

ANALISE COMPARATIVA, *IN SILICO*, DE TRANSCRITOS CORRELACIONADOS À DETERMINAÇÃO DE SEXO EM ABELHAS SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA COM GENOMA DE *Apis mellifera*.

Elaine Castro de Mattos Torres¹; Gislene Almeida Zilse²; Carlos Gustavo Nunes Silva³.

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPCA /INPA; ³Co-orientador UFAM.

1. Introdução

As abelhas assim como as vespas e formigas pertencem a ordem Hymenoptera. Taxonomicamente as abelhas sem ferrão estão classificadas na Tribo Meliponini (Apidae: Apinae). Juntamente com as espécies do gênero *Apis* (Apidae: Apinae), as espécies de Meliponini são as únicas abelhas que constituem colônias (espécies eussociais) (Michener, 2000). Camargo e Pedro (2008) propõem a existência de 33 gêneros dentro da tribo Meliponini com um total de 397 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. As abelhas do gênero *Melipona* são as que têm as maiores espécies em tamanho e é o principal gênero em número de espécies (69), com distribuição exclusivamente Neotropical, apresentando sua maior diversidade na bacia amazônica. Esses insetos têm um papel de fundamental importância na polinização das plantas destes ecossistemas e também na dispersão de sementes (Bacelar-Lima *et al.*, 2006). Alguns grupos de insetos sociais estão ameaçados pelo declínio de suas populações, motivando pesquisadores, conservacionistas e até mesmo o poder público a uma atenção mais direcionada a este tipo de fauna. O sexo em abelhas é determinado por haplodiploidia, onde os machos se originam de ovos não fertilizados (haplóide) e as fêmeas, de ovos fertilizados (diplóide). Além da haplodiploidia, nas abelhas existe um mecanismo complementar de determinação do baseado em um único loco, conhecido como CSD (*Complementary Sex Determiner*), segundo o qual, os indivíduos heterozigotos são fêmeas e os indivíduos homo e hemizigotos são machos. Entretanto, os machos diplóides não são viáveis reprodutivamente e são mortos pelas operárias. Logo, o loco *csd* influi diretamente na estabilidade populacional destes insetos nas matas e criadouros (Carvalho, 2001). Ainda assim pesquisas quanto ao polimorfismo alélico do *csd*, além das condições demográficas e estrutura populacional em himenópteros sociais, continuam pouco exploradas. Tal enfoque, porém, se faz necessário dado ao fato que as abelhas estão incluídas no grupo de insetos que mais contribuem beneficemente a Terra, provendo serviços cruciais aos ecossistemas, tais como a polinização (Bacelar Lima *et al.*, 2006). Em 2003, Beye *et al.* isolaram e caracterizaram o gene responsável por este mecanismo de determinação complementar em *Apis mellifera*, denominado *csd*. Hasselmann e colaboradores (2008) encontraram um outro gene relacionado a determinação de sexo em *A. mellifera* denominado *fem*, o gene sobre o qual o *csd* atua na cascata da regulação de determinação sexual. O gene *fem* já foi parcialmente isolado e caracterizado em *Melipona*

interrupta por hasselmann et a (2008). Portanto, este trabalho objetivou comparar transcritos do gene *fem* de *Melipona interrupta* (Hymenoptera, Apidae) com o gene *csd* e *fem* de *Apis mellifera*.

2. Material e Métodos

A pesquisa iniciou-se na busca de seqüências completa do gene *csd* (*complementary sex determiner*) de espécies de *Apis* (depositada pelos pesquisadores do Honeybee Genome Sequencing Consortium em 2006) e do gene *fem* (*feminizer*) de *Melipona interrupta* (Nunes et al., 2008) no site NCBI (National Center For Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih>) utilizando a ferramenta BLASTn. Essas seqüências foram alinhadas, organizadas e comparadas com o auxílio do programa BIOEDIT versão 5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3. Resultados e Discussão

Com o acesso ao site do NCBI foi criado um banco de dados contendo 1 (uma) seqüência do gene *fem* de *Melipona interrupta*, 15 (quinze) seqüências completas do *csd* de *Apis mellifera* e 2 (duas) seqüências de *fem* de *Apis mellifera* (Tabela 1). Por meio das comparações feitas com auxílio da ferramenta BLASTn, verificou-se que as diversas seqüências encontradas no banco de dados para o gene *csd* correspondem a diferentes alelos desse loco. As similaridades encontradas entre determinados alelos foram altas, sendo que em alguns alelos são até de 98%.

Tabela 1: Número de identificação, descrição e tamanho das seqüências (numero de bases) dos genes *fem* e *csd* de *Apis mellifera* e *Melipona interrupta* retiradas no NCBI.

Nº DE IDENTIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO	TAMANHO
EU139305.1	<i>fem Melipona interrupta</i>	1.236
EU100940.1	<i>fem Apis mellifera</i>	1.206
EU100941.1	<i>fem Apis mellifera</i>	1.206
EU100899	<i>csd Apis mellifera</i>	1.230
EU100898	<i>csd Apis mellifera</i>	1.224
EU100897	<i>csd Apis mellifera</i>	1.212
EU100896	<i>csd Apis mellifera</i>	1.230
EU100895	<i>csd Apis mellifera</i>	1.227
EU100894	<i>csd Apis mellifera</i>	1.251
EU100893	<i>csd Apis mellifera</i>	1.233
EU100892	<i>csd Apis mellifera</i>	1.176
EU100891	<i>csd Apis mellifera</i>	1.239
EU100890	<i>csd Apis mellifera</i>	1.239
EU100889	<i>csd Apis mellifera</i>	1.224
EU100888	<i>csd Apis mellifera</i>	1.236
EU100887	<i>csd Apis mellifera</i>	1.221
EU100886	<i>csd Apis mellifera</i>	1.230
EU100885	<i>csd Apis mellifera</i>	1.245

Comparou-se as seqüências do gene *fem* de *Melipona interrupta* e *fem* de *Apis mellifera*, além da comparação entre os diversos alelos de *csd* de *A. mellifera* encontrados no GeneBank com o gene *fem* de *M. interrupta*. Observou-se regiões de extensionamento (formação de *gaps*) em ambos os alinhamentos realizados pelo programa CLUSTALw, incluso no pacote do sistema BIOEDIT (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Além da formação de *gaps* para proporcionar o alinhamento, foram observadas regiões sem identidade. Na comparação entre o único gene *fem* de *Melipona* descrito no banco de dados com os 15 de *csd*, observou-se o não alinhamento em uma região hipervariada, a qual não apresentou correspondência com a seqüência de *fem* de *M. interrupta*. Ao longo de todo o alinhamento foram observadas também regiões conservadas com grau de identidade entre as seqüências de 66% entre os genes *fem* das duas espécies. Observou-se também uma extensão propiciada pelo programa de alinhamento CLUSTALw, na região do nucleotídeo 222 a 260. No total foram verificadas 11 extensões de *gaps* e um índice de 74% de identidade.

4. Conclusões e perspectivas

Com a comparação entre os genes *fem* de *Melipona* e *csd* de *Apis*, observou-se nas extremidades das seqüências regiões conservadas que vão permitir o desenho de *primers* para que se obtenha seqüências completas de *fem* de *Melipona*.

5. Referências

- Bacelar-Lima, C. G.; Freire, D. C. B.; Coletto-Silva, A.; Costa, K. B.; Laray, J. P. B.; Vilas-Boas, H. C.; Carvalho-Zilse, G. A. 2006. Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. *Acta Amazonica*, 36(3): 343-348.
- Beye, M.; Hasselmann, M.; Fondrk, M.K.; Page Jr., R.E.; Omholt, S.W. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114: 419-429.
- Camargo, J.M.F; Pedro, S.R.M. 2008. Meliponini Lepageletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. e Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*.
- Carvalho, G.A. 2001. The Number of Sex Alleles (CSD) in a Bee Population and its Practical Importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10(1): 10-15.
- Hasselmann M., Gempe T., Schiott M., Nunes-Silva C.G., et al. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway. *Nature* DOI:10.1038/nature07052.
- Michener, C.D. 2000. *Bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 927pp.