfe</i>	MQ vs VQ↑	MQ vs W_FOR	MQ vs W_NEW	MQ vs W_SEV	VQ↑ vs W_FOR	VQ↑ vs W_NEW	VQ↑ vs W_SEV	W_FOR vs W_NEW↑	W_FOR vs W_SEV	W_NEW vs W_SEV
<i>jhamt</i>	MQ vs VQ	MQ vs W_FOR↑	MQ vs W_NEW↑	MQ vs W_SEV	VQ vs W_FOR	VQ vs W_NEW	VQ vs W_SEV	W_FOR vs W_NEW↑	W_FOR vs W_SEV	W_NEW↑ vs W_SEV
<i>jhe</i>	MQ vs VQ↑	MQ vs W_FOR↑	MQ vs W_NEW↑	MQ vs W_SEV	VQ vs W_FOR	VQ vs W_NEW	VQ↑ vs W_SEV	W_FOR vs W_NEW	W_FOR↑ vs W_SEV	W_NEW↑ vs W_SEV
<i>jheh</i>	MQ vs VQ	MQ vs W_FOR	MQ vs W_NEW	MQ vs W_SEV	VQ vs W_FOR	VQ vs W_NEW	VQ vs W_SEV	W_FOR vs W_NEW	W_FOR vs W_SEV	W_NEW vs W_SEV
<i>DMRTA2</i>	MQ↑ vs VQ	MQ↑ vs W_FOR	MQ↑ vs W_NEW	MQ vs W_SEV	VQ vs W_FOR	VQ vs W_NEW	VQ vs W_SEV↑	W_FOR vs W_NEW	W_FOR vs W_SEV↑	W_NEW vs W_SEV↑

Apesar de VQ, W_NEW e W_FOR mostrarem alta expressão de enzimas de síntese, esses fenótipos também possuem uma alta expressão de *jhe*, a enzima de degradação de HJ. Outro fato que podemos destacar em relação ao padrão de expressão dessas enzimas é quando os fenótipos VQ e W_NEW são comparados com W_FOR. Nessas comparações, tais fenótipos não diferem em relação a expressão de *jhe*. No entanto, observamos que VQ e W_NEW apresentam alta expressão das enzimas de síntese (*mfe* e *jhamt*). Dessa forma, é provável que os níveis de HJ seja mais alto nesses dois fenótipos se comparado a W_FOR. Rainhas acasaladas e W_SEV apresentam baixa expressão de *jhe* em todas as comparações que foram realizadas e não apresentam diferença de expressão quando comparadas entre si. Dessa forma, é provável que tais fenótipos tenham acúmulo de HJ na hemolinfa. Por fim, *DMRT A2*, gene de resposta a HJ se mostra altamente expresso em MQ e W_SEV em todas as comparações realizadas. Quando esses fenótipos são comparados entre si (MQ vs W_SEV), não apresentam diferenças de expressão em relação à *DMRT A2*. Para consultar os valores de

\log_2FC e $pjad$ em cada par de comparação ver Tabela S14 (Material suplementar). Na análise de enriquecimento que foi realizada para os dados de ovários, processos relacionados a síntese ou sinalização de HJ foram recuperados nos fenótipos MQ, VQ e W_SEV (ver Tabela 6).

4.8 Termos enriquecidos (GO) em bibliotecas de ovários e corpo gorduroso

Nessa análise nós focamos nos genes preferencialmente expressos em cada fenótipo estudado MQ, VQ, W_NEW, W_FOR, W_SEV. Essa abordagem foi realizada com objetivo de reduzir a lista de GO. No diagrama de Venn (Figura 11) pode ser observado o número de genes que foram incluídos nessa análise para ovários (Figura 11. A) e para o corpo gorduroso (Figura 11. B). Esses genes foram selecionados usando os mesmos critérios descritos previamente ($pjad \leq 0,05$ e $\log_2FC < -1,0$ ou $> 1,0$).

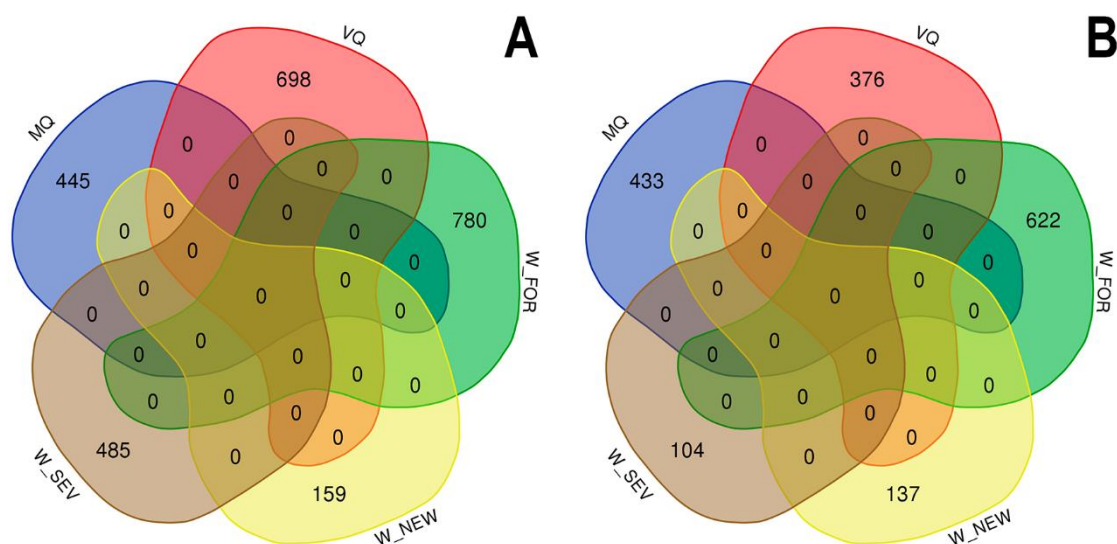


Figura 11. Número de genes preferencialmente expresso em cada fenótipo. (A) ovários e (B) corpo gorduroso. Rainha acasalada (MQ), Rainha virgem (VQ), operária forrageira (W_FOR), operária recém-emergida (W_NEW), operária com sete dias (W_SEV).

Como esperado, nos ovários foram encontrados diversos termos ligados a oogênese/reprodução. Nós selecionamos alguns processos biológicos que julgamos importantes pela natureza dos dados analisados (ovários) e checamos a presença e ausência de tais processos em todos os fenótipos (Tabela 4). Os Processos *chromatin remodeling*, *notch signaling pathway* foram compartilhados por MQ e W_SEV. Esses fenótipos também compartilham termos relacionados a formação de um plasma germinativo. Em MQ foram

encontrados dois processos relacionado a esse evento (GO:0045451, GO:0019094) em W_SEV três processos foram recuperados (GO:0045451, GO:0046594, GO:0007317). MQ e W_NEW compartilham *positive regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway* (EGFR) e *ecdysone biosynthetic process*. Em MQ, W_SEV e VQ os seguintes processos foram recuperados: *mitotic spindle organization*, *mitotic spindle assembly checkpoint signaling*, *germ cell development*, *epidermal growth factor receptor signaling pathway (EGFR)*, *hedgehog signaling pathway*, *somatic stem cell population maintenance*, *TOR signaling*. Processos relacionados a síntese ou sinalização de HJ, foram recuperados em MQ, W_SEV (GO:0035626) e VQ (GO:0006718). Em W_NEW foi encontrado o termo *hormone-mediated signaling pathway*, que tanto pode está relacionada ao hormônio juvenil, quanto aos ecdisteróides (20E). Alguns processos relacionados a oogênese presentes nos fenótipos MQ, W_SEV, VQ e W_NEW também estão presentes em operárias forrageiras (ver Tabela 4). Vale resaltar, que em todos fenótipos foram recuperados os termos *apoptotic process* e *negative regulation of apoptotic process* (processos não listados na Tabela abaixo).

Os processo biológicos enriquecidos no corpo gorduroso de MQ, VQ, W_SEV, W_NEW, W_FOR parecem gerais, nós tivemos dificuldades de caraterizar os fenótipos estudados através dessa análise. Dessa forma, resgatamos os dez processos mais enriquecidos em cada fenótipo. Tais processos podem ser visualizados na Figura 12.

Tabela 4. Processos biológicos enriquecidos nos ovários de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. Rainha acasalada (MQ), operária com sete dias (W_SEV), operária recém-emergida (W_NEW), Rainha virgem (VQ) e operária forrageira (W_FOR).

GO	MQ	W_SEV	W_NEW	VQ	W_FOR
GO:0051301 cell division	X	X	X	X	-
GO:0000278 mitotic cell cycle	X	X	X	X	X
GO:0007283 spermatogenesis	X	X	X	X	X
GO:0007052 mitotic spindle organization	X	X	-	X	-
GO:0030154 cell differentiation	X	X	X	X	X
GO:0007094 mitotic spindle assembly checkpoint signaling	X	X	-	X	-
GO:0006338 chromatin remodeling	X	X	-	-	-
GO:0007059 chromosome segregation	X	X	-	X	-
GO:0016055 Wnt signaling pathway	X	X	-	X	X
GO:0007224 hedgehog signaling pathway	X	X	-	X	-
GO:0000086 G2/M transition of mitotic cell cycle	X	X	-	-	X
GO:0007281 germ cell development	X	X	-	X	-
GO:0007057 spindle assembly involved in female meiosis I	X	-	-	-	-
GO:0007053 spindle assembly involved in male meiosis	-	X	-	-	-
GO:0009953 dorsal/ventral pattern formation	X	-	X	-	X
GO:0009952 anterior/posterior pattern specification	X	-	X	X	X
GO:0007173 epidermal growth factor receptor signaling pathway	X	X	-	X	-
GO:0045742 positive regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	X	-	X	-	-
GO:0007259 receptor signaling pathway via JAK-STAT	X	-	-	-	X
GO:0046427 positive regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT	-	X	-	-	-
GO:0030010 establishment of cell polarity	X	X	-	-	-
GO:0007163 establishment or maintenance of cell polarity	X	-	X	X	-
GO:0030718 germ-line stem cell population maintenance	X	-	-	-	-
GO:0042078 germ-line stem cell division	X	-	-	-	-
GO:0035019 somatic stem cell population maintenance	X	X	-	X	-
GO:0019094 pole plasm mRNA localization	X	-	-	-	-
GO:0007317 regulation of pole plasm oskar mRNA localization	-	X	-	-	-
GO:0045451 pole plasm oskar mRNA localization	X	X	-	-	-
GO:0046594 maintenance of pole plasm mRNA location	-	X	-	-	-
GO:0006697 ecdysone biosynthetic process	X	-	X	-	-
GO:0007179 transforming growth factor beta receptor signaling pathway	X	X	-	X	X
GO:0007219 Notch signaling pathway	X	X	-	-	-
GO:0031929 TOR signaling	X	X	-	X	-
GO:0035626 juvenile hormone mediated signaling pathway	X	X	-	-	-
GO:0009755 hormone-mediated signaling pathway	-	-	X	-	-
GO:0006718 juvenile hormone biosynthetic process	-	-	-	X	-

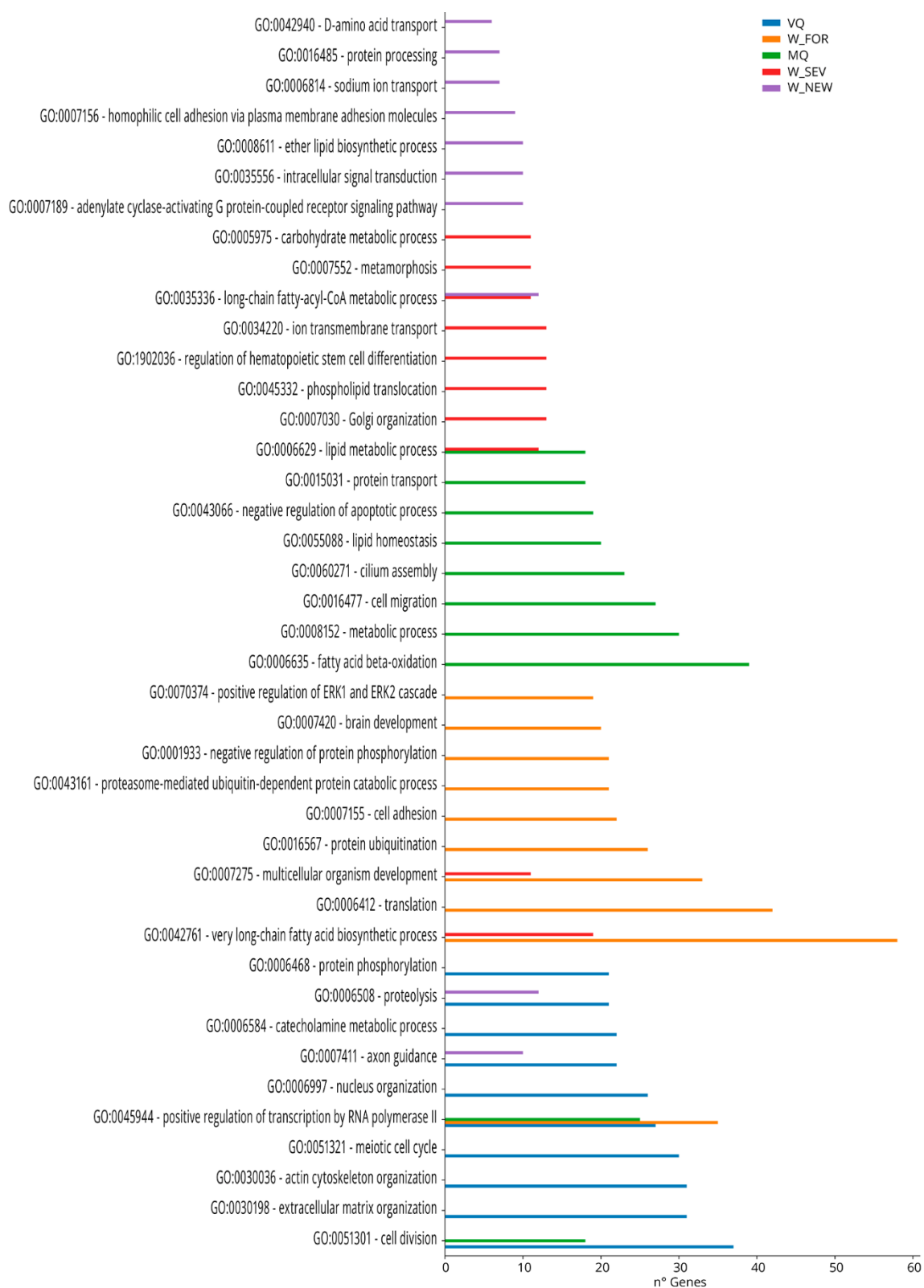


Figura 12. Processos biológicos (GO) enriquecidos no corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*. A barra no eixo X representa o número de genes relacionado a cada GO. Rainha virgem (VQ - azul), operária forrageira (W_FOR - laranja), rainha acasalada (MQ - verde), operária com sete dias (W_SEV - vermelho), operária recém-emergida (W_NEW - roxo).

4.9 Número de genes diferencialmente expresso entre corpo gorduroso e ovários de um mesmo fenótipo

Na Figura 13 (A-E) pode ser visto um resumo da expressão diferencial entre corpo gorduroso e ovário de cada fenótipo estudado W_SEV, MQ, W_NEW, VQ, e W_FOR. Na comparação par a par foram encontrados 9.254 genes diferencialmente expressos em W_SEV, destes, 377 são expressos exclusivamente no corpo gorduroso e 390 exclusivo dos ovários. Em MQ recuperamos 7.844 genes diferencialmente expressos, destes, 333 foram exclusivos do corpo gorduroso e 525 exclusivos dos ovários. Em W_NEW foram encontrados 7.426 genes diferencialmente expressos, com 200 e 225 genes exclusivos de corpo gorduroso e ovário respectivamente. Rainhas virgens apresentaram o menor número de genes diferencialmente expressos entre ovários e corpo gorduroso, 3.092, com 122 específicos de corpo gorduroso e 267 exclusivos de ovários. Por último, em W_FOR observamos 5.553 genes diferencialmente expressos, com 172 e 180 genes exclusivos do corpo gorduroso e ovários respectivamente. Esses dados podem nos ajudar a entender a especificidade entre os ovários e o corpo gorduroso nos diferentes fenótipos e a perda dessa especificidade demonstrada por operárias forrageiras.

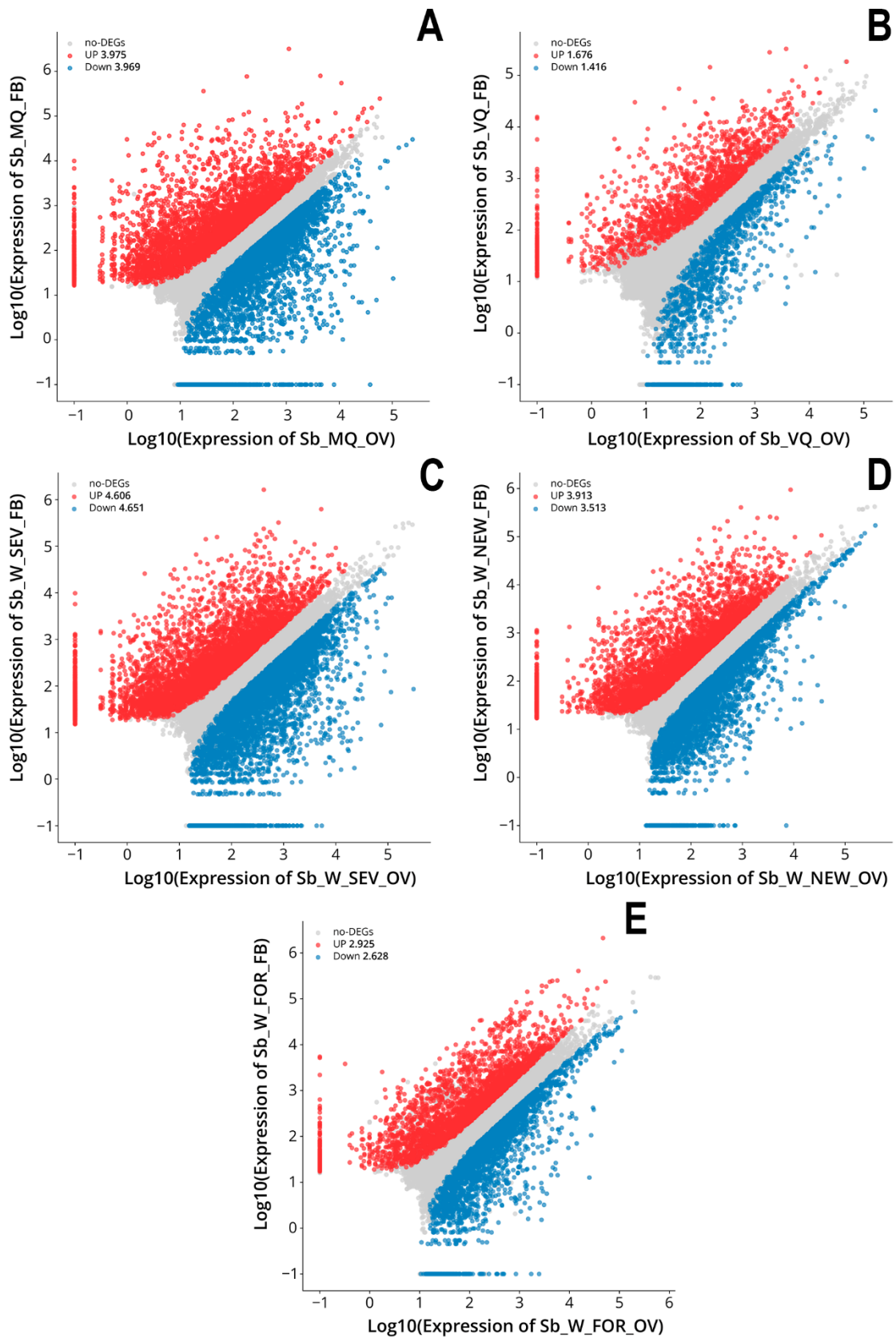


Figura 13. *Scatter plot* dos genes diferencialmente expressos entre corpo gorduroso e ovários de um mesmo fenótipo. Pontos em vermelho representam genes regulado de forma positiva e pontos em azul regulados de forma negativa. Pontos em cinza significam genes sem diferença de expressão. (A) corpo gorduroso de rainhas acasaladas (MQ) versus ovários de MQ. (B) Corpo gorduroso de rainhas virgens (VQ) vs ovários de VQ. (C) Corpo gorduroso de operárias com sete dias (W_SEV) vs ovários de W_SEV. (D) Corpo gorduroso de operárias recém-emergidas (W_NEW) vs ovários de W_NEW. (E) Corpo gorduroso de operárias forrageiras (W_FOR) vs ovários de W_FOR.

5. DISCUSSÃO

5.1 Similaridades e diferenças entre os perfis transcricionais globais de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*

Nesse estudo, nós usamos RNA-seq e morfologia ovariana para fornecer dados sobre o perfil transcricional que rainhas e operárias de *S. bipunctata* apresentam em estágios específicos do desenvolvimento adulto, com foco na oogênese. Os dados de ovários que foram analisados sustentam a nossa hipótese inicial. Nesse órgão, o perfil transcricional de uma operária com sete dias se assemelha ao perfil transcricional de uma rainha acasalada, em postura (Figura 3). Isso demonstra que para os ovários, a fisiologia reprodutiva está acima da casta. Nas análises da morfologia ovariana realizada para esses fenótipos (MQ e W_SEV), foi observado que os ovários de ambas as castas de *S. bipunctata* possuem ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, pré-vitelogênese, vitelogênese e corionogênese, o que explica o resultado obtido na análise do RNA-seq dos ovários. Esse resultado se assemelha ao obtido por Macedo *et al.* (2016) que ao analisarem transcriptomas de microRNAs de amostras de ovários ativos e inativos de rainhas e operárias de *A. mellifera*, verificaram que a expressão de treze mirRNAs dos dezenove que foram analisados eram influenciados pelo estado reprodutivo dos ovários e, dessa forma, o padrão de expressão de tais moléculas reguladoras era compartilhado entre as castas.

O outro agrupamento obtido em nosso estudo através da análise da distância euclidiana para os dados de ovários (Figura 3) mostra que operárias recém-emergidas (W_NEW), com ovários em início de ativação, que apresentam ovócitos em estágio de pré-vitelogênese, se agrupam a rainhas virgens (VQ) com ovários inativados e a operárias forrageiras (W_FOR), que possuem uma morfologia ovariana alterada/degenerada. Esses diferentes estados de ovários compartilham a expressão de genes, que dependendo do estímulo recebido, pode traçar rotas diferentes, sendo elas: (i) progressão da oogênese (VQ e W_NEW) ou (ii) interrupção da oogênese e perda do potencial reprodutivo (W_FOR).

Os resultados de RNA-seq do corpo gorduroso de *S. bipunctata* nos fazem rejeitar a nossa hipótese inicial. O corpo gorduroso dos insetos é um tecido especial, análogo ao tecido adiposo e fígado dos vertebrados (Li *et al.*, 2019). Em *A. mellifera*, as células que compõem o corpo gorduroso, trofócitos e enócitos, são consideradas um ótimo modelo para estudos de

senescência celular, uma vez que não se dividem durante a vida adulta (Hsieh & Hsu, 2011a, 2011b). Em nosso estudo, o perfil de expressão global para esse tecido mostra uma separação entre as castas (Figura 4). Rainhas acasaladas e virgens se agrupam, o segundo agrupamento que é recuperado na análise da distância euclidiana para esse tecido é formado pela casta operária (W_NEW, W_SEV e W_FOR). Dessa forma, os dados transcriptômicos do corpo gorduroso apresentam resultados diferentes do que foi observado para os dados de ovários. Tais resultados podem ser explicados pela longevidade celular que rainhas de espécies sociais, os indivíduos mais longevos da colônia, tendem a apresentar em relação às operárias que reconhecidamente possui uma vida mais curta. De fato, nós observamos a alta expressão de genes envolvidos na proteção de células e tecidos do corpo contra toxinas, xenobióticos e danos oxidativos nessa casta. Ainda em relação ao padrão de expressão do corpo gorduroso, nós observamos que o perfil transcricional apresentado por operárias nas diferentes fases do desenvolvimento adulto analisadas (W_NEW, W_SEV e W_FOR) marca o envelhecimento, com operárias forrageiras apresentando o perfil transcricional mais contrastante. Esse resultado pode estar relacionado às diversas transformações que ocorrem nessa fase da vida que consequentemente podem estar associadas à atividade de forrageamento e senescência. Por exemplo, a transição de uma operária nutridora para forrageira envolve a mudança de uma dieta rica em pólen para uma dieta rica em açúcares, o que ativa vias metabólicas diferentes. Essas mudanças são captadas pelo corpo gorduroso que é um tecido considerado dinâmico e multifuncional, o qual está envolvido em diversas funções como: estoque de energia, resposta imunológica e detector de nutrientes, atuando como um sensor nutricional (Zhang & Xi, 2014). Em *A. mellifera* um estudo transcriptômico que usou o corpo gorduroso e avaliou seu padrão de expressão em rainhas e operárias em fases jovens e velhas do desenvolvimento adulto, obtiveram um resultado similar ao descrito para *S. bipunctata* (Lu *et al.*, 2021).

5.2 Genes diferencialmente expressos, identificação e classificação

5.2.1 Ovários

Nas análises de expressão par a par considerando os cortes que foram aplicados, verificamos que para os ovários, os fenótipos em estágios avançados da oogênese (MQ *vs* W_SEV)

apresentam o menor número de genes diferencialmente expressos (Figura 5. D). O segundo menor número de genes diferencialmente expressos é observado entre rainhas virgens e operárias recém-emegidas (Figura 5. A). Esses resultados mostram, mais uma vez, que o padrão de expressão desse órgão é governado pelo estado dos ovários.

No diagrama de Venn que foi construído para esses dados (Figura 7. A), observamos que fêmeas com potencial reprodutivo (MQ, W_SEV, W_NEW e VQ) compartilham alta expressão de *star*, *aubergine* e *Cdc2-related kinase cdk10*. O gene *star* é um membro da via de sinalização de EGFR. Essa via é importante para as diversas etapas da oogênese à exemplo do encapsulamento dos ovócitos pelas células foliculares, no estabelecimento da polaridade das câmaras de ovos e no estabelecimento do eixo dorso-ventral do embrião (Pickup & Banerjee, 1998; Lynch *et al.*, 2010). Na análise de enriquecimento que foi realizada, processos biológicos que demonstram a presença da via EGFR nesses fenótipos foram recuperados (Tabela 6), confirmando a atividade dessa via em fêmeas com potencial reprodutivo. O gene materno *aubergine* também é de suma importância para a oogênese em *D. melanogaster*. Além do seu papel na formação do plasma germinativo (Voronina *et al.*, 2011) e no silenciamento de elementos transponíveis nas células da linhagem germinativa (Gunawardane *et al.*, 2007), mais recentemente foi reportado que esse gene também tem seu papel nos estágios iniciais da oogênese. *Aubergine* promove a auto-renovação e a diferenciação das células-tronco da linhagem germinativa (Ma *et al.*, 2017). O gene *Cdc2-related kinase cdk10* é indispensável para a oogênese por estar envolvido na regulação do ciclo celular durante a mitose e meiose (Sauer *et al.*, 1996; Taieb *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 2013).

Fêmeas que apresentam atividade reprodutiva, com ovócitos viáveis no vitelário (MQ, W_SEV, W_NEW) compartilham a alta expressão de genes envolvidos na proteção da integridade do genoma das células germinativas (genes *piwi*), a exemplo de *argonaute 3* (Gunawardane *et al.*, 2007) e genes que participam da formação do plasma germinativo em *D. melanogaster*, *cappuccino*, *vasa* e *nanos* (Voronina *et al.*, 2011, Trcek & Lehmann, 2019, Whittle & Extavour, 2019).

Os genes *maelstrom*, *luna*, (também conhecido como *krueppel-like factor luna*), *yellow-g*, *yellow-g2*, *axin*, *pangolin*, *dishevelled* e *armadillo* apresentaram um padrão de expressão específico de fêmeas em estágios avançados da oogênese (MQ e W_SEV). *Maelstrom* é uma

proteína do plasma germinativo. Mutantes de *maelstrom* em *D. melanogaster* exibem uma incorreta localização de transcritos de *gurken*, *oskar* and *bicoid* no polo posterior do ovócito. Maelstrom também está diretamente envolvido no silenciamento de transposons nas células germinativas, em *D. melanogaster* e ratos (Clegg *et al.*, 1997; Lim & Kai, 2007; Robert *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Soper *et al.*, 2008). O gene *luna*, presente em *D. Melanogaster*, é homólogo de KLF6/KLF7, membros da família krueppel-like factor (KLFs) de mamíferos. Em *D. melanogaster*, *luna* tem seu papel no desenvolvimento inicial do embrião (De Graeve *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2014).

Os genes *axin*, *pangolin*, *dishevelled* e *armadillo* participam da via de sinalização de Wnt. Essa via é altamente conservada de vertebrados a invertebrados e regula vários processos biológicos, entre eles estão: desenvolvimento embrionário, divisão, sobrevivência, adesão e migração celular, manutenção das células-tronco, entre outros processos (Swarup *et al.*, 2012; Saito-Diaz *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2016; Waghmare & Page-McCaw, 2018). A via Wnt, além de outras vias importantes para a oogênese como um todo, a exemplo de: *hedgehog signaling pathway*, *TOR signaling* e *notch signaling pathway*, foram recuperadas na análise de enriquecimento realizada (ver esses e outros processos em Tabela 6).

Os genes *yellow-g*, *yellow-g2* também apresentam um padrão de expressão específico de ovários de MQ e W_SEV, esses genes foram citados na literatura como altamente expressos em fêmeas reprodutivas do gênero *Drosophila*, *Blatella*, *Aedes* e *Gonatopus* (vespas) com funções associadas a formação do córion ou maturação reprodutiva (Claycomb *et al.*, 2004; Irls *et al.*, 2009; Noh *et al.*, 2020; Jevitt *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021) . Os genes *yellow-g* e *yellow-g2*, também foram encontrados como altamente expressos em transcriptomas de ovários de rainhas acasaladas e operárias com ovários ativados de *A. mellifera* (Niu *et al.*, 2014). Nas bibliotecas de ovários de rainhas acasaladas e operárias com ovários ativos produzidas por Macedo (2013) para essa espécie, foi observado um resultado semelhante na expressão de *yellow-g*.

Com relação aos fenótipos que estão com ovários em início de ativação, inativados e degenerados, representados por operárias recém-emergidas, rainhas virgens e operárias forrageiras, respectivamente. Foi observado que tais fenótipos compartilham a alta expressão de *yellow-x1*, *yellow-b* e *yellow-e3*. A relação de genes *yellow-x* com ovários inativos de rainhas

virgens e operárias de *A mellifera*, também foi encontrado por Macedo, (2013). No diagrama de Venn (Figura 7. A) foi observado que ovários de operárias forrageiras possuem 1.508 genes que possuem um padrão de expressão específico desse fenótipo, dentre eles podemos citar *yellow-fe major royal jelly protein 1 (mrjp1)*. Na comparação entre os fenótipos mais extremos com relação a morfologia ovariana, à exemplo de MQ *vs* W_FOR, encontramos uma expressão elavada de *mrjp1* nos ovários de operárias forrageiras ($\log_2FC = -7,502$; $pjad = 0,0002$), demonstrando que esse gene está relacionado à ovários degenerados em *S. bipunctata*. Esse resultado pode ser explicado em parte, por baixos títulos de ecdisteróides (20E) que provavelmente ocorrem nessa fase. Em *A. mellifera* já foi verificado que os ecdisteróides regulam negativamente a expressão de *mrjp1* (Melo *et al.*, 2014; Winkler *et al.*, 2018). O padrão de expressão das enzimas envolvidas na via dos ecdisteróides encontradas em ovários de *S. bipunctata* será discutida adiante.

Em *A. mellifera* são encontrado dez genes *yellow* e nove genes codificantes da família MRJP (do inglês: *Major Royal Jelly Protein*). Esses genes podem desempenhar diversas funções como: nutrição, comportamento, maturação reprodutiva entre outras. As MRJPs formam um *cluster* flanqueado por genes *yellow*, localizadas mais precisamente entre os genes *ye-3* e *yellow-h*. Tais genes possuem uma origem evolutiva comum. Acredita-se que as MRJPs tenham evoluído recentemente por eventos múltiplos de duplicação de um único gene, *yellow-e3*. O gênero *Apis* possui uma clara expansão da família MRJPs se comparada as outras abelhas estudadas, as quais, tem sido descrito até o momento uma única MRJP (*mrjp-like*). O gene *mrjp-like/mrjp9-like* possui similaridade com a sequência do gene *mrjp9* de *A. mellifera* (Drapeau *et al.*, 2006, Kupke *et al.*, 2012; Kapheim *et al.*, 2015; Helbing *et al.*, 2017; dePaula *et al.*, 2020). Em nosso estudo, além dos seis genes *yellow* com expressão diferencial que foram encontrados nos ovários de *S. bipunctata*, também encontramos duas MRJPs, *mrjp9-like*, que não possuem expressão diferencial nos transcriptomas analisados (E-value $3e-138$; 51.58% de identidade com *A. mellifera*; NP_001019868.1) e *mrjp1* (E-value 0,0; 99.48% de identidade com *A. mellifera*; NP_001011579.1), que está altamente expresso em ovários de forrageiras. O gene *mrjp1* está sendo reportado pela primeira vez em uma espécie de abelha que não pertence ao gênero *Apis*. Esse resultado trará mudanças na

interpretação de como os genes pertencentes a família MRJPs evoluíram nas abelhas corbiculadas.

5.2.2 Corpo gorduroso

Nas análises de expressão par a par para o corpo gorduroso, verificamos que rainhas acasaladas e rainhas virgens possuem o menor número de genes diferencialmente expressos. Os maiores números foram observados na comparação entre as diferentes castas (Figura 6).

No diagrama de Venn que foi construído para os dados de corpo gorduroso (Figura 7. B), observamos que as rainhas (MQ e VQ) compartilham alta expressão de *Multidrug resistance protein* (*pgp-1*), *Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B* (*coQ10*), e *Oxidation resistance protein 1* (*Oxr1*). Nesses fenótipos, *pgp-1* se mostrou altamente expresso, tanto no corpo gorduroso, quanto nos ovários. No corpo gorduro esse gene permaneceu no topo da lista dos genes mais expressos todas as vezes que rainhas foram comparadas com operárias (ver Tabelas S9 à S12). A proteína de membrana *pgp-1* ou MDR1 como é conhecida em mamíferos, confere proteção as células e tecidos por exportar toxinas e xenobióticos para fora das células. Em humanos tem sido amplamente estudada por promover resistência às várias drogas usadas em tratamentos contra o câncer (Fojo *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2018; Bossennec *et al.*, 2018). Em insetos, *pgp-1* tem sido estudado no contexto de resistência à inseticida e adaptação aos metabólitos secundários de plantas (Figueira-Mansur *et al.*, 2013; Groen *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2019).

O gene *CoQ10*, altamente expresso no corpo gorduroso de rainhas (MQ e VQ), é essencial para o fornecimento de energia celular (produção de ATP). Atua como um impotante anti-oxidante protegendo as células do dano oxidativo causado pelos radicais livres e pode ter função anti-envelhecimento em alguns organismos. Em roedores, foi verificado que CoQ10 neutraliza o envelhecimento da fisiologia ovariana. Em humanos, o declínio da concentração de CoQ10 em alguns tecidos após os 30 anos é pensado coincidir com o declínio da fertilidade e aumento das aneuploidias embrionárias (Rosen *et al.*, 1995; Crane, 2001; Morré *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 2004; Hargreaves, 2003; Ben-Meir *et al.*, 2015; Barcelos & Haas, 2019; Yang *et al.*, 2022). Em *A. mellifera*, foi verificado que operárias tratadas com CoQ10 vivem mais e possuem maior proteção contra *Nosema*, além disso, foi

observado maior atividade de enzimas com função antioxidante (CAT, GST, SOD) nas abelhas tratadas (Strachecka *et al.*, 2014). Em um outro estudo, foi detectado altas concentrações de CoQ10 em larvas de rainhas (Yue *et al.*, 2010), demonstrando que CoQ10 pode estar relacionado a longevidade em abelhas, o que vai ao encontro dos resultados observados em *S. bipunctata*.

O outro gene que possui um padrão de expressão específico de rainhas de *S. bipunctata* é *Oxr1*. Esse gene foi inicialmente descrito como capaz de reparar danos oxidativos ao DNA bacteriano (Volker *et al.*, 2000). Mais tarde, a relação entre a alta expressão de *Oxr1* e a proteção contra o estresse oxidativo (ROS), se mostrou conservada em mamíferos (Murray *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Finelli *et al.*, 2016) e insetos (Kobayashi *et al.*, 2014). Além disso, foi observado em vários experimentos que o silenciamento de *Oxr1* pode regular vários genes com função antioxidantes em mamíferos, à exemplo de *glutathione peroxidase 2*, *catalase* e *peroxiredoxin 4* (Yang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). O silenciamento de *Oxr1* em *Anopheles gambiae* regula a expressão das enzimas *catalase* e *glutathione peroxidase* que também participam do mecanismo de desintoxicação celular nessa espécie (Jaramillo-Gutierrez *et al.*, 2010).

Dada a interação de CoQ10 e *Oxr1* com a atividade de enzimas antioxidantes, nós resgatamos dos transcriptomas de corpo gorduroso a expressão de genes reconhecidamente envolvidos no gerenciamento de danos oxidativos, à exemplo de *glutathione S transferases* (GSTs), *superoxide dismutases* (SODs) e *peroxiredoxins* (Prxs) (Corona *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2021). De maneira geral, rainhas acasaladas de *S. bipunctata* apresentam uma maior expressão de genes que codificam essas enzimas (Figura 9). A segunda maior expressão desse conjunto de genes é observado em operárias com sete dias. Esses resultados indicam que fêmeas com uma intensa atividade reprodutiva (estado vitelogênico dos ovários), como é o caso de rainhas acasaladas e operárias com sete dias, essa última, em menor nível que a primeira, apresentam uma maior expressão de enzimas antioxidantes. Esse resultado pode ser explicado em parte pela hipótese da “blindagem oxidativa” (do inglês: *oxidative shielding hypothesis*), que argumenta que a transição de um estado não reprodutivo para o reprodutivo está associada a uma redução gradual na extensão do dano oxidativo aos tecidos do corpo (Blount *et al.*, 2016). Estudos em Isoptera também revelaram dados que podem

suportar essa hipótese (Takasi *et al.*, 2017; Tasaki *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2019; Tasaki *et al.*, 2021). Um trabalho recente com *A. mellifera* demonstrou que operárias que ativam seus ovários adquirem proteção contra o estresse oxidativo e conseqüentemente vivem mais. Tais operárias possuem alta expressão de vários genes antioxidantes, incluindo os que estão sendo apresentados no presente estudo (Kennedy *et al.*, 2021).

Em *S. bipunctata*, a expressão dos genes que codificam enzimas antioxidantes também nos permitiram verificar que, apesar do compartilhamento do padrão de expressão dessas enzimas entre rainhas e operárias (MQ e W_SEV), existe uma classe de enzimas, as *GSts*, que se expressam preferencialmente em rainhas de *S. bipunctata* (ver Figura 9, oito dos doze genes da família GST foram expressos em rainhas). Dessa forma, a expressão desse conjunto de genes no corpo gorduroso sugere que os genes da família GST podem estar envolvidos na longevidade apresentada por rainhas dessa espécie.

Com relação às operárias forrageiras de *S. bipunctata*, nós encontramos dois conjuntos de genes que diferenciam esse fenótipo dos demais. As enzimas da família P450 (Figura 8), que têm sido amplamente estudadas no contexto de resistência metabólica à inseticidas (Manjon *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019) e genes que codificam proteínas ribossômicas, que são importantes na biogênese dos ribossomos e também desenvolvem uma série de funções extra-ribossômicas (Zhou *et al.*, 2015). Esses últimos genes se mantiveram no topo da lista dos genes mais expressos no corpo gorduroso todas as vezes que operárias forrageiras foram comparadas com os demais fenótipos (MQ, VQ, W_SEV e W_NEW) (ver Tabela S9, S11 e S12, Material Suplementar).

As enzimas pertencentes a família citocromo P450 são numerosas e envolvidas em diversas funções, das quais podemos citar funções fisiológicas e metabolismo de xenobióticos. Os organismos possuem uma grande variação na quantidade de genes P450 presentes em seus genomas, alguns apresentam 246 (*S. curviseta*, Collembola), outros apenas 23 (*Aculops lycopersici*, Eriophyidae) (Dermauw *et al.*, 2020). Em insetos, os mosquitos são conhecidos por possuir um grande número de enzimas P450 (196 em *Culex quinquefasciatus*, Yang & Liu, 2011; 186 em *Aedes albopictus*, Chen *et al.*, 2015). Já as abelhas possuem um conjunto reduzido dessas enzimas. Um estudo realizado com base em dez espécies de abelhas encontrou de 40 à 59 genes P450 (Darragh *et al.*, 2021). No genoma de *Nasonia vitripennis*, esses genes

são abundantes (92 genes). Esse último resultado demonstra que um baixo número de genes P450 não é uma regra para os Hymenoptera (Oakeshott *et al.*, 2010). Nós encontramos 177 genes P450, com exceção dos envolvidos no metabolismo de ecdisteróides e do hormônio juvenil. O número de genes P450 encontrados em nosso estudo é elevado se considerado ao número descrito para outras abelhas. Esses genes são resultantes de um extenso processo de duplicação gênica, assim, guardam grande similaridade entre suas sequências (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Sezutsu *et al.*, 2013; Dermauw *et al.*, 2020). Esse tipo de gene torna a montagem de um transcriptoma sem um genoma espécie-específico um desafio. Dessa forma, é possível que devido a limitação dos dados, o número de P450 em *S. bipunctata* esteja superestimado. Alternativamente, esse resultado pode estar correto, uma vez que, dentro dos artrópodes, existe uma diversidade enorme no número e sequências de P450. Aceitando que em *S. bipunctata* esse número seja elevado, esses resultados poderiam parcialmente ser explicados pela necessidade de um mecanismo de desintoxicação mais sofisticado. Nessa espécie, além da exposição aos metabólitos secundários produzidos por plantas que podem estar presentes no pólen e néctar (ex: Flavonóides e alcalóides), os quais fazem parte da alimentação das abelhas em geral, principalmente das eussociais que estocam esses produtos (*beebread* e mel) (Johnson *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2018); as abelhas sem ferrão ainda possuem a particularidade de viverem expostas a diferentes espécies de fungos em seu ambiente natural (ninho). Estudos publicados recentemente demonstraram que *Scaptotrigona depilis* depende da interação entre três espécies diferentes de fungo para ter sucesso em seu desenvolvimento e chegar na fase adulta. Para essa espécie, os fungos presentes nas células de cria se fazem necessários para as larvas em desenvolvimento (Menezes *et al.*, 2015; Paludo *et al.*, 2019). Dessa forma, é provável que a exposição das larvas a esse tipo de alimento possa ter possibilitado o aumento de enzimas P450 nessas espécies, fazendo com que as abelhas sem ferrão prosperem na presença de tais compostos.

Até o momento, falamos apenas no número de enzimas P450 que foram encontradas em *S. bipunctata*. Sabemos que resultados mais acurados com relação a expansão ou não desse tipo de enzimas nessa espécie apenas será possível quando *S. bipunctata* tiver seu genoma sequenciado. Com relação ao padrão de expressão desse conjunto de genes no corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*, foi possível observar que eles podem ser

considerados marcadores moleculares de operárias em atividade de forrageamento. Esse resultado pode ser explicado pela provável exposição dessas operárias aos xenobióticos que são encontrados fora do ninho, à exemplo de inseticidas, fungicidas, herbicidas entre outros contaminantes ambientais. Em *A. mellifera*, a expressão de genes P450 foi associada a atividade de forrageamento (Vannette *et al.*, 2015). Além disso, já foi encontrada uma associação entre alta expressão de enzimas P450 no corpo gorduroso e uma dieta rica em açúcares para *Bombus impatiens* (Costa *et al.*, 2020). Conforme discutido no capítulo 1, acreditamos que a dieta de operárias forrageiras de *S. bipunctata* seja rica em açúcares nessa fase da vida adulta (ver Zerbo *et al.*, 2001).

O outro grupo de genes que diferencia operárias forrageiras dos demais fenótipos são os que codificam proteínas ribossomais. No momento, existem controvérsias na literatura se uma maior atividade de síntese proteica está relacionada a longevidade ou envelhecimento (Ward *et al.*, 2002; Frenk & Houseley, 2018). Em *Caenorhabditis elegans*, foi encontrado uma diminuição na taxa de síntese proteica com o envelhecimento, principalmente para proteínas ribossomais e as que participam da regulação da tradução (Dhondt *et al.*, 2017). Por outro lado, um estudo realizado com células de pacientes acometidos pela síndrome de progeria (do inglês: *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*), condição rara caracterizada por um envelhecimento acelerado, demonstrou uma elevada síntese proteica se comparado as células normais (Buchwalter & Hetzer, 2017). Outros estudos também demonstraram que a baixa expressão de mRNA de proteínas ribossomais é preditiva da longevidade, considerando indivíduos inteiros (killifish - Baumgart *et al.*, 2016), bem como, células consideradas de vida longa ou curta (em humanos - Seim *et al.*, 2016). Por fim, em insetos sociais, resultados semelhantes foram obtidos (Kunh *et al.*, 2021). Nesse estudo, os autores geraram transcriptomas de rainhas da espécie *Cryptotermes secundus*, amostrando idades que representam todo o ciclo de vida de rainhas dessa espécie (ca. 13 anos). Esses transcriptomas revelaram, dentre outros resultados, que o envelhecimento (rainhas com 10 à 13 anos) está relacionado a regulação positiva da síntese de proteína, caracterizada por alta expressão de vários genes que codificam proteínas ribossomais. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em operárias forrageiras de *S. bipunctata*.

5.3 Comparação entre corpo gorduroso e ovários, o que esses dados nos revelam?

Na Figura 13, é possível observar o número de genes diferencialmente expressos quando o corpo gorduroso e ovários de um mesmo fenótipo são comparados. Além disso, contabilizamos quanto desses genes são específicos do corpo gorduroso e dos ovários em ambas as castas (ver seção 4.9). Desses resultados, três principais conclusões podem ser destacadas:

(i) Os maiores números de genes diferencialmente expressos entre corpo gorduroso e ovários foram observados em rainhas acasaladas, operárias recém-emergidas e com sete dias. Em contraste, os menores número de genes foram observados em rainhas virgens (ovários inativos) e operárias forrageiras (ovários degeneração/reabsorção). Dessa forma, fêmeas que estão em atividade reprodutiva, ou seja, em estágios mais avançados da oogênese, possuem um maior número de genes diferencialmente expressos, tantos nos ovários, quanto no corpo gorduroso.

(ii) Com relação ao número de genes que se expressam de forma exclusiva no corpo gorduroso e nos ovários dos fenótipos aqui estudados, observamos que as rainhas expressam um maior número de genes específicos quando comparadas com as operárias. Nas rainhas também observamos que os ovários expressam mais genes específicos que o corpo gorduroso. Esse resultado mostra em forma de expressão gênica a divisão do trabalho reprodutivo dentro da colônia. As rainhas são os indivíduos que possuem uma única tarefa durante toda a vida, a reprodução. Assim, o corpo gorduroso e os ovários devem ser mais especializados para desempenhar tal função. Por outro lado, devido as diferentes funções que irão desenvolver no decorrer de suas vidas, as operárias devem ser altamente plásticas. Desse modo, não possuem uma especificidade tão acentuada entre ovários e corpo gorduroso como vimos na outra casta.

(iii) As forrageiras possuem um menor número de genes diferencialmente expressos entre o corpo gorduroso e ovários se comparado a MQ, W_SEV, e W_NEW. Essa fase do desenvolvimento adulto também expressa um menor número de genes específicos de ovário e de corpo gorduroso. Esse último resultado sugere que ao envelhecer, ovários e corpo gorduroso da casta operária convergem para perfis transcricionais semelhantes, o que pode indicar uma perda da identidade celular dos ovários e do corpo gorduroso. Estudos em

mamíferos têm mostrado que o envelhecimento causa convergência transcricional entre diferentes tecidos (Izgi *et al.*, 2021).

Nós realizamos uma análise exploratória com parâmetros relaxados usando todos os transcriptomas produzidos e confirmamos esse resultado (ver Figura S5, Material suplementar). Nessa análise, foi observado que as amostras de ovários de operárias forrageiras se agrupam com amostras de corpo gorduroso de operárias. Esse resultado demonstra que, ovários de operárias forrageiras possuem uma maior similaridade com o corpo gorduroso de operárias forrageiras e se distancia das outras amostras de ovários analisadas. No capítulo 1 dessa tese nós descrevemos as diversas alterações morfológicas presentes nos ovários das operárias forrageiras em decorrência do envelhecimento. A degeneração/descharacterização do órgão agora é mostrado aqui através do perfil transcricional.

5.4 Via dos ecdisteróides (20E)

O hormônio ecdisteróide (20E) se mostra indispensável para diversas etapas da oogênese, à exemplo da diferenciação das células-tronco da linhagem germinativa, crescimento e sobrevivência do ovócito, desenvolvimento da câmara de ovos e vitelogênese (Buszczak *et al.*, 1999; König *et al.*, 2011; Ables *et al.*, 2015).

Nos transcriptomas de ovários de *S. bipunctata* foram encontrados todos os genes que participam da via dos ecdisteróides (*neverland*, *spook*, *phantom*, *disembodied*, *shadow*, *shade* e *Cyp18a1*) (Figura 10). Essa via se encontra mais expressa em rainhas acasaladas, seguido de rainhas virgem, operárias com sete dias e recém-emergidas. Uma menor atividade dessa via é observado em operárias forrageiras. Esses resultados indicam que 20E está ligado à ativação dos ovários em *S. bipunctata*, visto que, uma maior expressão desses genes é observado em fêmeas com potencial reprodutivo. Os ecdisteróides (20E) também marcam o estado reprodutivo de rainhas e operárias de *Bombus terrestris* (Bloch *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos em *A. mellifera*. Nessa espécie, Niu *et al.* (2014) encontraram *phantom* e *shade* altamente expressos em ovários de rainhas acasaladas e operárias com ovários ativos. Cardoen *et al.* (2011) observaram alta expressão de *shade* e vários outros genes de resposta ao 20E em corpo inteiro de operárias com ovários ativos. Frente a esses resultados, podemos concluir que 20E está relacionado a oogênese em rainhas e operárias de espécies

com diferentes graus de eussocialidade (uma visão alternativa para o papel de 20E em abelhas eussociais é apresentada por Hartfelder *et al.*, 2002).

5.5 Relação entre vitelogenina e hormônio juvenil em *S. bipunctata*

O Hormônio juvenil (HJ) possui a típica função de gonadotrofina na maioria das fêmeas de insetos adultos, considerado um fator chave na regulação da oogênese. Vários processos são importantes para que o ovócito possa progredir até o estágio final da ovogênese, um deles, é o acúmulo de vitelogenina (Vg). Na maioria dos insetos, o hormônio juvenil tem a função de controlar a produção dessa proteína pelo corpo gorduroso, seguida de seu acúmulo no ovócito em desenvolvimento (De Loof *et al.*, 2001; Riddiford, 2012). Dessa forma, na maioria dos insetos, HJ e Vg são positivamente correlacionados (Wyatt & Davey, 1996).

Apis mellifera (Apini) constitui uma das exceções com relação ao papel gonadotrófico do HJ, bem como, para a relação desse hormônio com a síntese de Vg. Em *A. mellifera*, é conhecido que há um aumento de HJ na hemolinfa de rainhas no estágio de adulto farado. Em operárias também ocorre esse aumento, no entanto, é mais tardio, observado na emergência do adulto. Esse aumento nos níveis de HJ, tanto em rainhas quanto em operárias de *A. mellifera*, tem sido descrito como importante para o início do aparecimento de Vg na hemolinfa. Os níveis de HJ na hemolinfa de rainha e operárias declinam rapidamente após esse aumento. Em rainhas, se mantêm baixos pelo resto da vida. Situação diferente ocorre em operárias. Nessa casta, após duas semana de vida, é observado um aumento substancial nos níveis de HJ na hemolinfa, acompanhado de um declínio na produção de Vg. Esses sinais marcam a fase de forrageamento nessa espécie. A relação negativa entre HJ e Vg em operárias de *A. mellifera* é conhecido como um circuito duplo repressor, no qual o HJ regula a síntese de Vg e, Vg, por sua vez, reprime os níveis de HJ. Portanto, em *A. mellifera*, o HJ perdeu sua função na reprodução e passou a regular o comportamento em operárias dessa espécie (Rembold, 1987; Engels *et al.*, 1990; Fahrback *et al.*, 1995; Hartfelder & Engels, 1998; Jassim *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Barchuk *et al.*, 2002; Amdam & Omholt, 2003; Guidugli *et al.*, 2005).

Estudos sobre o papel de HJ em outros representantes das abelhas corbiculadas mostram resultados diferentes dos observados em *A. mellifera*. Em *Euglossa viridissima*

(Euglossini), representante do grupo irmão das demais abelhas corbiculadas, não foi visto diferenças nos títulos de HJ quando comparadas fêmeas jovens *versus* velhas e dominantes *versus* subordinadas, demonstrando que HJ não varia com a idade nem com o *status* social nessa espécie (Séguret *et al.*, 2021). Em *Bombus terrestris* (Bombini), HJ mantém seu papel na reprodução e possui relação positiva com a expressão de *vg* no corpo gorduroso e com os níveis da proteína (Vg) na hemolinfa (Bloch *et al.*, 2002; Shpigler *et al.*, 2014; Shpigler *et al.*, 2020).

Em *Melipona scutellaris* (Meliponini), espécie filogeneticamente mais próxima a *S. bipunctata*, foi observado que rainhas virgens possuem altos títulos de HJ, o que está correlacionado com alto potencial reprodutivo dessas fêmeas (Cardoso-Júnior *et al.*, 2017). Assim, *M. scutellaris* se assemelha a Bombini, em que o papel de HJ na reprodução foi mantido, e difere de *A. mellifera*. Na casta operária de *M. scutellaris*, Cardoso-Júnior *et al.* (2017) verificaram ainda que operárias nutridoras possuem altos títulos de HJ se comparado a operárias forrageiras. Os resultados obtidos por esses autores para *M. scutellaris* novamente diferem de *A. mellifera*. Em *A. mellifera*, uma situação inversa acontece, operárias nutridoras possuem baixos títulos de HJ, que aumentam quando elas desempenham tarefas de forrageamento. Nossos dados de expressão das enzimas de síntese e degradação de HJ apontam para uma direção semelhante ao encontrado para as espécies *Bombus terrestris* e *Melipona scutellaris*. As enzimas envolvidas na síntese e degradação de HJ (*mfe*, *jhamt*, *jhe*, *jheb*) foram encontradas diferencialmente expressas nos ovários de *S. bipunctata*. Esse resultado aponta os ovários como um possível local de síntese desse hormônio em *S. bipunctata*, tal como ocorre em outras espécies de insetos (Borovsky *et al.*, 1994; Tian *et al.*, 2010; Van *et al.*, 2014). Enzimas envolvidas na síntese e degradação de HJ também já foram observadas nos ovários de *A. mellifera* (*jhamt*, *jhe*, *jheb* - Niu *et al.*, 2014; *jhe* Lago *et al.*, 2022). Esses resultados avaliados em conjunto sugerem a visão alternativa de que os *corpora allata* (CA) não são a única fonte de HJ em abelhas.

Os títulos de HJ não são conhecidos em *S. bipunctata*, porém, a atividade das enzimas, principalmente *jhe*, que é uma enzima de degradação de HJ, pode nos ajudar a compreender o papel desse hormônio nessa espécie. Em transcriptomas de ovários (Lago *et al.*, 2022) e discos imaginais (Soares *et al.*, 2021) de *A. mellifera*, *jhe* se mostrou um bom

preditor dos títulos de HJ na hemolinfa. Em ambos os estudos, *jhe* se apresentou altamente expresso em operárias em momentos em que os títulos de HJ na hemolinfa são baixos (5º instar larval) e foi regulada negativamente em rainhas quando há uma alta/acúmulo desse hormônio (5º instar larval). A regulação negativa de *jhe* em ovários de rainhas acasaladas e operárias com sete dias de *S. bipunctata* observada nesse estudo, indica um acúmulo de HJ na hemolinfa desses fenótipos, o que é consistente com o estado reprodutivo que eles representam (fêmeas em fase vitelogênica/maturação reprodutiva). Outro indício dos altos títulos de HJ em fases reprodutivas de *S. bipunctata* é a alta expressão de *vg* no corpo gorduroso que foi compartilhada apenas por MQ e W_SEV. *Vitellogenin* é considerado um gene de resposta a HJ em outros insetos, à exemplo de *Blattella germanica*, *Bombus terrestris*, *Tribolium castaneum*, entre outros insetos (Comas *et al.*, 2001; Parthasarathy *et al.*, 2010; Shpigler *et al.*, 2020). Além da expressão de *vg* no corpo gorduroso de rainhas acasaladas e operárias com sete dias, também observamos alta expressão do gene *DMRT A2* nos ovários desses fenótipos. Esse gene foi encontrado altamente expresso em gônadas de *A. mellifera* e demonstrou responder aos altos títulos de HJ (Lago *et al.*, 2021).

Os resultados aqui apresentados são indícios de que o hormônio juvenil possui função gonadotrófica em *S. bipunctata*. Tais resultados também demonstram que, diferentemente de *A. mellifera*, o hormônio juvenil em *S. bipunctata* possui uma relação positiva com *vg*. Dessa forma, apesar do hormônio juvenil apresentar algumas discrepâncias em relação ao seu papel dentro das abelhas corbiculadas, com base nos resultados obtidos para as espécies até aqui estudadas, podemos inferir que o hormônio juvenil exerce um papel gonadotrófico e, portanto, conserva função ancestral para o clado Bombini+Meliponini (segundo hipótese de relacionamento filogenético proposta por Boussert *et al.*, 2019).

6. CONCLUSÃO

A análise dos transcriptomas de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*, juntamente com a morfologia dos ovários de ambas as castas, nos revelaram algumas questões sobre o processo reprodutivo (oogênese) e a diferenciação de casta nessa espécie:

(i) O perfil transcricional global dos ovários de ambas as castas em diferentes estágios do desenvolvimento adulto não apresentou diferenças que separe rainhas e operárias. O perfil transcricional de operária com sete dias se assemelha ao perfil transcricional de uma rainha acasalada em postura. Esses fenótipos apresentam os mesmos estágios da oogênese. Esses resultados demonstram que para os ovários a fisiologia reprodutiva está acima da casta. Em relação às rainhas virgens, estas são classificadas como um fenótipo que possui ovário inativo do ponto de vista morfológico. Entretanto, o perfil transcricional apresentado por rainhas virgens revelou grupos de genes compartilhados com rainhas acasaladas, operárias com sete dias e recém-emergidas que indicam que sua fisiologia já está voltada para a reprodução. Esses genes estão envolvidos na diferenciação das células-tronco da linhagem germinativa, regulação do ciclo celular e na via EGFR que é conhecida por ser importante em diversas etapas da oogênese. Assim, o agrupamento que envolve MQ, VQ, W_NEW e E_SEV, foi categorizada como fêmeas que possuem potencial reprodutivo. Fêmeas que apresentavam ovócitos em estágio de pré-vitelogênese foram categorizadas como fêmeas em atividade reprodutiva e incluem MQ, W_SEV e W_NEW, compartilhando genes que estão relacionados a proteção das células da linhagem germinativa, bem como, genes envolvidos na formação de uma região muito especial para o desenvolvimento, a região do plasma germinativo. Ainda em relação a ativação dos ovários, rainhas acasaladas e operárias com sete dias foram classificadas como fêmeas em estágios avançados da oogênese, compartilhando genes envolvidos no silenciamento de transposons nas células germinativas e vários genes que fazem parte da via de sinalização de Wnt. Nesses fenótipos também foram encontrados genes relacionados a formação do córion e desenvolvimento inicial do embrião. Com relação a ovários que consideramos de fato inativados, como é o caso de operárias forrageiras, nós encontramos alguns genes yellow e, para nossa surpresa, também encontramos o gene *major royal jelly protein 1*. Esse estudo é o primeiro a reportar o gene *mrjp1* em uma espécie de abelha que não pertence ao gênero *Apis*.

(ii) Considerando os dados do corpo gorduroso, nós observamos que esse tecido separa as castas, demonstrando que rainhas virgens e acasaladas compartilham um perfil transcricional que é específico de casta. Nós acreditamos que essa separação está relacionada a longevidade que as rainhas de espécies eussociais possuem se comparadas a operárias.

Observamos que os genes *pgp-1*, *coQ10*, e *Oxr1* podem ser considerados marcadores moleculares de rainhas nessa espécie, e estão associados à proteção das células e tecidos contra toxinas e xenobióticos, além de atuarem nas respostas aos danos oxidativos. Os genes que codificam as enzimas antioxidantes *GSTs* são preferencialmente expressos em rainhas e devem estar envolvidos na longevidade apresentada por essa casta. No total, vinte quatro enzimas antioxidantes foram apresentadas nesse estudo. Essas enzimas são mais expressas em rainhas acasaladas, o que sugere que indivíduos reprodutivos possuem um mecanismo de reparo aos danos oxidativos mais eficiente. Em relação ao perfil transcricional do corpo gorduroso de operárias forrageiras, o qual foi o perfil mais contrastante observado nesse estudo, identificamos dois conjuntos de genes que podem ser usados como marcadores desse estágio do desenvolvimento adulto. Os genes que codificam as enzimas da família P450 e diversos genes que codificam proteínas ribossomais.

(iii) Além dos achados já mencionados, notamos também, através da comparação dos genes diferencialmente expressos entre ovários e corpo gorduroso dentro de um mesmo fenótipo, que rainhas possuem uma maior especificidade entre os tecidos quando comparadas às operárias. A menor especificidade em operárias aponta que o envelhecimento nessa casta faz com que ovários e corpo gorduroso percam sua identidade celular e se assemelhem em relação ao perfil transcricional. Esse resultado é influenciado pela degeneração dos ovários que ocorre na fase de forrageira e que foi descrita no capítulo 1 desta tese. Esse estudo também trouxe novidades interessantes em relação às vias metabólicas envolvidas na reprodução. Através da expressão das enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios 20E e HJ, nós observamos que 20E está relacionado a reprodução em *S. bipunctata*. Já o hormônio juvenil, além de conservar sua função gonadotrófica nessa espécie, também possui uma correlação positiva com *vg*.

7. CONCLUSÃO GERAL DA TESE

Nesse estudo geramos conhecimento em relação à morfologia ovariana, definimos o local das células-tronco da linhagem germinativa, descobrimos tipos celulares presentes nos ovários de *S. bipunctata*, interpretados como essenciais para sustentar o processo da oogênese, e classificamos os diferentes estágios da oogênese em operárias dessa espécie. Por meio de dados transcriptômicos de ovários e corpo gorduroso de rainhas e operárias de *S. bipunctata*, somados aos dados da morfologia ovariana, revelamos os mecanismos envolvidos na ativação dos ovários de rainhas e operárias dessa espécie. Ademais, identificamos genes envolvidos na diferenciação de casta nessa espécie, através das análises dos transcriptomas de corpo gorduroso. A abordagem utilizada nesse estudo é inédita para abelhas nativas e deve servir de base para trabalhos futuros com enfoque molecular envolvendo espécies de abelhas sem ferrão.

8. REFERÊNCIAS

- Ables ET, Bois KE, Garcia CA & Drummond-Barbosa D. 2015. Ecdysone response gene E78 controls ovarian germline stem cell niche formation and follicle survival in *Drosophila*. *Developmental Biology* 400: 33–42.
- Akahira Y, Sakagami SF, Zucchi R. 1970. Die Nöhreier von Arbeiterinnen einer stachellosen Biene, *Trigona (Scaptotrigona) postica*, die von der Königin kurz vor der eigenen Eiablage gefressen warden. *Zoologischer Anzeiger* 185: 85–93.
- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnol* 37: 420–423.
- Amdam GV Omholt SW. 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* 223: 451–464.
- Andrews S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available in < <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>>
- Barcelos IP & Haas RH. 2019. CoQ10 and Aging. *Biology (Basel)* 8: 28.
- Barchuk AR, Bitondi MMG & Simões ZLP. 2002. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* 2: e8.
- Barron AB, Oldroyd BP. 2001. Social regulation of ovary activation in 'anarchistic' honeybees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49: 214–219.
- Baumgart M, Priebe S, Groth M, Hartmann N, Menzel U, Pandolfini L, Koch P, Felder M, Ristow M, Englert C, Guthke R, Platzer M & Cellerino A. 2016. Longitudinal RNA-Seq analysis of vertebrate aging identifies mitochondrial complex I as a small-molecule-sensitive modifier of lifespan. *Cell Systems* 2: 122–132.
- Beig, D. 1972. The production of males in queen right colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apicultural Research* 11:33–39.
- Ben-Meir A, Burstein E, Borrego-Alvarez A, Chong J, Wong E, Yavorska T, *et al.* 2015. Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging. *Aging Cell* 14: 887–895.

- Bloch G, Borst DW, Huang Z, Robinson GE, Cnaani J & Hefetz A. 2000. Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology* 46: 47–57.
- Bloch G, Hefetz A & Hartfelder K. 2000. Ecdysteroid titer, ovary status, and dominance in adult worker and queen bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of Insect Physiology* 46: 1033–1040.
- Blount JD, Vitikainen EIK, Stott I & Cant MA. 2016. Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews* 91: 483–497.
- Borges LDF, Batista LL, Malta SM, Rodrigues TS, Silva JRDC, Venturini G, Pereira ADC, Guedes PHG, Ueira-Vieira C, Bonetti AM. 2021. 10-hydroxy-2E-decenoic acid (10HDA) does not promote caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. *Scientific Reports* 11: 9882.
- Borovsky D, Carlson DA, Ujvary I & Prestwich GD. 1994. Biosynthesis of (10R)-juvenile hormone III from farnesoic acid by *Aedes aegypti* ovary. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2: 75–90.
- Bossennec M, Di Roio A, Caux C & Ménétrier-Caux C. 2018. MDR1 in immunity: friend or foe? *Oncoimmunology* 7: e1499388.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. 2016. *Nature Biotechnol* 34: 525–7.
- Bresnahan ST, Döke MA, Giray T, Grozinger CM. 2022. Tissue-specific transcriptional patterns underlie seasonal phenotypes in honey bees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* 31: 174–184.
- Brito DV, Silva CGN, Hasselmann M, Viana LS, Astolfi-Filho S, Carvalho-Zilse GA. 2015. Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to sex and caste development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 66: 24–30.
- Brito DV, Silva CGN, Rêgo LCN, Carvalho-Zilse GA. 2021. Expression of methyl farnesoate epoxidase (mfe) and juvenile hormone esterase (jhe) genes and their relation to social organization in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae). *Genetics and Molecular Biology* 44: e20200367.

- Bryant DM, Johnson K, DiTommaso T, Tickle T, Couger MB, Payzin-Dogru D, Lee TJ, Leigh ND, Kuo TH, Davis FG, Bateman J, Bryant S, Guzikowski AR, Tsai SL, Coyne S, Ye WW, Freeman RM Jr, Peshkin L, Tabin CJ, Regev A, Haas BJ, Whited JL. 2017. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Reports* 18: 762–776.
- Buchwalter A & Hetzer MW. 2017. Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nature Communications* 8: 328.
- Buszczak M, Freeman MR, Carlson JR, Bender M, Cooley L & Segraves WA. 1999. Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* 126: 4581–4589.
- Camargo CA. 1972. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia* 2: 133-138.
- Cardoen D, Ernst UR, Boerjan B, Bogaerts A, Formesyn E, de Graaf DC, Wenseleers T, Schoofs L, Verleyen P 2012. Worker honeybee sterility: a proteomic analysis of suppressed ovary activation. *Journal of Proteome Research* 11: 2838–2850.
- Cardoen D, Wenseleers T, Ernst UR, Danneels EL, Laget D, de Graaf DC, Schoofs L, Verleyen P. 2011. Genome-wide analysis of alternative reproductive phenotypes in honey bee workers. *Molecular Ecology* 20: 4070–4084.
- Cardoso-Júnior CAM, Silva RP, Borges NA, de Carvalho WJ, Walter SL, Simões ZLP, Bitondi MMG, Ueira Vieira C, Bonetti AM, Hartfelder K. 2017. Methyl farnesoate epoxidase (mfe) gene expression and juvenile hormone titers in the life cycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Journal of Insect Physiology*. 101: 185–194.
- Carter JM, Baker SC, Pink R, Carter DR, Collins A, Tomlin J, Gibbs M & Breuker CJ. 2013. Unscrambling butterfly oogenesis. *BMC Genomics* 14: 283.
- Castanieto A, Johnston MJ & Nystul TG. 2014. EGFR signaling promotes self-renewal through the establishment of cell polarity in *Drosophila* follicle stem cells. *eLife* 3: e04437.
- Chen XG, Jiang X, Gu J, Xu M, Wu Y, Deng Y, Zhang C, Bonizzoni M, Dermauw W, Vontas J, Armbruster P, Huang X, Yang Y, Zhang H, He W, Peng H, Liu Y, Wu K, Chen J, Lirakis M, Topalis P, Van Leeuwen T, Hall AB, Jiang X, Thorpe C,

- Mueller RL, Sun C, Waterhouse RM, Yan G, Tu ZJ, Fang X, James AA. 2015. Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: E5907–E5915.
- Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, Fenger DD & Orr-Weaver TL. 2004. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. *Developmental Cell* 6:145–55.
- Clegg NJ, Frost DM, Larkin MK, Subrahmanyam L, Bryant Z & Ruohola-Baker H. 1997. maelstrom is required for an early step in the establishment of *Drosophila* oocyte polarity: posterior localization of grk mRNA. *Development* 124: 4661–4671.
- Cockrum C, Kaneshiro KR, Rechtsteiner A, Tabuchi TM, Strome S. 2020. A primer for generating and using transcriptome data and gene sets. *Development* 147: dev193854.
- Comas D, Piulachs MD & Bellés X. 2001. Induction of vitellogenin gene transcription in vitro by juvenile hormone in *Blattella germanica*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 183: 93–100.
- Corona M & Robinson GE. 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology* 15: 687–701.
- Costa CP, Duennes MA, Fisher K, Der JP, Watrous KM, Okamoto N, Yamanaka N, Woodard SH. 2020. Transcriptome analysis reveals nutrition- and age-related patterns of gene expression in the fat body of pre-overwintering bumble bee queens. *Molecular Ecology* 29: 720–737.
- Crane FL. 2001. Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition* 20: 591–598.
- Cruz-landim C & Höfling MA. 1971. Cytochemical and ultrastructural studies on eggs from workers and queen of *Trigona*. *Revista Brasileira Pesquisas Médicas e Biológicas* 4: 19–25.
- Cruz-Landim C, Reginato, RD, Imperatriz-Fonseca VL. 1998. Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queens, with comments on ovary development and caste differentiation. *Papéis Avulsos de Zoologia* 40: 289–296.
- Cruz-Landim. 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. UNESP: São Paulo.

- Darragh K, Nelson DR & Ramírez SR. 2021. The birth-and-death evolution of cytochrome P450 genes in bees. *Genome Biology and Evolution* 13: evab261.
- De Graeve F, Smaldone S, Laub F, Mlodzik M, Bhat M & Ramirez F. 2003. Identification of the *Drosophila* progenitor of mammalian Krüppel-like factors 6 and 7 and a determinant of fly development. *Gene* 314: 55–62.
- De Loof A, Baggerman G, Breuer M, Claeys I, Cerstiaens A *et al.* 2001. Gonadotropins in insects: An overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47: 129–138.
- de Paula Freitas FC, Lourenço AP, Nunes FMF, Paschoal AR, Abreu FCP, Barbin FO, Bataglia L, Cardoso-Júnior CAM, Cervoni MS, Silva SR, Dalarmi F, Del Lama MA, Depintor TS, Ferreira KM, Gória PS, Jaskot MC, Lago DC, Luna-Lucena D, Moda LM, Nascimento L, Pedrino M, Oliveira FR, Sanches FC, Santos DE, Santos CG, Vieira J, Barchuk AR, Hartfelder K, Simões ZLP, Bitondi MMG & Pinheiro DG. 2020. The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* - a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. *BMC Genomics* 21: 386.
- Dermauw W, Van Leeuwen T, Feyereisen R. 2020. Diversity and evolution of the P450 family in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 127: 103490.
- Dhondt I, Petyuk VA, Bauer S, Brewer HM, Smith RD, Depuydt G & Braeckman BP. 2017. Changes of protein turnover in aging *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Cellular Proteomics* 16: 1621–1633.
- do Carmo Zerbo A, Silva de Moraes RL & Brochetto-Braga MR. 2001. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae [correction of Apidia], Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129: 139–147.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." *Bioinformatics* 29: 15–21.

- Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C & Maleszka R. 2006. Evolution of the yellow/major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research* 16: 1385–1394.
- Duncan EJ, Hyink O, Dearden PK. 2016. Notch signalling mediates reproductive constraint in the adult worker honeybee. *Nature Communications* 7: 12427.
- Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Paulino Simões ZL, Trube A, Braun R & Dittrich F. 1990. Honeybee reproduction: Vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In Hoshi M & Yamashita O (Eds). *Advances in Invertebrate Reproduction* 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 495–502.
- Fahrbach SE, Giray T & Robinson GE. 1995. Volume changes in the mushroom bodies of adult honey bee queens. *Neurobiology of Learning and Memory* 63: 181–191.
- Figueira-Mansur J, Ferreira-Pereira A, Mansur JF, Franco TA, Alvarenga ES, Sorgine MH, Neves BC, Melo AC, Leal WS, Masuda H, Moreira MF. 2013. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Molecular Biology* 22: 648–658.
- Finelli MJ, Sanchez-Pulido L, Liu KX, Davies KE & Oliver PL. 2016. The evolutionarily conserved Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), lysin motif (LysM), domain catalytic (TLDC) domain is neuroprotective against oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 291: 2751–2763.
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM & Pastan I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 265–269.
- Frenk S & Houseley J. 2018. Gene expression hallmarks of cellular ageing. *Biogerontology* 19: 547–566.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 15: 644–652.

- Groen SC, LaPlante ER, Alexandre NM, Agrawal AA, Dobler S & Whiteman NK. 2017. Multidrug transporters and organic anion transporting polypeptides protect insects against the toxic effects of cardenolides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **81**: 51–61.
- Grozinger CM, Fan Y, Hoover SE, Winston ML. 2007. Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* **16**: 4837–48.
- Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simões ZL & Hartfelder K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters* **579**: 4961–4965.
- Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* **315**:1587–1590.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J *et al.* 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**: 1494–1512.
- Hargreaves IP. 2003. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* **40**: 207–218.
- Hartfelder K & Engels W. 1998. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* **40**: 45–77.
- Hartfelder K & Engels W. 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology* **40**: 45–77.
- Hartfelder K, Bitondi MM, 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 Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 211–216.
- Hartfelder K, Rembold H. 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee,

Scaptotrigona postica depilis. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical, Systems, and Environmental Physiology* **160**: 617–620.

- Hartfelder K, Tiberio GJ, Lago DC, Dallacqua RP, Bitondi MG. 2018. The ovary and its genes-developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, **49**: 49–70.
- Helbing S, Lattorff MG, Moritz RFA & Buttstedt A. 2017. Comparative analyses of the major royal jelly protein gene cluster in three *Apis* species with long amplicon sequencing. *DNA Research* **24**: 279–287.
- Hoover SE, Keeling CI, Winston ML, Slessor KN. 2003. The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften* **90**:477–80.
- Hsieh YS & Hsu CY. 2011a. Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Experimental Gerontology* **46**: 233–240.
- Hsieh YS & Hsu CY. 2011b. The changes of age-related molecules in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **42**: 728–739.
- Hsin H & Kenyon C. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*.1999 **399**: 362–366.
- Irls P, Bellés X & Piulachs MD. 2009. Identifying genes related to choriogenesis in insect panoistic ovaries by Suppression Subtractive Hybridization. *BMC Genomics* **10**: 206.
- Izgi H, Han D, Isildak U, Huang S, Kocabiyik E, Khaitovich P, Somel M & Dönertaş HM. 2022. Inter-tissue convergence of gene expression during ageing suggests age-related loss of tissue and cellular identity. *eLife* **11**: e68048.
- Jaramillo-Gutierrez G, Molina-Cruz A, Kumar S & Barillas-Mury C. 2010. The *Anopheles gambiae* oxidation resistance 1 (OXR1) gene regulates expression of enzymes that detoxify reactive oxygen species. *PLOS One* **5**: e11168.
- Jassim O, Huang ZY & Robinson GE. 2000. Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *Journal of Insect Physiology* **46**: 243–249.

- Jevitt A, Chatterjee D, Xie G, Wang X-F, Otwell T, Huang YC & Deng WM (2020). A single-cell atlas of adult *Drosophila* ovary identifies transcriptional programs and somatic cell lineage regulating oogenesis. *PLoS Biology* 18: e3000538.
- Jiang H, Tian A & Jiang J. 2016. Intestinal stem cell response to injury: lessons from *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 3337–3349.
- Jin M, Liao C, Chakrabarty S, Zheng W, Wu K & Xiao Y. 2019. Transcriptional response of ATP-binding cassette (ABC) transporters to insecticides in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 154: 46–59.
- Johnson RM, Harpur BA, Dogantzis KA, Zayed A & Berenbaum MR. 2018. Genomic footprint of evolution of eusociality in bees: floral food use and CYPome “blooms”. *Insectes Sociaux* 65: 445–454.
- Johnson RM. 2015. Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology* 60: 415–434.
- Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, Camarda CG, Schaible R, Casper BB, Dahlgren JP, Ehrlén J, García MB, Menges ES, Quintana-Ascencio PF, Caswell H, Baudisch A & Vaupel JW. 2014. Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505: 169–173.
- Judice C, Hartfelder K, Pereira GAG. 2004. Caste-specific gene expression profile in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* – are there common patterns in highly eusocial bees? *Insectes Sociaux* 51: 352–358.
- Judice CC, Carazzole MF, Festa F, Sogayar MC, Hartfelder K, Pereira GAG. 2006. Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Molecular Biology* 15: 33–44.
- Kang I, Kim W, Lim JY, Lee Y, Shin C. 2021. Organ-specific transcriptome analysis reveals differential gene expression in different castes under natural conditions in *Apis cerana*. *Scientific Reports* 11: 11267.
- Kapheim KM, Pan H, Li C, Salzberg SL, Puiu D, Magoc T, *et al.* 2015. Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science* 348: 1139–1143.

- Kapheim KM, Pan H, Li C, Salzberg SL, Puiu D, Magoc T, *et al.* 2015. Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science* **348**: 1139–1143.
- Kennedy A, Herman J & Rueppell O. 2021. Reproductive activation in honeybee (*Apis mellifera*) workers protects against abiotic and biotic stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* **376**: 20190737.
- Kerr WE: Sex determination in bees. 1974. III Caste determination in *Melipona* and genetic control. *Insectes Sociaux* **21**: 357–368.
- Kobayashi N, Takahashi M, Kihara S, Niimi T, Yamashita O & Yaginuma T. 2014. Cloning of cDNA encoding a *Bombyx mori* homolog of human oxidation resistance 1 (OXR1) protein from diapause eggs, and analyses of its expression and function. *Journal of Insect Physiology* **68**: 58–68.
- König A, Yatsenko AS, Weiss M & Shcherbata HR. 2011. Ecdysteroids affect *Drosophila* ovarian stem cell niche formation and early germline differentiation. *The EMBO Journal* **30**: 1549–1562.
- Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, Heinze J, Korb J, Libbrecht R, Meusemann K, Paxton RJ, Séguret A, Schaub F & Bernadou A. 2021. Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* **376**: 20190732.
- Kriventseva E.V. et al. 2019. OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Research* **47**: 807–811
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**: 567–80.
- Kuhn MJM, Meusemann K, Korb J. 2021. Disentangling the aging gene expression network of termite queens. *BMC Genomics* **22**: 339.
- Kupke J, Spaethe J, Mueller MJ, Rössler W & Albert Š. 2012. Molecular and biochemical characterization of the major royal jelly protein in bumblebees suggest a non-nutritive function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**: 647–654.

- Lacerda LM, Simões ZLP. 2006. Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados. *Iheringia* 96: 1678–4766.
- Lago DC, Hasselmann M, Hartfelder K. 2022. Sex- and caste-specific transcriptomes of larval honey bee (*Apis mellifera* L.) gonads: DMRT A2 and Hsp83 are differentially expressed and regulated by juvenile hormone. *Insect Molecular Biology* doi: 10.1111/imb.12782.
- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–9.
- Lim AK & Kai T. 2007. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 6714–6719.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550.
- Lu CY, Weng YT, Tan B & Hsu CY. 2021. The trophocytes and oenocytes of worker and queen honey bees (*Apis mellifera*) exhibit distinct age-associated transcriptome profiles. *Geroscience* 43: 1863–1875.
- Lynch JA, Peel AD, Drechsler A, Averof M & Roth S. 2010. EGF signaling and the origin of axial polarity among the insects. *Current Biology* 20: 1042–1047.
- Ma X, Zhu X, Han Y, Story B, Do T, Song X, Wang S, Zhang Y, Blanchette M, Gogol M, Hall K, Peak A, Anoja P & Xie T. 2017. Aubergine controls germline stem cell self-renewal and progeny differentiation via distinct mechanisms. *Developmental Cell* 41: 157–169.
- Macedo LMF, Nunes FMF, Freitas FCP, Pires CV, Tanaka ED, Martins JR, Piulachs MD, Cristino AS, Pinheiro DG, Simões ZLP. 2016. MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Molecular Biology* 25: 216–226.
- Macedo LMF. 2013. Análise do processo de ativação dos ovários de *Apis mellifera*, aspectos morfológicos e expressão gênica. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.

- Manjon C, Troczka BJ, Zaworra M, Beadle K, Randall E, Hertlein G, Singh KS, Zimmer CT, Homem RA, Lueke B, Reid R, Kor L, Kohler M, Benting J, Williamson MS, Davies TGE, Field LM, Bass C & Nauen R. 2018. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current Biology* 28: 1137–1143.
- Mello TR, Aleixo AC, Pinheiro DG, Nunes FM, Bitondi MM, Hartfelder K, Barchuk AR & Simões ZL. 2014. Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Genetics* 5: 445.
- Menezes C, Vollet-Neto A, Marsaioli AJ, Zampieri D, Fontoura IC, Luchessi AD, Imperatriz-Fonseca VL. 2015. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology* 25: 2851–2855.
- Miles MV, Horn PS, Tang PH, Morrison JA, Miles L, DeGrauw T & Pesce AJ. 2004. Age-related changes in plasma coenzyme Q10 concentrations and redox state in apparently healthy children and adults. *Clinica Chimica Acta* 347: 139–44.
- Morré DM, Guo F & Morré DJ. 2003. An aging-related cell surface NADH oxidase (arNOX) generates superoxide and is inhibited by coenzyme Q. *Molecular and Cellular Biochemistry* 254: 101–109.
- Murray AR, Chen Q, Takahashi Y, Zhou KK, Park K & Ma J-X. 2013. MicroRNA-200b downregulates oxidation resistance 1 (Oxr1) expression in the retina of type 1 diabetes model. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* 54: 1689–1697.
- Niu D, Zheng H, Corona M, Lu Y, Chen X, Cao L, Sohr A, Hu F. 2014. Transcriptome comparison between inactivated and activated ovaries of the honey bee *Apis mellifera* L. *Insect Molecular Biology* 23: 668–681.
- Noh MY, Kim SH, Gorman MJ, Kramer KJ, Muthukrishnan S & Arakane Y. 2020. Yellow-g and Yellow-g2 proteins are required for egg desiccation resistance and temporal pigmentation in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 122: 103386.

- Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C. 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology* 19: 147–163.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet J-M, Crozier RH. 1994. Anarchy in the beehive. *Nature* 371: 749.
- Paludo CR, Pishchany G, Andrade-Dominguez A, Silva-Junior EA, Menezes C, Nascimento FS, Currie CR, Kolter R, Clardy J & Pupo MT. 2019. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PLoS ONE* 14: e0219696.
- Parthasarathy R, Sun Z, Bai H & Palli SR. 2010. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 405–414.
- Pickup AT & Banerjee U. 1999. The role of star in the production of an activated ligand for the EGF receptor signaling pathway. *Developmental Biology* 205: 254–259.
- Pinto LZ, Bitondi MMG & Simoes ZLP. 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology* 46: 153–160.
- Rasmussen C, Cameron SA. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 206–232.
- Rembold H. 1987. Caste differentiation of the honeybee—Fourteen years of biochemical research at Martinsried. In Eder J & Rembold H (Eds). *Chemistry and biology of social insects*. Verlag J. Peperny, Munchen, pp. 3–13.
- Riddiford LM. 2012. How Does Juvenile Hormone Regulate Insect Metamorphosis and Reproduction? *General and Comparative Endocrinology* 52: 477–484.
- Robert VJ, Sijen T, van Wolfswinkel J & Plasterk RH. 2005. Chromatin and RNAi factors protect the *C. elegans* germline against repetitive sequences. *Genes Development* 19: 782–787.

- Ronai I, Allsopp MH, Tan K, Dong S, Liu X, Vergoz V, Oldroyd BP. 2017. The dynamic association between ovariole loss and sterility in adult honeybee workers. *Proceedings of the Royal Society B*. 284: 20162693.
- Ronai I, Barton DA, Oldroyd BP, Vergoz V. 2015. Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death. *Journal of Insect Physiology* 81: 36–41.
- Ronai I, Oldroyd BP, Barton DA, Cabanes G, Lim J, Vergoz V. 2016a. Anarchy is a molecular signature of worker sterility in the honey bee. *Molecular biology and Evolution* 33:134–142.
- Ronai I, Oldroyd BP, Vergoz V. 2016b. Queen pheromone regulates programmed cell death in the honey bee worker ovary. *Insect Molecular Biology* 25:646–652.
- Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS & Britigan BE. 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal* 9: 200–209.
- Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCaw A, Lee E. 2013. The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors* 31: 1–31.
- Sakagami SF, Beig D, Akahira Y. 1963. Occurrence of ovary developed workers in queenright colonies of stingless bees. *Revista Brasileira de Biologia* 23: 115–129.
- Santos TCA, Cruz-Landim C. 2002. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 703–714.
- Sauer K, Weigmann K, Sigrist S & Lehner CF. 1996. Novel members of the cdc2- related kinase family in *Drosophila*: cdk4/6, cdk5, PFTAIRE, and PITSLRE kinase. *Molecular Biology of the Cell* 7: 1759–1769.
- Schumann NAB, Cardoso-Junior CAM, Silva EH, Ueira-Vieira C, Beletti ME, Franco MB, Bezerra-Laure M, Araujo GR, Travençolo BAN, Bonetti AM. 2019. Three-dimensional reconstruction of *corpora allata* nucleus reveals insights into epigenetic mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. *Apidologie* 50: 330–339.
- Séguret A, Stolle E, Fleites-Ayil FA, Quezada-Euán JJG, Hartfelder K, Meusemann K, Harrison MC, Soro A & Paxton RJ. 2021. Transcriptomic signatures of ageing vary

- in solitary and social forms of an orchid bee. *Genome Biology and Evolution* **13**: evab075.
- Seim I, Ma S & Gladyshev VN. 2016. Gene expression signatures of human cell and tissue longevity. *npj Aging and Mechanisms of Disease* **2**: 16014.
- Sezutsu H, Le Goff G & Feyereisen R. 2013. Origins of P450 diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* **368**: 20120428.
- Sgrò CM & Partridge L. 1999. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* **286**: 2521–2524.
- Sheng Li, Xiaoqiang Yu, Qili Feng. 2019. Fat Body Biology in the Last Decade. *Annual Review of Entomology* **64**: 315–333.
- Shpigler H, Amsalem E, Huang ZY, Cohen M, Siegel AJ, Hefetz A, Bloch G. 2014. Gonadotropic and physiological functions of juvenile hormone bumblebee (*Bombus terrestris*) workers. *PLoS One* **9**: e100650.
- Shpigler HY, Herb B, Drnevich J, Band M, Robinson GE & Bloch G. 2020. Juvenile hormone regulates brain-reproduction tradeoff in bumble bees but not in honey bees. *Hormones and Behavior* **126**: 104844.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **31**: 3210–3212.
- Soares MPM, Pinheiro DG, de Paula Freitas FC, Simões ZLP, Bitondi MMG. 2021. Transcriptome dynamics during metamorphosis of imaginal discs into wings and thoracic dorsum in *Apis mellifera* castes. *BMC Genomics* **22**: 756.
- Soper SFC, van der Heijden GW, Hardiman TC, Goodheart M, Martin SL, de Boer P & Bortvin A. 2008. Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Developmental Cell* **15**: 285–297
- Staurengo da Cunha MA. 1979. Ovarian development in *Scaptotrigona postica* Latr. 1807 (Hym.: Apidae) II. A quantitative study. *Insectes Sociaux* **26**: 196–203.
- Steinegger M, Söding J. 2017. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nature Biotechnol* **35**: 1026–1028.

- Strachecka A, Olszewski K, Paleolog J, Borsuk G, Bajda M, Krauze M, Merska M & Chobotow J. 2014. Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **86**: 165–79.
- Swarup S & Verheyen EM. 2012. Wnt/Wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* **4**: a007930.
- Taieb F, Thibier C & Jessus C. 1997. On cyclins, oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development* **48**: 397–411.
- Tanaka ED, Hartfelder K. 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Structure & Development* **33**: 431–442.
- Tanaka ED, Hartfelder K. 2009. Sequence and expression pattern of the germ line marker vasa in honey bees and stingless bees. *Genetics and Molecular Biology* **32**: 582–593.
- Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K & Iuchi Y. 2017. An efficient antioxidant system in a long-lived termite queen. *PLoS ONE* **12**: e0167412.
- Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K & Iuchi Y. 2018. Long-lived termite queens exhibit high Cu/Zn-superoxide dismutase activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **5127251**.
- Tasaki E, Takata M & Matsuura K. 2021. Why and how do termite kings and queens live so long? *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* **376**: 20190740.
- Teles ACAS, Mello TRP, Barchuk AR, Simões ZLP. 2007. Ultraspiracle of the stingless bees *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona depilis*: cDNA sequence and expression profiles during pupal development. *Apidologie* **38**: 462–471.
- Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP. 2008. Genome-wide analysis of genes related to ovary activation in worker honey bees. *Insect Molecular Biology* **17**:657–65.
- Tian L, Ji BZ, Liu SW, He C-L, Jin F, Gao J, Stanley D & Li S. 2010. JH biosynthesis by reproductive tissues and *corpora allata* in adult longhorned beetles, *Apriona germari*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **75**: 275–286.

- Trcek T, Lehmann R. 2019. Germ granules in *Drosophila*. *Traffic* 20: 650–660.
- Van Ekert E, Heylen K, Rougé P, Powell CA, Shatters RG Jr, Smagghe G & Borovsky D. 2014. *Aedes aegypti* juvenile hormone acid methyl transferase, the ultimate enzyme in the biosynthetic pathway of juvenile hormone III, exhibits substrate control. *Journal of Insect Physiology* 64: 62–73.
- Vannette R, Mohamed A & Johnson B. 2015. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports* 5: 16224.
- Vieira CU, Bonetti AM, Simões ZL, Maranhão AQ, Costa CS, Costa MC, Siquieroli AC, Nunes FM. 2008. Farnesoic acid O-methyl transferase (FAMeT) isoforms: conserved traits and gene expression patterns related to caste differentiation in the stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 67: 97–106.
- Volkert MR, Elliott NA & Housman DE. 2000. Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14530–14535.
- Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P & Nagamori I. 2011. RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 3: a002774.
- Waghmare I & Page-McCaw A. 2018. Wnt signaling in stem cell maintenance and differentiation in the *Drosophila* germarium. *Genes (Basel)* 9: 127.
- Wang Y, Liu M, Zhang J, Liu Y, Kopp M, Zheng W, Xiao S. 2018. Multidrug resistance protein 1 deficiency promotes doxorubicin-induced ovarian toxicity in female mice. *Toxicological Sciences* 163: 279–292.
- Ward WF. 2002. Protein degradation in the aging organism. In: Reboud-Ravaux M (ed.) *Protein Degradation in Health and Disease*. Progress in Molecular and Subcellular Biology, 29, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Waterhouse RM, Seppey M, Simão FA, Manni M, Ioannidis P, Klioutchnikov G *et al.* 2017. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution* 35: 5430–5448.

- Weber U, Rodriguez E, Martignetti J & Mlodzik M. 2014. Luna, a *Drosophila* KLF6/KLF7, is maternally required for synchronized nuclear and centrosome cycles in the preblastoderm embryo. *PLoS One* 9: e96933.
- Wee CY, Tamizi AA, Nazaruddin NH, Ng SM, Khoo JS, Jajuli R. 2020. First Draft Genome Assembly of the Malaysian Stingless Bee, *Heterotrigona itama* (Apidae, Meliponinae). *Data* 5: 112. <https://doi.org/10.3390/data5040112>
- Werck-Reichhart D & Feyereisen R. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 1: REVIEWS3003.
- Whittle CA, Extavour CG. 2019. Contrasting patterns of molecular evolution in metazoan germ line genes. *BMC Evolutionary Biology* 19: 53.
- Winkler P, Sieg F & Buttstedt A. 2018. Transcriptional control of honey bee (*Apis mellifera*) major royal jelly proteins by 20-Hydroxyecdysone. *Insects* 9: 122.
- Wyatt GR & Davey KG. 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Advances in Insect Physiology* 26: 1–155.
- Yang L, Wang H, Song S, Xu H, Chen Y, Tian S, Zhang Y & Zhang Q. 2022. Systematic understanding of anti-aging effect of coenzyme Q10 on oocyte through a network pharmacology approach. *Frontiers in Endocrinology* 13: 813772.
- Yang M, Lin X, Rowe A, Rognes T, Eide L & Bjørås M. 2015. Transcriptome analysis of human OXR1 depleted cells reveals its role in regulating the p53 signaling pathway. *Scientific Reports* 5: 17409.
- Yang M, Luna L, Sørbo JG, Alseth I, Johansen RF, Backe PH, Danbolt NC, Eide L & Bjørås M. 2014. Human OXR1 maintains mitochondrial DNA integrity and counteracts hydrogen peroxide-induced oxidative stress by regulating antioxidant pathways involving p21. *Free Radical Biology and Medicine* 77: 41–48.
- Yang T, Liu N. 2011. Genome analysis of cytochrome P450s and their expression profiles in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One* 6: e29418.
- Yang Y, Ye X, Dang C, Cao Y, Hong R, Sun YH, Xiao S, Mei Y, Xu L, Fang Q, Xiao H, Li F & Ye G. 2021. Genome of the pincer wasp *Gonatopus flavifemur* reveals unique venom evolution and a dual adaptation to parasitism and predation. *BMC Biology* 19: 145.

- Ye C, Rasheed H, Ran Y, Yang X, Xing L & Su X. 2019. Transcriptome changes reveal the genetic mechanisms of the reproductive plasticity of workers in lower termites. *BMC Genomics* 20: 702.
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology* 11: R14.
- Yue B, Xue X & Wu L. 2010. HPLC determination of coenzyme Q10 in queen bee larvae. *Journal of Food Science* 31: 206–208.
- Zhang D, Xiong H, Shan J, Xia X & Trudeau VL. 2008. Functional insight into Maelstrom in the germline piRNA pathway: a unique domain homologous to the DnaQ-H 3'-5' exonuclease, its lineage-specific expansion/loss and evolutionarily active site switch. *Biology Direct* 3: 48.
- Zhang W, Yao Y, Wang H, Liu Z, Ma L, Wang Y & Xu B. 2019. The roles of four novel P450 genes in pesticides resistance in *Apis cerana cerana* Fabricius: expression levels and detoxification efficiency. *Frontiers in Genetics* 10: 1000.
- Zhang X, Zhang S, Liu X, Wang Y, Chang J, Zhang X, Mackintosh SG, Tackett AJ, He Y, Lv D, Laberge R-M, Campisi J, Wang J, Zheng G & Zhou D. 2018. Oxidation resistance 1 is a novel senolytic target. *Aging Cell* 17: e12780–e12780.
- Zhang Y, Xi yongmei. 2014. Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of tissue science & engineering*, 6: 1431–442.
- Zhou X, Liao WJ, Liao JM, Liao P & Lu H. 2015. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular and Cellular Biology* 7: 92–104.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Amostras de operárias da espécie *Scaptotrigona bipunctata* enviadas para o sequenciamento dos transcriptomas de ovário e corpo gorduroso.

Amostra	Nome	Material	Organismo	Descrição	Nº Abelhas pools	Concentração ng/ul	Massa ug	Método utilizado para extração RNA
1	Sb_W_NEW_OV_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária recém-emergida	25	42	2.1	Trizol
2	Sb_W_NEW_OV_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária recém-emergida	17	43.4	2.17	Trizol
3	Sb_W_NEW_OV_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária recém-emergida	21	41.8	2.09	Trizol
4	Sb_W_SEV_OV_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária com sete dias	5	67.4	3.37	Trizol
5	Sb_W_SEV_OV_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária com sete dias	5	66	3.3	Trizol
6	Sb_W_SEV_OV_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária com sete dias	6	59.2	2.96	Trizol
7	Sb_W_FOR_OV_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária forrageira	59	47.8	2.39	Trizol
8	Sb_W_FOR_OV_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária forrageira	36	43	2.15	Trizol
9	Sb_W_FOR_OV_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de operária forrageira	59	41.2	2.06	Trizol
10	Sb_W_NEW_FB_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária recém-emergida	3	46.6	2.33	Trizol
11	Sb_W_NEW_FB_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária recém-emergida	3	42.6	2.13	Trizol
12	Sb_W_NEW_FB_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária recém-emergida	3	54.6	2.73	Trizol
13	Sb_W_SEV_FB_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária com sete dias	3	52	2.6	Trizol
14	Sb_W_SEV_FB_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária com sete dias	3	74	3.7	Trizol
15	Sb_W_SEV_FB_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária com sete dias	3	51.4	2.57	Trizol
16	Sb_W_FOR_FB_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária forrageira	3	53	2.65	Trizol
17	Sb_W_FOR_FB_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária forrageira	3	44.8	2.24	Trizol
18	Sb_W_FOR_FB_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de operária forrageira	3	50.2	2.51	Trizol
Total					260			

Tabela S2. Amostras de rainhas da espécie *Scaptotrigona bipunctata* enviadas para o sequenciamento dos transcriptomas de ovário e corpo gorduroso. Para as amostras de rainha foram necessários apenas um único indivíduo para cada condição biológica.

Amostra	Nome	Material	Organismo	Descrição das amostras	concentração ng/ul	Massa ug	Método utilizado para extração de RNA
1	Sb_MQ_OV_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de rainha acasalada	78,8	3,94	Trizol
2	Sb_MQ_OV_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de rainha acasalada	83,6	4,18	Trizol
3	Sb_MQ_OV_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de rainha acasalada	94,9	4,75	Trizol
4	Sb_VQ_OV_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de rainha virgem	50,93	2,55	Trizol
5	Sb_VQ_OV_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de rainha virgem	48,59	2,42	Trizol
6	Sb_VQ_OV_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Ovário de rainha virgem	40,54	3,03	Trizol
7	Sb_MQ_FB_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de rainha acasalada	71,64	3,58	Trizol
8	Sb_MQ_FB_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de rainha acasalada	66,94	3,34	Trizol
9	Sb_MQ_FB_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de rainha acasalada	64,17	3,2	Trizol
10	Sb_VQ_FB_RB1	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de rainha virgem	79,4	3,97	Trizol
11	Sb_VQ_FB_RB2	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de rainha virgem	74,73	3,7	Trizol
12	Sb_VQ_FB_RB3	RNA total	<i>S. bipunctata</i>	Corpo gorduroso de rainha virgem	75,73	3,7	Trizol

Tabela S3. Estatística da montagem do transcriptoma referência de rainhas e operárias de *S. bipunctata* realizada por duas abordagens seguindo o proposto por Morandi *et al.* (2018).

Estatística Trinity	de novo	Montagem guiada	Montagem final
Total trinity 'genes'	204.194	82.990	32.215
Total trinity transcripts	306.627	141.753	55.758
Percent GC	38,81	37,90	39,32
Stats based on ONLY LONGEST ISOFORM per 'GENE'			
Transcripts Contig N50	972	1.374	4.093
Transcripts Median contig length	341	332	905
Transcripts Average contig	649,15	709,80	1.984,16
Transcripts Total assembled bases	132.552.072	58.905.945	63.919.870

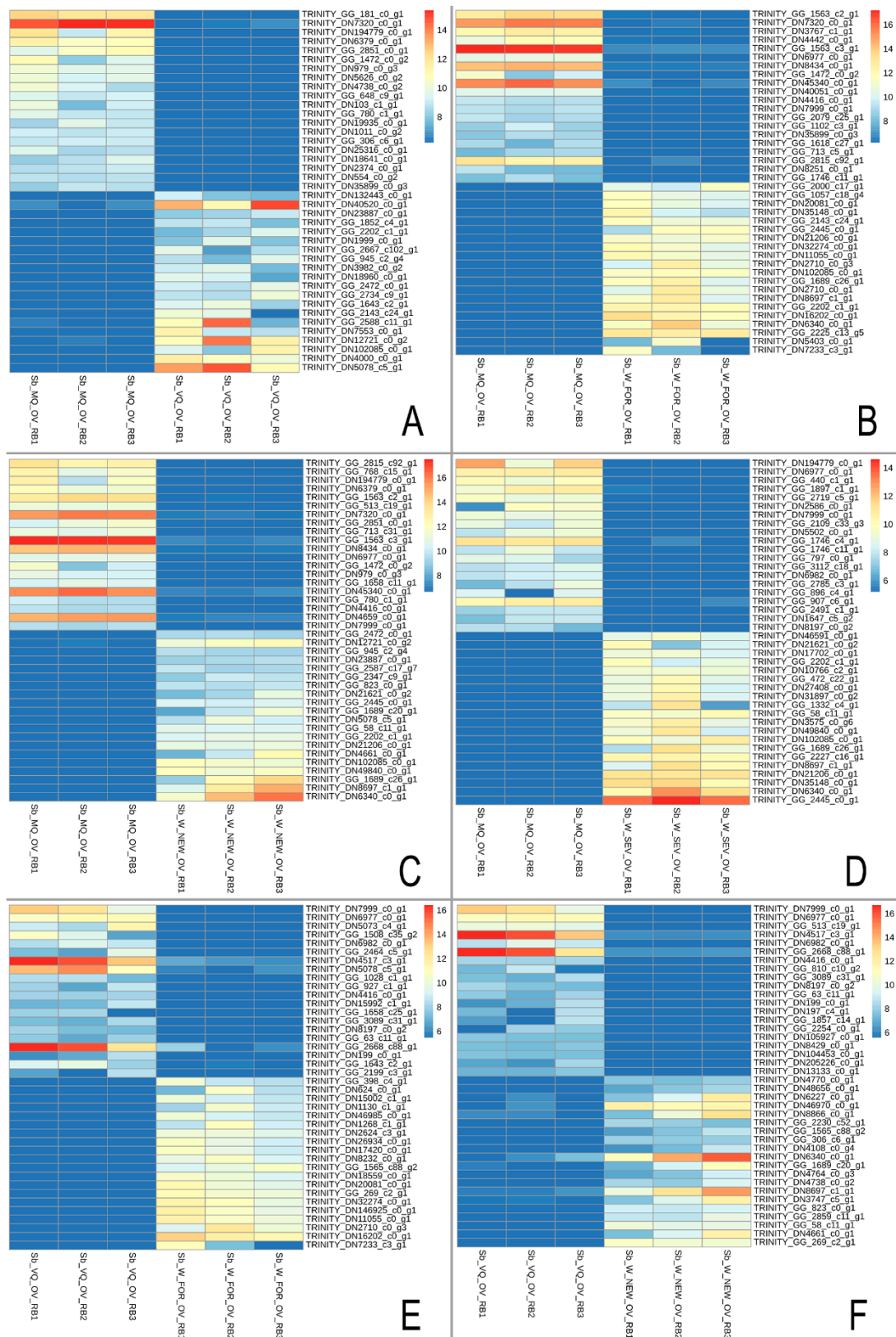


Figura S1. Heatmaps de genes que apresentam as maiores variações no nível de expressão das comparações par a par nas bibliotecas de ovários. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra são as réplicas biológicas de cada fenótipo. (A) ovários de rainhas acasalada (MQ) *vs* ovários de rainhas virgens (VQ). (B) Ovários de rainhas acasaladas *vs* ovários de operárias forrageiras (W_FOR). (C) Ovários de MQ *vs* operárias recém-emergidas (W_SEV). (D) Ovários de MQ *vs* ovários de operárias com sete dias (W_SEV). (E) Ovários de rainhas virgens (VQ) *vs* ovários de W_FOR. (F) Ovários de VQ *vs* ovários de W_NEW.

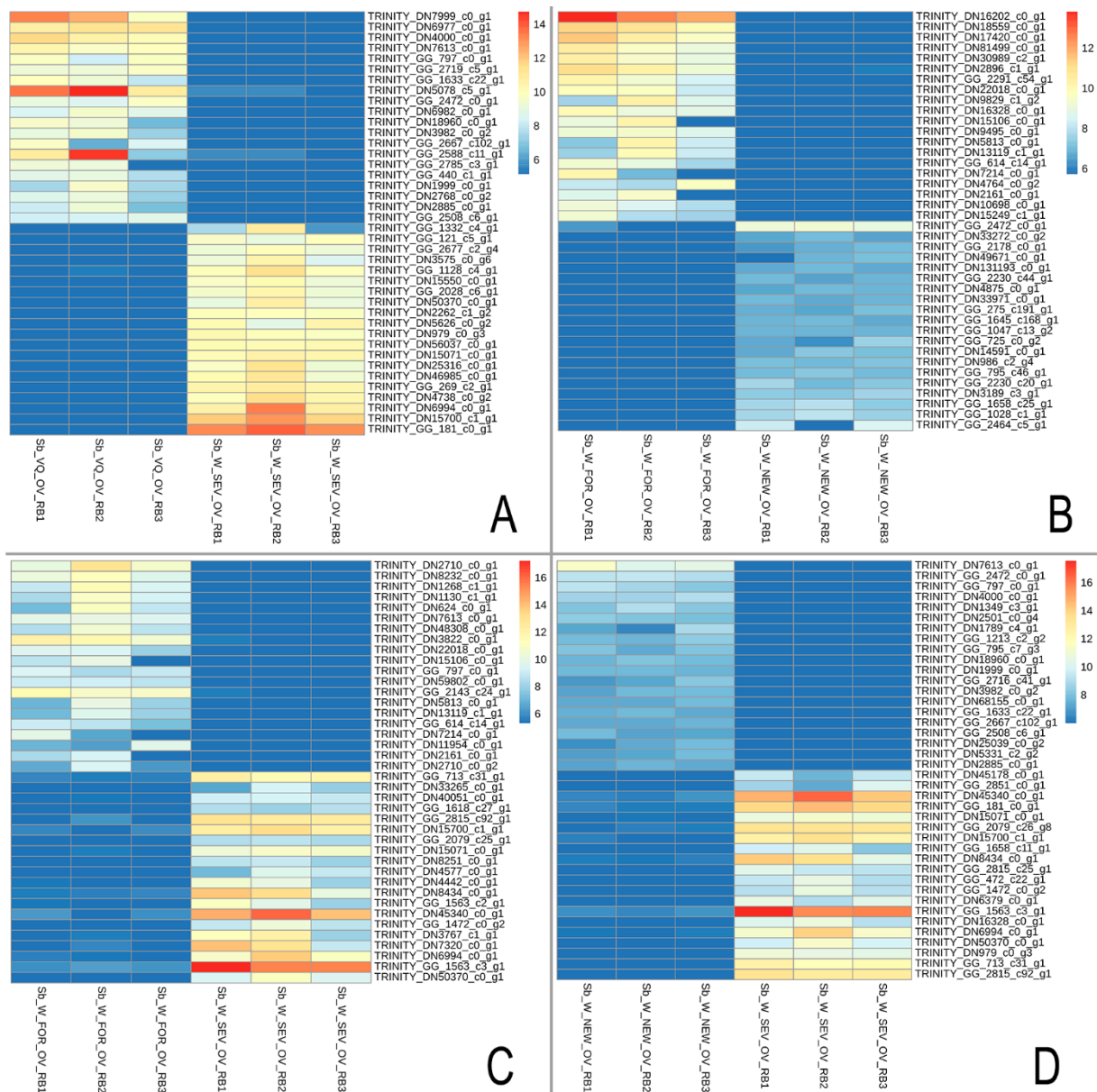


Figura S2. Heatmaps de genes que apresentam as maiores variações no nível de expressão das comparações par a par nas bibliotecas de ovários. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra são as réplicas biológicas de cada fenótipo. (A) Ovários de rainhas recém-emergidas (VQ) *vs* ovários de operárias com sete dias (W_SEV). (B) Ovários de operárias forrageiras (W_FOR) *vs* ovários de operárias recém-emergidas (W_NEW). (C) Ovários de W_FOR *vs* ovários W_SEV. (D) Ovários de W_NEW *vs* ovários de W_SEV.

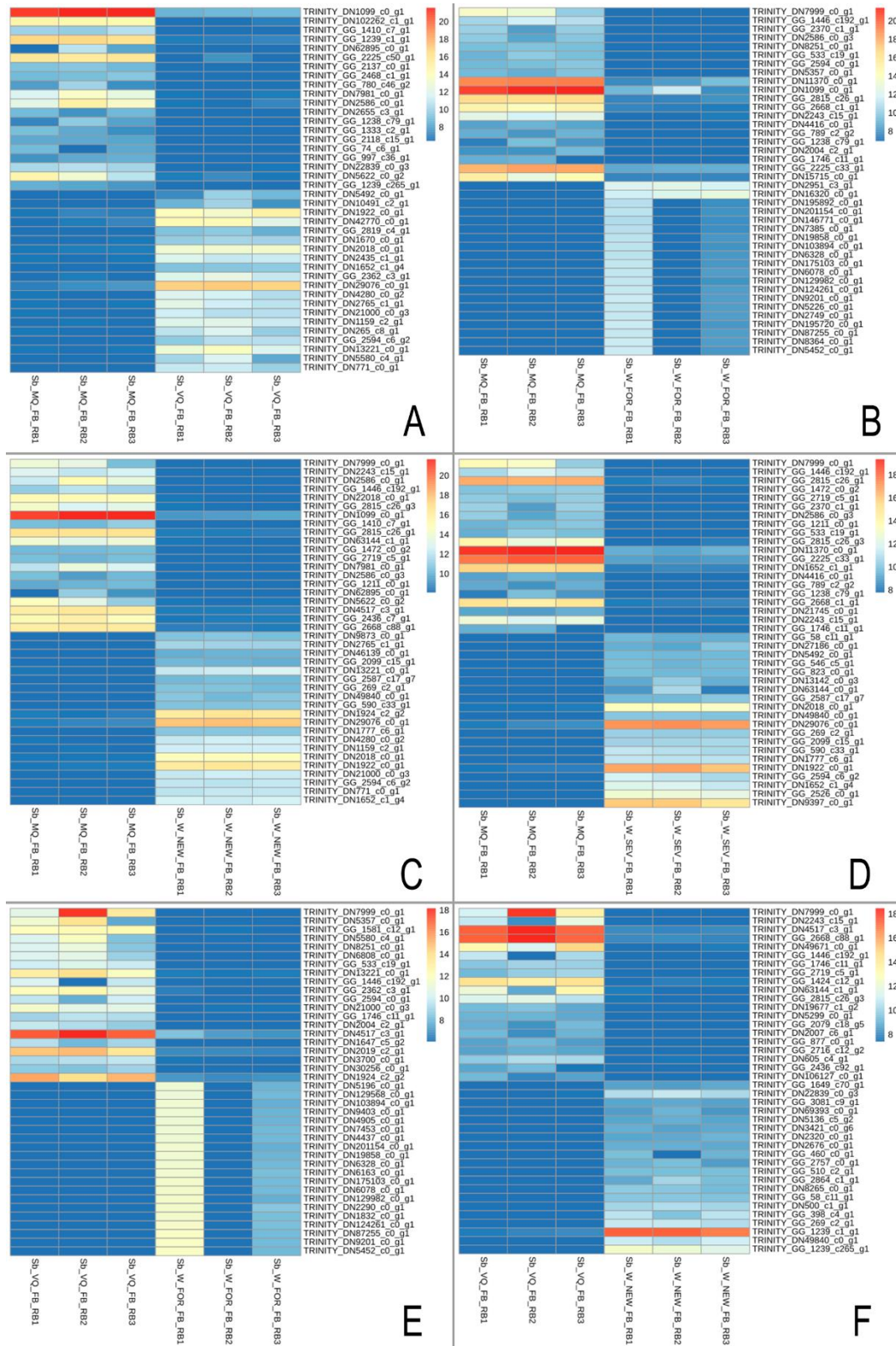


Figura S3. Heatmaps de genes que apresentam as maiores variações no nível de expressão das comparações par a par nas bibliotecas de corpo gorduroso. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra são as réplicas biológicas de cada fenótipo. (A) corpo gorduroso de rainhas acasalada (MQ) *vs* corpo gorduroso de rainhas virgens (VQ). (B) Corpo gorduroso de MQ *vs* corpo gorduroso de operárias forrageiras (W_FOR). (C) Corpo gorduroso de MQ *vs* corpo gorduroso de operárias recém-emergidas (W_SEV). (D) Corpo gorduroso de MQ *vs* corpo gorduroso de operárias com sete dias (W_SEV). (E) Corpo gorduroso de rainhas virgens (VQ) *vs* corpo gorduroso de W_FOR. (F) Corpo gorduroso de VQ *vs* corpo gorduroso de W_NEW.

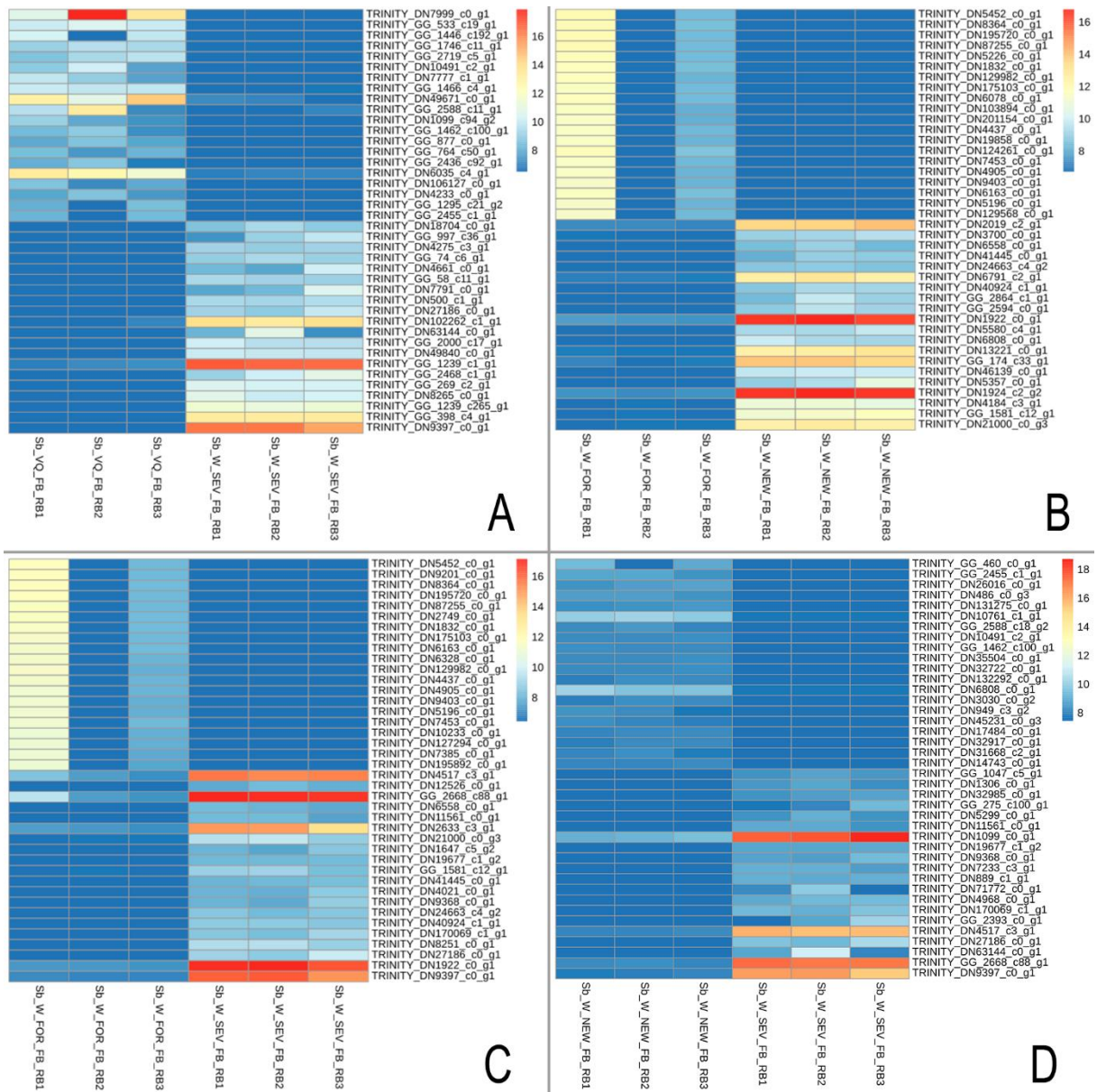


Figura S4. Heatmaps de genes que apresentam as maiores variações no nível de expressão das comparações par a par nas bibliotecas de corpo gorduroso. Cada linha representa um gene, cada coluna representa uma amostra, o número associado a cada amostra são as réplicas biológicas de cada fenótipo. (A) Corpo gorduroso de rainhas recém-emergidas (VQ) *vs* corpo gorduroso de operárias com sete dias (W_SEV). (B) Corpo gorduroso de operárias forrageiras (W_FOR) *vs* corpo gorduroso de operárias recém-emergidas (W_NEW). (C) Corpo gorduroso de W_FOR *vs* corpo gorduroso de W_SEV. (D) Corpo gorduroso de W_NEW *vs* corpo gorduroso de W_SEV.

Tabela S4. Lista de genes referente a Figura S1, A e B.

Fig.S1 ovários de rainha acasaladas vs ovário de rainhas virgens		Fig. S1 B ovários de rainhas acasaladas vs ovários de operárias forrageiras	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
GG_181_c0_g1	.	GG_1563_c2_g1	.
DN7320_c0_g1	.	DN7320_c0_g1	.
DN194779_c0_g1	.	DN3767_c1_g1	.
DN6379_c0_g1	.	DN4442_c0_g1	Heparanase
GG_2851_c0_g1	.	GG_1563_c3_g1	.
GG_1472_c0_g2	.	DN6977_c0_g1	.
DN979_c0_g3	.	DN8434_c0_g1	.
DN5626_c0_g2	tRNA (adenine(37)-N6)-methyltransferase	GG_1472_c0_g2	.
DN4738_c0_g2	.	DN45340_c0_g1	.
GG_648_c9_g1	E3 ubiquitin-protein ligase MARCHF3	DN40051_c0_g1	Transposable element Tcb2 transposase
DN103_c1_g1	.	DN4416_c0_g1	Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B, mitochondrial
GG_780_c1_g1	Cytochrome P450 4C1	DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1
DN19935_c0_g1	.	GG_2079_c25_g1	.
DN1011_c0_g2	Programmed cell death protein 2-like	GG_1102_c3_g1	Elongation of very long chain fatty acids protein AAEL008004
GG_306_c6_g1	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	DN35899_c0_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
DN25316_c0_g1	.	GG_1618_c27_g1	.
DN18641_c0_g1	.	GG_713_c5_g1	Myosin-M heavy chain
DN2374_c0_g1	.	GG_2815_c92_g1	Cytochrome b5 reductase 4
DN554_c0_g2	F-box/LRR-repeat protein 14	DN8251_c0_g1	Senecionine N-oxygenase
DN35899_c0_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3
DN132443_c0_g1	.	GG_2000_c17_g1	Aquaporin AQPae.a
DN40520_c0_g1	Glutathione S-transferase	GG_1057_c18_g4	BMP-binding endothelial regulator protein
DN23887_c0_g1	UDP-glucosyltransferase 2	DN20081_c0_g1	Cytochrome P450 9e2
GG_1852_c4_g1	Dual oxidase maturation factor 1	DN35148_c0_g1	.
GG_2202_c1_g1	.	GG_2143_c24_g1	.
DN1999_c0_g1	Excitatory amino acid transporter 2	GG_2445_c0_g1	.
GG_2667_c102_g1	.	DN21206_c0_g1	.
GG_945_c2_g4	.	DN32274_c0_g1	.
DN3982_c0_g2	.	DN11055_c0_g1	Cytochrome P450 9e2
DN18960_c0_g1	.	DN2710_c0_g3	.
GG_2472_c0_g1	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	DN102085_c0_g1	Inositol oxygenase
GG_2734_c9_g1	.	GG_1689_c26_g1	Peritrophin-1
GG_1643_c2_g1	Peroxidasin	DN2710_c0_g1	.
GG_2143_c24_g1	.	DN8697_c1_g1	Peritrophin-1
GG_2588_c11_g1	Endochitinase	GG_2202_c1_g1	.
DN7553_c0_g1	Alpha-tocopherol transfer protein-like	DN16202_c0_g1	Cytochrome P450 9e2
DN12721_c0_g2	.	DN6340_c0_g1	Peritrophin-1
DN102085_c0_g1	Inositol oxygenase	GG_2225_c13_g5	Cytochrome P450 6B1
DN4000_c0_g1	Kv channel-interacting protein 4	DN5403_c0_g1	.
DN5078_c5_g1	.	DN7233_c3_g1	.

Tabela S5. Lista de genes referente a Figura S1, C e D.

Fig S1. C Ovários de rainhas acasaladas vs ovários operárias recém-emergidas		Fig S1. D Ovários de rainhas acasaladas vs ovários operárias com sete dias	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
GG_2815_c92_g1	Cytochrome b5 reductase 4	DN194779_c0_g1	.
GG_768_c15_g1	Urea transporter 1	DN6977_c0_g1	.
DN194779_c0_g1	.	GG_440_c1_g1	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
DN6379_c0_g1	.	GG_1897_c1_g1	Chromosome-associated kinesin KIF4
GG_1563_c2_g1	.	GG_2719_c5_g1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3
GG_513_c19_g1	WD40 repeat-containing protein SMU1	DN2586_c0_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
DN7320_c0_g1	.	DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1
GG_2851_c0_g1	.	GG_2109_c33_g3	CXXC-type zinc finger protein 1
GG_713_c31_g1	.	DN5502_c0_g1	.
GG_1563_c3_g1	.	GG_1746_c4_g1	ZZ-type zinc finger-containing protein 3
DN8434_c0_g1	.	GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3
DN6977_c0_g1	.	GG_797_c0_g1	General transcription factor 3C polypeptide 6
GG_1472_c0_g2	.	GG_3112_c18_g1	Protein wings apart-like
DN979_c0_g3	.	DN6982_c0_g1	.
GG_1658_c11_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	GG_2785_c3_g1	.
DN45340_c0_g1	.	GG_896_c4_g1	.
GG_780_c1_g1	Cytochrome P450 4C1	GG_907_c6_g1	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50-C
DN4416_c0_g1	Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B, mitochondrial	GG_2491_c1_g1	Zinc finger protein 687
DN4659_c0_g1	.	DN1647_c5_g2	.
DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1	DN8197_c0_g2	.
GG_2472_c0_g1	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	DN46591_c0_g1	60S ribosomal protein L11
DN12721_c0_g2	.	DN21621_c0_g2	Putative uncharacterized protein YLR154W-B
GG_945_c2_g4	.	DN17702_c0_g1	.
DN23887_c0_g1	UDP-glucosyltransferase 2 {ECO:0000303 PubMed:29215010}	GG_2202_c1_g1	.
GG_2587_c17_g7	.	DN10766_c2_g1	.
GG_2347_c9_g1	.	GG_472_c22_g1	.
GG_823_c0_g1	Glycerol-3-phosphate phosphatase {ECO:0000305};	DN27408_c0_g1	L-lactate dehydrogenase {ECO:0000312 FlyBase:FBgn0001258}
DN21621_c0_g2	Putative uncharacterized protein YLR154W-B	DN31897_c0_g2	Probable 39S ribosomal protein L49, mitochondrial
GG_2445_c0_g1	.	GG_1332_c4_g1	T-complex protein 1 subunit theta
GG_1689_c20_g1	Chondroitin proteoglycan 2	GG_58_c11_g1	Histone deacetylase complex subunit SAP18
DN5078_c5_g1	.	DN3575_c0_g6	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1
GG_58_c11_g1	Histone deacetylase complex subunit SAP18	DN49840_c0_g1	60S ribosomal protein L17
GG_2202_c1_g1	.	DN102085_c0_g1	Inositol oxygenase
DN21206_c0_g1	.	GG_1689_c26_g1	Peritrophin-1
DN4661_c0_g1	.	GG_2227_c16_g1	Transmembrane 9 superfamily member 3
DN102085_c0_g1	Inositol oxygenase	DN8697_c1_g1	Peritrophin-1
DN49840_c0_g1	60S ribosomal protein L17	DN21206_c0_g1	.
GG_1689_c26_g1	Peritrophin-1	DN35148_c0_g1	.
DN8697_c1_g1	Peritrophin-1	DN6340_c0_g1	Peritrophin-1
DN6340_c0_g1	Peritrophin-1	GG_2445_c0_g1	.

Tabela S6. Lista de genes referente a Figura S1, E e F.

Fig S1. E Ovários de rainhas virgens vs ovários de operárias forrageiras		Fig S1. F Ovários de rainhas virgens vs ovários de operárias recém-emergidas	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1	DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1
DN6977_c0_g1	.	DN6977_c0_g1	.
DN5073_c4_g1	Potassium channel subfamily K member 18	GG_513_c19_g1	WD40 repeat-containing protein SMU1
GG_1508_c35_g2	Arylphorin subunit alpha	DN4517_c3_g1	.
DN6982_c0_g1	.	DN6982_c0_g1	.
GG_2464_c5_g1	Protein SPT2 homolog	GG_2668_c88_g1	.
DN4517_c3_g1	.	DN4416_c0_g1	Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B, mitochondrial
DN5078_c5_g1	.	GG_810_c10_g2	.
GG_1028_c1_g1	.	GG_3089_c31_g1	.
GG_927_c1_g1	Probable bifunctional dTTP/UTP pyrophosphatase/methyltransferase protein {ECO:0000305}	DN8197_c0_g2	.
DN4416_c0_g1	Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B, mitochondrial	GG_63_c11_g1	Tyrosine decarboxylase {ECO:0000312 WormBase:K01C8.3b}
DN15992_c1_g1	.	DN199_c0_g1	40S ribosomal protein S20
GG_1658_c25_g1	.	DN197_c4_g1	Cathepsin L
GG_3089_c31_g1	.	GG_1857_c14_g1	.
DN8197_c0_g2	.	GG_2254_c0_g1	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP
GG_63_c11_g1	Tyrosine decarboxylase {ECO:0000312 WormBase:K01C8.3b}	DN105927_c0_g1	.
GG_2668_c88_g1	.	DN8429_c0_g1	.
DN199_c0_g1	40S ribosomal protein S20	DN104453_c0_g1	.
GG_1643_c2_g1	Peroxidase	DN205226_c0_g1	.
GG_2199_c3_g1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	DN13133_c0_g1	Trypsin, alkaline C
GG_398_c4_g1	Elongation of very long chain fatty acids protein F {ECO:0000250 UniProtKB:Q9VH58}	DN4770_c0_g1	.
DN624_c0_g1	.	DN48656_c0_g1	.
DN15002_c1_g1	Cytochrome P450 6d3	DN6227_c0_g1	Trypsin-1
DN1130_c1_g1	.	DN46970_c0_g1	Heat shock protein HSP 90-beta
DN46985_c0_g1	ATP synthase F(0) complex subunit C2, mitochondrial {ECO:0000305}	DN8866_c0_g1	Protein G12
DN1268_c1_g1	.	GG_2230_c52_g1	Collagen alpha-4(IV) chain
DN2624_c3_g1	Sodium bicarbonate cotransporter 3	GG_1565_c88_g2	.
DN26934_c0_g1	Ferritin subunit	GG_306_c6_g1	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52
DN17420_c0_g1	Glycine N-methyltransferase	DN4108_c0_g4	Peritrophin-1
DN8232_c0_g1	.	DN6340_c0_g1	Peritrophin-1
GG_1565_c88_g2	.	GG_1689_c20_g1	Chondroitin proteoglycan 2
DN18559_c0_g1	Myosin light chain kinase, smooth muscle	DN4764_c0_g3	.
DN20081_c0_g1	Cytochrome P450 9e2	DN4738_c0_g2	.
GG_269_c2_g1	Protein NipSnap	DN8697_c1_g1	Peritrophin-1
DN32274_c0_g1	.	DN3747_c5_g1	Trypsin-1
DN146925_c0_g1	Icarapin	GG_823_c0_g1	Glycerol-3-phosphate phosphatase {ECO:0000305}
DN11055_c0_g1	Cytochrome P450 9e2	GG_2859_c11_g1	.
DN2710_c0_g3	.	GG_58_c11_g1	Histone deacetylase complex subunit SAP18
DN16202_c0_g1	Cytochrome P450 9e2	DN4661_c0_g1	.
DN7233_c3_g1	.	GG_269_c2_g1	Protein NipSnap

Tabela S7. Lista de genes referente a Figura S2, A e B.

Fig.S2 A Ovários de rainhas virgens vs ovários de operárias com sete dias		Fig. S2 B Ovários de operárias forrageiras vs ovários de operárias recém-emergidas	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1	DN16202_c0_g1	Cytochrome P450 9e2
DN6977_c0_g1	.	DN18559_c0_g1	Myosin light chain kinase, smooth muscle
DN4000_c0_g1	Kv channel-interacting protein 4	DN17420_c0_g1	Glycine N-methyltransferase
DN7613_c0_g1	.	DN81499_c0_g1	.
GG_797_c0_g1	General transcription factor 3C polypeptide 6	DN30989_c2_g1	Acyl-CoA Delta(11) desaturase
GG_2719_c5_g1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3	DN2896_c1_g1	E3 UFM1-protein ligase 1 homolog
GG_1633_c22_g1	.	GG_2291_c54_g1	.
DN5078_c5_g1	.	DN22018_c0_g1	Probable cytochrome P450 6a13
GG_2472_c0_g1	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	DN9829_c1_g2	.
DN6982_c0_g1	.	DN16328_c0_g1	.
DN18960_c0_g1	.	DN15106_c0_g1	.
DN3982_c0_g2	.	DN9495_c0_g1	Facilitated trehalose transporter Tret1
GG_2667_c102_g1	.	DN5813_c0_g1	.
GG_2588_c11_g1	Endochitinase	DN13119_c1_g1	Actin, cytoplasmic A4
GG_2785_c3_g1	.	GG_614_c14_g1	.
GG_440_c1_g1	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 {ECO:0000305}	DN7214_c0_g1	.
DN1999_c0_g1	Excitatory amino acid transporter 2	DN4764_c0_g2	.
DN2768_c0_g2	.	DN2161_c0_g1	.
DN2885_c0_g1	Kielin/chordin-like protein	DN10698_c0_g1	Probable cytochrome P450 6a21
GG_2508_c6_g1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 21	DN15249_c1_g1	Collagen alpha-2(IV) chain
GG_1332_c4_g1	.	GG_2472_c0_g1	Protein SPT2 homolog
GG_121_c5_g1	.	DN33272_c0_g2	.
GG_2677_c2_g4	.	GG_2178_c0_g1	.
DN3575_c0_g6	.	DN49671_c0_g1	.
GG_1128_c4_g1	Protein NipSnap	DN131193_c0_g1	Collagen alpha-1(XXVIII) chain
DN15550_c0_g1	ATP synthase F(0) complex subunit C2, mitochondrial {ECO:0000305}	GG_2230_c44_g1	.
GG_2028_c6_g1	.	DN4875_c0_g1	.
DN50370_c0_g1	.	DN33971_c0_g1	.
DN2262_c1_g2	.	GG_275_c191_g1	.
DN5626_c0_g2	.	GG_1645_c168_g1	.
DN979_c0_g3	tRNA (adenine(37)-N6)-methyltransferase	GG_1047_c13_g2	.
DN56037_c0_g1	Protein winged eye	GG_725_c0_g2	.
DN15071_c0_g1	Histone H4	DN14591_c0_g1	.
DN25316_c0_g1	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein	DN986_c2_g4	.
DN46985_c0_g1	Malate dehydrogenase, mitochondrial	GG_795_c46_g1	.
GG_269_c2_g1	.	GG_2230_c20_g1	.
DN4738_c0_g2	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	DN3189_c3_g1	Cytochrome P450 4g15
DN6994_c0_g1	.	GG_1658_c25_g1	.
DN15700_c1_g1	Protein ABHD18 {ECO:0000305}	GG_1028_c1_g1	.
GG_181_c0_g1	T-complex protein 1 subunit theta	GG_2464_c5_g1	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase

Tabela S8. Lista de genes referente a Figura S2, C e D.

Fig. S2 C Ovários de operárias forrageiras vs ovários de operárias com sete dias		Fig. S2 D ovários de operárias recém-emergidas vs ovários de operárias com sete dias	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN2710_c0_g1	.	DN7613_c0_g1	.
DN8232_c0_g1	.	GG_2472_c0_g1	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase
DN1268_c1_g1	.	GG_797_c0_g1	General transcription factor 3C polypeptide 6
DN1130_c1_g1	.	DN4000_c0_g1	Kv channel-interacting protein 4
DN624_c0_g1	.	DN1349_c3_g1	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF2
DN7613_c0_g1	.	DN2501_c0_g4	.
DN48308_c0_g1	.	DN1789_c4_g1	.
DN3822_c0_g1	Acidic amino acid decarboxylase GADL1	GG_1213_c2_g2	.
DN22018_c0_g1	Probable cytochrome P450 6a13	GG_795_c7_g3	Elongator complex protein 4
DN15106_c0_g1	.	DN18960_c0_g1	.
GG_797_c0_g1	General transcription factor 3C polypeptide 6	DN1999_c0_g1	Excitatory amino acid transporter 2
DN59802_c0_g1	Probable cytochrome P450 6a14	GG_2716_c41_g1	.
GG_2143_c24_g1	.	DN3982_c0_g2	.
DN5813_c0_g1	.	DN68155_c0_g1	.
DN13119_c1_g1	Actin, cytoplasmic A4	GG_1633_c22_g1	.
GG_614_c14_g1	.	GG_2667_c102_g1	.
DN7214_c0_g1	.	GG_2508_c6_g1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 21
DN11954_c0_g1	Trypsin-1	DN25039_c0_g2	Troponin I
DN2161_c0_g1	.	DN5331_c2_g2	.
DN2710_c0_g2	.	DN2885_c0_g1	Kielin/chordin-like protein
GG_713_c31_g1	Histone H4	DN45178_c0_g1	Cytochrome b5 reductase 4
DN33265_c0_g1	.	GG_2851_c0_g1	.
DN40051_c0_g1	.	DN45340_c0_g1	.
GG_1618_c27_g1	.	GG_181_c0_g1	Histone H4
GG_2815_c92_g1	.	DN15071_c0_g1	.
DN15700_c1_g1	.	GG_2079_c26_g8	.
GG_2079_c25_g1	.	DN15700_c1_g1	.
DN15071_c0_g1	.	GG_1658_c11_g1	.
DN8251_c0_g1	.	DN8434_c0_g1	.
DN4577_c0_g1	Heparanase	GG_2815_c25_g1	.
DN4442_c0_g1	.	GG_472_c22_g1	.
DN8434_c0_g1	Senecionine N-oxygenase	GG_1472_c0_g2	.
GG_1563_c2_g1	.	DN6379_c0_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
DN45340_c0_g1	.	GG_1563_c3_g1	.
GG_1472_c0_g2	.	DN16328_c0_g1	.
DN3767_c1_g1	Cytochrome b5 reductase 4	DN6994_c0_g1	.
DN7320_c0_g1	.	DN50370_c0_g1	.
DN6994_c0_g1	Transposable element Tcb2 transposase	DN979_c0_g3	.
GG_1563_c3_g1	.	GG_713_c31_g1	.
DN50370_c0_g1	.	GG_2815_c92_g1	.

Tabela S9. Lista de genes referente a Figura S3, A e B.

Fig. S3 A Corpo gorduroso de rainhas acasaladas vs corpo gorduroso de rainhas virgens		Fig.S3 B Corpo gorduroso de rainhas acasaladas vs corpo gorduroso de operárias forrageiras	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN1099_c0_g1	Vitellogenin	DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1
DN102262_c1_g1	Cytochrome P450 6k1	GG_1446_c192_g1	.
GG_1410_c7_g1	.	GG_2370_c1_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
GG_1239_c1_g1	Cytochrome P450 6k1	DN2586_c0_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
DN62895_c0_g1	Fatty acyl-CoA reductase 1 {ECO:0000250 UniProtKB:Q8WVX9}	DN8251_c0_g1	Senecionine N-oxygenase
GG_2225_c50_g1	Cytochrome P450 6A1	GG_533_c19_g1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial
GG_2137_c0_g1	Homogentisate 1,2-dioxygenase	GG_2594_c0_g1	Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS
GG_2468_c1_g1	Tolloid-like protein	DN5357_c0_g1	.
GG_780_c46_g2	.	DN11370_c0_g1	Lysosomal acid glucosylceramidase {ECO:0000305}
DN7981_c0_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	DN1099_c0_g1	Vitellogenin
DN2586_c0_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	GG_2815_c26_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
DN2655_c3_g1	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-3	GG_2668_c1_g1	.
GG_1238_c79_g1	.	DN2243_c15_g1	Cytochrome P450 6A1
GG_1333_c2_g1	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	DN4416_c0_g1	Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B, mitochondrial
GG_2118_c15_g1	APC/C activator protein CDH1	GG_789_c2_g2	.
GG_74_c6_g1	Neprilysin-1 {ECO:0000303 PubMed:24395329}	GG_1238_c79_g1	.
GG_997_c36_g1	.	DN2004_c2_g1	.
DN22839_c0_g3	Cytochrome P450 6j1	GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3
DN5622_c0_g2	.	GG_2225_c33_g1	Probable cytochrome P450 6a14
GG_1239_c265_g1	.	DN15715_c0_g1	Protein obstructor-E {ECO:0000303 PubMed:28076349}
DN5492_c0_g1	.	DN2951_c3_g1	60S ribosomal protein L35
DN10491_c2_g1	.	DN16320_c0_g1	40S ribosomal protein S25
DN1922_c0_g1	.	DN195892_c0_g1	40S ribosomal protein S10b
DN42770_c0_g1	Fatty acyl-CoA reductase wat {ECO:0000305}	DN201154_c0_g1	40S ribosomal protein S26
GG_2819_c4_g1	MFS-type transporter SLC18B1	DN146771_c0_g1	60S acidic ribosomal protein P1
DN1670_c0_g1	.	DN7385_c0_g1	40S ribosomal protein S24
DN2018_c0_g1	.	DN19858_c0_g1	60S ribosomal protein L30
DN2435_c1_g1	.	DN103894_c0_g1	40S ribosomal protein S2
DN1652_c1_g4	.	DN6328_c0_g1	Probable 60S ribosomal protein L37-A
GG_2362_c3_g1	.	DN175103_c0_g1	60S ribosomal protein L7
DN29076_c0_g1	.	DN6078_c0_g1	60S ribosomal protein L10
DN4280_c0_g2	Putative fatty acyl-CoA reductase CG8306 {ECO:0000250 UniProtKB:Q8WVX9, ECO:0000312 EMBL:AAF57977.2}	DN129982_c0_g1	60S ribosomal protein L23a
DN2765_c1_g1	.	DN124261_c0_g1	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
DN21000_c0_g3	.	DN9201_c0_g1	60S ribosomal protein L24
DN1159_c2_g1	.	DN5226_c0_g1	60S ribosomal protein L3
DN265_c8_g1	.	DN2749_c0_g1	40S ribosomal protein S13
GG_2594_c6_g2	.	DN195720_c0_g1	40S ribosomal protein S8
DN13221_c0_g1	.	DN87255_c0_g1	40S ribosomal protein S11
DN5580_c4_g1	.	DN8364_c0_g1	.
DN771_c0_g1	Ras-like GTP-binding protein RhoL	DN5452_c0_g1	.

Tabela S10. Lista de genes referente a Figura S3, C e D.

Fig. S3 C Corpo gorduroso de rainhas acasaladas vs corpo gorduroso de operárias recém-emergidas		Fig. S3 D Corpo gorduroso de rainhas acasaladas vs corpo gorduroso de operárias com sete dias	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1	DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1
DN2243_c15_g1	Cytochrome P450 6A1	GG_1446_c192_g1	.
DN2586_c0_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	GG_2815_c26_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
GG_1446_c192_g1	.	GG_1472_c0_g2	.
DN22018_c0_g1	Probable cytochrome P450 6a13	GG_2719_c5_g1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3
GG_2815_c26_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	GG_2370_c1_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
DN1099_c0_g1	Vitellogenin	DN2586_c0_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
GG_1410_c7_g1	.	GG_1211_c0_g1	.
GG_2815_c26_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	GG_533_c19_g1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial
DN63144_c1_g1	Cytochrome P450 6B6	GG_2815_c26_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
GG_1472_c0_g2	.	DN11370_c0_g1	Lysosomal acid glucosylceramidase {ECO:0000305}
GG_2719_c5_g1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3	GG_2225_c33_g1	Probable cytochrome P450 6a14
DN7981_c0_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	DN1652_c1_g1	Putative fatty acyl-CoA reductase CG5065 {ECO:0000250 UniProtKB:Q8WVX9, ECO:0000312 EMBL:AAF57974.1}
DN2586_c0_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	DN4416_c0_g1	Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B, mitochondrial
GG_1211_c0_g1	.	GG_789_c2_g2	.
DN62895_c0_g1	Fatty acyl-CoA reductase 1 {ECO:0000250 UniProtKB:Q8WVX9}	GG_1238_c79_g1	.
DN5622_c0_g2	.	GG_2668_c1_g1	.
DN4517_c3_g1	.	DN21745_c0_g1	.
GG_2436_c7_g1	Cytochrome P450 6B1	DN2243_c15_g1	Cytochrome P450 6A1
GG_2668_c88_g1	.	GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3
DN9873_c0_g1	Putative fatty acyl-CoA reductase CG8306 {ECO:0000250 UniProtKB:Q8WVX9, ECO:0000312 EMBL:AAF57977.2}	GG_58_c11_g1	.
DN2765_c1_g1	.	DN27186_c0_g1	.
DN46139_c0_g1	Fatty acyl-CoA reductase wat {ECO:0000305}	DN5492_c0_g1	Putative fatty acyl-CoA reductase CG8306 {ECO:0000250 UniProtKB:Q8WVX9, ECO:0000312 EMBL:AAF57977.2}
GG_2099_c15_g1	.	GG_546_c5_g1	Fatty acyl-CoA reductase wat {ECO:0000305}
DN13221_c0_g1	.	GG_823_c0_g1	.
GG_2587_c17_g7	.	DN13142_c0_g3	Heat shock cognate 71 kDa protein
GG_269_c2_g1	.	DN63144_c0_g1	Thioredoxin reductase-like selenoprotein T homolog CG3887 {ECO:0000305}
DN49840_c0_g1	.	GG_2587_c17_g7	Lysyl oxidase homolog 3 {ECO:0000305}
GG_590_c33_g1	Heat shock cognate 71 kDa protein	DN2018_c0_g1	Protein NipSnap
DN1924_c2_g2	.	DN49840_c0_g1	.
DN29076_c0_g1	Pupal cuticle protein	DN29076_c0_g1	60S ribosomal protein L17
DN1777_c6_g1	Thioredoxin reductase-like selenoprotein T homolog CG3887 {ECO:0000305}	GG_269_c2_g1	.
DN4280_c0_g2	60S ribosomal protein L17	GG_2099_c15_g1	.
DN1159_c2_g1	Protein NipSnap	GG_590_c33_g1	Cytochrome P450 6a8
DN2018_c0_g1	.	DN1777_c6_g1	2-acylglycerol O-acyltransferase 2 {ECO:0000305}
DN1922_c0_g1	.	DN1922_c0_g1	Glycerol-3-phosphate phosphatase {ECO:0000305}
DN21000_c0_g3	Lysyl oxidase homolog 3 {ECO:0000305}	GG_2594_c6_g2	.
GG_2594_c6_g2	.	DN1652_c1_g4	Ras-like GTP-binding protein RhoL
DN771_c0_g1	.	GG_2526_c0_g1	.
DN1652_c1_g4	.	DN9397_c0_g1	Histone deacetylase complex subunit SAP18

Tabela S11. Lista de genes referente a Figura S3, E e F.

Fig. S3 E Corpo gorduroso de rainhas virgens vs corpo gorduroso de operárias forrageiras		Fig. S3 F Corpo gorduroso de rainhas virgens vs corpo gorduroso de operárias recém-emergidas	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1;	DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1;
DN5357_c0_g1	.	DN2243_c15_g1	Cytochrome P450 6A1;
GG_1581_c12_g1	.	DN4517_c3_g1	.
DN5580_c4_g1	.	GG_2668_c88_g1	.
DN8251_c0_g1	Senecionine N-oxygenase;	DN49671_c0_g1	Cytochrome P450 4g15;
DN6808_c0_g1	Sialin;	GG_1446_c192_g1	.
GG_533_c19_g1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial;	GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3;
DN13221_c0_g1	.	GG_2719_c5_g1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3;
GG_1446_c192_g1	.	GG_1424_c12_g1	.
GG_2362_c3_g1	.	DN63144_c1_g1	Cytochrome P450 6B6;
GG_2594_c0_g1	Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS;	GG_2815_c26_g3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone];
DN21000_c0_g3	.	DN19677_c1_g2	.
GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3;	DN5299_c0_g1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1-interacting protein;
DN2004_c2_g1	.	GG_2079_c18_g5	.
DN4517_c3_g1	.	DN2007_c6_g1	.
DN1647_c5_g2	.	GG_877_c0_g1	.
DN2019_c2_g1	Chitin deacetylase 1 {ECO:0000303 PubMed:30755482};	GG_2716_c12_g2	.
DN3700_c0_g1	.	DN605_c4_g1	.
DN30256_c0_g1	.	GG_2436_c92_g1	.
DN1924_c2_g2	Pupal cuticle protein;	DN106127_c0_g1	Dynein axonemal heavy chain 10;
DN5196_c0_g1	60S ribosomal protein L35;	GG_1649_c70_g1	.
DN129568_c0_g1	60S ribosomal protein L30;	DN22839_c0_g3	60S ribosomal protein L17;
DN103894_c0_g1	40S ribosomal protein S10b;	GG_3081_c9_g1	Cytochrome P450 6k1;
DN9403_c0_g1	40S ribosomal protein S2;	DN69393_c0_g1	Protein NipSnap;
DN4905_c0_g1	60S acidic ribosomal protein P2;	DN5136_c5_g2	Elongation of very long chain fatty acids protein F {ECO:0000250 UniProtKB:Q9VH58};
DN7453_c0_g1	Elongation factor 1-alpha;	DN3421_c0_g6	.
DN4437_c0_g1	Probable 60S ribosomal protein L37-A;	DN2320_c0_g1	Histone deacetylase complex subunit SAP18;
DN201154_c0_g1	60S ribosomal protein L7;	DN2676_c0_g1	Elongation of very long chain fatty acids protein 6 {ECO:0000303 PubMed:26214738};
DN19858_c0_g1	60S ribosomal protein L10;	GG_460_c0_g1	.
DN6328_c0_g1	40S ribosomal protein S23;	GG_2757_c0_g1	28S ribosomal protein S30, mitochondrial;
DN6163_c0_g1	60S ribosomal protein L23a;	GG_510_c2_g1	Pancreatic triacylglycerol lipase {ECO:0000305};
DN175103_c0_g1	60S ribosomal protein L24;	GG_2864_c1_g1	.
DN6078_c0_g1	40S ribosomal protein S8;	DN8265_c0_g1	ER membrane protein complex subunit 4;
DN129982_c0_g1	40S ribosomal protein S3a {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03122};	GG_58_c11_g1	.
DN2290_c0_g1	40S ribosomal protein SA {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03015};	DN500_c1_g1	Laccase-1;
DN1832_c0_g1	60S ribosomal protein L23;	GG_398_c4_g1	.
DN124261_c0_g1	40S ribosomal protein S9;	GG_269_c2_g1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone];
DN87255_c0_g1	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40;	GG_1239_c1_g1	RNA-binding protein 42;
DN9201_c0_g1	60S ribosomal protein L26;	DN49840_c0_g1	Cytochrome P450 6j1;
DN5452_c0_g1	40S ribosomal protein S7;	GG_1239_c265_g1	Netrin-A;

Tabela S12. Lista de genes referente a Figura S4, A e B.

Fig S4. A Corpo gorduroso de rainhas virgens vs corpo gorduroso de operárias com sete dias		Fig. S4. B Corpo gorduroso de operárias forrageiras vs corpo gorduroso de operárias recém-emergidas	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN7999_c0_g1	Multidrug resistance protein pgp-1;	DN5452_c0_g1	60S ribosomal protein L35;
GG_533_c19_g1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial;	DN8364_c0_g1	40S ribosomal protein S25;
GG_1446_c192_g1	.	DN195720_c0_g1	40S ribosomal protein S26;
GG_1746_c11_g1	Bestrophin-3;	DN87255_c0_g1	40S ribosomal protein S10b;
GG_2719_c5_g1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3;	DN5226_c0_g1	40S ribosomal protein S24;
DN10491_c2_g1	.	DN1832_c0_g1	60S acidic ribosomal protein P2;
DN7777_c1_g1	.	DN129982_c0_g1	Probable 60S ribosomal protein L37-A;
GG_1466_c4_g1	VW domain-containing oxidoreductase;	DN175103_c0_g1	60S ribosomal protein L10;
DN49671_c0_g1	Cytochrome P450 4g15;	DN6078_c0_g1	60S ribosomal protein L7;
GG_2588_c11_g1	Endochitinase;	DN103894_c0_g1	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40;
DN1099_c94_g2	.	DN201154_c0_g1	40S ribosomal protein S8;
GG_1462_c100_g1	.	DN4437_c0_g1	40S ribosomal protein S3a {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03122};
GG_877_c0_g1	.	DN19858_c0_g1	60S ribosomal protein L24;
GG_764_c50_g1	.	DN124261_c0_g1	40S ribosomal protein S2;
GG_2436_c92_g1	.	DN7453_c0_g1	40S ribosomal protein SA {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03015};
DN6035_c4_g1	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-8;	DN4905_c0_g1	60S ribosomal protein L23;
DN106127_c0_g1	Dynein axonemal heavy chain 10;	DN9403_c0_g1	40S ribosomal protein S9;
DN4233_c0_g1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3;	DN6163_c0_g1	40S ribosomal protein S23;
GG_1295_c21_g2	Actin, muscle;	DN5196_c0_g1	40S ribosomal protein S7;
GG_2455_c1_g1	tRNA dimethylalyltransferase;	DN129568_c0_g1	60S ribosomal protein L26;
DN18704_c0_g1	.	DN2019_c2_g1	.
GG_997_c36_g1	Elongation of very long chain fatty acids protein F {ECO:0000250 UniProtKB:Q9VH58};	DN3700_c0_g1	.
DN4275_c3_g1	.	DN6558_c0_g1	Cuticle protein 6;
GG_74_c6_g1	Elongation of very long chain fatty acids protein 6 {ECO:0000303 PubMed:26214738};	DN41445_c0_g1	Pupal cuticle protein;
DN4661_c0_g1	Protein NipSnap;	DN24663_c4_g2	.
GG_58_c11_g1	Tolloid-like protein;	DN6791_c2_g1	.
DN7791_c0_g1	Cytochrome P450 6k1;	DN40924_c1_g1	.
DN500_c1_g1	60S ribosomal protein L17;	GG_2864_c1_g1	.
DN27186_c0_g1	Aquaporin AQP Ae.a;	GG_2594_c0_g1	Sialin;
DN102262_c1_g1	Cytochrome P450 6a8;	DN1922_c0_g1	.
DN63144_c0_g1	Cytochrome P450 6k1;	DN5580_c4_g1	.
GG_2000_c17_g1	.	DN6808_c0_g1	Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS;
DN49840_c0_g1	.	DN13221_c0_g1	.
GG_1239_c1_g1	.	GG_174_c33_g1	.
GG_2468_c1_g1	Histone deacetylase complex subunit SAP18;	DN46139_c0_g1	.
GG_269_c2_g1	.	DN5357_c0_g1	.
DN8265_c0_g1	Nepriylisin-1 {ECO:0000303 PubMed:24395329};	DN1924_c2_g2	.
GG_1239_c265_g1	Cytochrome P450 9e2;	DN4184_c3_g1	.
GG_398_c4_g1	.	GG_1581_c12_g1	.
DN9397_c0_g1	.	DN21000_c0_g3	Chitin deacetylase 1 {ECO:0000303 PubMed:30755482};

Tabela S13. Lista de genes referente a Figura S4, C e D.

Fig. S4 C Corpo gorduroso de operárias forrageiras vs corpo gorduroso de operárias com sete dias		Fig. S4 D Corpo gorduroso de operárias recém-emergidas vs corpo gorduroso de operárias com sete dias	
Gene	Descrição Swiss-Prot	Gene	Descrição Swiss-Prot
DN5452_c0_g1	60S ribosomal protein L35;	GG_460_c0_g1	.
DN9201_c0_g1	60S ribosomal protein L30;	GG_2455_c1_g1	tRNA dimethylallyltransferase;
DN8364_c0_g1	40S ribosomal protein S25;	DN26016_c0_g1	Elongation of very long chain fatty acids protein 6 {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03206, ECO:0000305};
DN195720_c0_g1	40S ribosomal protein S26;	DN486_c0_g3	.
DN87255_c0_g1	40S ribosomal protein S10b;	DN131275_c0_g1	.
DN2749_c0_g1	60S acidic ribosomal protein P1;	DN10761_c1_g1	.
DN1832_c0_g1	60S acidic ribosomal protein P2;	GG_2588_c18_g2	.
DN175103_c0_g1	60S ribosomal protein L10;	DN10491_c2_g1	.
DN6163_c0_g1	40S ribosomal protein S23;	GG_1462_c100_g1	.
DN6328_c0_g1	60S ribosomal protein L23a;	DN35504_c0_g1	.
DN129982_c0_g1	Probable 60S ribosomal protein L37-A;	DN32722_c0_g1	.
DN4437_c0_g1	40S ribosomal protein S3a {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03122};	DN132292_c0_g1	.
DN4905_c0_g1	60S ribosomal protein L23;	DN6808_c0_g1	Sialin;
DN9403_c0_g1	40S ribosomal protein S9;	DN3030_c0_g2	.
DN5196_c0_g1	40S ribosomal protein S7;	DN949_c3_g2	.
DN7453_c0_g1	40S ribosomal protein SA {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_03015};	DN45231_c0_g3	.
DN10233_c0_g1	60S ribosomal protein L32;	DN17484_c0_g1	.
DN127294_c0_g1	60S ribosomal protein L34;	DN32917_c0_g1	.
DN7385_c0_g1	60S ribosomal protein L3;	DN31668_c2_g1	.
DN195892_c0_g1	40S ribosomal protein S11;	DN14743_c0_g1	.
DN4517_c3_g1	.	GG_1047_c5_g1	.
DN12526_c0_g1	.	DN1306_c0_g1	.
GG_2668_c88_g1	.	DN32985_c0_g1	Cytochrome P450 6a8;
DN6558_c0_g1	Senecionine N-oxygenase;	GG_275_c100_g1	.
DN11561_c0_g1	.	DN5299_c0_g1	.
DN2633_c3_g1	.	DN11561_c0_g1	.
DN21000_c0_g3	.	DN1099_c0_g1	.
DN1647_c5_g2	.	DN19677_c1_g2	.
DN19677_c1_g2	.	DN9368_c0_g1	WW domain-binding protein 2;
GG_1581_c12_g1	.	DN7233_c3_g1	.
DN41445_c0_g1	.	DN889_c1_g1	.
DN4021_c0_g1	.	DN71772_c0_g1	.
DN9368_c0_g1	.	DN4968_c0_g1	.
DN24663_c4_g2	.	DN170069_c1_g1	Vitellogenin;
DN40924_c1_g1	.	GG_2393_c0_g1	.
DN170069_c1_g1	.	DN4517_c3_g1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1-interacting protein;
DN8251_c0_g1	.	DN27186_c0_g1	.
DN27186_c0_g1	.	DN63144_c0_g1	.
DN1922_c0_g1	.	GG_2668_c88_g1	Trafficking protein particle complex subunit 11;
DN9397_c0_g1	.	DN9397_c0_g1	TBC1 domain family member 15;

Tabela S14. Via do hormônio juvenil e gene de resposta a esse hormônio nos ovários de *S. bipunctata*. Apenas valores $\log_2FC < -1,0$ ou $>1,0$ e $p_{adj} \leq 0,05$ foram considerados altamente expressos. Valores negativos de \log_2FC representam genes altamente expressos nas amostras descritas na coluna B.

gene/ID	Amostra A	Amostra B	$\log_2FoldChange$	p_{adj}
mfe/TRINITY_DN829_c0_g1	Sb_MQ_OV	Sb_VQ_OV	-2,638	0,007281
	Sb_MQ_OV	Sb_W_FOR_OV	0,665	0,260128
	Sb_MQ_OV	Sb_W_NEW_OV	-0,569	0,262502
	Sb_MQ_OV	Sb_W_SEV_OV	0,299	0,688031
	Sb_VQ_OV	Sb_W_FOR_OV	3,297	0,000498
	Sb_VQ_OV	Sb_W_NEW_OV	2,011	0,040722
	Sb_VQ_OV	Sb_W_SEV_OV	2,786	0,002139
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_NEW_OV	-1,246	0,000661
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_SEV_OV	-0,510	0,283246
	Sb_W_NEW_OV	Sb_W_SEV_OV	0,732	0,042067
jhamt/TRINITY_DN904_c5_g1	Sb_MQ_OV	Sb_VQ_OV	-3,829	0,058544
	Sb_MQ_OV	Sb_W_FOR_OV	-3,750	0,006686
	Sb_MQ_OV	Sb_W_NEW_OV	-6,164	2,23E-16
	Sb_MQ_OV	Sb_W_SEV_OV	-3,093	0,069749
	Sb_VQ_OV	Sb_W_FOR_OV	0,058	0,980057
	Sb_VQ_OV	Sb_W_NEW_OV	-2,380	0,059658
	Sb_VQ_OV	Sb_W_SEV_OV	0,514	0,773924
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_NEW_OV	-2,383	0,000126
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_SEV_OV	0,449	0,711686
	Sb_W_NEW_OV	Sb_W_SEV_OV	2,861	4,69E-06
jhe/TRINITY_DN5451_c0_g1	Sb_MQ_OV	Sb_VQ_OV	-3,205	0,003346
	Sb_MQ_OV	Sb_W_FOR_OV	-5,436	5,87E-11
	Sb_MQ_OV	Sb_W_NEW_OV	-4,000	2,71E-11
	Sb_MQ_OV	Sb_W_SEV_OV	-0,118	0,925332
	Sb_VQ_OV	Sb_W_FOR_OV	-2,229	0,084932
	Sb_VQ_OV	Sb_W_NEW_OV	-0,798	0,567444
	Sb_VQ_OV	Sb_W_SEV_OV	2,962	0,005367
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_NEW_OV	1,443	0,148006
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_SEV_OV	5,195	6,46E-10
	Sb_W_NEW_OV	Sb_W_SEV_OV	3,732	5,87E-10
jheh/TRINITY_DN1693_c0_g1	Sb_MQ_OV	Sb_VQ_OV	0,046	0,929986
	Sb_MQ_OV	Sb_W_FOR_OV	0,456	0,11319
	Sb_MQ_OV	Sb_W_NEW_OV	0,071	0,830716
	Sb_MQ_OV	Sb_W_SEV_OV	-0,339	0,456818
	Sb_VQ_OV	Sb_W_FOR_OV	0,418	0,294342
	Sb_VQ_OV	Sb_W_NEW_OV	0,003	0,99501
	Sb_VQ_OV	Sb_W_SEV_OV	-0,535	0,295697
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_NEW_OV	-0,389	0,168391
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_SEV_OV	-0,952	0,008222
	Sb_W_NEW_OV	Sb_W_SEV_OV	-0,564	0,138879
DMRT A2/TRINITY_GG_2719_c17_g1	Sb_MQ_OV	Sb_VQ_OV	2,809	5,66E-06
	Sb_MQ_OV	Sb_W_FOR_OV	2,044	0,000665
	Sb_MQ_OV	Sb_W_NEW_OV	2,110	4,82E-18
	Sb_MQ_OV	Sb_W_SEV_OV	0,608	0,075018
	Sb_VQ_OV	Sb_W_FOR_OV	-0,770	0,46687
	Sb_VQ_OV	Sb_W_NEW_OV	-0,744	0,32628
	Sb_VQ_OV	Sb_W_SEV_OV	-2,344	0,000239
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_NEW_OV	0,069	0,943048
	Sb_W_FOR_OV	Sb_W_SEV_OV	-1,561	0,016464
	Sb_W_NEW_OV	Sb_W_SEV_OV	-1,643	6,88E-15

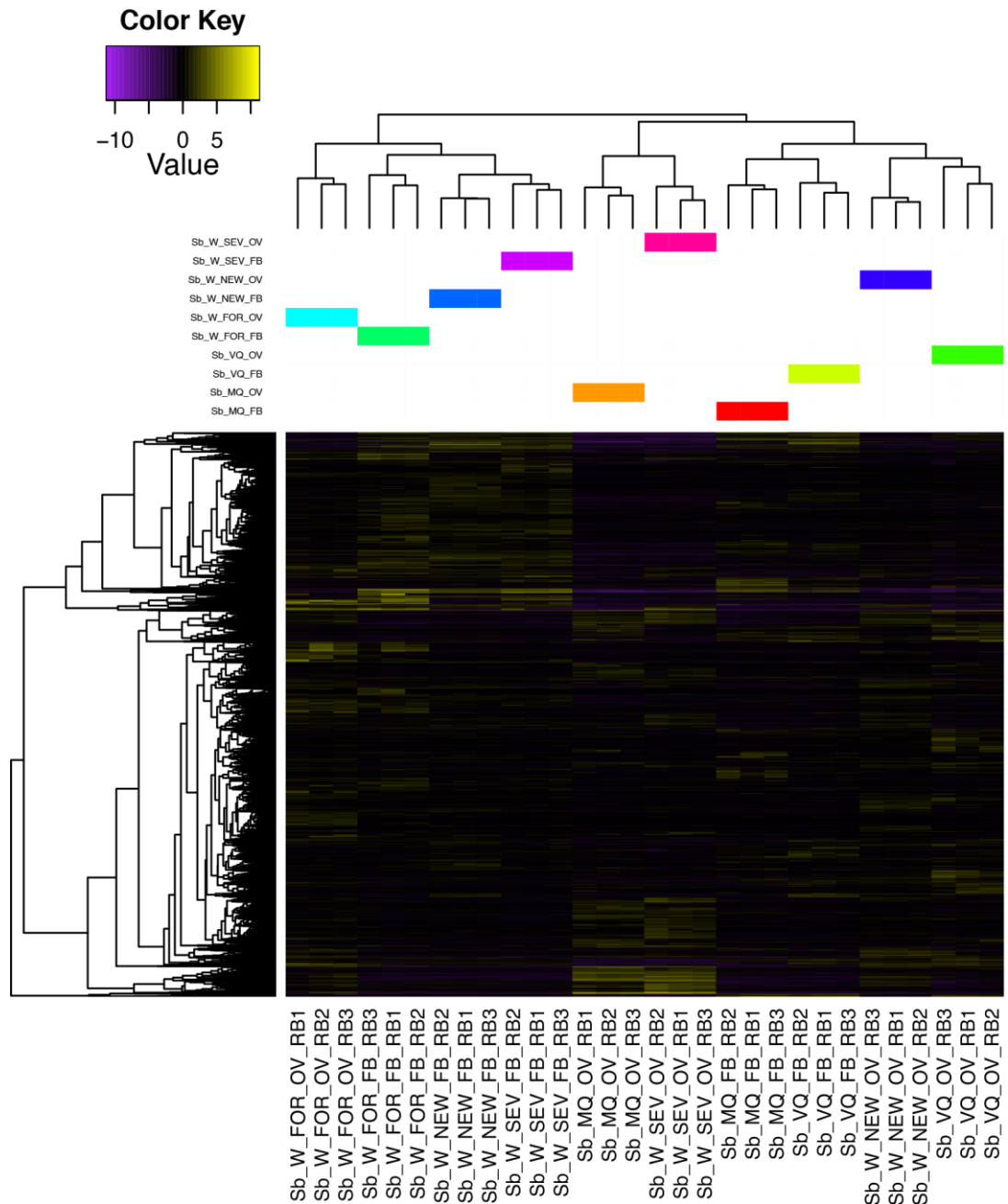


Figura S5. Clusterização entre transcritos e amostras de ovário (OV) e corpo gorduroso (FB) de rainhas e operárias da espécie *S. bipunctata* em diferentes fases do desenvolvimento adulto, considerando um valor de $p = 0,05$. O *heatmap* mostra níveis relativos de expressão de cada transcrito (linhas) em cada amostra (coluna). A informação referente aos transcritos foi omitida da imagem devido ao grande número dados. (W_SEV_OV) ovário de operária com sete dias, (W_SEV_FB) corpo gorduroso de operária com sete dias, (W_NEW_OV) ovário de operária recém-emergida, (W_NEW_FB) corpo gorduroso de operária recém-emergida, (W_FOR_OV) ovário de operárias forrageiras, (W_FOR_FB) corpo gorduroso de operária forrageira, (VQ_OV) ovário de rainha virgem, (VQ_FB) corpo gorduroso de rainha virgem, (MQ_OV) ovário de rainha acasalada, (MQ_FB) corpo gorduroso de rainha acasalada. Os números associados a cada sigla referem-se aos números de réplicas biológicas que foram sequenciadas para cada fenótipo. A escala de valores de expressão está em \log_2 .



ELSEVIER



Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae)

Danielle Luna-Lucena¹, Franciene Rabico¹ and Zilá LP Simoes^{1,2}

Eusocial lifestyle is one of the most important transitions in the evolutionary history of some groups of organisms. In bees, there are only two eusocial groups: the honey bees (Apini) and the stingless bees (Meliponini). Despite similarities on the eusocial lifestyles of these taxa, they present profound differences related to caste determination, development, behavior, and reproductive capacity of their members. In most of them the queen has a monopoly on reproduction. However, even though workers are typically sterile, they can contribute to producing haploid eggs that generate males, or trophic eggs, used as an additional nutrition by the queen.

Addresses

¹ Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

² Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding authors: Luna-Lucena, Danielle (dlunalucena@usp.br), Simoes, Zilá LP (zlpismoe@usp.br)

Current Opinion in Insect Science 2018, 31:20–28

This review comes from a themed issue on **Development and regulation**

Edited by **Elisabeth Marchal** and **Maria-Dolors Piulachs**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 2nd July 2018

<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.06.006>

2214-5745/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The way of life of eusocial Hymenoptera presents particularities that are fascinating. For instance, in highly eusocial bees, diploid female young larvae can follow one of two pathways, they might develop into fertile queens or sterile workers depending on the quantity and quality of their diet. One of the most extreme cases of such polyphenism is in the ovaries of female castes of the genus *Apis*. Dissimilarities in the ovary of these species occur during larval development during the fifth instar [1,2]. Differences in diet result in differential levels of juvenile hormone (JH) between castes. Low levels of JH in workers expose the ovaries to strong events of programmed cell death, whereas high levels of JH in

queens protect their ovaries. As a consequence, workers present shorter ovaries with fewer ovarioles (2–12) as compared to the ovaries of queens, which are longer and can have 120–200 ovarioles [3–6], therefore guaranteeing the reproductive monopoly to the queen. However, in some bee societies, differences in the structure of the ovaries are not as pronounced between castes, which occurs in the primitively eusocial Bombini species and in the highly eusocial Meliponini [7–9].

The Meliponini, or stingless bees, form a wide spectrum of eusocial species characterized by a high behavioral, ecological and reproductive diversity [9]. From a reproductive perspective, the stingless bees can be considered a rich source of knowledge that enables us to understand the extraordinary diversity of the eusocial lifestyle they may present. Here we will address the presence of castes and division of the reproductive work in the eusocial species of Apini and Meliponini.

The presence of castes in eusocial bees

The female caste phenotype in eusocial species in Apidae is, in most cases, the result of different nutrition. However, the genus *Melipona* constitutes an exception in which there is also a genetic component. These differences strongly suggest that the system of caste differentiation has probably arisen more than once and independently in groups of eusocial bees [9].

In honeybees, the larva that will become the queen and the other larvae that will become workers are fed with royal jelly until the 3rd larval instar [10]. As of that stage, queens continue to be fed royal jelly whereas workers are fed a mixture of royal jelly, pollen, and honey [11]. This difference in nutrition has consequences for both castes such as more rapid growth, metamorphic moult, and ecdysis in queens than in workers [10]. However, the reproductive capacity is the most critical change. In queens, ovaries maintain their size during larval and pupal phases, protected by high juvenile hormone titers in the hemolymph. As a consequence, queens present long ovaries with 120–200 ovarioles, in addition to a well-developed spermatheca that is capable for storing millions of spermatozoa from multiples matings [5]. Consequences of the low JH titers in workers are expressed as a modification of their whole reproductive system. Between the 4th and 5th larval instars [1,2], workers' ovarioles undergo severe programmed cell death (PCD)

events by apoptosis, which degrades approximately 90% of their ovarioles [4,12**], resulting in only 2–12 remaining ovarioles per ovary [13], a reduced spermatheca, and the development of a functional stinging apparatus. The number of ovarioles in workers can vary both between [14] and within populations [15], and is associated to the paternal genotype [16] and also to several quantitative trait loci [6,15]. The different nutrition of larvae can also alter ecdysteroids titers [3,17], increase TOR activity [18] and activate an insulin signaling pathway in a caste-specific way in the larvae of queens [19].

These hormonal signals generate patterns of caste-specific gene expression, causing epigenetic alterations as in the methylation patterns [20] and a specific activation or inhibition of different families of genes. Recently, analyses of RNA-seq revealed patterns of genes differentially expressed in ovaries of queens and workers in larval stages and in adults, with a higher percentage of genes with metabolic functions in queens. This contrasts with the data generated by several experiments focused on workers where enriched genes are associated to development processes [21,22,23*,24]. Furthermore, microarray analyses revealed the gene expression in the 5th larval instar of workers to be more diverse than in the 4th and 5th instars of queens, although differentially expressed genes are not directly associated to programmed cell death [25**].

The case of stingless bees

The developmental timeframe of *Apis mellifera* is already well-known and studied. The same is not true for species of stingless bees where there is still uncertainty about the delimitation of the developmental stages. What is known is that the process of differentiation into castes in species of stingless bees begins in the final larval stage and extends during the pupal stage, and is regulated by JH and moult phases [17,26]. This differential development results in divergence of reproductive system development, such as reduced ovaries and ducts in workers. Workers develop ovaries that are shorter than those of queens although they have the same number of ovarioles [27], that is, four. This number may vary in the queens [28].

In most species of stingless bees, the determination of castes is trophic, in that the amount of food is the decisive factor. In *Scaptotrigona postica*, cells where the oviposition by the queen will occur receive a massive provision of food deposited by workers. Right after eggs are laid, cells are operculated [29]. Cells that will hold queens are bigger and receive larger amount of food. The effects caused by differences in the quantity of reserves supplied can only be noticed at the end of the larval feeding phase, because when workers' larvae have already stopped feeding, the queen larva keeps feeding. Therefore, differences in hormonal levels between castes are accentuated at the end of the larval phase [30].

At the prepupal stage of *S. postica*, *Melipona quadrifasciata*, and *Frieseomelitta varia*, the process of cell death and reproductive system differentiation in workers and queens are similar, although during adult life they present diverse reproductive behaviors. In general, during the development of the reproductive system in workers of those species, PCD occurs preferentially in germinative cells, in the basal region of the ovary, and in the oviducts, rendering this caste unable to mate [27,31]. In that case, in contrast to what occurs in *A. mellifera*, the queens fertility is not due to a higher number of ovarioles but rather to longer ones [31]. In workers of some species, PCD is so intense in the pupal phase that no functional ovaries remain in the adults, rendering them sterile, like in the case of *F. varia* in which almost all ovarioles undergo cell death [32].

Bees of the genus *Melipona* constitute an exception to the determination of castes in stingless bees. In species of this genus, the size of the rearing cells is the same for queens, workers and drones, and so is the amount of food they contain. Thus, it is possible that there is a genetic component determining queens and workers [33]. For these bees, nutrition appears to perform a secondary role since larvae that ingest a lower amount of food do not become morphological queens [33,34], but instead develop into genetic queens. In a study on the gene *feminizer* (*fem*), [35**] it was shown that in *M. interrupta*, the gene *fem* is not only specifically linked to gender during the embryonic development, but also has caste-specific expression during late larvae development, and is also regulated by JH. Therefore, the gene *fem* is a candidate that could trigger mechanisms in caste differentiation in *Melipona* bees.

Some molecular studies on the caste differentiation in *Melipona*, such as the differential display reverse transcription (DDRT)-PCR, found 14 transcripts differentially expressed in newly emerged adult workers and queens of *M. quadrifasciata* [36]. Regarding these transcripts of *Melipona*, some were identified as genes codifying members of the cytochrome P450 family, myosin, projectin, Sas10 and Rab11, whose products are related to foraging behavior and caste differentiation [36]. Even with increasing knowledge of molecular signatures, they are not yet capable of fully explaining the process of caste determination in these bees.

Reproductive aspects of eusocial bees

Although castes are differently determined in Apini and Meliponini, as described above, the literature reports a common biological event (PCD), as a landmark in caste differentiation [31] and consequently in the reduced reproductive capacity of workers of these different species. In most species of eusocial bees, workers are not permanently sterile as in *F. varia* [32] or subfertile, as in *A. mellifera*. In several species, they can collaborate in the

reproductive process by laying haploid eggs that will produce males (see Table 1), or else by laying unfertilized diploid eggs that will produce females, as in *A. mellifera capensis*, considered one of the exceptions in the genus *Apis* [37].

Honeybees

In workers of *A. mellifera*, both the reduction in the number of ovarioles that are also shortened due to PCD at early development, and the vestigial spermatheca they present limited reproductive activity of the caste [5, [42^{*}], 12^{**}]. Queens that in turn have the reproductive monopoly in that society can lay 1500 or more eggs per day [5]. Furthermore, queens of *A. mellifera* exercise strong influence on the reproduction of workers through a sophisticated control mechanism relying on pheromone (for behavioral restriction see Ratnieks and Visscher [38]). The Queen Mandibular Pheromone (QMP) produced by the queen and released in the colony is interpreted as a restrictive chemical signal able to trigger the programmed cellular death in the ovaries even in adult workers. As a consequence, workers' ovaries present degeneration of the developed or the developing oocytes, resulting in blocked oogenesis in the ovaries, preventing the production of haploid eggs [39, 40^{*}]. However, in an orphaned colony, some workers detect the absence of the queen, activate their ovaries and lay haploid eggs. The result of the queen presence/absence stimulus can be detected both by the morphology of the ovaries [39, 40^{*}], and molecular signatures [41, 42^{*}]. Macedo et al. [42^{*}] analyzed microRNAs involved in the activation of ovaries in queens and workers and observed that miR-306 has its expression increased in workers' ovaries in response to the absence of the queen in the colony. This response occurs few hours after the removal of the queen.

Despite of the control employed by honeybee queens, a small percentage of 5%–10% of workers activate their

ovaries even in the presence of a fertile queen. They are called 'anarchist workers' [43, 44]. The anarchistic phenotype was naturally found in colonies in Australia [43]. Montague and Oldroyd [45] found that males produced by anarchistic workers belonged to a specific subfamily of the colony. These data led the authors to suggest that such behavior has a genetic base. Later, other authors who also investigated the anarchist phenotype reached the same conclusion [46, 47]. As cited by Hartfelder and cols. [48], despite anarchistic workers being an exception in the genus *Apis*, the egg laying behavior in the presence of a queen is present in most species in the group of stingless bees.

Stingless bees

Castes of the group Meliponini do not present accentuated dimorphism in the ovaries as compared to queens and workers of the genus *Apis*. In general, for most of the Meliponini species studied, the number of ovarioles present in each ovary is considerably lower, under four ovarioles per ovary in both castes [8, 49]. However, this trait alone is not a limiting factor [8]. The limited reproductive capacity observed in workers is acquired during pre-imaginal development [31]. The reduced morphology of the reproductive organs and mating inability is typical of the worker caste. Despite the reproductive limitation of the workers, the Meliponini group present a large diversity in reproductive traits as compared to eusocial species of the Apini group. Such differences in the reproductive capacity of stingless bee workers range from species that always activate their ovaries, *S. postica* [50, 51], to species that lost their reproductive capacity and are sterile, *F. varia* [32] and *Duckeola ghilianii* [52] and even to species that reproduce only in the absence of the queen, *Leurotrigona muelleri* [53] and *Friesella schrottkyi* [54].

Table 1

Behavior and reproductive capacity of stingless bees. The different columns indicate from left to right, ovariole numbers present in queen and worker. Type of eggs produced by workers: Reproductive (R) and/trophic (T). Percentage (%) of males produced by workers (WPM); H, high; L, low. Posture of eggs by workers in the presence (P) or absence (A) of the queen. Consulted literature (Ref)

Species	Ovariole numbers Queen/Workers	Type of eggs produced by workers R/T	WPM	Workers posture (P/A)	Ref.
<i>M. quadrifasciata anthidioides</i> (Lepelletier)	4/4	R and T	64.2	P	[8, 28, 63]
<i>M. quadrifasciata anth</i> (Lepelletier)	4/4	R and T	64	P	[28, 63]
<i>M. bicolor</i> (Lepelletier)	4/4	R and T	H	P	[28, 70]
<i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille)	4/4	R and T	13, 42, H	P	[28, 51, 62, 63]
<i>Scaptotrigona aff. depilis</i> (Moure)	4/4	R and T	4–70	P	[71, 78]
<i>Paratrigona subnuda</i> (Moure)	4/4	R and T	64	P	[28, 79]
<i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille)	4/4	?/T	0	P	[28, 80]
<i>Plebeia remota</i> (Holmberg)	4–8/4	R/?	3	P	[28, 63]
<i>Leurotrigona muelleri</i> (Friese)	?	R/?	0	A	[53, 72]
<i>Friesella schrottkyi</i> (Friese)	?	R	L	A	[54, 76]
<i>Trigona cilipes</i> (Fabricius)	?	T	–	P ¹	[77 [*]]
<i>Frieseomelitta varia</i> (Lepelletier)	4/degenerate	–	–	Sterile workers	[32, 27]

P¹ workers of *Trigona cilipes* produce eggs but do not lay them. (?) unknown condition.

In the group of species that always activate their ovaries there are those which effectively produce offspring (see Table 1). Such workers compete with the queen for the production of males and can be considered to be the ‘anarchists’ in the Meliponini group. To date, different types of evidence have led to the belief that stingless bee queens mate with one single male because counts of spermatozoa [55] mating plugs [56], allozyme markers [57] and microsatellites [58]; with some exceptions as microsatellite indicating moult mating [59]. The type of mating might increase offspring variability and has consequences on relationships among colony members.

If we consider mating in these species to be of the monandric type, the kinship relation within the colony favors workers’ individual reproduction. Workers present a greater degree of kinship with their offspring ($r = 0.5$) and nephews ($r = 0.375$) as compared to the kinship shared with their brothers ($r = 0.25$) [60]. In this scenario, it is expected that workers monopolize the production of males, competing for the production of this gender with the queen [58,61]. In fact, there are species in which workers are responsible for up to 100% of males produced in a colony, such as *S. postica* and *Melipona scutellaris* [62–64]. However, some studies show that workers’ maternity is not generalized. Furthermore, even in species in which workers’ reproduction occurs more often, such as *S. postica*, the rate of workers’ male offspring may vary among colonies (see [51,62,63]) and seems to be dependent on whether mating is monandrous or polyandrous. In this situation, the reproduction decision on the part of workers would follow the predictions of kin selection. The other possibility is that even if the kinship is high within the colony it is probable that other factors influence workers’ decision whether to produce their own offspring, such as the direct cost of this individual reproduction to the colony. Reproduction is considered a physiologically and energetically costly process [65,66]. Therefore, the energy spent on reproduction would no longer be directed toward foraging or other type of work, jeopardizing the colony efficiency [67].

Within this context, workers of *M. scutellaris* seem to have a solution to the exploitation of a workforce of closely related individuals. Workers of this species can probably assess the kinship shared with colony individuals and decide to reproduce after the death of a queen with which they shared a high level of kinship. Considered to be true parasites, workers can produce a significant proportion of males after a queen replacement event, putting the cost of reproduction on the shoulders of less related individuals [68].

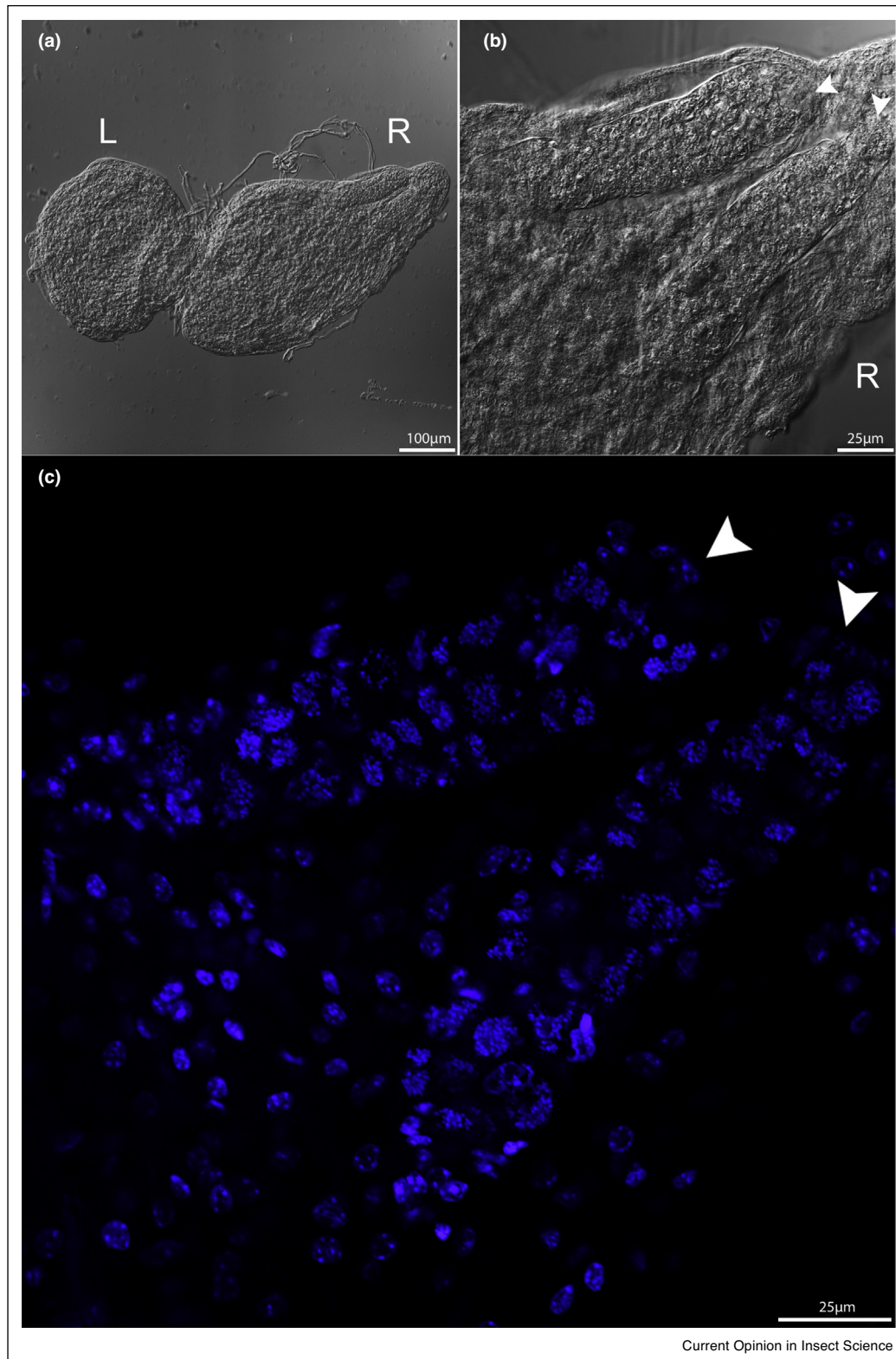
In the group of workers that always activate their ovaries there are still some particularities such as the laying of non-reproductive eggs, the so-called trophic eggs. Such eggs are unviable due to an absence of a nucleus, besides

having a differentiated morphology as compared to reproductive eggs [69–71]. To date there is an agreement as to the role of trophic eggs. This resource represents a rich source of food (protein and lipids) to help the queen sustain a high egg laying rate [72]. Despite the importance trophic eggs can have in such societies, the molecular processes involved in their formation or yet in the plasticity presented by females of these species upon producing trophic and reproductive (viable) eggs are poorly known. Trophic eggs are common in other eusocial species of the order Hymenoptera (e.g. ants [73]) and also occur in non-eusocial insects (e.g. Heteroptera [74]). In ant species, such eggs are produced both by queens and workers [73]. In this group the molecular bases for forming trophic eggs involve two molecules known as maternal determinants — *vasa* and *nanos*. In viable oocytes *vasa* and *nanos* are located at their posterior pole. However, these molecules are not present in the formation of trophic oocytes. In these species, in addition to trophic and reproductive oocytes, there are also oocytes that fail on subsequent stages of development for presenting a deviation in the correct localization pattern of *vasa* and *nanos*. This last type of oocyte is exclusive to the caste of workers and represents a ‘reproductive constraint’ [75*]. To date, there is no report of the occurrence of this type of reproductive constraint in species of Meliponini. For these species only two types of oocytes have been cited in the literature, the trophic and reproductive ones. But the presence of this physiological constraint would partly explain the low percentage of males produced by workers of species in which the queen mates with one male.

In addition to the reproductive behavior of the species described before, we can also consider the species *Leurotrigona muelleri* and *Friesella schrottkyi*, which behaves similarly to workers of the species *Apis mellifera*. In this species, the queen prevents workers’ reproduction via pheromone. If the queen is removed from the colony, workers reestablish reproduction [54,53,76]. A last, intriguing example of workers that activate their ovaries is *Trigona cilipes*. In this species, workers activate their ovaries and although the oocytes produced reach their final developmental stage, they are never laid, even if the queen is removed from the colony [77*].

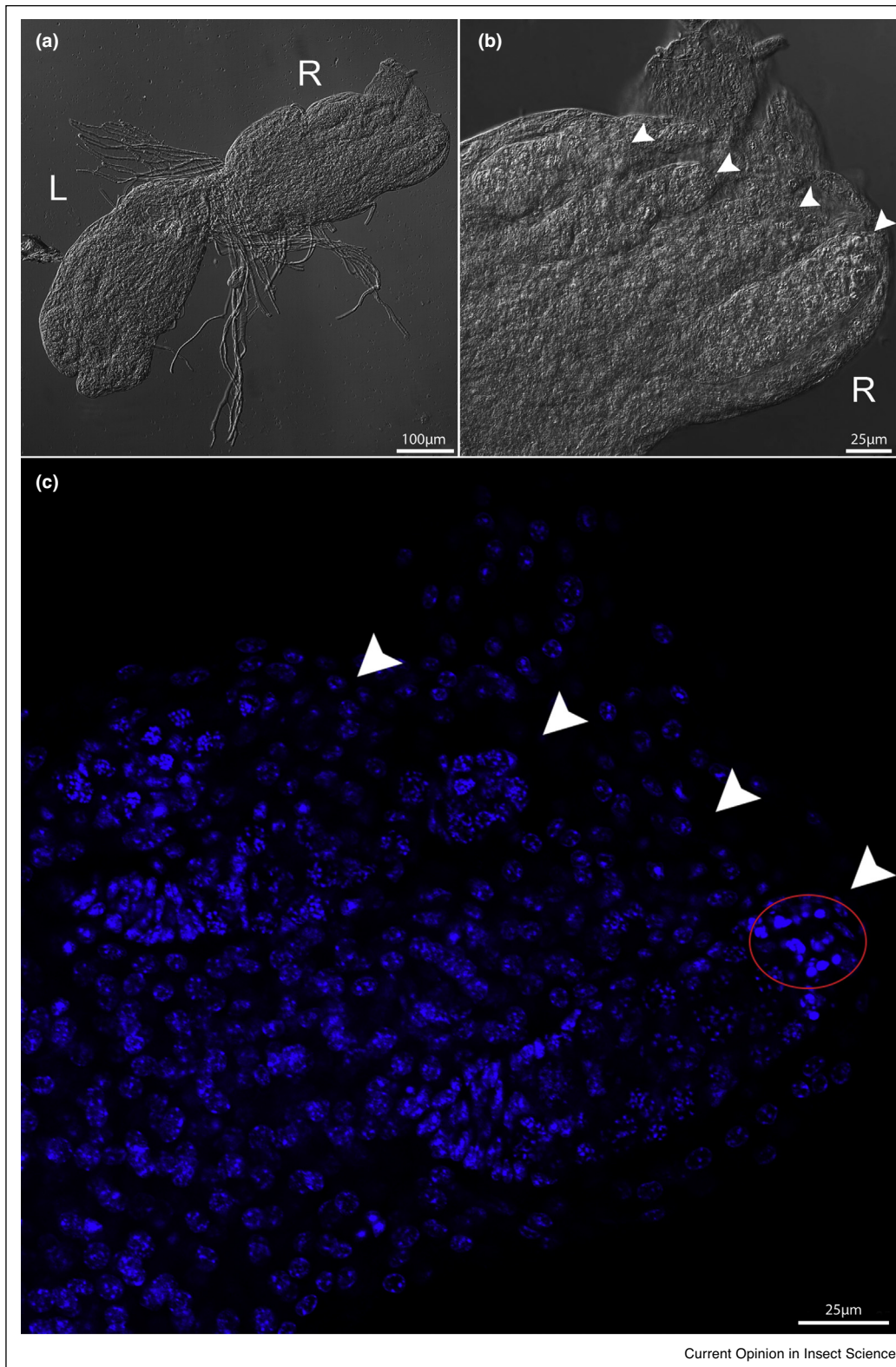
The species representing one extreme of the reproductive behavior constraint within the Meliponini group is *Frieseomelitta varia*. In this species, workers present non-functional ovaries due to their degeneration resulting from the cell death process at the beginning of pupal development [32,27]. However, recent observations (unpublished results, Figures 1 and 2) on the morphology of adult workers ovaries of *F. varia* point to the possibility of some workers to have retained the capacity to activate their ovaries, demonstrated by the presence of apparently normal ovarioles.

Figure 1



Ovaries of *Frieseomelitta varia* adult worker. **(a)** White field image showing a pair of asymmetric ovaries (left, L and right, R) indicating an unequal process of cell death during development. **(b)** Details of the right ovary (R) showing two ovarioles at the anterior part of the ovary (arrows). **(c)** DAPI stained ovarioles (R) showing characteristic viable nuclei (arrows). Images obtained at a Leica SP 5 Confocal microscope.

Figure 2



Ovaries of *Frieseomelitta varia* adult worker. **(a)** White field image showing a pair of ovaries with signals of viable (R) and inviable (L) ovarioles. **(b)** Detail of the ovary (R) with four ovarioles (arrows). **(c)** DAPI stained ovarioles showing viable nuclei and region of degenerating nuclei in the same ovary (red circle). Images obtained at a Leica SP 5 Confocal microscope.

Concluding remarks

Eusociality in Hymenoptera is not equally distributed. This fascinating life style, characterized by a combination of overlapping generations, cooperative brood care, and reproductive division of labor is restricted to some wasps, ants and bees. In the bees its acquired a very special meaning. Besides the economic workforce of this Hymenoptera, still deserve a deeper understanding the aspects of their biology, diversity and evolution. In this society, there are queen and workers. The reproductive division of labor between castes is a special trait. The queen is known as the complete female and the workers are subfertile or sterile. During development, the workers have their reproductive organs definitively modified; caste is, therefore, an irreversible process. Among the bees, the stingless bee species differ greatly in the degree of reproductive dominance, thus representing excellent model for studies aiming to gain insights into how caste determination and reproductive capacity evolved.

Funding

Funded by the São Paulo State Research Foundation FAPESP, Process No. 2016/06657-0.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

We are thankful to Flávia Freitas and Gavin Taylor for carefully reading of the manuscript. We would like to thank to Daercio Lucena for helping us with the preparation of images. We are also grateful Kátia Ferreira for the suggestions to this work.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Dedej S, Hartfelder K, Aumeier P, Rosenkranz P, Engels W: **Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*)**. *J Apic Res* 1998, **37**:183-190.
 2. Hartfelder K, Steinbrück G: **Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary**. *Invertebr Reprod Dev* 1997, **31**:237-250.
 3. Rembold H: **Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera***. *Insect Biochem* 1987, **17**:1003-1006.
 4. Schmidt Capella IC, Hartfelder K: **Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary**. *J Insect Physiol* 1998, **44**:385-391.
 5. Snodgrass RE: *Anatomy of the Honey Bee*. Cornell University Press; 1956.
 6. Linksvayer TA, Kaftanoglu O, Akyol E, Blatch S, Amdam GV, Page RE: **Larval and nurse worker control of developmental plasticity and the evolution of honey bee queen-worker dimorphism**. *J Evol Biol* 2011, **24**:1939-1948.
 7. Iwata K: **Egg giantism in subsocial Hymenoptera, with ethological discussion on tropical bamboo carpenter bees**. *Nat Life Southeast Asia* 1964, **3**:399-435.
 8. Martins GF, Serrão JE: **A comparative study of the ovaries in some Brazilian bees (Hymenoptera; Apoidea)**. *Pap Avulsos Zool (São Paulo)* 2004, **44**:45-53.
 9. Michener CD: *The Bees of the World*. John Hopkins University Press; 2007.
 10. Rembold H, Kremer JP, Ulrich GM: **Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera***. *Apidologie* 1980, **11**:29-38.
 11. Haydak MH: **Honey bee nutrition**. *Ann Rev Entomol* 1970, **15**:143-156.
 12. Dallacqua RP, Bitondi MMG: **Dimorphic ovary differentiation in honeybee (*Apis mellifera*) larvae involves caste-specific expression of homologs of Ark and Buffy cell death genes**. *PLoS One* 2014 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098088>.
The expression analysis of Amark and Ambuffy indicate a functional relationship between the expression of conserved cell death genes and the morphological events leading to caste-specific ovary differentiation in a social insect.
 13. Rozen JG: **Survey of the number of ovarioles in various taxa of bees (Hymenoptera, Apoidea)**. *Proc Entomol Soc Wash* 1986, **88**:707-710.
 14. Ruttner F, Hesse B: **Rassenspezifische Unterschiede in Ovarentwicklung und Eiablage von weiselosen Arbeiterinnen der Honigbiene *Apis mellifera* L.** *Apidologie* 1981, **12**:159-183.
 15. Linksvayer TA, Rueppell O, Siegel A, Kaftanoglu O, Page RE, Amdam GV: **The genetic basis of transgressive ovary size in honeybee workers**. *Genetics* 2009, **183**:693-707.
 16. Makert GR, Paxton RJ, Hartfelder K: **Ovariole number – a predictor of differential reproductive success among worker subfamilies in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies**. *Behav Ecol Sociobiol* 2006, **60**:815-825.
 17. Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K: **Caste and metamorphosis–hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae**. *Gen Comp Endocrinol* 1990, **79**:31-38.
 18. Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K, Amdam GV: **The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development**. *PLoS One* 2007 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000509>.
 19. Azevedo SV, Hartfelder K: **The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development e differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae**. *J Insect Physiol* 2008, **54**:1064-1071.
 20. Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R: **Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation**. *Science* 2008, **319**:1827-1830.
 21. Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simões ZLP, Maleszka R: **Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera***. *BMC Dev Biol* 2007 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-7-70>.
 22. Cristino AS, Nunes FMF, Lobo CH, Bitondi MMG, Simoes ZLP, Costa LD, Lattorff HMG, Moritz RFA, Evans JD, Hartfelder K: **Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality**. *Insect Mol Biol* 2006, **15**:703-714.
 23. Niu D, Zheng H, Corona M, Lu Y, Chen X, Cao L, Sohr A, Hu F: **Transcriptome comparison between inactivated and activated ovaries of the honey bee *Apis mellifera* L.** *Insect Mol Biol* 2014, **23**:668-681.
The gene expression patterns between inactivated and activated ovaries of queens and workers provided new insights into the molecular mechanisms involved in ovary activation.
 24. Cameron RC, Duncan EJ, Dearden PK: **Biased gene expression in early honeybee larval development**. *BMC Genomics* 2013. [10.1186/1471-2164-14-903](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-903).
 25. Lago DC, Humann FC, Barchuk AR, Abraham KJ, Hartfelder K: **Differential gene expression underlying ovarian phenotype determination in honey bee, *Apis mellifera* L., caste development**. *Insect Biochem Mol Biol* 2016, **79**:1-12.

To analyze the divergence of caste we performed a microarray analysis on fourth and early fifth instar queen and worker ovaries. Nine genes were expressed in both castes and/or during development. Four of these genes (*sdr*, *hsp90*, *hsp60* and *hex70b*) responded to JH.

26. Campos LAO, Costa MA: **Determinação do sexo em abelhas. XXVIII. Determinação de castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae).** *Rev Bras Biol* 1989, **49**:999-1001.
27. Boleli IC, Simoes-Paulino ZL, Bitondi MM: **Regression of the lateral oviducts during the larval-adult transformation of the reproductive system of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*.** *J Morphol* 2000, **2**:141-151.
28. Cruz-Landim C, Reginato RD, Imperatriz-Fonseca VL: **Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queens, with comments on ovary development and caste differentiation.** *Pap Avulsos Zool* 1998, **40**:289-296.
29. Camargo CA: **Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae).** *Rev Bras Biol* 1972, **2**:133-138.
30. Hartfelder K, Rembold H: **Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in post-embryonic development of the stingless bee *Scaptotrigona postica*.** *Comp Physiol* 1991, **160**:607-620.
31. Cruz-Landim C, Patrício K, Antonialli Jr WF: **Cell death and ovarian development in highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): caste differentiation and worker egg laying.** *Braz J Morphol Sci* 2006, **23**:27-42.
32. Boleli IC, Simões ZLP, Gentile-Bitondi MM: **Cell death in the ovaries cause permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees.** *J Morphol* 1999, **242**:271-282.
33. Kerr WE: **Sex determination in bees. III Caste determination in *Melipona* and genetic control.** *Insect Soc* 1974, **21**:357-368.
34. Kerr WE, Stort AC, Montenegro MJ: **Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero *Melipona*.** *Anais Acad Bras Ciênc* 1966, **38**:149-168.
35. Brito DV, Silva CGN, Hasselmann M, Viana LS, Astolfi-Filho S, ●● Carvalho-Zilse GA: **Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to sex and caste development.** *Insect Biochem Mol Biol* 2015, **66**:24-30.
Investigated sex determination in *Melipona interrupta*, focusing the feminizer gene and its association to JH. The findings provide support for the conserved regulatory function of fem in *Melipona* and demonstrate a significant correlation between key elements of sex and caste determination.
36. Judice CC, Carazzole MF, Festa F, Sogayar MC, Hartfelde RK, Pereira GAG: **Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*.** *Insect Mol Biol* 2006, **15**:33-44.
37. Goudie F, Oldroyd B: **Thelytoky in the honey bee.** *Apidologie* 2014, **45**:306-326.
38. Ratnieks FLW: **Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies.** *Behav Ecol Sociobiol* 1993, **32**:191-198.
39. Tanaka ED, Hartfelder K: **The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes.** *Arthropod Struct Dev* 2004, **33**:431-442.
40. Ronai I, Barton DA, Oldroyd BP, Vergoz V: **Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death.** *J Insect Physiol* 2015, **81**:36-41.
Investigated oogenesis in the adult honey bee worker ovary in the presence of queen and in its absence besides the workers reproductive plasticity. In this way, the worker sterility' relies on the regulation of oogenesis via programmed cell death and honey bees have a checkpoint at mid-oogenesis to regulate the fertility of the workers.
41. Duncan EJ, Hyink O, Dearden PK: **Notch signalling mediates reproductive constraint in the adult worker honeybee.** *Nat Commun* 2016. 10.1038/ncomms12427.
42. Macedo LMF, Nunes FMF, Freitas FCP, Pires CV, Tanaka ED, ● Martins JR, Piulachs MD, Cristino AS, Pinheiro DG, Simões ZLP: **MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.).** *Insect Mol Biol* 2016, **25**:216-226.
Analyzed ovary transcriptome library of reproductive and nonreproductive workers of honeybee to assess the expression of the regulatory molecules and miRNAs. They found that differentially expressed miRNAs are related to ovary physiology and oogenesis.
43. Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet J-M, Crozier RH: **Anarchy in the beehive.** *Nature* 1994, **371**:749.
44. Barron AB, Oldroyd BP: **Social regulation of ovary activation in 'anarchistic' honey-bees (*Apis mellifera*).** *Behav Ecol Sociobiol* 2001, **49**:214-219.
45. Montague CE, Oldroyd BP: **The evolution of worker sterility in honey bees: an investigation into a behavioral mutant causing failure of worker policing.** *Evolution* 1998, **52**:1408-1415.
46. Châline N, Ratnieks FLW, Burke T: **Anarchy in the UK: detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honey bee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites.** *Mol Ecol* 2002, **11**:1795-1803.
47. Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP: **Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees.** *Insect Mol Biol* 2006, **15**:537-644.
48. Hartfelder K, Tiberio GJ, Lago DC, Dallacqua RP, Bitondi MMG: **The ovary and its genes – developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*.** *Apidologie* 2018, **49**:49-70.
49. Sakagami SF, Beig D, Akahira Y: **Occurrence of ovary developed workers in queenright colonies of stingless bees.** *Rev Bras Biol* 1963, **23**:115-129.
50. Sakagami SF, Zucchi R: **Oviposition process in a stingless bee, *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latreille.** *Studia Entomol* 1963, **6**:497-510.
51. Paxton RJ, Bego LR, Shah MM, Mateus S: **Low mating frequency of queens in the stingless bee *Scaptotrigona postica* and worker maternity of males.** *Behav Ecol Sociobiol* 2003, **53**:174-181.
52. Sakagami SF, Zucchi R: **Oviposition behavior of an Amazonian stingless bee *Trigona (Duckeola) ghilianii*.** *J Fac Sci Hokkaido Univ Zool* 1968, **16**:564-581.
53. Sakagami SF, Zucchi R: **Oviposition behavior of two dwarf stingless bees, *Hypotrigona (Leurotrigona) muelleri* and *H. (Trigonisca) duckei*, with notes on the temporal articulation of oviposition process in stingless bees.** *J Fac Sci Hokkaido Univ VI Zool* 1974, **1**:361-421.
54. Nunes TM, Mateus S, Favaris AP, Amaral MFZJ, von Zuben LG, Clossoski GC, Bento JMS, Oldroyd BP, Silva R, Zucchi R, Silva DB, Lopes NP: **Queen signals in a stingless bee: suppression of worker ovary activation and spatial distribution of active compounds.** *Sci Rep* 2014 <http://dx.doi.org/10.1038/srep07449>.
55. Kerr WE, Zucchi R, Nakadaira JT, Butolo JE: **Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae).** *J NY Entomol Soc* 1962, **70**:265-276.
56. Da Silva DLN, Zucchi R, Kerr WE: **Biological and behavioural aspects of reproduction in some species of Melipona (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** *Anim Behav* 1972, **20**:123-132.
57. Contel EPB, Kerr WE: **Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system.** *Genetica* 1976, **46**:271-277.
58. Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, Strassmann JE: **Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees.** *Proc R Soc B* 1999, **266**:379-384.

59. Paxton RJ, Weisschuh N, Engels W, Hartfelder K, Quezada-Euán JJG: **Not only single mating in stingless bees.** *Naturwissenschaften* 1999, **86**:143-146.
60. Trivers RL, Hare H: **Haplodiploidy and the evolution of the social insects.** *Science* 1976, **191**:249-263.
61. Queller DC, Strassmann JE: **Kin selection and social insects.** *Bioscience* 1998, **48**:165-175.
62. Beig D: **The production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*.** *J Apic Res* 1972, **11**:33-39.
63. Tóth E, Strassmann JE, Nogueira Neto P, Imperatriz Fonseca VL, Queller DC: **Male production in stingless bees: variable outcomes of queen-worker conflict.** *Mol Ecol* 2002, **11**:2661-2667.
64. Tóth E, Queller DC, Dollin A, Strassmann JE: **Conflict over male parentage in stingless bees.** *Insectes Soc* 2004, **51**:1-11.
65. Cavaliere V, Bernardi F, Romani P, Duchi S, Gargiulo G: **Building up the *Drosophila* eggshell: first of all the eggshell genes must be transcribed.** *Dev Dyn* 2008, **237**:2061-2072.
66. Schwenke RA, Lazzaro BP, Wolfner MF: **Reproduction-immunity trade-offs in insects.** *Annu Rev Entomol* 2016, **61**:239-256.
67. Wenseleers T, Helantera H, Hart A, Ratnieks FLW: **Worker reproduction and policing in insect societies: an ESS analysis.** *J Evol Biol* 2004, **17**:1035-1047.
68. Alves DA, Imperatriz-Fonseca VL, Franco TM, Santos-Filho PS, Nogueira-Neto P, Billen J, Wenseleers T: **The queen is dead — long live the workers: intraspecific parasitism by workers in the stingless bee *Melipona scutellaris*.** *Mol Ecol* 2009, **18**:4102-4111.
69. Akahira Y, Sakagami SF, Zucchi R: **Die Nähreier von Arbeiterinnen einer stachellosen Biene, *Trigona (Scaptotrigona) postica*, die von der Königin kurz vor der eigenen Eiablage gefressen werden.** *Zool Anz* 1970, **185**:85-93.
70. Koedam D, Velthuis HHW, Dohmen MR, Imperatriz Fonseca VL: **The behaviour of laying workers and the morphology and viability of their eggs in *Melipona bicolor bicolor*.** *Physiol Entomol.* 2001, **26**:254-259.
71. Lacerda LM, Simões ZLP: **Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados.** *Iheringia* 2006, **96**:1678-4766.
72. Sakagami SF: **Academic Press. Social Insects.** 1982.
73. Gobin B, Ito F: **Queens and major workers of *Acanthomyrmex ferox* redistribute nutrients with trophic eggs.** *Naturwissenschaften* 2000, **87**:323-326.
74. Hironaka M, Nomakuchi S, Iwakuma S, Filippi L: **Trophic egg production in a subsocial shield bug, *Parastrachia japonensis* Scott (Heteroptera: Parastrachiidae), and its functional value.** *Ethology* 2005, **111**:1089-1102.
75. Khila A, Abouheif E: **Reproductive constraint is a developmental mechanism that maintains social harmony in advanced ant societies.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:17884-17889.
- Compared the developmental genetic capacity of queens and workers to reproduce in species of ants and was proposed that high levels of reproductive constraint has most likely evolved as a consequence of selection at the colony level.
76. Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert ADP: **Worker reproduction in the stingless bee species *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae).** *Entomol Gen* 1998, **23**:169-175.
77. Silva-Matos EV, Noll FB, Mateus S, Zucchi R: **Non-ovipositing nurse workers with developed ovaries in *Trigona cilipes cilipes* (Hymenoptera, Meliponini).** *Braz J Morphol Sci* 2006, **23**:343-347.
- Numerous species of tropical stingless bees have workers that lay eggs in queenright colonies. Was analyzed the behavior related to cell provisioning and oviposition process in a colony of *Trigona cilipes* in the queenright and queenless stages. Was observed that workers activate the ovaries, mimics oviposition, but they never oviposited the eggs.
78. Lacerda ML, Paulino Simões ZL, Velthuis HHW: **The sharing of male production among workers and queens in *Scaptotrigona depilis* (Moore, 1942) (Apidae, Meliponini).** *Insect Soc* 2010. 10.1007/s00040-010-0070-9.
79. Tóth E, Queller DC, Imperatriz Fonseca VL, Strassmann JE: **Genetic and behavioral conflict over male production between workers and queens in the stingless bee *Paratrigona subnuda*.** *Behav Ecol Sociobiol* 2002, **53**:1-8.
80. Grosso AF, Bego LR, Martinez AS: **The production of males in queenright colonies of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Meliponinae).** *Sociobiology* 2000, **35**:475-485.