

05080
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE GENES
QUE SE EXPRESAN DE MANERA DIFERENCIAL
EN LARVAS OBRERAS Y REINAS DE LA ABEJA**
Apis mellifera.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
MIGUEL CORONA VILLEGAS

CUERNAVACA, MOR., SEPTIEMBRE DE 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

273466.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS SE REALIZO BAJO LA DIRECCION DEL DR. MARIO
ENRIQUE ZURITA ORTEGA EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Esta tesis la dedico, a las mujeres más importantes en mi vida:

* MARGARITA
* EMERITA
* MARICELA
* FRIDA
* AURA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar, a mi tutor Mario Zurita Ortega, por darme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por su confianza!. A Enrique Estrada, excelente apicultor y criador de reinas, quien sin su colaboración para coleccionar las larvas, este trabajo tampoco hubiera sido posible. A mi amigo Francisco Trujillo director del Instituto de Investigaciones Apícolas de México, quien desde los tiempos de la Facultad, me encaminó por el mundo de las abejas.

Agradezco al Dr. Possani su gran apoyo para que pudiera terminar la escritura de esta tesis, así como sus consejos para la corrección de la misma. Quiero agradecer igualmente, los valiosos comentarios de los demás miembros de mi jurado de examen, Dra. Marieta Tuena, Dra. Martha Vázquez, Dr. Baltazar Becerril, Dr. Alejandro Alagón y Dr. Alejandro. En particular, quiero agradecer a la Dra. Martha Vázquez por su meticulosa revisión y corrección del texto, lo cual mejoró mucho su calidad. De manera especial, quiero dar las gracias a la Dra. Tuena, por su interés en mi trabajo y el estímulo que me brindó para continuarlo.

Gracias a los miembros del laboratorio Zurita-Covarrubias y de Possani por su amistad, así como su colaboración para finalizar tanto el trabajo experimental como la escritura de la tesis. Finalmente, agradezco el apoyo y los consejos de mi amigo Jalil Saab, los cuales sin duda, también fueron importantes para terminar mi tesis.

INDICE GENERAL

Indice de figuras y tablas.....	4
1.1.- RESUMEN ESPAÑOL.	5
1.2.- RESUMEN INGLES	6
2.0.- INTRODUCCION.....	7
2.1.- Biología y ciclo de vida básicos de la abeja <i>Apis mellifera</i>	7
2.2.- Introducción al estudio de las abejas.....	11
2.3.- Antecedentes del estudio de la determinación de castas.....	12
2.4.- La alimentación recibida por las larvas de obreras y reinas es diferente en calidad y cantidad.....	13
2.5.- Principales consecuencias fisiológicas de la alimentación diferencial entre castas.....	16
2.6.- Posibles funciones de la hormona juvenil (HJ) en la determinación de castas.....	21
2.7.1- Introducción al estudio de los receptores nucleares (RN).....	25
2.7.2.- La cascada regulatoria de RN inducida por ecdisona al inicio de la metamorfosis en <i>Drosophila melanogaster</i>	26
3.0.- OBJETIVO.....	32
4.0.- MATERIALES Y METODOS.....	35
4.1.- Material Biológico.....	35
4.2.- Adaptación de una técnica para purificación de RNA.....	39
4.3.- Adaptación de la técnica de "RNA-Diferential Display PCR"	40
4.4.- Implementación de una técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA ("RACE").....	42
4.5.- Elaboración de un banco y búsqueda de cDNAs específicos.....	47
4.6.- Secuenciación y análisis de IFm-2.....	47
4.7.- Elaboración de cDNA y RT PCR.....	48
4.8.- Cuantificación de DNA mitocondrial por "Dot blots"	50
5.0.- PUBLICACION.....	51
6.0.- RESULTADOS.....	51
6.1.- Identificación de transcritos diferencialmente expresados por RNA-DD PCR y RT-PCR.....	51
6.2.- Aislamiento de un cDNA que codifica para Ifm-2.....	52

6.3.- Los niveles del mRNA de Am IF/2mt son más abundantes en larvas de reinas durante el 4to. instar y durante la parte del quinto instar previa a la operculación.	55
6.4.- La expresión de otros genes involucrados en la función mitocondrial, tanto codificados en el núcleo como en la mitocondria, también es diferencial entre reinas y obreras.....	61
6.5.- No existen diferencias significativas en el número de genomas mitocondriales durante el desarrollo de ambas castas	61
6.6.- Genes de la familia de los receptores nucleares.....	61
7.0.- DISCUSION	64
7.1.- Análisis de IFm-2 y sus implicaciones funcionales.....	64
7.2.- Estequiometría de RNAs mitocondriales y su implicación en la función de IFm-2 en la síntesis de proteínas.....	70
7.3.- La mayor abundancia de algunos de los mRNAs involucrados en la función mitocondrial en larvas de reinas, sugiere que podría existir mayor abundancia de los restantes transcritos involucrados en esta función.....	71
7.4.- Posibles mecanismos de control de la expresión de genes mitocondriales.	73
7.5.- La HJ activa la expresión de genes involucrados en la actividad mitocondrial?.....	75
7.6.- El Posible receptor de HJ y su mecanismo molecular de acción...	78
7.7.- El tamaño y su posible influencia en la metamorfosis.....	80
7.8- Posible mecanismo de inducción de características morfológicas diferenciales entre castas por la influencia de HJ.....	82
7.9.- Posibilidades del análisis del patrón de expresión de los RN durante el desarrollo de ambas castas.....	
8.0.- CONCLUSIONES	88
9.- BIBLIOGRAFIA.....	89

ABREVIATURAS

COX-1.....	Citocromo oxidasa subunidad 1.
cytc.....	Citocromo C
BRC.....	Receptor nuclear Complejo amplio ("Broad complex").
DHR3.....	Receptor hormonal 3 (" <i>Drosophila</i> hormone receptor 3")
DHR78.....	Receptor hormonal 78 (" <i>Drosophila</i> hormone receptor 78")
EMV.....	Extensión máxima de vida (EMV.)
EROs.....	Especies reactivas de oxígeno
EF-1 α	Factor de elongación de la traducción citoplasmática 1
F.....	Fructosa
G.....	Glucosa
GP	Glándulas protorácicas.
HJ.....	Hormona juvenil
HT	Hormona tiroidea
HRE.....	Siglas en inglés de elementos de respuesta a hormona.
IF-2mt	Factor 2 de iniciación de la traducción mitocondrial
JO.....	Jalea de obrera
JR.....	Jalea Real
m.....	minuto
RN.....	Receptor nuclear
Ecr.....	Receptor de la hormona ecdisona.
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa ("polimerase chain reaction")
RACE.....	Amplificación rápida de extremos de cDNA ("Rapid amplification of cDNA ends").
RNA-DD PCR	Despliegue diferencial de RNA
RT-PCR.....	Trascriptasa reversa-PCR
RXR.....	Receptor de ácido retinoico (receptor nuclear).
SED.....	Sitios específicos de descondensación (" <i>puffs</i> ")
s.....	Segundo
sei.....	Siglas en inglés.
UFP.....	Unidades formadoras de placas
USP.....	Receptor nuclear ultraspiracle

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Factores que actuan en la determinación de castas	8
Figura 2.- Desarrollo postembrionario de reinas y obreras.....	9
Figura 3.- Principales estados de desarrollo de la abeja.....	10
Figura 4.- Crecimiento de larvas hembras de abeja.....	17
Figura 5.- Respiración de larvas hembras de abeja.....	18
Figura 6.- Títulos de hormona juvenil en larvas.hembras de abeja..	19
Figura 7.- Pulsos de ecdisona y SEDs durante la metamorfosis.....	31
Figura 8.- La cascada regulatoria de RN inducida por ecdisona.....	32
Figura 9.- Esquema "RNA Differential Display PCR"	41
Figura 10.- Esquema "RACE" modificado.....	43
Figura 11.- Fotografía de un Southern de RACE.....	46
Figura 12.- Secuencia nucleotídica Am IF-2mt.....	53
Figura 13.- Southern RT-PCR cytc.....	60
Figura 14.- Alineamiento de la región de unión a DNA de los RN....	63
Figura 15.- Títulos de ecdisona.....	85
Figura 16.- Gráfica comparativa HJ-ecdisona.....	86
Tabla 1.- Composición química de la jalea real.....	14
Tabla 2.- Composición de lípidos en la jalea real.....	15
Tabla 3.- Porcentaje de crecimiento de larvas de reina.....	37
Tabla 4.- Porcentaje de crecimiento de larvas de obrera.....	38
Tabla 5.- Clasificación de pupas.....	39
Tabla 6.- Frecuencia de uso de codones de Am IF-2mt.....	68
Tabla 7.- Frecuencia de uso de codones de <i>Apis mellifera</i>	69

1.-RESUMEN

La alimentación que reciben las larvas hembras de la abeja *Apis mellifera*, determina si ésta se desarrolla en obrera o reina. Aunque la abeja es el insecto social mejor estudiado, hasta el presente no se han realizado estudios en los que se reporten diferencias a nivel molecular entre ambas castas. En este trabajo utilizamos la técnica conocida como RNA differential display PCR (RNA-DD PCR) para la amplificación de fragmentos de cDNAs que codifican para genes que son diferencialmente expresados durante el desarrollo larvario de ambas castas; uno de estos fragmentos fue extendido hacia el extremo 5' y usado como probador para la búsqueda del cDNA completo en un banco que elaboramos a partir de larvas de reina de 4.5 días. De esta forma, fue aislado una clona de 2.2 kb que codifica para el factor de iniciación de la traducción mitocondrial 2 (IF-2mt). Mediante un análisis semi-cuantitativo con RT-PCR, se encontró que este gen es preferencialmente expresado a lo largo del desarrollo larvario de reinas y de manera particular, durante las últimas 18 horas antes del sellado de la celdas que ocurre alrededor de los 4.5 días en reinas y 5.6 días en obreras .

El hecho de encontrar que en las larvas de reinas existe mayor cantidad del mRNA del factor de iniciación de la traducción mitocondrial, nos hizo suponer que tanto los transcritos mitocondriales sobre los cuales este factor ejerce su actividad iniciadora, como los transcritos que codifican para las subunidades de los complejos respiratorios codificadas en el núcleo, podrían estar también incrementados en larvas de reina. Los análisis con RT-PCR realizados con un gen codificado en la mitocondria (subunidad 1 de la citocromo c oxidasa) y con un gen codificado en el núcleo (citocromo c) confirman, al menos en estos casos, la hipótesis anterior. No se encontraron diferencias en el número de genomas mitocondriales entre reinas y obreras, lo cual sugiere que la mayor abundancia de los transcritos mitocondriales observado en las larvas de reinas con respecto a obreras es debido a una mayor actividad transcripcional o menor degradación de los mensajeros.

Por otra parte, puesto que el proceso de determinación de castas parece ser controlado por hormonas, se decidió investigar si existe una expresión diferencial de los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares. Como primer paso hacia este objetivo, utilizamos oligonucleótidos degenerados para amplificar cuatro diferentes fragmentos que codifican para los genes homólogos de USP, DHR3, DHR78 y E78A de *Drosophila*. En un futuro será analizado el patrón de expresión de estos genes en ambas castas.

SUMMARY

The type of nourishment received by the honeybee larvae determines their development into queens or workers. Although the honey bee is the social insect best studied, very little work has been performed at the molecular level, to understand the events and molecules responsible for the cast differentiation of this insect. In this thesis, we used the RNA differential display PCR technique for amplification of fragments of cDNAs coding for genes responsible for developmental differentiation of both castes. We identified a clone that encodes a gene homologous to the nuclear-encoded mitochondrial translation initiation factor (AmIF-2mt). Semi-quantitative analysis using RT-PCR throughout the bee development detected a higher level of expression of this gene in queen larvae in comparison with worker larvae. analysis of genes that code for two other mitochondrial proteins: cytochrome oxidase subunit 1 (COX-1, mitochondrial encoded) and cytochrome c (cyt c, nuclear encoded) also showed differential expression of these two genes among queens and workers. In particular, the cyt c transcript is more abundant in queen larvae and also throughout the metamorphosis of queens. We found that no significant differences in the mitochondrial copy number occurred between queens and workers. this suggests that the higher levels of mitochondrial transcripts observed in queen larvae is either due to a more pronounced mitochondrial transcriptional activity or to a lower degradation level of messengers, than to mitochondrial genome dosage .

Additionally, considering that the caste determination process seems to be controlled by hormones, we investigated if differential expression of members of this superfamily exists. As a first step toward this objective, we used degenerated oligonucleotides for the amplification of four different fragments (two amplified from genomic DNA and two from 4.5 days queen larvae cDNA), which encode homologue genes from *Drosophila melanogaster*: USP, DHR3, E78A AND XR78, respectively. This receptors are involved in the regulatory hierarchy induced by ecdysone and influenced by juvenile hormone on the onset of metamorphosis. In future we expect to analyze the expression profiles of these genes in both castes.

2.0. -INTRODUCCION

2.1.- Biología y ciclo de vida básicos de la abeja *Apis mellifera*.

Antes de intentar abordar una revisión del conocimiento actual del estudio de la determinación de castas, es importante introducir alguno de los conceptos básicos de la biología de las abejas. En una colonia existen tres tipos morfológicos o castas: un macho o zángano y dos tipos de hembras, una fértil, la reina, madre de todos los individuos de la colonia y una infértil, la obrera, la cual como su nombre lo indica, cumple de acuerdo con su edad diferentes funciones dentro de la colmena (Figura 1). La abeja como todos los insectos holometábolos, pasa por cuatro estados de desarrollo: el embrionario, el larvario, la pupa y el adulto (figuras 2 y 3). Mientras que el estado embrionario tiene una duración de 3 días en ambas castas, la duración de los demás estados varía: la duración de la etapa larvaria, incluido el estado de prepupa, es de 8 días en obreras y siete días en reinas, mientras que el de pupa es de nueve días en obreras y de sólo cinco en reinas (Bertholf, 1925). Incluyendo las aproximadamente 12 horas que tarda la abeja recién nacida en romper la celda para nacer, la duración total del desarrollo es 20.5 días para las obreras y 15.5 días para la reina. Durante dicho desarrollo tienen lugar seis *instars*, que son los períodos entre mudas o ecdisis, de los cuales cinco comprenden la etapa larvaria. La duración de los primeros cuatro *instar* es sincrónico en ambas castas, existiendo variación a partir de la segunda mitad del quinto instar y en el sexto (ver figura 2). El primer *instar* comprende desde la eclosión del huevo hasta la primera muda a las 18 horas. El segundo instar también tiene una duración de 18 horas, el tercero y cuarto 24 horas y el quinto, incluyendo prepupa, 84 horas (3.5 días) en reinas y 108 horas (4.5 días) en obreras. El quinto *instar* separa la prepupa de la pupa y el sexto la pupa del ímago adulto.

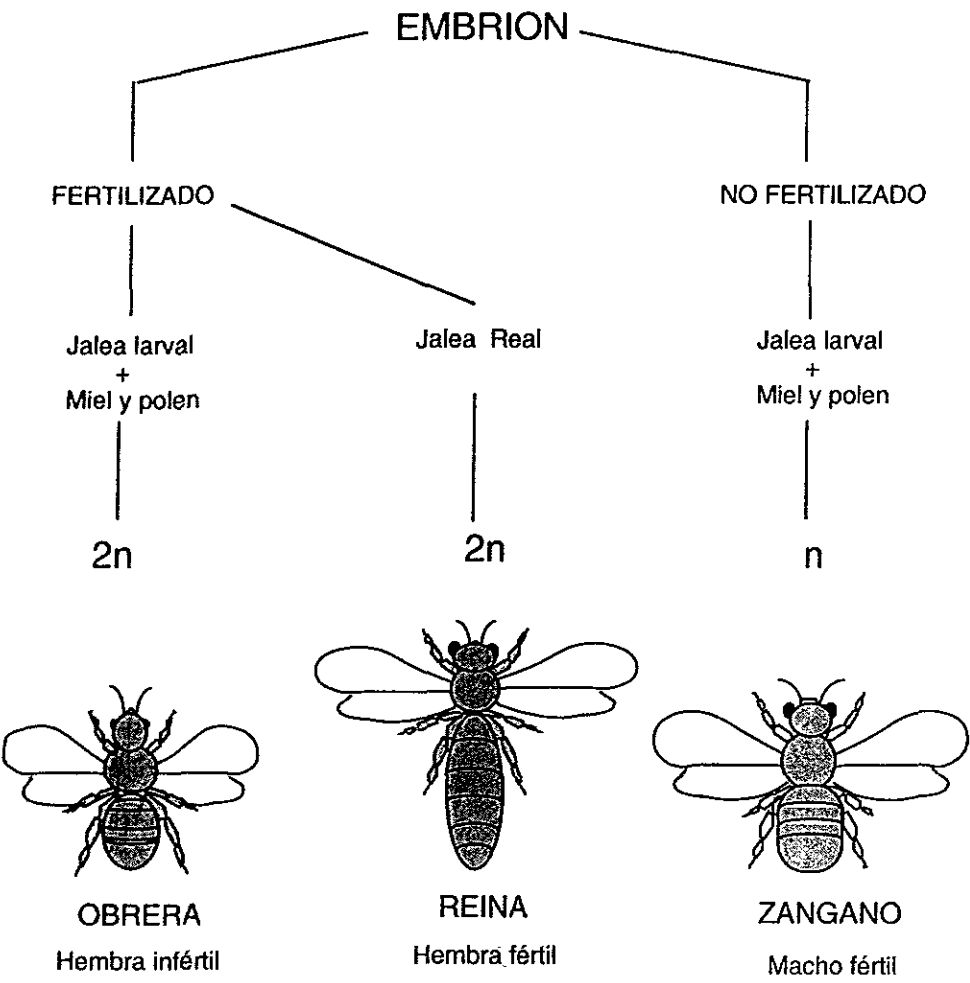


Figura 1.- La fertilización del huevo determina el sexo. La alimentación recibida por las larvas hembras, determina si se diferencian en reinas u obreras.

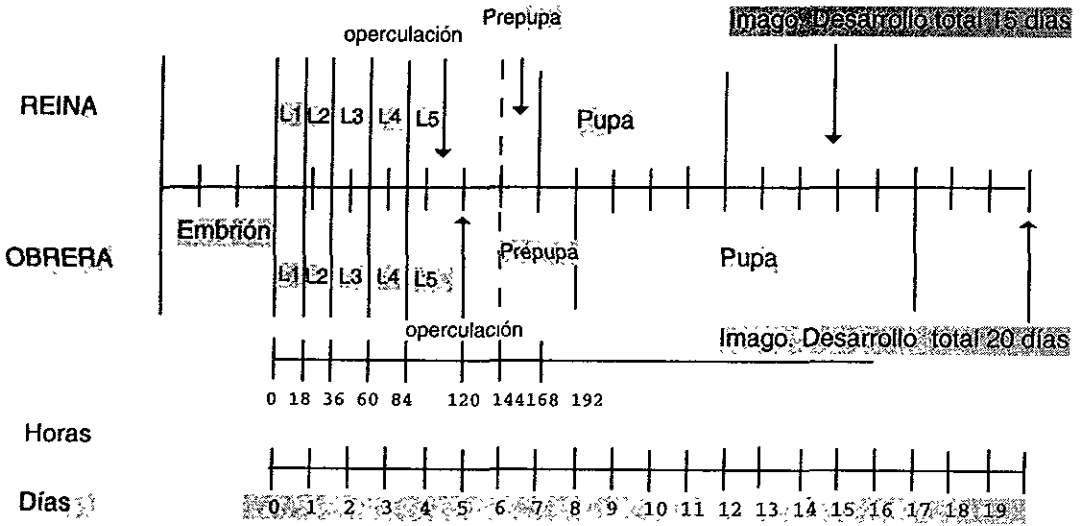


Figura 2.- Desarrollo postembrionario de reinas y obreras de la abeja *Apis mellifera* (modificado de Bertholf, 1925, copiado por Beetsma, 1979).

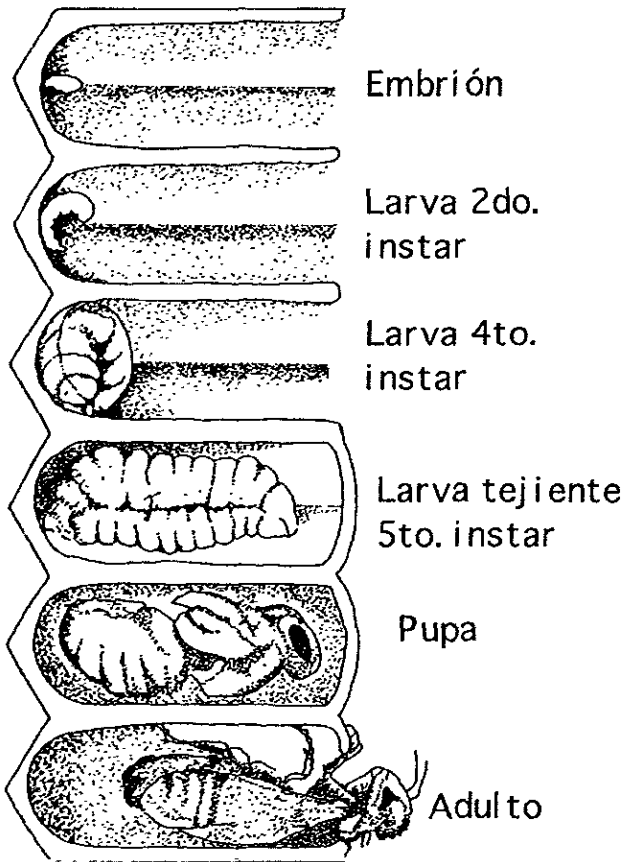


Figura 3.- Principales estados de desarrollo de la abeja *Apis mellifera*.

Un punto de referencia importante en el desarrollo de la abeja, refiere al llamado momento de sellado de las celdas u operculación. Este sucede durante el quinto instar (aproximadamente cuatro días y medio en reinas y 5 días en obreras) y señala el fin del período durante el cual las larvas son alimentadas (Bertholf, 1925) (ver figura 2, pag. 9).

2.2.- Introducción al estudio de las abejas. Una perspectiva histórica.

Además de la importancia económica de la abeja *Apis mellifera*, ésta es un sujeto interesante de estudio como modelo del comportamiento animal y de la biología del desarrollo. La abeja es el insecto social más estudiado y en general uno de los animales más estudiados por el hombre desde la antigüedad, como lo denotan los textos de Aristóteles (Anatomía de los animales. Libro cuarto. cap. VI), Plinio (Historia Natural. L. XI) y Virgilio (Geórgidas. Canto cuarto. L. III, XVI). El estudio de este insecto tuvo su principal auge durante el siglo pasado con investigadores como Lanstrong y Dzierzon quienes revolucionaron la apicultura, y algunos de los más denotados científicos de la época como Darwin y Mendel, quien no tuvo éxito en sus experimentos genéticos con abejas probablemente porque no conocía que las reinas eran fecundadas por el esperma de más de un zángano (Ittis, 1932). No obstante, a partir de la segunda década de este siglo, la mosca *Drosophila* aventajó significativamente a la abeja como el insecto más estudiado, de tal suerte, que en la actualidad hay muy pocos ejemplos de su estudio utilizando herramientas bioquímicas y menos aún moleculares. Tales estudios han sido preferentemente enfocados al examen de los genes que codifican para toxinas de su veneno y de genes mitocondriales para estudios de evolución molecular y taxonómicos. El trabajo que se presenta

en esta tesis, constituye el primer esfuerzo para tratar de entender a nivel molecular el proceso de la determinación de castas. Recientemente otros grupos de investigación, también han usado técnicas de biología molecular para la identificación de genes expresados diferencialmente entre larvas de reinas y obreras (Evans y Wheeler, 1999).

2.3.- Antecedentes históricos del estudio de la determinación de castas.

Debido a su potencial para la comprensión de fenómenos biológicos de gran trascendencia para la biología moderna, entre ellos los eventos relacionados a la morfogénesis y longevidad, la determinación de castas en los insectos sociales reviste particular interés y ha sido estudiada por numerosos investigadores desde el siglo pasado (ver revisiones de Weaver, 1966; Beetsma, 1979; Brian, 1979, 1980).

En la antigüedad se pensaba que las colmenas de abejas eran "encabezadas" por un rey, hasta que el microscopista holandés Jan Swammerdam (1737-1738) demostró, en base a detallados estudios anatómicos, que en una colonia de abejas hay una sola hembra reproductiva, madre de todos los individuos que en ella habitan, la reina. Posteriormente, Dzierzon (1845) encontró que la reina apareada puede producir huevos sin fertilizar de los que se desarrollan partenogénicamente los zánganos y huevos fertilizados, de los que se desarrollan hembras. De manera complementaria, Pérez sugirió por primera vez en 1889, que el desarrollo de una hembra en reina u obrera, no es debida a diferencias genéticas, sino a la alimentación diferencial que las larvas reciben de las abejas nodrizas.

2.4.- La alimentación recibida por las larvas de obreras y reinas es diferente en calidad y cantidad.

La calidad del alimento suministrado a las larvas es diferente en ambas castas. Las larvas de reinas son alimentadas a lo largo de todo su desarrollo con jalea real (JR), una mezcla de secreciones de las glándulas mandibulares e hipofaríngeas en aproximadamente igual proporción. En contraste, las larvas de obreras son alimentadas los primeros tres días con jalea de obreras (JO), la cual contiene una proporción tres a cuatro veces mayor de las secreciones de las glándulas hipofaríngeas con respecto a las de las mandibulares; a partir del cuarto día, este alimento inicial es modificado con la adición de miel y polen (Jung-Hoffman, 1966). La composición química de ambas secreciones es diferente. (ver la composición química de la JR en tabla 1 y 2). La JR es al menos diez veces más abundante en ácido pantoténico y en dos compuestos heterocíclicos, la biopterina y la neopterina. Otra importante diferencia entre ambos alimentos, es su contenido de azúcares: la JR ofrecida a larvas de 2-3 días contiene alrededor de 12% (peso seco) de azúcares, principalmente glucosa y fructosa, mientras que JO ofrecida a larvas de la misma edad, sólo contiene 4% de azúcares (Shuel y Dixon, 1959; Rembold, 1965).

La cantidad del alimento suministrado a las larvas en desarrollo también ha mostrado ser diferente entre castas. Lindaver (1952), reportó que las abejas nodrizas llevan alrededor de 1600 visitas a larvas de reinas, por sólo 150 a las de obreras. También se ha reportado que la reina consume alrededor de 5% más alimento que lo que consumen los individuos intercastas o intermediarios y 19% más que las obreras (Dietz y Lambreton , 1970).

Componente	Cantidad
Agua.....	67.0 %
Proteína cruda.....	12.5 %
Azúcares totales.....	11.0 %
Fructosa.....	6.0 %
Glucosa.....	4.2 %
Sacarosa.....	0.3 %
Otros.....	0.5 %
Acidos grasos totales.....	5.0 %
Minerales.....	1.0 %
K.....	5500 µg/g
Mg.....	700 µg/g
Na.....	600 µg/g
Ca.....	300 µg/g
Zn.....	80 µg/g
Fe.....	30 µg/g
Cu.....	25 µg/g
Mn.....	7 µg/g
No determinado.....	3.5 %
<hr/>	
Vitaminas	
Tiamina.....	6 µg/g
Riboflamina.....	9 µg/g
Piridoxina.....	3 µg/g
Niacina.....	50 µg/g
Acido pantoténico.....	100 µg/g
Inositol.....	100 µg/g
Biotina.....	1.5 µg/g
Acido folico.....	0.2 µg/g
Vitamina C.....	4.0 µg/g
Vitamina A.....	N.D.
Vitamina D.....	N.D.
Vitamina E.....	N.D.
Vitamina K.....	N.D.
pH.....	3.8

Tabla 1.- Composición química típica de la jalea real. Los datos presentados son basados en reportes de Evans *et al.*, 1937; Melampy y Jones, 1939; Hydak y Palmer, 1942; Haydak y Vivino, 1950; Nation y Robinson, 1971; Lercker *et al.*, 1982; Takenaka, 1984; Howe *et al.*, 1985; Asencot y Lensky, 1988; Karaali *et al.*, 1988. N.D.= No detectado.

Componente	Cantidad
Acidos Hidroxi grasos	
ácido 3-Hidroxi octanoico.....	0.3 %
ácido 8-Hidroxi octanoico.....	5.5 %
ácido 3-Hidroxi decanoico.....	1.9 %
ácido 10- Hidroxi decanoico.....	21.6 %
ácido (E)-10-hidroxi dec-2-enoico.....	31,8 %
ácido 3,10-Dihidroxi decanoico.....	1.8 %
Acidos dicarboxilicos	
ácido octandioico.....	0.8 %
ácido decandioico.....	1.4 %
dec-2-endioico.....	2.7 %
Acidos grasos simples	
ácidos octanoico.....	0.1 %
Otros	
ácido p-hydroxi benzoico.....	trazas.
ácido glucónico.....	24 %
No determinados y otros.....	8.4 %
Esteroles	
24-metileno colesterol.....	50 µg/g
B-stigmasterol.....	20 µg/g
Delta 5 Avenaesterol.....	15 µg/g
Colesterol.....	10 µg/g
Stigmasterol.....	2 µg/g
Delta 7 Avenaesterol.....	0.8 µg/g
Testosterona.....	0.012 µg/g

Tabla 2.- Composición lipídica de la jalea real. Datos tomados de Takenaka, 1984, Brow *et al.*, 1961, Lecker *et al.*, 1982; Vittek y Slomiany, 1984.

2. 5.- Principales consecuencias fisiológicas de la alimentación diferencial.

Hasta ahora ha sido reportado que ocurren tres principales diferencias fisiológicas entre ambas castas derivadas de su alimentación diferencial:

1) Hay un mayor porcentaje de ingestión de alimento y por consiguiente, más ganancia de peso en larvas de reinas con respecto a obreras. Al investigarse la proporción de ingestión de alimento con JR marcada con ^{32}P se encontró que a pesar de que les fue ofrecida la misma calidad y cantidad de alimento, las larvas consumieron diferentes proporciones del mismo. Los individuos que se desarrollaron en reinas consumieron 19% más alimento que los que se desarrollaron en obreras (Dietz y Lambremont, 1970). Aunque esto podría sugerir diferencias genéticas en la capacidad de ingesta de alimento, claramente muestra una relación directa entre el consumo de alimento y el desarrollo de características de reinas. Al finalizar el cuarto día de desarrollo la larva de reina pesa menos que la obrera, sin embargo, durante las siguientes 24 horas la reina sufre un crecimiento extraordinario que le permite alcanzar y rebasar en un 60 % el peso de las obreras (Wang, 1965, ver figura 4). Se ha demostrado que existe una relación positiva entre la concentración de azúcares en el alimento, con respecto al porcentaje de su ingesta y ganancia de peso en las larvas (Asencot y Lensky, 1976). Lo anterior podría explicar, al menos parcialmente, el hecho de que la JR (con más azúcares) induce un mayor consumo de alimento y por consiguiente, ganancia de peso. Sin embargo, este argumento por sí sólo, no explica porque la JR no induce mayor tamaño en las larvas de reina en los 4 primeros días de desarrollo larvario, lo cual sugiere que además de una nutrición más rica, se requiera la acumulación de otros factores.



CRECIMIENTO LARVAL DE HEMBRAS DE ABEJA

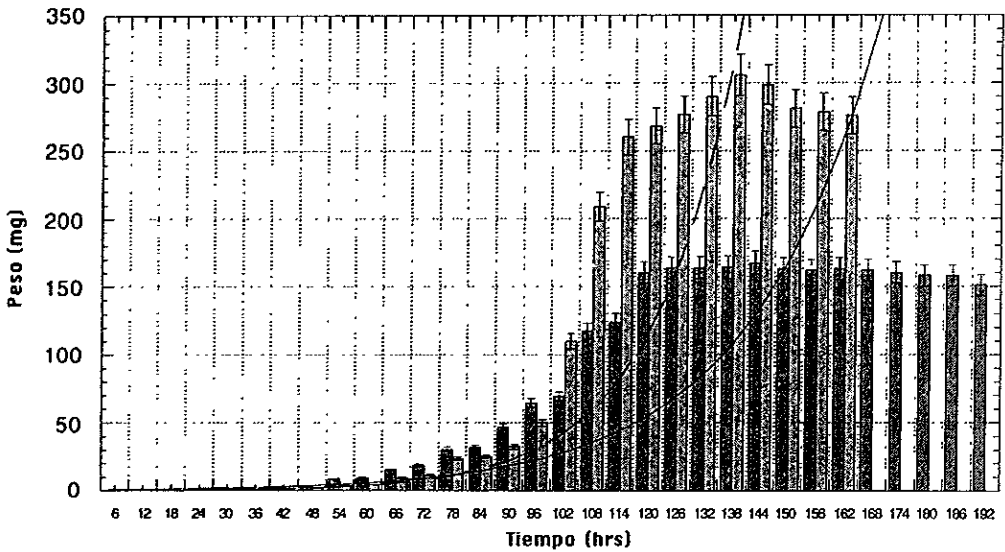


Figura 4.- Crecimiento de larvas hembras de la abeja *Apis mellifera*. Modificado de Wang *et al.*, 1965.

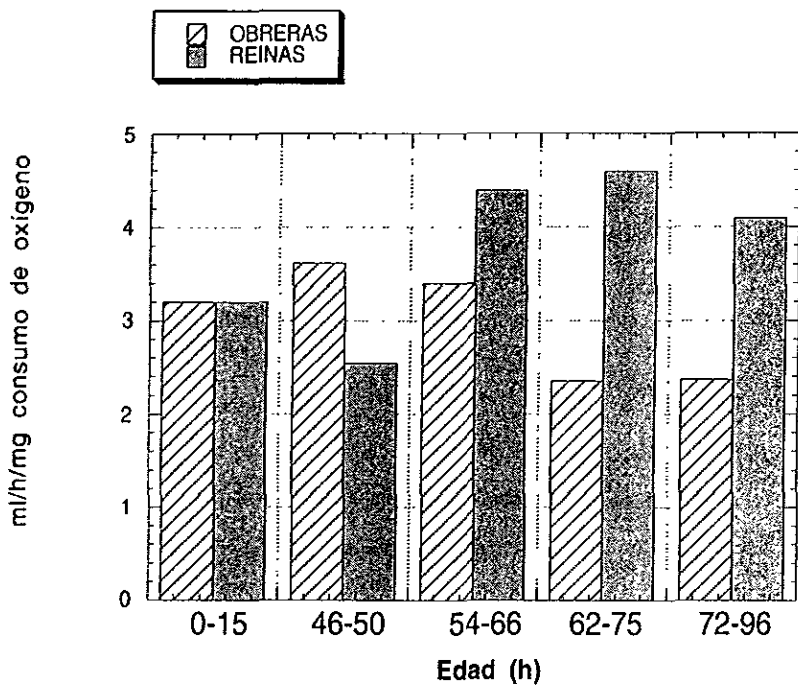


Figura 5.- Respiración en larvas hembras de abeja. Datos de Shuel y Dixon, 1968.

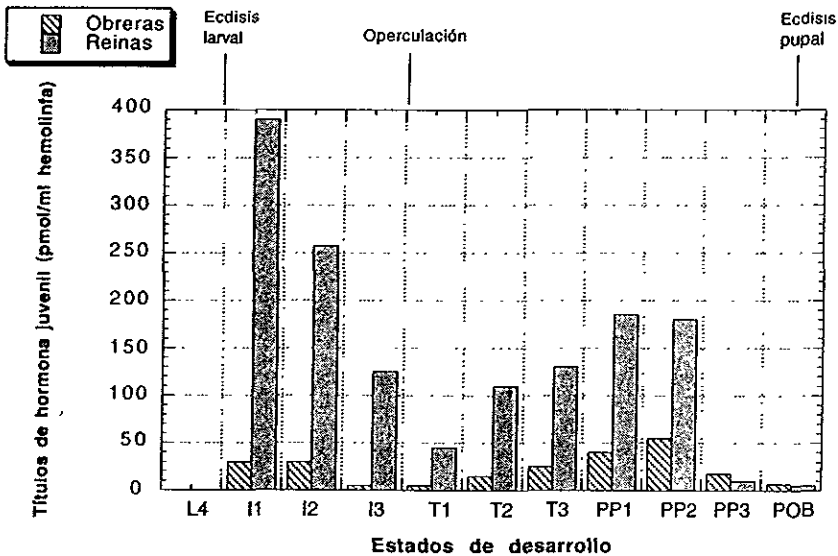


Figura 6.- Títulos de hormona juvenil en la hemolinfa de larvas hembras de abeja. L4 = larva cuarto instar. I = Ingesta, I1, I2, e I3, son diferentes estadios de larvas que son alimentadas. PP = prepupa, POB = pupa ojos blancos. Modificado de Rachinsky *et al.*, 1990.

2) En las larvas de reinas, hay un mayor metabolismo respiratorio, el cual es manifestado en un mayor consumo de oxígeno. Este aparece poco después de finalizar el segundo día de desarrollo larvario (50 h fase media del tercer instar) y continúa hasta el final del 4to día (inicio del quinto instar). La diferencia más grande en el consumo de oxígeno fue detectada al finalizar el tercer día (mitad del 4to. instar, ver figura 5). En este mismo estudio se encontró que la JR induce una mayor respiración tanto si es dada a una larva proveniente de una celda de obrera o de reina; en contraste la JO dada a larvas de reinas, reduce el incremento en el consumo de oxígeno (Shuel y Dixon, 1968). Estos datos indican una correlación directa entre la calidad del alimento y la actividad respiratoria.

3) Existe una diferencia importante en los niveles de la HJ entre las larvas de reinas y obreras. Dicha diferencia hormonal parece ser provocada por factores nutricionales, ya que la secreción de esta hormona es dependiente de la concentración de azúcares en el alimento ingerido por las larvas (Asencot y Lensky, 1976; Beetsma, 1979). La relación entre la concentración de azúcares en el alimento ingerido por las larvas y la secreción de HJ, podría explicar por qué la larva de reina desarrolla una *corpora allata* activa (glándula secretora de HJ) poco tiempo después de que es alimentada con JR, pero no cuando es alimentada con JO (Wirtz, 1973). Lo anterior muestra porque la larva de reina logra alcanzar mayores niveles de dicha hormona durante su desarrollo (Wirtz y Beetsma, 1972; Wirtz, 1973; Lensky *et al.*, 1978, Rembold 1987). La diferencia más importante en los niveles de la HJ entre ambas castas es encontrada al inicio del quinto instar, donde es detectada una concentración 15 veces mayor en larvas de reina con respecto a obreras (Rachinsky *et al.*, 1990, ver figura 6).

2.6.- Posibles funciones de la hormona juvenil en la determinación de castas.

La HJ está involucrada en múltiples procesos biológicos que ocurren durante el desarrollo de los insectos y de manera particular, cumple un importante papel durante la determinación de castas en los insectos sociales. Aunque se han sugerido algunas de sus posibles funciones, en general su mecanismo de acción es desconocido. En un esfuerzo por sistematizar la información hasta ahora reportada con respecto a la función de la HJ durante la determinación de castas, podemos resumir en tres sus principales funciones:

Posible inducción de crecimiento larval mediante activación del metabolismo respiratorio.

La hormona juvenil, que es inducida por la ingesta de alimento (Asencot y Lensky, 1976; ver rev. por Beetsma, 1979), podría tener la función de coordinar el estado nutricional de la larva (cantidad de alimento ingerido), con respecto a la activación de la maquinaria metabólica que permitiría la conversión del alimento en energía químicamente disponible (ATP). Esto podría explicar porque la JR con una mayor concentración de azúcares, no es suficiente para inducir un mayor crecimiento durante los primeros 4 días de desarrollo larvario, y sólo después de este momento, cuando los niveles de la HJ se han acumulado y son mucho mayores en larvas de reinas, es cuando se acelera de manera muy importante su crecimiento. Esta posible función de la HJ es apoyada por la observación de que la aplicación de HJ a larvas de obrera promueve una mayor ingesta de alimento y mayor peso antes de la pupación (245 mg), comparada con las larvas control (171 mg) (Asencot y Lensky, 1976) Así mismo, en otros

insectos sociales tales como las hormigas, la aplicación de análogos de HJ provocan que las larvas aceleren el crecimiento y esto resulte en un mayor tamaño al pupar (Brian, 1974).

Otra serie de datos que apoyan esta posible función de la HJ, provienen del estudio de esta hormona en otros insectos no sociales, donde de manera general, ha sido involucrada en la transferencia de sustancias de reserva y la utilización de ellas para producir la energía necesaria para permitir la síntesis de macromoléculas y el crecimiento de tejidos larvarios (L'Hélias, 1953; citado por L'Hélias, 1970; Locke, 1980). También la HJ parece actuar sobre el metabolismo de lípidos, ya que en insectos alactomizados (a los que se les extirpó la *corpora allata*) se observa que estos sintetizan lípidos pero no pueden utilizarlos como fuente de energía. (Thomsen, 1952; L'Hélias, 1954c; citados por L'Hélias, 1970). Además cuando se alactomizan larvas de *Carausius morosus* (insecto palo de la India, orden Orthoptera), hay una disminución en la síntesis de proteínas (L'Hélias, 1953; citado por L'Hélias, 1970) y de manera muy importante, una disminución del fosfato orgánico (L'Hélias, 1954a,b.; citado por L'Hélias, 1970).

De manera directa, la HJ ha sido involucrada en la inducción de la respiración. Por ejemplo, la extirpación de la *corpora alata* de larvas del 3er y 4to instar de *Carausius morosus* resulta en una reducción significativa en el consumo de oxígeno (Pflugfelder, 1940; L'Hélias, 1954c, Neugebauer, 1961; citados por L'Hélias, 1970); pero la inyección de extractos de HJ inducen de nuevo la respiración (Williams 1959; Gilbert y Schneiderman 1961; citado por L'Hélias, 1970). Una situación similar sucede cuando se les reimplanta la *corpora alata* a

hembras de *Pyrrhocoris* (un tipo de chinche, orden Hemiptera) alactomizadas (Slama y Hrubesova, 1963; Slama y Janda, 1965, citado por L'Hélias, 1970).

Función reproductiva.

En las abejas, la concentración de la HJ está relacionada con la protección de los ovarios, evitando que éstos sufran una degeneración regresiva (De Wilde, 1976; Ber-Lin Chai y Shuel, 1970). De aquí que las larvas de obreras sufren esta degeneración, pero no las reinas. Además, esto explica por qué en experimentos de trasplantes de larvas hay una relación directa entre el tiempo que permanece la larva en la celda real con respecto al número de ovariolos y el volumen de la espermateca que presentan las hembras al nacer (Woike, 1971); lo que muestra que la HJ además afecta otras estructuras relacionadas al sexo. Esta función de la HJ no es exclusiva de insectos sociales: en hembras de *Pyrrhocoris* alactomizadas, las células foliculares ováricas permanecen inactivas de manera indefinida, pero al reimplantarles la *corpora allata* se recupera la actividad folicular y la vitelogénesis (Slama y Hrubesova, 1963; Slama y Janda, 1965; citados por L'Hélias, 1970).

Inducción de características de reina.

La aplicación de HJ a larvas de obrera desde los 2 a los 4.5 días, ha demostrado de manera convincente que la HJ promueve el desarrollo de características de reina. (Shuel et al., 1978; Wirtz y Beetsma, 1972; Dietz et al., 1979). Dado el efecto inductorio de la JR sobre la secreción de HJ, se podría explicar porque cuando se hacen trasplantes de larvas de obrera hacia celdas reales, se van perdiendo las características morfológicas de reina a medida que se

transplantan larvas mayores. Evidencias adicionales, acerca del papel de la HJ en la generación de características de reina, así como su mecanismo de inducción por alimentos (azúcares) fueron obtenidos por Asencot y Lenski, (1976). Estos investigadores alimentaron larvas de obrera con diferentes cantidades de glucosa y fructosa (4%-20%) y encontraron que a medida que incrementaban la cantidad de azúcares, el porcentaje de alimento ingerido, peso ganado y desarrollo de características de reina fueron mayores: Con 4% de azúcares sólo obtuvieron obreras, pero con el más alto porcentaje de azúcares tolerado por las larvas (20%), obtuvieron 50% de reinas, 41% de intermediarias y 9 % de obreras. La inducción de características de reina de manera directamente proporcional a la cantidad de azúcares ingerida, probablemente se debe a la inducción de la secreción de HJ, que como hemos visto, también parece ser dependiente de la cantidad absoluta (lograda por calidad o cantidad) del alimento ingerido. Quizá no se logró obtener un 100% de reinas, debido a que no se indujo la secreción de HJ necesaria para lograrlo, ya que no se pudo incrementar la concentración de azúcares más allá del 20% (por las propiedades higroscópicas de la misma). Una posible confirmación de las anteriores suposiciones, y que además destaca la función de la HJ, fue obtenida cuando Asencot y Lensky lograron 50% de reinas y obreras al aplicar 1 μg de HJ a larvas de obrera alimentadas con JO adicionada con 4% de Glucosa y fructosa. Al incrementar la concentración de HJ aplicada hasta 10 μg , finalmente se logró obtener un 100% de reinas.

Otro experimento muy importante para demostrar la influencia determinante de la HJ en la generación de características de reina, proviene del trabajo de Wirtz y Beetsma (1972). Estos investigadores demostraron que cuando es inyectado 1 μg de HJ a larvas de obrera de 3.5 días de desarrollo, se desarrollan individuos

con características morfológicas y tiempo de desarrollo de reina (16 días), aunque con el tamaño de una obrera. En otros insectos sociales, también se ha demostrado que la HJ es fundamental para la inducción de características de reinas (ver revisión por Brian, 1979).

· 2.7.1- Introducción al estudio de los receptores nucleares

El control diferencial de la expresión genética es un tema central de la biología molecular. Debido a su propiedad de difundir a través de las membranas biológicas, las hormonas lipofílicas son candidatos ideales para servir como reguladores en este proceso. Estas hormonas incluyen tanto esteroides (glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona, andrógenos, estrógenos), como no esteroides (retinoides, hormonas tiroideas, la vitamina D, y sesquiterpenos). Estas hormonas fueron aisladas a inicios de este siglo, en base a sus efectos fisiológicos y a su capacidad de afectar el desarrollo, la diferenciación y la metamorfosis. Posteriormente, el desarrollo de ligandos radioactivos permitió la identificación de sus receptores proteicos, los cuales mostraron que se traslocaban del citoplasma al núcleo, de allí que se les diera el nombre genérico de receptores nucleares (RN), (para revisión, ver Mangelsdorf *et al.*, 1995). Adicionalmente, en la década de 60s fue notado que varios de los cambios morfológicos y fisiológicos observados en los renacuajos después de la administración de la hormona tiroidea, fueron precedidos por transcripción de RNA (Tata, 1963,1965,1966), lo cual sugiere que este tipo de hormonas actúa directa o indirectamente en el núcleo activando la transcripción genética.

Posteriormente Ashburner (1974), demostró que los ecdisteroides, las hormonas metamórficas de los insectos, disparan la descondensación de sitios

específicos ("puffs") en los cromosomas politénicos de *Drosophila*. Posteriormente se identificaron unidades transcripcionales activadas por dichas hormonas y se identificaron algunos de los sitios de unión (elementos de respuesta a hormona, HREs, sei) de complejos hormona-receptor dentro de la región promotora de estos genes. El conjunto de estos datos (revisados por Yamamoto, 1985) originaron el modelo clásico de acción de las hormonas lipofílicas sobre los RN. En este modelo, se propone que la unión de la hormona a su receptor induce un cambio alostérico. Dicha transformación capacita al complejo hormona-receptor para unirse a sitios de alta afinidad en la cromatina (HREs) y de esta manera, modular la transcripción. La clonación de los RN fue un prerequisite esencial para llegar a comprender las bases moleculares de este proceso.

2.7.2.- La cascada regulatoria de RN inducida por ecdisona al inicio de la metamorfosis en *Drosophila melanogaster*.

Diferentes pulsos de ecdisona inducen la expresión de RN en sitios específicos de descondensación (SEDs).

Durante el ciclo de vida de la mosca *Drosophila melanogaster*, tienen lugar diferentes variaciones en los niveles de la hormona esteroide 20-hidroxiecdisona (aquí referida como ecdisona), los cuales modulan las transiciones más importantes durante su desarrollo (para revisiones ver Oro *et al.*, 1992 Thummel, 1996). El pico más importante en los niveles de ecdisona tiene lugar al finalizar el tercer y último instar de desarrollo larvario (referido como pulso larval tardío), induciendo la formación del puparium. Este es seguido, alrededor de 10 horas después, por otro pulso de ecdisona (referido

como pulso de prepupa) que dispara la transición de prepupa a pupa (ver figura 7, pag. 31). Es importante remarcar que durante el período de prepupa, la mayor parte de los órganos larvales son destruidos y son sustituidos por tejidos adultos que se desarrollan a partir de los discos imagales. En otras palabras, en este período ocurre la mayor reprogramación genética en la vida del insecto, ya que se cambia de un transcriptoma de insecto a uno de adulto.

La visualización de los efectos de la ecdisona sobre los cromosomas politénicos a proporcionado información muy valiosa para elucidar los mecanismos moleculares de su acción. Los genes que se transcriben en los cromosomas politénicos son frecuentemente visualizados como “*puffs*” o puntos específicos de descondensación (SED) lo cual ofrece una magnífica oportunidad para observar los efectos de las hormonas esteroides sobre la expresión génica.

Cuando los cromosomas politénicos están lo suficientemente grandes para ser analizados (parte media del tercer instar), se observan aproximadamente 15 SEDs (llamados SEDs de intermuda). Estos sufren una regresión en respuesta a los altos niveles de ecdisona que disparan la formación del puparium; al mismo tiempo, otros 6 SEDs (llamados tempranos) son inducidos de manera transiente. Horas después, los SEDs tempranos sufren a su vez una regresión y ahora aparecen alrededor de 100 nuevos SEDs (llamados tardíos). Unos cuantos de los SEDs de intermuda son inducidos cuando los niveles de ecdisona decaen después de la formación del puparium; después, el pulso de ecdisona de prepupa reintroduce la secuencia de activación de los SEDs tempranos y tardíos (ver figura 7). Tanto el pulso de ecdisona de la parte final del tercer instar, como el pulso de ecdisona de la prepupa, inducen la aparición de varios de los mismos SEDs

tempranos y tardíos, sin embargo algunos de estos SEDs sólo son inducidos en un estado de desarrollo determinado.

Basado en las anteriores observaciones, Ashburner (1974), propuso un modelo para la regulación genética de los SEDs tempranos y tardíos inducidos por ecdisona. En dicho modelo el complejo ecdisona-receptor directamente induce a los SEDs tempranos. Las proteínas expresadas en estos SEDs tendrían dos funciones regulatorias opuestas: reprimirían su propia actividad, pero inducirían la activación de los SEDs tardíos. El modelo además propone que la ecdisona reprime directamente la actividad de los SEDs tardíos, previniendo de su inducción prematura por las proteínas de los SEDs tempranos.

Clonación y función de los receptores nucleares de *Drosophila*.

Cuando se propuso el modelo de Ashburner, en el laboratorio de Hoggness se empezó a realizar un esfuerzo encaminado a elucidar los mecanismos de acción de la ecdisona a nivel molecular. Estos esfuerzos iniciales condujeron a la clonación de los primeros genes de los SEDs de intermuda (Muskavitch *et al.*, 1980; Meyerowitz *et al.*, 1982) y los genes de los SEDs tardíos 4F y 71E (M. Wolfner, 1980, tesis doctoral Universidad de Stanford). La clonación molecular de los genes SEDs tempranos no fue lograda hasta que se desarrollaron las técnicas de caminado molecular o "*chromosomal walking*", lo cual permitió el aislamiento de los genes de *Drosophila* basándose únicamente en su localización citogenética (Bender *et al.*, 1983).

La caracterización molecular de los SEDs tempranos 2B5, 74EF y 75B condujo al aislamiento de los genes E74 y E75 del llamado complejo amplio o "*Broad complex*" (BR-C). De manera consistente con la función reguladora propuesta,

estos genes tempranos dirigen la síntesis de factores de transcripción. El BR-C codifica para una familia de proteínas con diferentes isoformas, cada una teniendo de uno a cuatro pares de dedos de zinc (dominio proteico que une DNA). Las proteínas E74A y E74B tienen en común un dominio idéntico de unión a DNA, mientras que las proteínas E75A, E75B y E75C son miembros huérfanos, (que no unen hormonas) de la superfamilia de los receptores nucleares (Burtis *et al.*, 1990; Segraves y Hogness, 1990).

Un paso importante en esta área se dio con la clonación de "*ultraspiracle*" (USP) en base a su similitud con el receptor de ácido retinoico (RXR) de vertebrados. (Oro *et al.*, 1990); así como con la clonación del receptor de ecdisona (EcR), usando como sonda al gene de E75 (Koelle *et al.*, 1991). Posteriormente se demostró que un heterodímero de los productos de estos dos genes constituían al receptor funcional de la ecdisona (Yao, *et al.*, 1992). Existen tres isoformas de EcR (Talbot *et al.*, 1993) y todas pueden funcionar como receptores después de heterodimerizar con USP (Koelle, 1992. Tesis doctoral, Universidad de Stanford). De manera interesante, se ha mostrado que estas isoformas son expresadas de manera tejido específico, con lo cual se abren nuevas perspectivas para poder investigar como es logrado la especificidad de la respuesta a ecdisona. (Talbot *et al.*, 1993).

Aunque el aislamiento de los genes E74 y E75 del BR-C se basó en su expresión en las glándulas salivales larvales, estudios posteriores han mostrado que estos genes son expresados ampliamente durante el desarrollo en otros órganos y tejidos y que su expresión correlaciona con las concentraciones de ecdisona (Thummel *et al.*, 1990). Estas observaciones fueron la base para el modelo de la coordinación tisular, en el cual se propone que existe una cascada regulatoria

disparada por ecdisona similar a la propuesta por Ashburner en las glándulas salivales larvales. De acuerdo a este modelo, combinaciones sobrelapantes de factores de transcripción tempranos, los cuales serían estado y tejido específicos, regularían a través del desarrollo a distintos grupos de genes de respuesta secundaria, los cuales al actuar a su vez sobre sus blancos, provocarían los efectos particulares de la ecdisona sobre los diferentes tejidos sensibles (Burtis *et al.*, 1990, Thummel *et al.*, 1990).

Concentración de ecdisona e inducción tisular estado específica de los receptores nucleares.

Aunque los SEDs tempranos son inducidos al final del estado larval, los transcritos de Br-C EcR y E74B pueden ser detectados desde un día antes (fase media tercer instar). Al llegar la parte final del tercer instar, los transcritos de EcR, E74B son reprimidos, al tiempo que es inducido E74A (ver figura 7 y 8A). Para explicar cómo ocurren estos patrones de expresión, se ha propuesto un modelo que se basa en estudios de respuesta a ecdisona en órganos larvales en cultivo (Karim y Thummel 1991, 1992). Los promotores de Br-C, EcR y E74A son los más sensibles a ecdisona respondiendo a un umbral de concentración crítica de 2×10^{-9} M. En contraste, es requerida una concentración 10 veces mayor de hormona para reprimir la transcripción de EcR y E74B e inducir la de E74A. En combinación con los datos de concentración hormonal disponibles, estos patrones dosis-respuesta sugieren que una baja concentración de ecdisona en la fase temprana del tercer instar larval inducen la transcripción de Br-C, EcR y E74B (Andres *et al.*, 1993), (ver figura 8A). El pulso larval tardío de ecdisona es de la suficiente magnitud para reprimir al EcR y E74B, inducir E74A y además inducir al BR-C.

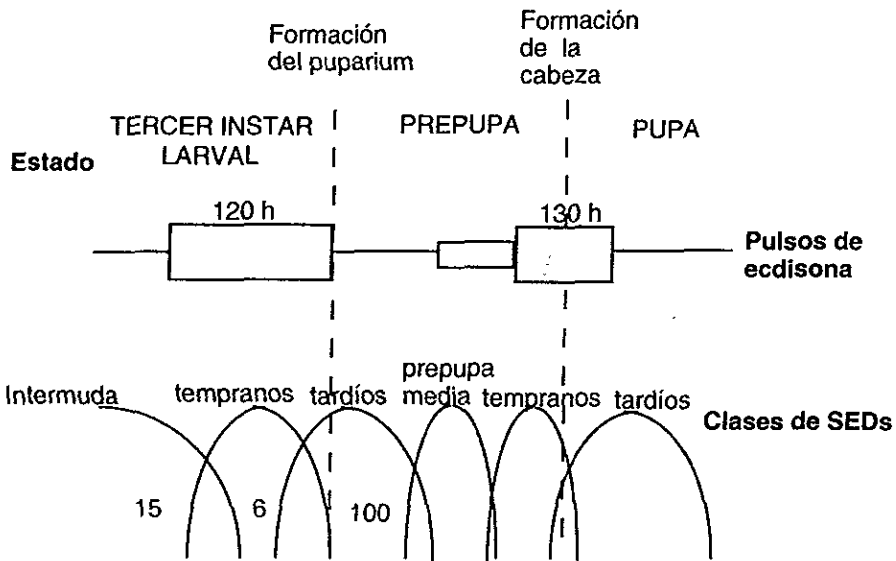


Figura 7.-Regulación por ecdisona de los SEDs (sitios específicos de descondensación) en los cromosomas politénicos de *Drosophila*. Los magnitud de los pulsos de ecdisona se representa de acuerdo con el grosor de la barra blanca con puntos negros. Modificado de Thumel, 1996.

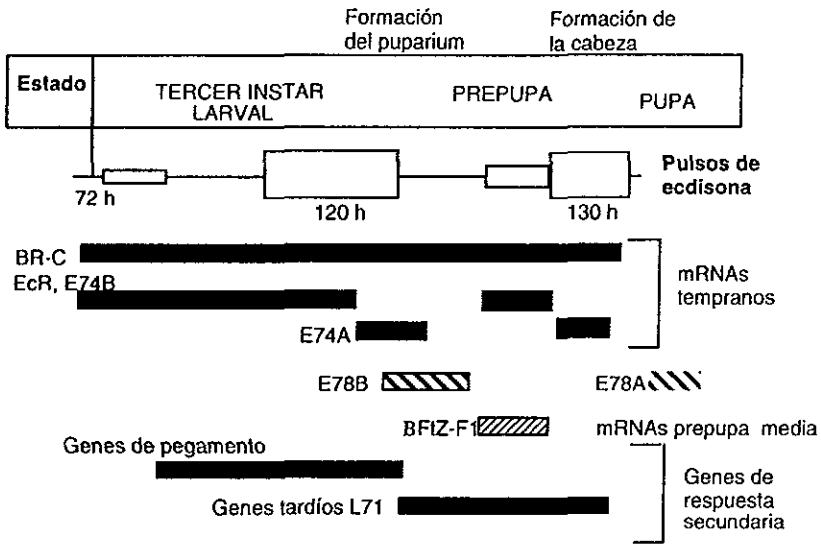


Figura 8A.- Patrón temporal de expresión de los genes regulados por ecdisona durante la metamorfosis. La magnitud de los pulsos de ecdisona se representa de acuerdo con el grosor de la barra blanca con puntos negros en la parte superior. Modificado de Thummel, 1996.

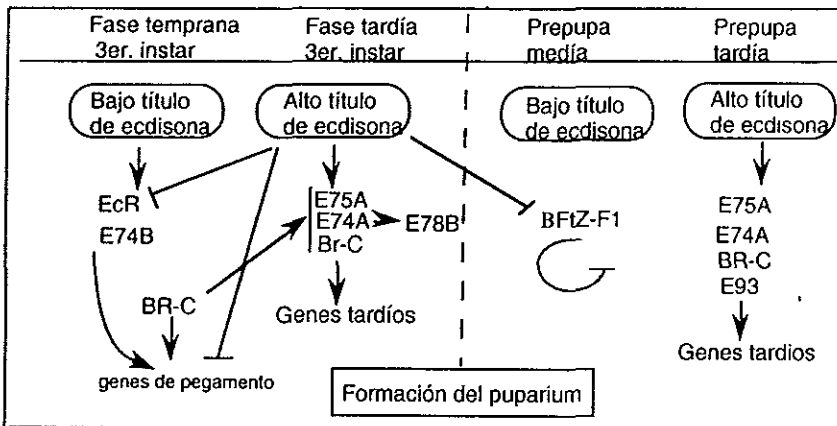


Figura 8B.- Las múltiples cascadas regulatorias inducidas por ecdisona dirigen la puesta en marcha del proceso de la metamorfosis. Esta figura resume algunas de las interacciones regulatorias discutidas en el texto. Modificado de Thummel, 1996.

E78B y E78A son dos unidades transcripcionales de un gen temprano-tardío inducible por ecdisona. E78B es una isoforma truncada de RN que carece de región de unión a DNA, la cual se expresa en la fase tardía del tercer instar (figura 8B). Se ha demostrado, mediante experimentos realizados con órganos larvales en cultivos, que E78B es un transcrito de respuesta primaria a ecdisona verdadero, ya que puede ser inducido por esta hormona aún en ausencia de síntesis de proteínas. No obstante, a diferencia de otros genes tempranos, E78B requiere de la síntesis de otras proteínas para su máximo nivel de transcripción. De esta manera, el retardo en la inducción de este gen puede ser atribuida al requerimiento de una o más factores de transcripción tempranos inducidos por ecdisona (Stone y Thummel, 1993). De acuerdo con este modelo, en contraste con el Br-C, estos factores de competencia generan un retraso en la inducción de E78B, debido a que no se encuentran presentes con anterioridad en el tejido.

Los RN no solo pueden dar competencia a la respuesta por ecdisona. Otros RN como DHR 38 (Sutherland *et al.*, 1995) y DHR78 (también llamado XR78E/F) la inhiben. Se ha demostrado *in vitro*, que este RN compite directamente contra el receptor de ecdisona por los sitios de unión al DNA. Puesto que los niveles de este transcrito se incrementan en el 3er instar y su expresión es sólo ligeramente influenciada por ecdisona, es posible que DHR78 pueda contribuir a la regulación de la cascada transcripcional inducida por esta hormona. Bajo este modelo, DHR78 podría actuar amortiguando la respuesta a cualquier fluctuación prematura en los títulos de ecdisona. Esto permitiría la adecuada expresión temporal y espacial de los genes inducidos por esta hormona (Zelhof *et al.*, 1995).

3.0.- OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es la identificación de mRNAs que son preferencialmente expresados en larvas de reinas con respecto a obreras. Con la identificación de estos transcritos, esperamos encontrar alguna pista de cómo funcionan algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de determinación de castas en insectos sociales en general y en abejas en particular.

4.0.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Material Biológico. Abejas

Todas las muestras colectadas fueron obtenidas de colonias de la abejas europeas *Apis mellifera ligustica*, mantenidas libres de cruzamientos de abejas africanas (*Apis mellifera adansoni* y *A.m. capensis*) en apiarios mantenidos en el estado de Morelos en un clima de templado a seco.

Colecta de larvas antes de la operculación.

Las larvas de reinas y obreras de menos de 2 días fueron colectadas de acuerdo a la fecha probable de eclosión de sus huevos, con un error experimental máximo de 12 horas (no fueron pesadas por limitaciones técnicas). Después de este tiempo y hasta la operculación, se tomó en consideración el peso de las larvas como un criterio adicional para una mayor precisión en la asignación de edad. En el caso de las reinas, los datos obtenidos de edad-peso fueron similares a los reportados por Wang (1965), (ver tabla 1). En el caso de las obreras, sólo fueron similares hasta antes del tiempo de operculación de las celdas (aproximadamente 4 días con 18 h).

3.0.- OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es la identificación de mRNAs que son preferencialmente expresados en larvas de reinas con respecto a obreras. Con la identificación de estos transcritos, esperamos encontrar alguna pista de cómo funcionan algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de determinación de castas en insectos sociales en general y en abejas en particular.

4.0.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Material Biológico. Abejas

Todas las muestras colectadas fueron obtenidas de colonias de la abejas europeas *Apis mellifera ligustica*, mantenidas libres de cruzamientos de abejas africanas (*Apis mellifera adansonii* y *A.m. capensis*) en apiarios mantenidos en el estado de Morelos en un clima de templado a seco.

Colecta de larvas antes de la operculación.

Las larvas de reinas y obreras de menos de 2 días fueron colectadas de acuerdo a la fecha probable de eclosión de sus huevos, con un error experimental máximo de 12 horas (no fueron pesadas por limitaciones técnicas). Después de este tiempo y hasta la operculación, se tomó en consideración el peso de las larvas como un criterio adicional para una mayor precisión en la asignación de edad. En el caso de las reinas, los datos obtenidos de edad-peso fueron similares a los reportados por Wang (1965), (ver tabla 1). En el caso de las obreras, sólo fueron similares hasta antes del tiempo de operculación de las celdas (aproximadamente 4 días con 18 h).

Colecta de larvas y pupas después de la operculación.

La estimación de la edad de larvas después de la operculación fue realizada, tomando en consideración como referencia: 1) el tiempo probable de eclosión, 2) el tiempo después de la operculación 3) caracteres morfológicos, 4) el peso, 5) en el caso de las larvas, el estado de avance en el tejido del capullo.

En el caso de las reinas, la relación edad-peso fue de nuevo similar a la reportada por Wang (1965) (ver tabla 1) y fue un factor utilizado en la asignación de edad únicamente a los 4 días y 18 horas. Después de este tiempo, debido a la poca diferencia en el peso esperado de las muestras, este factor fue considerado secundario para la asignación de edad. En el caso de las obreras, aunque el peso de las larvas fue menor al reportado por Wang, el peso fue tomado como criterio de asignación de edad hasta los 5 días (tabla 2).

Las pupas de obreras y reinas fueron colectadas de acuerdo al grado de pigmentación de los ojos y tórax, pudiéndose distinguir de acuerdo a este criterio 8 diferentes estadios (tabla 3). No obstante la probable utilidad de la anterior clasificación, para los fines de este trabajo y debido a la abundancia de muestras por analizar, fueron resumidos en tres los principales estadios de la pupa. Estos son: pupas ojos blancos, ojos rojos y ojos oscuros.

Finalmente, en el caso de las reinas, con el fin de evitar la utilización de individuos que se desarrollen en intercastas, no fueron colectados individuos que aún y cuando presentaran las características morfológicas de acuerdo a la edad estimada, fueran de un peso significativamente menor al esperado. De esta forma, después de la operculación, no fueron colectadas larvas o pupas de un peso menor a 225 mg.

REINAS

DIAS	HORAS	PESO (mg)	ESTADIO
2.00	48	2.23	3er instar
2.25	54	3.53	3er instar
2.50	60	4.40	4to.instar 1
2.75	66	9.47	4to.instar 2
3.00	72	11.5	4to instar 3
3.25	78	23.5	4to.instar 4
3.50	84	25.5	5to.instar 1
3.75	90	32.3	5to.instar 2
4.00	96	49.8	5to instar 3
4.25	102	110.1	5to.instar 4
4.50	108	208.9	Operculación
4.75		260.1	Extendida 1
5.00	120	268.2	Extendida 2
5.25	126	276.7	Extendida 3
5.50	132	290.3	Extendida 4
5.75	138	306.9	Extendida 5
6.00	144	298.8	Prepupa 1
6.25	150	281.1	Prepupa 2
6.50	156	278.5	Prepupa 3
6.75	162	276.1	Prepupa 4

Tabla 3. Porcentaje de crecimiento de larvas de reina. Modificado de Wang (1965).

OBRERAS

DIAS	HORAS	PESO mg	ESTADIO
2.00	48	3.3	3er instar 1
2.25	54	8.6	3er instar 2
2.50	60	9.5	4to. instar 1
2.75	66	15.4	4to instar 2
	72	18.5	4to instar 3
3.00			
3.25	78	30.4	4to. instar 4
3.50	84	21.8	5to instar 1
3.75	90	46.8	5to instar 2
4.00	96	64.4	5to instar 3
4.25	102	69.3	5to. instar 4
4.50	108	117.4	5to instar 5
4.75	114	123.9	5to instar 6
5.00	120	160.2	operculacion
5.25	126	163.7	
5.50	132	163.9.	
5.75	138	164.1	
6.00	144	167.5	prepupa 1
6.25	150	163.0	prepupa 2
6.50	156	161.6	prepupa 3
6.75	162	162.9	prepupa 4
7.00	168	162	Prepupa 5
7.25	174	160	Prepupa 6
7.50	180	158.9	Prepupa 7
7.75	186	157.9	Prepupa 8
8.00	192	151.5	Pupa 0

Tabla 4. Porcentaje de crecimiento de larvas de obrera. Modificado de Wang (1965).

<u>Estadio</u>	<u>Ojos</u>	<u>Tórax</u>
Pupa uno	Blanco	Blanco
Pupa dos	naranja	Blanco
Pupa tres	rojo	Blanco
Pupa cuatro	oscuro	Blanco
Pupa cinco	oscuro	Crema
Pupa seis	oscuro	Café claro.
Pupa siete	oscuro	Café oscuro
Pupa ocho	oscuro	Oscuro

Tabla 5.- Clasificación de pupas de reinas y obrera en base a la pigmentación de ojos y tórax.

4.2.- Adaptación de una técnica para purificación de RNA.

La extracción del RNA se realizó mediante una modificación de la técnica de reportada por Chirgwin *et al.*,(1979), cuya principal diferencia es una precipitación selectiva inicial con urea 6M/LiCl 3M, la cual elimina una parte importante de DNA.

Procedimiento

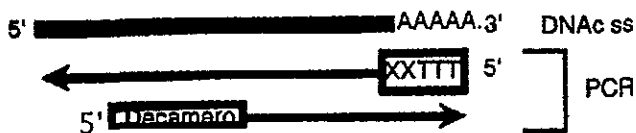
Las larvas fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas hasta polvo, el cual fue transferido a un homogeneizador donde fue agregado 1 ml de una solución de Urea 6M/LiCl 3M y mezclado. Dicha mezcla fue precipitada a -70°C cuando menos 3 horas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 10 m a 4°C y 12000 g, mantenidas en hielo y el sobrenadante decantado. En el

sobrenadante queda la mayor parte del DNA y el RNA precipitado en el fondo del tubo. La pastillas fueron resuspendidas en 0.75 µl de sol. D (Tiocianato de guanidina 4M; Citrato de Na pH 7 25 mM; sarcosil 0.5; β-mercaptoetanol 0.1M) y 75 µl Acetato de Na 2M pH 4 para 100 mg de tejido y extraídas con un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Después, de dejar en hielo 15 m (hasta ver dos fases), y centrifugar a 12000 g a 4°C durante 10 m, la fase acuosa superior, fue transferida a otro tubo y precipitada con 1 volumen (750 µl) de isopropanol (2-propanol) durante 1 hora a -20°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados durante 15 m a 4°C y 12000g, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con etanol al 70%. Finalmente, la pastilla fue secada ligeramente y resuspendida en H₂O tratada con DEPC.

4.3.- Adaptación de la técnica de RNA-Differential Display PCR (RNA-DD PCR).

El RNA fue extraído de larvas de 4.5 días y tratado con 10 unidades de inhibidor DNAasa libre de RNasas (Boehringer Mannheim) por 30 m. La técnica de RNA display utiliza oligonucleótidos poli T con dos bases adicionales en el 3' (T11NN) y decámeros al azar para la amplificación de fragmentos diferencialmente expresados entre dos muestras (células, órganos, u organismos). Este método fue realizado como fue descrito originalmente por Liang y Parde, 1992 y Liang *et al.*, 1993 Los oligonucleótidos sintéticos fueron adquiridos de OPERON technologies (ver figura 9).

RNA DD-PCR



PAGE 6% , 8 M UREA

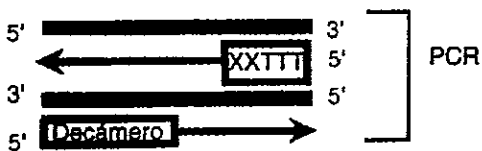
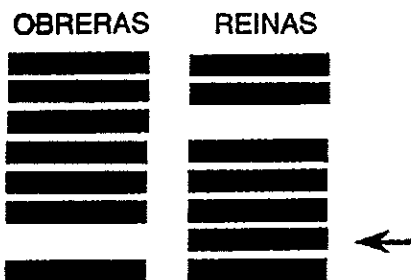


Figura 9.- RNA diferencial display PCR (RNA DD-PCR). Ver detalles en el texto.

4.4.- Implementación de una técnica de “Rapid Amplification of cDNA Ends” (RACE).

Debido al pequeño tamaño de los fragmentos generados por RNA-DD PCR, decidimos utilizar la técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) para obtener una extensión de dicho fragmento que nos permitiera 1) identificar si presenta homología con alguna secuencia reportada y 2) utilizarlo con mayores posibilidades de éxito como probador para aislar la clona completa de un banco de cDNAs. Debido a que con la técnica originalmente descrita, encontramos dificultad para la extensión de fragmentos, implementamos una modificación de dicha técnica que a continuación se describe:

La técnica de RACE es una poderosa herramienta para la extensión de cDNAs originalmente descrita por Frohman *et al.*, (1990). En general, después de la amplificación por RACE, aparece barrido de aproximadamente el tamaño esperado de donde frecuentemente es difícil aislar el fragmento de interés. Hemos realizado algunas modificaciones en esta técnica las cuales permiten una amplificación más eficiente de los fragmentos extendidos hacia el 5' y una sustancial reducción en el número de fragmentos amplificados durante el PCR. Esto ha sido particularmente útil en la extensión de fragmentos de cDNAs generados a partir de RNA DD PCR (Liang y Pardee, 1992). Las principales modificaciones introducidas son el uso de los oligonucleótidos poli T utilizados en el RNA-DD PCR (ver figura 10). Estos oligonucleótidos contienen dos nucleótidos diferentes en el extremo 3', lo cual conduce a que cada oligonucleótido amplifique sólo un subgrupo de la población de cDNAs. Para cubrir toda la población de cDNAs, en lugar de utilizar 12 oligonucleótidos con todas las combinaciones posibles en las dos últimas bases, sólo son necesarios 4 oligonucleótidos variando cada uno sólo en la última base 3' (Liang, *et al.*, 1993).

PROTOCOLO MODIFICADO DE RACE 5'

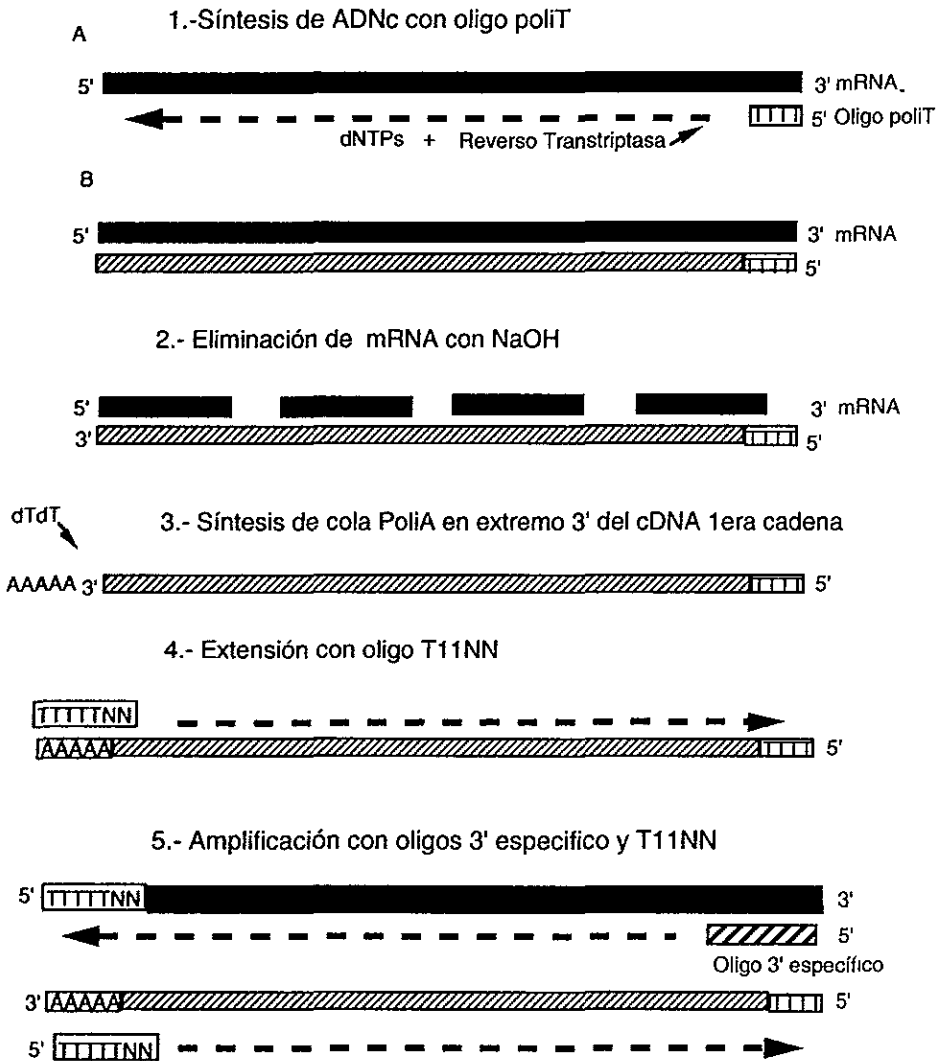


Figura 10.- Esquema de una variante de la metodología de extensión rápida de extremos de cDNA (RACE, por sus siglas en inglés).

Otra importante diferencia de nuestro método con respecto al original, es que mientras que en este último se utiliza un oligonucleótido específico para la primera amplificación y un segundo oligonucleótido más interno para la reamplificación; nosotros sólo utilizamos un oligonucleótido específico para ambas amplificaciones. Independientemente del ahorro en tiempo y dinero, este método es extremadamente útil en aquellos casos en los que sólo se conoce un segmento limitado de la secuencia de un gen .

Reacción de síntesis de la primera cadena en un volumen final de 20 μ l, fueron incubados 1-2 μ g de RNA total en el "buffer" de la primera cadena (5 mM Tris-HCl; 75 mM KCl; 0.3 mM $MgCl_2$), 0.5 mM dNTPs, 2 mM de Oligo dT₁₅ y 20 unidades de inhibidor de RNasa (Stratagene Inc.) por 5 m a 65°C. Posteriormente, fueron agregadas 200 unidades de reverso transcriptasa MMV (GIBCO, BRL) y 10 mM DTT. La reacción fue incubada 1 h a 38°C .

Reacción de la Transferasa Terminal . La reacción de la primera cadena fue llevado a 100 μ l con agua y extraído con un volumen de cloroformo- alcohol Isoamílico (24:1). Posteriormente, el RNA fue hidrolizado agregando 20 μ l (1/5 volumen) de 2M NaOH, 2 mM EDTA (ácido etilendinitrilo, tetracético) e incubándolo por 5 m a 37°C. Posteriormente el cDNA fue precipitado a -70°C después de agregar 50 μ l de 7.5 M de acetato de amonio, 1 μ l de glucógeno (20 mg/ml) y tres volúmenes de etanol absoluto. Las muestras fueron centrifugadas por 15 m a 12000 g, lavadas con etanol al 70% , secados al aire y resuspendidas en 7 μ l de agua. El cDNA fue incubado con 4 μ l del 5X "buffer" de la reacción (GIBCO, BRL), (1.5 mM $CoCl_2$, 6.5 mM dATP) y 50 unidades de transferasa terminal en un volumen de 20 μ l. La reacción fue incubada a 37°C por 15 m (con lo que se espera la incorporación de 75-125 adeninas en el extremo 5' del cDNA) y entonces inactivada a 65°C por 15 m.

Primera amplificación. Se realizaron reacciones individuales para cada uno de los 4 oligo-dTNN. Fueron utilizados 2 μ l de la reacción de transferasa terminal para la reacción de amplificación que incluyó: 1X "buffer" de la reacción de la polimerasa (0.1 mM Tris-HCL; 0.15 mM MgCl₂; 50 mM KCl; pH 8.3), 0.2mM dNTP's, 2.0 μ M del oligo-dT₁₅NN y 0.2 μ M del oligonucleótido específico en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: un ciclo a 95°C/5 min (*hot start*). 30 ciclos a 94°C/50 s.; 47°C/2 min; 72°C/3 min y un tiempo final de elongación de 72°C/5 min.

Debido a que los productos de la primera amplificación no son abundantes y dado que aproximadamente 1/4 del total de los mensajeros son también amplificados (aunque de forma aritmética y no exponencial), se requiere reamplificar los productos obtenidos en la primera reacción. Las condiciones de este segundo PCR son similares a las del primero, y sólo se reemplaza el templado. Para mayor seguridad de identificar el producto deseado, los productos de la reamplificación fueron hibridados con un oligonucleótido interno. Es remarcable el hecho. que con esta técnica de RACE modificado, fuimos capaces de extender un fragmento que contenía 79% de A/T (un porcentaje inusualmente alto en un gen no codificado en mitocondria). Por lo tanto, dada la alta probabilidad de apareamientos inespecíficos con los oligonucleótidos poli-dT utilizados como "primers", es notoria la especificidad lograda con nuestra metodología (ver figura 11).

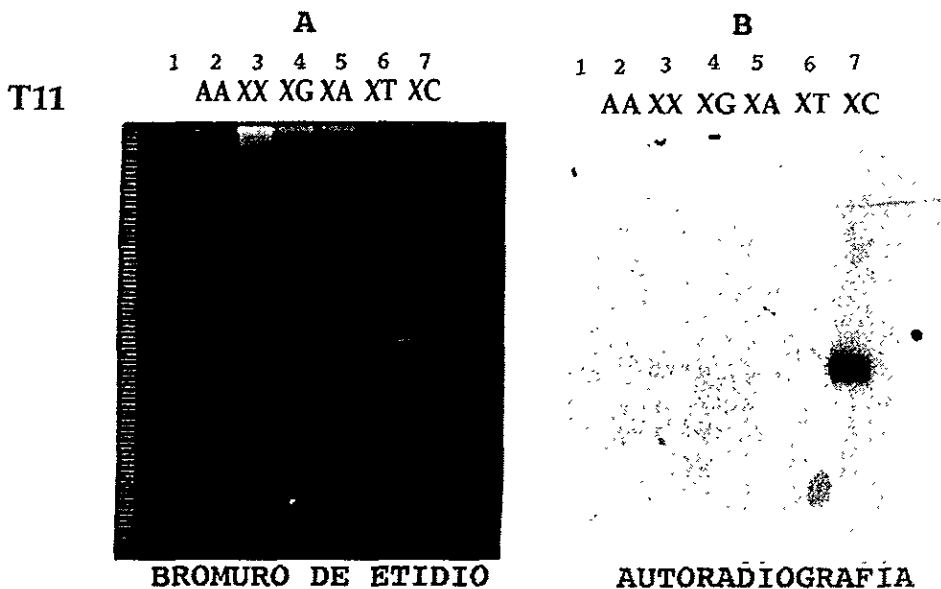


Figura 11.- Productos amplificados con una variante de la metodología de RACE-PCR para la extensión hacia el extremo 5' del fragmento 1. **Panel A.-** Productos cargados en un gel de agarosa al 1.5%. Carril 1, marcador de peso molecular pBR 322 *Hinf1*; carril 2, productos amplificados con un oligonucleótido reverso específico (ORE) y oligonucleótido T11AA; carril 3, ORE y T11NN, (N= cualquier base); carril 4, ORE y T11NG; carril 5, ORE y T11NA; carril 6, ORE y T11NT; carril 7, ORE y T11NC. **Panel B.** *Southern blot* del gel mostrado en A. Se utilizó como sonda el fragmento 1. En el carril 7, se observa la señal de hibridación de un fragmento de alrededor de 600 pb.

4.5.- Elaboración de un banco de cDNA y búsqueda de cDNAs específicos.

Elaboración de un banco cDNA

La elaboración del banco se realizó utilizando el “Zap-cDNA Synthesis Kit” y el extracto de empaquetamiento “Gigapack III Gold” de Stratagene, siguiendo las instrucciones del manual. De manera muy resumida, fueron utilizados 5 µg de RNA poli A de reinas de 4 días 10-18 h (antes, durante y después de la operculación) para transcribirlos reversamente utilizando como “*primer*” un oligonucleótido conteniendo una secuencia poli T y un sitio *XhoI* hacia el 5'. Durante la síntesis de la segunda cadena, se utilizó RNAsa H para introducir mellas en el RNA unido a la primera cadena y de esta manera generar fragmentos para primar la síntesis de DNA por la DNA pol I. Después de rasurar los extremos, pegarles adaptadores con sitios de *EcoRI* y digerir con *XhoI*, se procedió a ligarlos en el vector Lambda Uni-ZAP XR de Stragene, para finalmente empaquetarlos con extractos de proteínas de la cápside. De esta manera, fueron obtenidas alrededor de un millón de recombinantes. El banco fue entonces amplificado lográndose obtener un título de 1.8×10^9 UFP/ml.

Búsqueda de clonas en el banco.

La búsqueda (tamizado) en el banco, fue realizada utilizando como probador un fragmento de 600 pb inicialmente amplificado por RNA-DD y después extendido por RACE. La búsqueda fue realizada sobre 2×10^5 UFP utilizando una temperatura de hibridación de 42°C y siguiendo las demás condiciones recomendadas en el manual de Stratagene. En esta búsqueda fueron aisladas dos clonas positivas independientes.

4.6.- Secuenciación y Análisis de IF-2_{mt}.

La secuenciación de ambas clonas se realizó utilizando el *Thermo Sequenase Kit* (Amersham Life Science). Los análisis de las secuencias fueron realizados usando el paquete de programas de cómputo Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG) , Madison, Wisc.

4.7.- Adaptación de una metodología para la elaboración de cDNA y RT-PCR.

El RNA total fue aislado utilizando el protocolo previamente descrito. La fracción poli A fue purificada usando una columna de oligo-dT-celulosa (Boehringer Mannheim) siguiendo las indicaciones descritas por Sambrook et al., (1989). La reacción de síntesis de la primera cadena fue realizada utilizando 200 ng de poli A+ RNA con 1X "buffer" de la primera cadena (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0.01 mM DTT, 200 U de M-MLV transcriptasa reversa (GIBCO-BRL), 0.5 mM dNTPs, 2 mM Oligo dT₁₅. 20 U Inhibidor de RNAsa (Boehringer Mannheim) en un volumen final de 20 µl. La mezcla fue inicialmente incubada a 65°C por 5 min y luego 45°C durante el mismo tiempo, sin DTT ni enzima, los cuales fueron agregados después de bajar la temperatura a 38°C. Dicha temperatura de incubación fue mantenida durante 1 hora. Para la amplificación por PCR, fue utilizado 1 µl de la reacción de la primera cadena, 1X "buffer" de la reacción de Taq polimerasa (0.1mM Tris-HCl; 1.5m MgCl₂; 50 mM KCl, pH 8.3; 150 mM dNTP's; 0.5 mM de cada oligonucleótido y 1.5 U de Taq polimerasa (Boehringer Mannheim). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en una máquina Perkin Elmer 2400.

Todas las reacciones de PCR fueron iniciadas en caliente (hot start) con el siguiente programa: 94°C por 3 min, 60°C por 5 min (adición enzima), 72°C 1 min (1 ciclo). La secuencia de cada par de oligonucleótidos utilizado en cada reacción de amplificación, son descritos a continuación, al igual que sus condiciones de amplificación. La posición de los oligonucleótidos es relativa a la primera base de la fase abierta de lectura (ORF).

Factor de elongación de la traducción citoplasmático 1a (EF-1a) .

(Walldorf y Hovemann, 1990), utilizado como control. Extensión del producto:

348 pb, secuencia del oligonucleótido Directo (D):

5'AAGATCGGTGGTATCGGTAAGT3' (posición de la secuencia, 763-784); "primer"

(iniciador) reverso (R): 5'GCAAGCGATATGAGCGGTGTG (posición de la secuencia,

1329-1309). Condiciones de PCR: 94°C/30s, 50°C/40s, 72°C/30-60 s. 30

ciclos.

Factor de iniciación de la traducción mitocondrial (este trabajo) :

Extensión del producto: 396 Pb. (D): ATCTTGAAGGTTTAGTGAAGG 3'(posición de

la secuencia: 1028-1049); (R): CTTTTATTTTAAACATTTTCTT 3'(posición de la

secuencia: 1424-1402). Condiciones de PCR: 94°C/30s, 50°C /40s, 72°C /30s,

30 ciclos

Citocromo C (cytc, nuclear) (Inoue, et al., 1985, Limbach, et al., 1985):

Extensión del producto 275 pb, (D): CARAARTGYGCNCARTGYCAYACN (posición de

la secuencia: 49-72) (R): TTNGA NGCYTGYTCRATRTA NGCDAT (posición de la

secuencia: 323-298). Condiciones de PCR: 94°C/30s, 55°C /40s, 72°C/ 30s, 35

ciclos.

Citocromo oxidasa c subunidad I (COX-I, mitocondrial). (Hall et

al.,1991), extensión del producto: 1044 pb., (D): TTAAGATCCCCAGGATCATG 3'

(posición de la secuencia: 115-134) (R): TGCAAATACTGCACCTATTG (posición

de la secuencia: 1158-1139). Condiciones del PCR: 94°C/30s, 50°C/40s, 72°C/60s, 30 ciclos.

4.8.- Cuantificación de DNA mitocondrial por hibridación en Dots blots.

El DNA total (nuclear y mitocondrial), fue obtenido de los diferentes estados de desarrollo de obreras y reinas utilizando el *"Nucleon ST Kit for soft tissue"* de Amersham Life Science. La concentración del DNA fue determinada por espectrofotometría y visualización en geles de agarosa. Para la realización de la hibridación en *"Dot blots"*, fue aplicado 1 µg de este DNA a una membrana Hybond N+ nylon (Amersham Life Science) utilizando un aparato Minifold (Schleicher and Schuell).

Para determinar el número relativo de genomas nucleares fue utilizado como probador un fragmento de 348 pb del cDNA de EF-1α, de igual manera, para la cuantificación de genomas mitocondriales fue utilizado un fragmento de 1044 pb de COX-I. En ambos casos, la membrana fue prehibridada a 40°C por 4-8 h en 50% formamida, 5X SSC, 5X Denharts, 0.5 % pirofosfato de sodio más 100 mg/ml de DNA de timo de ternera sonificado e hibridados por 8 h a 40 °C en una solución similar pero con 0.1% SDS. El lavado de los filtros fue realizado en 0.2 X SSC, 0.2% SDS a 50°C y 60°C por 20 min en cada ocasión. Entre una y otra hibridación, la membrana fue hervida en 0.5% SDS por 30 min. Los filtros radioactivos fueron expuestos utilizando películas X-AR con pantallas intensificadoras a -70°C por 24 h en el caso de COX-1 y 3 h en el caso de EF-1α.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL GENES BETWEEN QUEENS AND WORKERS DURING CASTE DETERMINATION IN THE HONEYBEE *APIS MELLIFERA*

MIGUEL CORONA, ENRIQUE ESTRADA AND MARIO ZURITA*

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, APDO-Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62250, México

*Author for correspondence (e-mail marioz@ibt.unam.mx)

Accepted 29 January; published on WWW 22 March 1999

Summary

The nourishment received by female honeybee larvae determines their differentiation into queens or workers. In this study, we report the first molecular analysis of differences that occur between queens and workers during the caste-determination process. RNA-differential display experiments identified a clone that encodes for a gene that is homologous to the nuclear-encoded mitochondrial translation initiation factor (AmIF-2_{mt}). Semi-quantitative analysis by reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) throughout honeybee development detected a higher level of expression of this gene in queen larvae than in worker larvae. Analysis of two other genes encoding mitochondrial proteins, cytochrome oxidase

subunit I (COX-I; mitochondrial-encoded) and cytochrome *c* (cyt *c*; nuclear-encoded) also showed differential expression of these two genes between queens and workers. In particular, the cyt *c* transcript is more abundant in queen larvae and throughout the metamorphosis of the queen. These results indicate that the higher respiratory rate previously documented in queen larvae is accomplished through a higher level of expression of both nuclear- and mitochondrial-encoded genes for mitochondrial proteins.

Key words: honeybee, *Apis mellifera*, caste determination, mitochondrial gene, gene regulation

Introduction

A particular feature of social insects is the phenomenon of caste determination which, since the eighteenth century, has been investigated by numerous researchers using, initially, the honeybee as a model (for reviews, see Weaver, 1966; Bettsma, 1979; Brian, 1979). Perez (1889) was the first to establish that the development of honeybee larvae to queen or worker is not due to genetic differences, but is regulated by the differential nourishment that the female larvae receive from the nurse bees. Queen larvae are nourished with royal jelly, a mixture of hypopharyngeal and mandibular gland secretions. In contrast, worker larvae are nourished with worker jelly formed at first as a hypopharyngeal gland secretion by the nurse bees and later, this diluted with honey and pollen (Jung-Hoffman, 1966).

Worker and royal jelly thus differ in chemical composition (Rembold, 1965). One of the most important differences between these types of food is the sugar concentration: royal jelly contains approximately 12% sugar (wet mass) while worker jelly contains only 4% sugar (Shuel and Dixon, 1959). In addition, nourishment quantity is also drastically different between queens and workers, since nurse bees visit a queen larva 1600 times compared with 150 times for worker larvae (Lindaver, 1952). Therefore, the nutrition that the queen and worker larvae receive is quantitatively and qualitatively different.

In general, three major consequences result from the differential nutrition between worker and queen larvae. First, at the early fifth instar (approximately 96 h of larval development), the worker larva is larger than the queen larva (Asencot and Lensky, 1976); however, by the end of the fifth day (approximately 120 h of larval development), the queen larva is approximately 60% heavier (Wang, 1965). Second, the queen larva has a higher metabolic rate, reflected in a higher rate of oxygen uptake starting at mid third instar (approximately 50 h of larval development) and reaching a maximum in the mid fourth instar (72 h) (Shuel and Dixon, 1968). Third, there are important differences in the levels of juvenile hormone between the two castes. It is known that juvenile hormone secretions of the corpora allata depend on the quality and quantity of the food ingested by the larvae (Bettsma, 1979; Wirtz and Bettsma, 1972). Juvenile hormone levels increase in queen larvae during the third to fifth instars, reaching a peak at early stages of the fifth instar, when they are 15 times higher than in worker larvae (Lensky et al., 1978; Rembold, 1987; Rachinsky et al., 1990).

Several physiological and biochemical approaches have been documented in the study of caste determination in the honeybee. However, no molecular strategies have been used in analyses

of this fascinating developmental problem. In this work, we report the first studies that describe some of the molecular differences that occur during the process of caste determination between queen and worker larvae in *Apis mellifera*. Using RNA-differential display (RNA-DD), we have isolated a cDNA that encodes the *A. mellifera* homologue of the mitochondrial translation initiation factor (AmIF-2_m). This transcript is significantly more abundant in queen larvae than in worker larvae throughout the fourth- and fifth-instar larval stages, but no significant differences are found during prepupal and pupal development. A similar set of expression analyses was performed with two other mitochondrial genes, cytochrome oxidase I (COX-I) and cytochrome c (cyt c); in both cases, differences in transcript levels were found between queens and workers, in particular for the nuclear-encoded cyt c gene. Our results indicate that, during the differentiation of queen bees, there is an increase in the activity of nuclear- and mitochondrial-encoded genes that play roles in different mitochondrial functions. The possible role of juvenile hormone in coordinating the respiratory status of the honeybee larva with its nutritional state, and the possible influence of larval size on the onset of the genetic-caste-specific program are discussed.

Materials and methods

Honeybees

Larvae, pupae and adults were collected from *Apis mellifera ligustica* colonies. The mass and age of the queen larvae were similar to those reported by Wang (1965). However, the mass of worker larvae was lower than the reported values, probably because of the age of the cells used in our study. In the case of larvae collected after cell sealing, the age (using as reference the eclosion and cell sealing time) and morphology of the individuals were considered. The age of pupae was estimated according to eye pigmentation levels, but in the case of queens, pupae of less than 225 mg were excluded.

RNA display

Total RNA was isolated from worker and queen larvae at 4.5 days of development using the method of Chirgwin et al. (1979). RNA was treated with 10 units of RNase-free DNAase (Boehringer Mannheim) for 30 min. RNA-differential display (RNA-DD) used for the amplification of cDNAs was performed with random decamers and an oligo-(dT) primer with two random bases at the 3' end (dT11 MNs). The display was performed as reported by Liang and Pardee (1992). Synthetic oligonucleotides used in the amplification reactions were purchased from Operon Technologies Inc.

RACE

Owing to the small size of the polymerase chain reaction fragments obtained during the RNA display experiments, we used a rapid amplification of cDNA ends modification (RACE) technology with 5'-oligo dT-NN primers (M. Corona and M. Zurita, unpublished results) for the 5' extension of the cDNAs obtained using RNA-DD (Frohman et al., 1988).

cDNA library construction and screening

Poly(A)⁺ RNA (5 µg) from queen larvae at 4.5 days of development was used for the construction of a cDNA library in the λZAP vector. This library was prepared using the ZAP-cDNA synthesis kit and the Gigapack II gold packing extract following the recommendations of the supplier (Stratagene). Approximately 6 × 10⁶ independent recombinants were obtained, and the library was then amplified to give 1.8 × 10⁹ plaque-forming units ml⁻¹. To screen the library, a 600 base pair (bp) cDNA RACE-amplified fragment from clone 1 was used as a probe in approximately 2 × 10⁵ plaque-forming units. Hybridization was performed following the protocol supplied by Stratagene. From this screening, two independent positive clones were isolated and characterized in further detail.

DNA manipulations and sequence analysis

All cloning procedures and Southern hybridizations were performed according to the methods of Sambrook et al. (1989). Nucleotide sequencing was performed using the thermo Sequenase kit (Amersham Life Science). DNA and protein sequence analyses were performed using the Gap and Pileup programs from the Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison WI, USA.

RT-PCR

Poly(A)⁺ RNA was purified using an oligo-dT-cellulose column (Boehringer Mannheim) following the protocols of Sambrook et al. (1989). The first-strand reaction was made using 200 ng of poly(A)⁺ RNA with 1 × first-strand buffer (50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 75 mmol l⁻¹ KCl, 3 mmol l⁻¹ MgCl₂), 0.01 mmol l⁻¹ dithiothreitol (DTT), 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL), 0.5 mmol l⁻¹ dNTPs, 2 mmol l⁻¹ oligo(dT)₁₅, 20 units of RNAase inhibitor (Boehringer Mannheim) in a final volume of 20 µl. The mixture was initially incubated at 65 °C for 5 min, before DTT and the enzyme were added. The mixture was then incubated for 1 h at 38 °C. A sample of the first-strand reaction (1 µl) was used for the PCR reaction in 1 × Taq PCR buffer (0.1 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 50 mmol l⁻¹ KCl, pH 8.3), 150 mmol l⁻¹ dNTPs, 0.5 mmol l⁻¹ of each specific oligonucleotide and 1.5 units of Taq polymerase (Boehringer Mannheim). PCR reactions were carried out in a Perkin Elmer 2400. The reactions were incubated at 94 °C for 3 min and at 65 °C for 5 min before Taq polymerase was added. The mixtures were then incubated at 72 °C for 1 min for one cycle. Specific oligonucleotides were used in each reaction, and their sequences and PCR conditions are as follows.

Nuclear-encoded cytoplasmic elongation factor 1a (EF-1α) (Walldorf and Hovemann, 1990). Control product length: 348 bp, oligonucleotide sequence, direct primer (D): 5'-AAGATCGGTGGTATCGGTA CTG-3' (sequence position, 763-784); reverse primer (R): 5'-GCAAGCGATAT-GAGCGGTGTG-3' (sequence position, 1329-1309). PCR conditions: 94 °C for 30 s, 50 °C for 40 s, 72 °C for 30-60 s; 30 cycles. *Nuclear-encoded mitochondrial translation initiation factor* (this study) Product length: 396 bp; (D): 5'-

ATCTTGAAGGTTTGTAGTGAAGG-3' (sequence position, 1028-1049); (R): 5'-CTTTTATTTTAAACATTTTCTT-3' (sequence position, 1424-1402). PCR conditions: 94°C for 30 s, 50°C for 40 s, 72°C for 30 s; 30 cycles. *Nuclear-encoded cytochrome c (cyst c)*. Product length: 275 bp; (D): 5'-CARA-ARTGYGCNCARTGYCAYACN-3' (sequence position, 49-72); (R): 5'-TTNGANGCYTYGTCRATRTANGCDAT-3' (sequence position, 323-298); Y=T or C; R=A or G; and D=A, C or T. PCR conditions: 94°C for 30 s, 55°C for 40 s, 72°C for 30 s; five cycles. *Mitochondrial-encoded cytochrome oxidase subunit I (COX-I)*. Product length: 1044 bp, the oligo primers were identical to those reported by (Hall and Smith, 1991). (D): 5'-TTAAGATCCCCAGGATCATG-3' (sequence position, 115-134); (R): 5'-TGCAAATACTGCACCTATTG-3' (sequence position, 1158-1139). PCR conditions: 94°C for 30 s, 50°C for 40 s, 72°C for 60 s; 30 cycles. All RT-PCR products from both ethidium-bromide-stained gels and Southern blot hybridizations of the RT-PCR products were quantified by densitometry using the NIH image (1.60 b7) scanning system, and graphs were produced using KaleidaGraph 3.0. Error bars given in the figures correspond to a confidence interval of 99% calculated by the program.

Dot blot hybridizations

Total DNA (nuclear and mitochondrial) was isolated from different larval and pupal stages using the Nucleon ST kit for soft tissue (Amersham Life Science). DNA concentration was determined by spectroscopy and visualized in agarose gels. A sample (1 µg) of this total DNA was applied to a Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Life Science) using a Minifold (Schleicher and Schuell) apparatus. To determine the relative number of nuclear genomes, the EF-1α cDNA fragment (348 bp) was used as a probe. This probe was removed by boiling the membrane in 0.5% SDS for 30 min, and the same membrane was then rehybridized with a COX-I 1044 bp fragment for the detection of mitochondrial genomes. Membranes were prehybridized at 40°C for 4-8 h in 50% formamide, 5x SSC (1x SSC is 0.15 mol l⁻¹ sodium chloride, 0.015 mol l⁻¹ sodium citrate), 5x Denhardt's solution (1x Denhardt's solution is 0.02% bovine serum albumin, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% dextran sulphate), 0.5% sodium pyrophosphate plus 100 µg ml⁻¹ calf thymus DNA. Filters were then hybridized for 8 h at 40°C in this solution plus 0.1% SDS. Successive washes were performed in 0.2x SSC, 0.2% SDS at 50°C and 60°C, each for 20 min. Filters were used for autoradiography using X-AR Kodak films with intensifying screens at -70°C for 3 h in the case of COX-I and for 24 h in the case of EF-1α. The dot blot hybridizations of three independent experiments were quantified by densitometry using the NIH image (1.60 b7) system.

Results

Identification of cDNAs expressed differentially in queen and worker larvae by RNA-differential display

Fourth-instar honeybee worker larval (2.5-3.5 days old) development is reversible, in the sense that, if at this point these

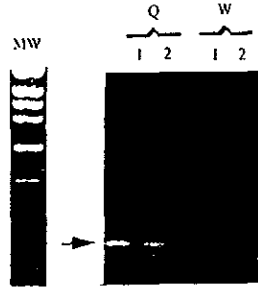


Fig. 1. Reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) of the RNA-differential display of clone 1 between queen and worker larvae at 4.5 days of larval development (fourth instar). Lanes 1 and 2 show different cDNA reactions. Q represents queen larvae, and W indicates worker larvae. MW denotes molecular mass markers. The arrow indicates the PCR product of the expected size that is present in the RNA preparation from queen larvae (for details, see the text).

larvae are fed with royal jelly, they can develop queen characters (Woike, 1971). After the fifth instar, the caste-determination process is no longer reversible. Therefore, larvae of the mid fifth instar (approximately 4.5 days of larval development) that had been fed throughout larval development with royal jelly (future queens) and larvae fed with worker jelly (future workers) were collected. Total RNA was purified from both types of larvae and used in typical RNA-differential display experiments (for details, see Materials and methods). Several cDNA fragments present only in the queen larvae were identified in sequencing gels. These fragments were gel-purified, reamplified, cloned and sequenced (data not shown). One of these clones (clone 1) is analyzed in further detail in this work.

To confirm that clone 1 is more abundant in queen larvae, specific oligonucleotide primers were used for RT-PCR experiments with the original total RNA from queen and worker larvae. Fig. 1 shows a cDNA fragment of the expected molecular size (100 bp indicated in the figure with an arrow) amplified in the RNA from queen larvae. No signal was detected in the worker preparation. This result confirms that clone 1 cDNA is more abundant in total RNA preparations from queen larvae than in those prepared from worker larvae at this developmental stage, and a detailed analysis of its expression throughout larval development was therefore performed.

As the clone 1 fragment isolated by RNA display was too short to be easily used for molecular procedures, the 250 bp fragment was extended at the 5' end using a variant of the RACE technique (see Materials and methods). Using this procedure, a fragment of 600 bp was obtained (data not shown) and used as a probe in library screening (see below).

Clone 1 encodes for the *Apis mellifera* mitochondrial translation initiation factor

To obtain information about the nature of the product

encoded by clone 1, a cDNA library from 4.5-day-old queen larva RNA was prepared (see Materials and methods). This library was screened using the clone 1 RACE-extended product as probe. Two different cDNA clones were identified. One of these clones was nearly full-length and was analyzed further. Sequence analysis of this clone identified an open reading frame on 2158 bases in the correct orientation; although no initiation codon was found at its 5' end, subsequent analyses indicated that this clone lacks only the first eight amino acid residues of the complete gene product. A computer search to identify previously reported homologous sequences showed that the conceptual open reading frame has a substantial degree of identity with mitochondrial translation initiation factor 2 (IF-2_{mit}) from mammals (Ma and Spremulli, 1995; Ma et al., 1995) and yeast (Vambutas et al., 1991) and with bacterial translation initiation factor 2 (Sacerdot et al., 1984; Friedrich et al., 1988) (Fig. 2). The best identities in overall protein sequence found were with two previously reported animal mitochondrial initiation factors: 41.34% identity with the bovine sequence and 40.86% with human IF-2_{mit}. On the basis of the high degree of homology between clone 1 and IF-2_{mit}, but not with the cytosolic IF-2 (data not shown), we may conclude that clone 1 encodes the *Apis mellifera* homologue of the IF-2_{mit} (AmIF-2_{mit}). The gene for AmIF-2_{mit} has two particular features: it contains a high A/T content along its coding region (72.3%), even compared with other IF-2_{mit} homologues (64.2% in yeast, 59.1% in bacteria, 58.7% in humans and 57.7% in the bovine sequence). Second, the last five amino acid residues at the carboxyl terminal region are 100% conserved among the animal IF₂s, even at the nucleotide sequence level (TGGGATCCAGGATT). Interestingly, this sequence contains seven bases that are identical, but in inverse orientation, to a single thyroid hormone response element (Sap et al., 1989).

AmIF-2_{mit} mRNA levels are differentially expressed in queen and worker larvae

It is known that, during caste determination, an increase in the rate of oxygen consumption takes place in queen larvae (Shuel and Dixon, 1968). The fact that one of the cDNAs identified in our RNA-differential display assays encodes honeybee IF-2_{mit}, a fundamental product for the translation of mitochondrial-encoded mRNAs, suggests that the higher mitochondrial activity in the queen larvae requires an increase in the whole set of mitochondrial products. These products can be encoded either in the nucleus or in the mitochondria themselves. To study AmIF-2_{mit} mRNA levels during critical queen versus worker developmental stages in more detail, we performed a semiquantitative RT-PCR analysis (Harting and Wiesner, 1997). Total RNA samples from queens and workers of fourth-instar and fifth-instar larvae, carefully classified by age and mass, were used as templates (see Materials and methods). This classification is fundamental since previous work has demonstrated that a significant increase in size and mass in larvae of both castes takes place in each instar (Wang, 1965), which could have an effect on the general metabolism

of the organism. Identical amounts of poly(A)⁺ RNA from queen and worker larvae were used for the RT-PCRs. Because few gene sequences have been reported in the honeybee so far, we used the *A. mellifera* cytoplasmic translation elongation factor (EF-1 α) as an internal control. Although it is known that EF-1 α RNA levels change during the development of insects such as *Drosophila melanogaster* (Hovemann et al., 1988) and in honeybees during metamorphosis (see below), these changes are identical in queens and workers. These results indicate that EF-1 α responds to the developmental program in both castes, but not to the caste-determination process; EF-1 α can therefore be used as a control in these experiments.

The differences between the two castes in the amount of RT-PCR product were quantified using a densitometric analysis in at least three independent experiments (both ethidium-bromide-staining and Southern blotting of the RT-PCR products), and the mean ratio between the experimental RT-PCR product and the RT-PCR control was then plotted. Examples of the RT-PCR gel and the densitometric analysis are presented in the Fig. 3. These results show that the expression of AmIF-2_{mit} from the early fourth instar is significantly greater in queen larvae than in worker larvae at each time point analyzed. The most dramatic difference in AmIF-2_{mit} RNA expression level between the castes is observed in the last 18 h before cell sealing (108 h), where it is approximately 30 times higher in queen larvae. This result explains why we found differential expression of this transcript with the RNA-differential display performed using RNA from this stage of development.

The abundance of AmIF-2_{mit} RNA in the future queens and workers was also analyzed in larvae after cell sealing, in prepupa and in different pupal stages and adults. The criteria for classification of the organisms in this experiment after cell sealing in the case of larvae were developmental timing in hours and the morphological differences between the pupal stages. In contrast to our observations in fourth- and fifth-instar larvae, there are no significant differences in amounts of AmIF-2_{mit} RNA between queens and workers during these stages (Fig. 4A,B). AmIF-2_{mit} RNA levels are constant in comparison with the control in the last larval stages, prepupae and adults in both queens and workers. As expected, EF-1 α RNA levels, used as an internal control, showed similar variations during different developmental stages but not between castes. Higher levels of EF-1 α mRNA are accumulated during metamorphosis (Fig. 4).

Differential expression in queens and workers of other nuclear- and mitochondrial-encoded genes involved in mitochondrial function

The fact that the AmIF-2_{mit} transcript is more abundant in fourth- and fifth-instar larvae in the queen than in the workers raises the question of whether this is a general phenomenon for other nuclear- or mitochondrial-encoded genes involved in mitochondrial function. To test this possibility, we quantified the mRNA levels of the mitochondrial-encoded COX-1 gene (cytochrome oxidase subunit 1) and of the nuclear-encoded

cytochrome c (cyt c) gene in both queen and worker castes For COX-I gene amplification, oligonucleotides were synthesized on the basis of the previously reported set which

amplifies a 1044 bp fragment (Hall and Smith, 1991). Although the *A. mellifera* cyt c sequence has yet not been reported, this is a highly conserved gene, and synthetic oligonucleotide

Sf	MSNFRIVYLA	KELAQPSQV	VEKAQQQLG	VKKMNGTIT	GDE	KLQQAF	K-PQTHKPA	QQASQPATH	QNHQKQKQT	KTKKQNRNR	YDRQCGSGS	100
Bs	-----	-----	-----	-----	-MS-	HRVYET	A-KQHVPSK	VIRALAEEN	EVNRHAMEL	ADYVKEVDG	IRFAAKETS	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VAGQNMSTN	QARSINQGN	NRQGQATOS	QGNRQGSTO	CGNPNQFQS	OGQNQRNRI	NHNGKPKNRI	FRFRNQLP	GKQSTSNRA	VFRVFR-	FR-	200
Bs	TNHEKADPK	QNRPRPPHA	NADFSDDEI	FDVNRKAAK	AKHGAKKA	ETHRTKQGS	EKKAFQAKR	GKQPAHY	QAAKAPKVQ	QVAVKEE	-----	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	EVLETTDEPN	VADIAKITH	EPAEILKFL	MGTFVKN	QTRALDIT	EELATEQSE	PGVLEIQVQ	IADIKKFEF	EALNPTTIS	RPEVTIHR	-----	300
Bs	KKITTFSQST	VAELANPLP	ESSEITVFL	NIGTVAT	IQYGLVAT	ELICSTYGV	VELEVDYD	ENFEAEIA	DAIPEDC	RPPVTIHR	-----	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	400
Bs	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	500
Bs	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	600
Bs	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	700
Bs	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	800
Bs	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												
Sf	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	900
Bs	VDRGKTTLD	TKRSNRISQ	E-QGIQTQ	IG AFYDIL	DC	KPIITFLDTP	HAATFSGRK	Q-SITDITL	VADIDQVQ	QVLELRAR	RAGVPLI	-----
Hs	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
As	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Conserved												

Fig 2 Comparison of the conceptual amino acid sequence of the *Apis mellifera* mitochondrial translation initiation factor (AmIF-2m) and the reported amino acid sequences of mitochondrial translation initiation factors from other organisms. Amino acid residues conserved in all the organisms are indicated in black and with asterisk; residues conserved only between bacteria are indicated in green; residues present in at least two organisms are indicated in pink. The AmIF-2m sequence is indicated in light blue (cyan) Sf is *Streptococcus faecium* (Accession no. M36878), Bs is *Bacillus stearotherophilus* (Accession no. X04399), Bt is the bovine sequence (Accession no. L37835), Hs is *Homo sapiens* (Accession no. L34600), Am is *Apis mellifera* (Accession no. J1200974), Sc is *Saccharomyces cerevisiae* (Accession no. X58379).

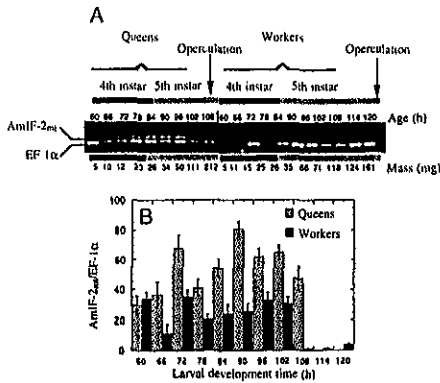


Fig. 3. Semi-quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) of the *Apis mellifera* mitochondrial translation initiation factor (AmIF-2_m) RNA between queen and worker larvae during the caste-determination process. Poly(A)⁺ RNA from different developmental stages of the fourth and fifth larval instars from queens and workers was purified and subject to a semi-quantitative RT-PCR assay (see Materials and methods). The larvae were classified by both the development time (h) and mass of each specimen (mg) as indicated. EF-1 α is the cytoplasmic elongation factor used as an internal control. An example of an agarose gel showing the RT-PCR products is shown in (A). (B) Quantification of the RT-PCR products, the mean of three independent experiments in which the ratio of the experimental PCR/control PCR was plotted against developmental time. The fourth- and fifth-instar developmental stages and the time of operation are indicated in A. Values are means \pm 99% confidence intervals.

primers were designed on the basis of the reported amino acid sequence of the honeybee protein (data not shown; Inoue et al., 1985). RT-PCR amplifications were performed using the same RNA samples as for the AmIF-2_m transcript analyses and quantified by densitometry. The COX-1 transcript is very abundant in queens at all time points analyzed (Fig. 5A). In contrast to what was observed with the AmIF-2_m transcript, COX-1 mRNA levels in worker larvae were also high, although lower than in queen larvae. During the last hours of worker larval development, just before operation, COX-1 mRNA levels decreased significantly (Fig. 5A). After operation and during the different pupal stages, COX-1 mRNA levels were almost identical in queens and workers (Fig. 5B). Again, we can observe that the EF-1 α RNA levels used as an internal control are more abundant during metamorphosis, as in the previous analyses, probably as consequence of the high degree of cell proliferation.

Cytochrome *c* mRNA levels were very low in both queen and worker larvae. Nevertheless, as in the case of AmIF-2_m, clear differences between queen and worker larvae were detected. In queen larvae, *cyt c* RNA was detected after 35

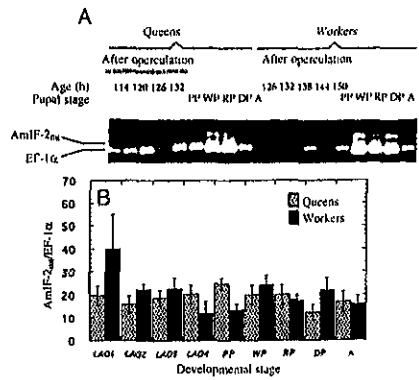


Fig. 4. Semi-quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the *Apis mellifera* mitochondrial translation initiation factor (AmIF-2_m) between queens and workers after operation (cell sealing) and during metamorphosis. (A) An agarose gel with the RT-PCR products; (B) quantification of the PCR products as described in Fig. 3. Again, the different larval stages in queens and workers after operation were classified by age (h). Since the larval age is different between queens and worker after operation, these were classified into four equivalent developmental stages indicated as LAO1-LAO4 (Larvae After Operation). PP, prepupa; WP, white-eye pupa; RP, red-eye pupa; DP, dark-eye pupa; A, adult (for details, see the text). Values are means \pm 99% confidence intervals for three independent experiments.

cycles of PCR amplification at levels comparable to COX-1 RNA detected after only 30 cycles (Fig. 5C). In worker larvae samples treated in the same way, the *cyt c* transcript could be detected only by Southern blot hybridizations of the RT-PCR products (data not shown). Densitometric analyses showed that the lowest concentration of *cyt c* RNA in worker larvae is detected in the same development stage as for the AmIF-2_m and COX-1 transcripts, during the last 18 h before cell sealing. For instance, at 4.5 days (108 h of larval development), *cyt c* RNA levels are approximately 100 times higher in queen larvae than in workers of the same age. In contrast to AmIF-2_m, *cyt c* mRNA levels after cell sealing and during metamorphosis were much higher in the queens than in the workers (Fig. 5D). These results indicates either that *cyt c* transcription is maintained at the same rate in queens during caste determination and metamorphosis or that *cyt c* mRNA is more stable than AmIF-2_m mRNA.

No significant differences in the mitochondrial copy number occurred between queens and workers

The differences in the amounts of AmIF-2_m, COX-1 and *cyt c* transcripts between queen and worker larvae could result from a higher copy number of the mitochondrial genome

resulting from greater mitochondrial biogenesis in queen larvae compared with worker larvae. We compared the number of mitochondrial and nuclear genomes in queen and worker individuals at different developmental stages. Dot blot hybridization of total purified DNA from different queen and worker larval stages was performed. This method compares the

relative mitochondrial copy number per cell in each specific developmental stage, since each nuclear genome can represent one cell (Forsburg and Guarente, 1989). This dot blot was sequentially hybridized with nuclear (EF-1 α) and mitochondrial (COX-1) DNA probes (Fig. 6). After densitometric quantification of signals from three independent

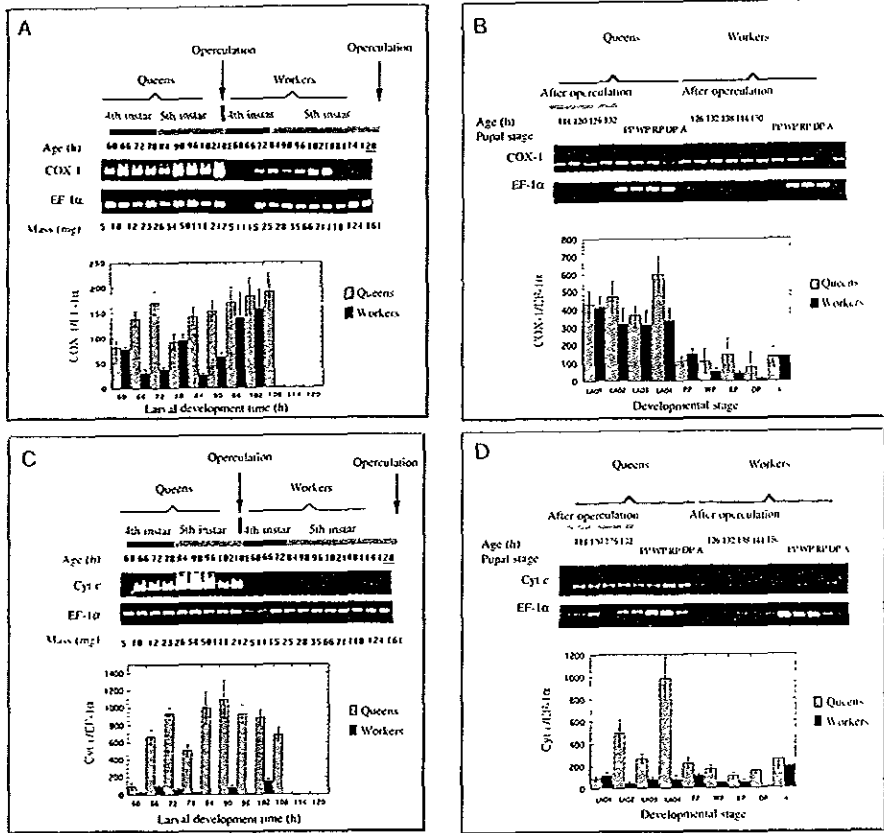


Fig. 5. Semi-quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) of the cytochrome oxidase subunit I (COX-1) and cytochrome c (cyt c) transcript levels during larval development at the time of caste determination and after operation and during metamorphosis. (A) COX-1 during larval development; (B) COX-1 after operation and during metamorphosis; (C) cyt c during larval development; (D) cyt c after operation and during metamorphosis. In each case, the quantification of the RT-PCR products is represented as in Figs 3 and 4. The same cDNAs used for the analyses of the transcript levels of the AmIF-2_{6S} RNA were used to amplify PCR fragments of COX-1 and cyt c in queens and workers. The variables used for classification are indicated in the figure, age (h) and mass (mg) for the larval stages before and after operation, and the colour of the eye for pupae, PP, prepupa; WP, white-eye pupa. Larvae after operation were classified into four equivalent developmental stages indicated as LAO1-LAO4 (Larvae After Operation) pupae, RP, red-eye pupa, DP, dark eye for prepupal and pupal stages. A, adult. EF-1 α is the cytoplasmic translation elongation factor used as internal control. Values are means \pm 90% confidence intervals for three independent experiments.

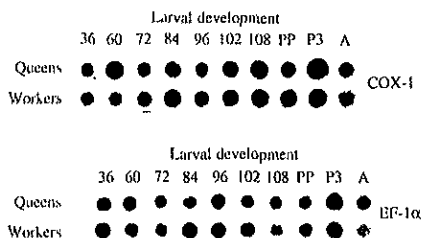


Fig. 6 Comparison of the number of mitochondrial and nuclear genomes between queens and workers. Cytochrome *c* (*cyt c*) was used as a probe for mitochondrial DNA, and the cytoplasmic elongation factor (*EF-1 α*) was used as probe for nuclear DNA. Total DNA (1 μ g from each stage) was dotted and hybridized sequentially against these two probes (for details, see Materials and methods). The DNA from different larval stages at the moment of caste determination is indicated by the age (36–108 h); PP, prepupae; P3, pupae with dark eyes (late pupae); A, adult. No significant differences between queens and workers in the number of mitochondrial genomes in relation to genomic DNA were observed in three independent densitometric experiments (data not show).

experiments with both nuclear and mitochondrial probes (data not shown), we found that there were no significant changes in the mitochondrial/nuclear genome ratio between queens and workers, indicating that the differences in transcript levels may be related to a higher transcriptional activity of mitochondrial products in the queens and not to the biogenesis of more mitochondria in this caste.

Discussion

For the first time, we have demonstrated differences in gene expression between queens and workers during the process of caste determination in *Apis mellifera*. The genes analyzed in this study can now be used as molecular markers for a more specific characterization of the gene regulation events in response to signal molecules, such as the juvenile hormone involved in this differentiation process.

Differences between queens and workers in the expression of genes that encode for mitochondrial proteins

Since the amount and quality of food received by the queen larvae is particularly rich, it is reasonable to think that the general metabolism of these individuals might be more active than in the worker larvae. In other words, more ATP is required to fulfill the metabolic demands of the accelerated growth of the queen larvae. This ATP may be produced either by increasing the mitochondrial activity per organelle or by increasing the number of mitochondria in queen individuals.

Higher mitochondrial activity can be achieved among other possibilities by increasing mitochondrial protein synthesis. In animal mitochondria, the molar concentration of all the mitochondrial mRNAs exceeds by far the concentration of

ribosomes, a situation that is different from that in the cytosolic compartment (Garsika et al., 1994; Harting and Wiesner, 1997). Since the rate of translation initiation depends on mRNA and ribosome concentrations (Xia, 1996), the translation initiation factor may be a key regulator for mitochondria protein synthesis. The fact that we found more *AmfF-2_m* mRNA in queen than in worker larvae suggests that mitochondrial translation might be increased in queen larvae, resulting in enhanced mitochondrial activity.

In animals, it has been reported that most mitochondrially encoded genes are regulated at the post-transcriptional level (Gillhan et al., 1994); however, in the case of the honeybee during the caste-determination process (fourth- and fifth-instar larvae), higher levels of *COX-I* mRNA were detected in the queen larvae (Fig. 5). Although *COX-I* mRNA levels are high in both castes, levels are approximately 1.5-fold greater in queens than in workers. The only exception is seen during the late fifth instar of the worker larval stage, in which *COX-I* mRNA levels are very low (detectable only by hybridization of the RT-PCR product, Fig. 5). This stage coincides with a decrease in juvenile hormone levels just before cell sealing. Interestingly, at this point, only the worker larvae, but not the queen larvae, undergo a reduced rate of growth, and this phenomenon may have some effect on *COX-I* transcript levels, either by reducing transcription of the *COX-I* gene or by reducing the stability of the mRNA. Although we have analyzed the expression levels of only one mitochondrial-encoded gene, we believe that a similar situation will be found for other mitochondrial-encoded gene transcripts because the animal mitochondrial genes encoding polypeptides are transcribed as a polycistronic RNA (Ojala et al., 1981; Mantoya et al., 1983).

The nuclear-encoded *cyt c* gene analyzed in this work showed higher levels of RNA expression in the queen, even during metamorphosis and in the adult stages. The mRNA levels for this gene and for the *AmfF-2_m* gene suggest that, in queens, there is a higher level of expression of the nuclear-encoded genes for mitochondrial proteins. The changes observed in the mitochondrial protein genes between queens and workers are not only a response to the rapid development of the queen, since they are detected from the fourth instar, in which the development of worker larvae is faster than that of queen larvae.

The accumulation of mitochondrial transcripts might indicate that, during the queen-determination process, the developing larvae require either more active mitochondria or a higher rate of biogenesis of these organelles. Our experiments show that the ratio between mitochondrial and nuclear genomes is the same during the caste-determination process in both queen and worker larvae, suggesting that mitochondrial biogenesis is not greater in queens during caste determination. The accumulation of nuclear transcripts for mitochondrial products that we have observed may be an indication that the strategy used by *A. mellifera* to deal with a large input of energy during the feeding of the queen larva may be to increase the larval respiratory capacity, thus increasing

the activity of their mitochondria more than increasing organelle biogenesis. The lower levels of nuclear-encoded and mitochondrial encoded transcripts for mitochondrial proteins detected in worker larvae may be related to a slower larval development during the later stages of the fifth instar.

Juvenile hormone and queen determination

In mammals, it has been demonstrated that nuclear genes that encode some mitochondrial proteins are activated by the action of nuclear receptors, in particular by the thyroid hormone receptor (Damonacos et al., 1996; Wiesner et al., 1992). In honeybees, juvenile hormone secretion is stimulated by food ingestion, and the high concentration of juvenile hormone in the queen larvae also correlates with the time of highest respiratory rate in the queen. Juvenile hormone may therefore coordinate the nutritive state of honeybee larva with its respiratory status by activating the metabolic machinery that allows the conversion of food into chemical energy (Rachinsky et al., 1990). Furthermore, in other insects, juvenile hormone has been implicated in the transfer and utilization of stored products to generate the energy for larval growth (L'Hélias, 1970; Locke, 1980) and to direct the induction of the increase in respiration rate (L'Hélias, 1970; Asencot and Lensky, 1976).

It is possible that, in honeybees, juvenile hormone could be implicated in the transcription of the *AmfF-2_m* gene and of other mitochondrial- and nuclear-encoded genes. It has been reported in mammals that the application of thyroid hormone increases the accumulation of mitochondrial-encoded transcripts, suggesting that this hormone may act directly or indirectly in the transcription of mitochondrial genes (Mutvei et al., 1989). A similar situation could occur in honeybee mitochondria during the caste-determination process when juvenile hormone is present. In future experiments, it will be interesting to determine whether the application of juvenile hormone to worker larvae results in an increase in the levels of *AmfF-2_m*, *cyt c* and *COX-1* transcript levels.

Size, caste determination and metamorphosis in social insects

In many insects, it has been proposed that larval size is an important factor inducing the onset of metamorphosis (Safranek and Williams, 1984). In social insects, metamorphosis is linked to the determination of the morphological characters of the caste. In several hymenopteran species, physiological differences and dimorphism in body size are achieved by the quantity fed and by an extension of the feeding period during the larval stage (Brian, 1979). It has been suggested that, at least in some *Bombus* species, it is larval size that determines pupation and caste (Plowright and Pendrel, 1977). It seems, however, that this is not the case for *A. mellifera*. Although there is a correlation between the size of the queen, pupation and the development of queen characters (Asencot and Lensky, 1976; Dietz and Lamberton, 1970; Woike, 1971), size is not a determinant in queen pupation and development. This conclusion is based on experiments in which the external application of juvenile hormone to a worker larva accelerated the onset of metamorphosis and the

development of queen characters independently of the size of the larva (Wirtz and Bettsma, 1972). It is possible that under natural conditions the increase in larval size of the queen larva during development is the result of an important adaptive strategy for the success of the queen in the colony.

The observations reported in this work on the expression of genes that encode mitochondrial proteins suggest that these genes could also be good molecular markers in a search for common factors in the queen-determination processes in other social insects. Experiments similar to those reported here could be performed with ants and wasps to verify whether there is a general difference between the queen and the rest of the colony in different species.

We are grateful to Virginia Barajas for her technical assistance and to Dr Veronica Narvaez, Dr Martha Vazquez and Dr Patricia León for discussions and for comments on the manuscript. The equipment used in this work was purchased with a grant to M.Z. from the PEW foundation.

References

- Asencot, M. and Lensky, Y. (1976). The effect of sugar and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens. *Life Sci.* 18, 693-700.
- Bettsma, J. (1979). The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World* 60, 24-39.
- Brian, M. V. (1979). Caste differentiation and division of labor. In *Social Insects*, vol. 1 (ed H. R. Hermann), pp. 121-221. New York, London: Academic Press.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Ruffter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Damonacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiiriyiotis, C., Spandidos, D. A. and Secker, C. E. (1996). Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 61, 226-232.
- Dietz, A. and Lamberton, E. N. (1970). Caste determination in honey bees II. Food consumption of individual honeybee larvae determined with P-labeled royal jelly. *Ann Ent Soc Am* 63, 1342-1345.
- Forsburg, S. L. and Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Cell Biol.* 5, 153-180.
- Friedrich, K., Brombach, M. and Pon, C. L. (1988). Identification, cloning and sequence of the *Streptococcus faecium* infB (translational initiation factor IF2). *Mol Gen Genet.* 214, 595-600.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8998-9002.
- Garsika, H. L., Facke, M., Escribano, J. R. and Wiesner, R. J. (1994). Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys Res Commun.* 200, 619-626.
- Gillham, N. W., Boyton, J. E. and Hauser, C. R. (1994). Translational regulation of gene expression in chloroplast and mitochondria. *Annu Rev Genet* 28, 71-93.

- Hall, H. G. and Smith, D. R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matrilines using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4548-4552.
- Hurling, I. and Wiesner, R. J. (1997). Quantification of transcript to template ratios as a measure of gene expression using RT-PCR. *Biotechniques* 23, 450-455.
- Hovemann, B., Richter, S., Walldorf, U. and Czepluch, C. (1988). Two genes encode related cytoplasmic factors 1 α (EF-1 α) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Res.* 16, 3175-3194.
- Inoue, S., Matsubara, H. and Yamanaka, T. (1985). Complete amino acid sequence of cytochrome c from the honeybee *Apis mellifera* and evolutionary relationship of the honeybee to other insects on the basis of the amino acid sequence. *J. Biochem.* 97, 947-954.
- Jung-Hoffman, I. (1966). Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. *Z. Bienenforsch.* 8, 296-322.
- Lensky, Y., Baehr, J. C. and Porcheron, P. (1978). Dosages radio-immunologiques des ecdysones et des hormones juvéniles au cours du développement post embryonnaire chez les ouvrières et les reines d'abeille (*Apis mellifera* L. var *ligustica*). *C.R. Acad. Sci. Paris D* 287, 821-824.
- L'Hélias C. (1970). Chemical aspects of growth and development in insects. In *Chemical Zoology*, vol. 5, *Arthropods*, part A (ed. M. Florkin and B. T. Scheer), pp. 343-390. New York, London: Academic Press.
- Liang, P. and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lindaver, M. (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vergl. Physiol.* 34, 299-345 (for a translation, see *Bee World* 34, 63-73).
- Locke, M. (1980). The cell biology of fat body development. In *Insect Biology in the Future* (ed. M. Locke and D. S. Smith), pp. 227-252. New York, London: Academic Press.
- Ma, J., Farwell, M. A., Burkhart, A. and Spremlin, L. L. (1995). Cloning and sequence analysis of the cDNA for bovine mitochondrial translational initiation factor 2. *Biochim. Biophys. Acta* 1261, 321-324.
- Ma, L. and Spremlin, L. L. (1995). Cloning and sequence analysis of the human mitochondrial translational initiation factor 2 cDNA. *J. Biol. Chem.* 270, 1859-1865.
- Montoya, J., Galnes, G. L. and Attardi, G. (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151-159.
- Mutvei, A., Kuzela, S. and Nelson, B. D. (1989). Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur. J. Biochem.* 180, 235-240.
- Ojala, D., Montoya, J. and Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.
- Perez, J. (1889). Les abeilles. In *Traité de Biologie de l'Abeille*, vol. 1 (ed. R. Chauvin). Paris, France: Masson (1968).
- Plowright, R. C. and Pendrel, B. A. (1977). Larval growth in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Can. Ent.* 109, 967-973.
- Ruchinsky, A., Strambi, C., Strambi, A. and Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysone in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocr.* 79, 31-38.
- Reimold, H. (1965). Biologically active substances in royal jelly. *Vitamin Hormones* 23, 359-382.
- Reimold, H. (1987). Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17, 1003-1006.
- Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J. W., Plumbridge, J. A. and Grunberg-Manago, M. (1984). Sequence of the initiation factor IF2 gene: unusual protein features and homologies with elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7787-7791.
- Safranek, L. and Williams, C. M. (1984). Critical weights for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biol. Bull.* 167, 555-567.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sap, J., Muñoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H. and Venstrom, B. (1989). Repression of a transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature* 340, 242-244.
- Shuel, R. W. and Dixon, S. E. (1959). Studies in the mode of action of royal jelly in honey bee development. II. Respiration of newly emerged larvae on various substrates. *Can. J. Zool.* 37, 803-813.
- Shuel, R. W. and Dixon, S. E. (1968). Respiration in developing honeybee larvae. *J. Apic. Res.* 7, 11-19.
- Vambutas, A., Ackerman, S. H. and Tzagoloff, A. (1991). Mitochondrial translational-initiation and elongation factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 201, 643-652.
- Walldorf, U. and Hovemann, B. T. (1990). *Apis mellifera* cytoplasmic elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) is closely related to *Drosophila melanogaster* EF-1 alpha. *FEBS Lett.* 267, 245-249.
- Wang, D. I. (1965). Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *J. Apic. Res.* 4, 3-5.
- Weaver, N. (1966). Physiology of caste determination. *Annu. Rev. Ent.* 11, 79-102.
- Wiesner, R. J., Kuroski, T. T. and Zak, R. (1992). Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol. Endocr.* 6, 1456-1467.
- Wirtz, P. and Bettsma, J. (1972). Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. *Ent. Exp. Appl.* 15, 517-520.
- Wolke, J. (1971). Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens and results of insemination. *J. Apic. Res.* 10, 455-465.
- Xia, X. (1996). Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics* 144, 1309-1320.

6.0.- RESULTADOS

6.1.- Identificación de transcritos diferencialmente expresados por RNA-DD PCR y RT-PCR.

Después de la parte media del quinto instar (4.5 días) del desarrollo larvario, el proceso de determinación de castas es totalmente irreversible. Por este motivo, se extrajo RNA total de larvas de obreras y reinas de este período para los experimentos de RNA-DD PCR. Con esta metodología se detectaron varios fragmentos entre 100-300 pb diferencialmente expresados entre ambas muestras. Dichos fragmentos fueron reamplificados, clonados y secuenciados. Sin embargo con dicha información, no se encontró identidad significativa con ninguna secuencia reportada.

Para confirmar que los fragmentos clonados son predominantemente expresados en larvas de reinas, se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de uno de dichos fragmentos (clona 1 200 pb). En la figura 1 del artículo se presenta el resultado de un experimento típico de RT-PCR, utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de larvas de reinas y obreras de 4.5 días. En dicho experimento en el que se amplificó con oligonucleótidos internos un fragmento (100 pb) de la clona 1, sólo se detectó la banda esperada en el caso de las larvas de reina. Este resultado confirmó que la clona 1 es más abundante en reinas y por lo tanto, era un buen candidato para tratar de obtener su transcrito completo y analizar con detalle su perfil de expresión durante el desarrollo larvario de reinas y obreras.

6.2.- Aislamiento de un cDNA que codifica para IF-2mt.

Puesto que el fragmento inicialmente amplificado por RNA-DD resultó demasiado corto (200 pb) para permitirnos encontrar homología con alguna secuencia reportada, se extendió hacia el 5' con una variante de la metodología de RACE (ver figura 10 y material y métodos). El alto e inusual contenido en A/T de este gene (72.3%), favorece la existencia de falsos apareamientos con el oligo poli T utilizado como "primer". Debido a esto fuimos incapaces de obtener una extensión completa de nuestro fragmento hacia 5'. Sin embargo, logramos extender nuestro fragmento inicial de aproximadamente 200 pb, 400 pb más hacia el extremo 5' (ver figura 11). Al ser secuenciado este fragmento, identificamos una fase abierta de lectura (ORF, *sei*) de alrededor de 200 aminoácidos que mostró 40.9% de identidad con el factor de iniciación de la traducción mitocondrial 2 (IF-2mt), recientemente identificado en humanos, este factor promueve la unión del tRNA Met iniciador a la subunidad ribosomal pequeña (Ma y Spremulli, 1995) (ver figura 2 del artículo).

Con el objetivo de obtener el transcrito completo de IF-2mt, construimos un banco de cDNA a partir de RNA poli A⁺ obtenido a partir de larvas de reinas de alrededor de 4 días y 12 horas (muestras de 4 días, 10 h, 12 h y 14 h). Esta librería fue tamizada utilizando como sonda el fragmento de 600 pb extendido por RACE. De esta manera, dos clonas independientes fueron identificadas, las cuales fueron completamente secuenciadas. En la más larga de estas clonas, fue identificado un ORF de 2158 pb en la orientación correcta, sin embargo no se encontró una metionina en el extremo 5' del cDNA (figura 12). Al comparar la secuencia deducida de aminoácidos con respecto a la de los demás homólogos animales del IF-2mt, encontramos que sólo 8 aminoácidos N terminales parecen

1/1
 AGA ATA TAT ATT CAA TCT AGT TTA TCA AAA CAA GTA ATA GAA ATT ATA TGG CGG GAA CAA
 arg ile tyr ile gln ser ser leu ser lys gln val ile glu ile ile trp arg glu gln
 61/21
 AAT ATA AAT TGT ATT TTA CAA ACC ATG AAT GTA TTA CAT ATT CAT TAT CAA CAT TAT CAT
 asn ile asn cys ile leu gln thr met asn val leu his ile his tyr gln his tyr his
 121/41
 ATT aCa CCa GTT TTT ACT aaa Caa aaa aaa gtt aaa gaa gat aCa GAA CTC AAT CTG Caa
 ile thr pro val phe thr lys gln lys lys val lys glu asp thr glu leu asn leu gln
 181/61
 aCa ATA TTT AAT GAA GAC AAA TTA GAT AAT TTA ATG GAT AAA CAG TTT AAA AAT AAA TCA
 thr ile phe asn glu asp lys leu asp asn leu met asp lys gln phe lys asn lys ser
 241/81
 TTA CCA GTA ATA GAA ATA TGG GAT CAA ATG ACA GTT AAA GAA TTA GCA AAT TCT GCC AAA
 leu pro val ile glu ile trp asp gln met thr val lys glu leu ala asn ser ala lys
 301/101
 AGG GAT ATT AAT GAT GTT TTA AAT GTT CTT TAT TTT Ata aat aaa aat gat aaa tat gaa
 arg asp ile asn asp val leu asn val leu tyr phe ile asn lys asn asp lys tyr glu
 361/121
 gaa aat act att tta aca act atg cct tta tta att aac gta gta aag tat ctt ggt ggg
 glu asn thr ile leu thr thr met pro leu leu ile asn val val lys tyr leu gly gly
 421/141
 aaa cac aaa ttc ata tCa AAA AAA ATT AAA AAA ACT ATG GAA AAT AAA GAT ATT ACT AAA
 lys his lys phe ile ser lys lys ile lys lys thr met glu asn lys asp ile thr lys
 481/161
 CGA CCT TTA CCA AAT GAA TCT CAA TTA ATA AAA CGA CAT CCA ATT GTA ACA ATA ATG GGG
 arg pro leu pro asn glu ser gln leu ile lys arg his pro ile val thr ile met gly
 541/181
 CaT gtt gat cat gGc aaA act act tta ctt gat gca tta cga Aat aca tCa att gCa aaa
 his val asp his gly lys thr thr leu leu asp ala leu arg asn thr ser ile ala lys
 601/201
 cct gAA TTT ggt ggt att aca caa tgt att ggt gCT TTC GAT GTA ACA TTG GAA TCT GGA
 ser glu phe gly gly ile thr gln cys ile gly ala phe asp val thr leu glu ser gly
 661/221
 GAA CGA GTA ACA TTC TTA GAT ACA CCT GGA CAT GCT GCT TTC ATT TCT ATG CGA CAT AGA
 glu arg val thr phe leu asp thr pro gly his ala ala phe ile ser met arg his arg
 721/241
 GGC GCG CAT ATA ACA GAT ATT GTA GTA TTA GTT GTA GCA GCT GAT GAT GGT GTT AAA GAA
 gly ala his ile thr asp ile val val leu val val ala ala asp asp gly val lys glu
 781/261
 CAA ACT TTG CAA AGT ATA GAA ATG GCA AAA GAT GCC AAG GTT CCA ATT ATT GTA GCT ATT
 gln thr leu gln ser ile glu met ala lys asp ala lys val pro ile ile val ala ile
 841/281
 AAT AAA ATT GAT AAA CCT AAC ATT GAC ATT ATT AAA GTC CAA TAT GAA TTA GCA AAA CAT
 asn lys ile asp lys pro asn ile asp ile ile lys val gln tyr glu leu ala lys his
 901/301
 GGA ATT GTA ATT GAA GAA CTT GGT GGT GAA ATA CAA TGT GTT AAA ATA TCT GCT TTA AAA
 gly ile val ile glu glu leu gly gly glu ile gln cys val lys ile ser ala leu lys
 961/321
 GGA ATT AAT TTA AGA GAA TTA ACA GAA GCT ATA ATT GTA CAA GCT GAA TTA ATG GAT TTA
 gly ile asn leu arg glu leu thr glu ala ile ile val gln ala glu leu met asp leu
 1021/341
 AAA GGA GAT CTT GAA GGT TTA GTG GAA GGT GTT ATT ATT GAT TGT AGT AAT CAT ATT GGA
 lys gly asp leu glu gly leu val glu gly val ile ile asp cys ser asn his ile gly
 1081/361
 CGA GGA AAA TTA GTG ACA CCT TTA ATC CAA CGT GGT ACT TTG AAA AAA GGA TGT TTA TTA
 arg gly lys leu val thr ala leu ile gln arg gly thr leu lys lys gly cys leu leu

1141/381
 GTA TCT GGA ATA GCA TCT GCA AAA GTA AGA agt atg ttt aat gat tct ggt aat cct atc
 val ser gly ile ala ser ala lys val arg ser met phe asn asp ser gly asn pro ile
 1201/401
 tta AAA gct aaa cca tcc gaa gta gta caa aTT TTA GGA TGG AAA GAA TTA CCT aAT GTT
 leu lys ala lys pro ser glu val val glN ile leu gly trp lys glu leu pro asn val
 1261/421
 GGA GAT GAA ATA TTA GAA GTA GAA aAT GAT AAA ATA CTA CAA GAA GTT ATA AAA TTT AGA
 gly asp glu ile leu glu val glu asn asp lys ile leu glN glu val ile lys phe arg
 1321/441
 CAA AAA CAA CGT GCT GAA ATt TTA GCT AAG GAA CAt AAA GCA GCT GCC GAT CAA AAA TTA
 glu lys his leu ile glu tyr leu ala lys glu his lys ala ala asp glN lys leu
 1381/461
 GAA AAA cAT CTC ATA Gaa TAT AAG AAA ATG TTA AAA ATA AAA AGA TTA TTT GGA AAA GAT
 glu lys his leu ile glu tyr lys lys met leu lys ile lys arg leu phe gly lys asp
 1441/481
 AGA AAA ATA ATG GAT ATG GTG AGA GAA AAG ATA ATC GAA GAA AAG AGA AAA AAT AAA AAT
 arg lys ile met asp met val arg glu lys ile ile glu glu lys arg lys asn lys asn
 1501/501
 AAA AAT CTT ACT CCT GCA GTT AAT ATT ATT GTA AAA GGT GAT GTG GCA GGA AGT GTT GAA
 lys asn leu thr pro ala val asn ile ile val lys gly asp val ala gly ser val glu
 1561/521
 GCA TTA CTA GAT ATT TTT GAT ACG TAT ACA TAT GAT ACA ATA TGC CAG TTA AAC ATT GTT
 ala leu leu asp ile phe asp thr tyr thr tyr asp thr ile cys glN leu asn ile val
 1621/541
 CAT TAT GGT ATA GGA TTT ATT ACG CAA TCG GAT ATA GAA TTA GCG AAT ACA TTT AAA GCA
 his tyr gly ile gly phe ile thr glN ser asp ile glu leu ala asn thr phe lys ala
 1681/561
 ATT AtT TAT GGA TTT AAT GTA AAT GCA ACT AAA CAA ATA AAA GAT GAG GCT AAC AAA AAA
 ile ile tyr gly phe asn val asn ala thr lys glN ile lys asp glu ala asn lys lys
 1741/581
 GGC GTA TCT CTT CGA TTT TAT aaT GIT GTA TAT AAA CTT ATT GAT AAT ATT AAA AAA GAA
 gly val ser leu arg phe tyr asn val val tyr lys leu ile asp asn ile lys lys glu
 1801/601
 ATT TAT GAT ATC CTG CCT GAA GTT GAT GTT GAA GAG ATA TTA GGA GAA GCA AAA GTA TTG
 ile tyr asp ile leu pro glu val asp val glu glu ile leu gly glu ala lys val leu
 1861/621
 CAA AAT TTT GAT ATA AAA GAT AAA AAC AAA AAA GTA AAT GTT GCA GGT TGC CGT TGC GTT
 glN asn phe asp ile lys asp lys asn lys lys val asn val ala gly cys arg cys val
 1921/641
 AAA GGT ATT CTT TTA AAA tct gga tta tat cat gta cta aga gga aat gaa aat att tat
 lys gly ile leu leu lys ser gly leu tyr his val leu arg gly asn glu asn ile tyr
 1981/661
 tca gga aaa tta ata tca atg aga caT TTA AAG GAA GAA gTG TCA TcG ATA GAA ACA AAT
 ser gly lys leu ile ser met arg his leu lys glu glu val ser ser ile glu thr asn
 2041/681
 TAT GAA TGT GGT CTT AGA TTT GAA GAT CCA ATG ATA TCA TTC CAA CCT GGA GAT ACT ATT
 tyr glu cys gly leu arg phe glu asp pro met ile ser phe glN pro gly asp thr ile
 2101/701
 ATT TGC ATC AAT ATA AAA AGA CAG AAA GAA AAA ATT GAG TGG GAT CCA GGA TTT TAA TTT
 ile cys ile asn ile lys arg glN lys glu lys ile glu trp asp pro gly phe OCH
 2161/721
 AGT ATT ATT GTA TTT ATA TAT GGA TAA TAT AAA ATA AAT AAT TAC
 2191/731

Figura 10.- Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de Am IF-2mt.. Los 18
 nucleótidos subrayados que corresponden a los últimos 5 aminoácidos del carboxilo
 terminal y el codón de termino, son conservados entre los homólogos animales. Las
 secuencias que promueven degradación de RNA (AUUUA) son puestas en negritas.

estar ausentes en esta clona (ver figura 2 del artículo), por lo que podemos considerarla casi completa. El homólogo de abeja de IFm-2 (Am IFm-2) tiene la mayor identidad con sus homólogos bovino (41.3%) y humano (40.9%) (Ma, L., *et al.*, 1995; Ma y Spremulli, 1995). Después con los homólogos de bacterias (*Escherichia coli*, 36.30%; *Streptococcus faecium*, 34.5%) (Sacerdot *et al.*, 1984; Friedrich, *et al.*, 1988) y por último, (a pesar de tratarse de un eucariote) con levadura (32.4%) (Vambutas *et al.*, 1991).

6.3.- Los niveles del mRNA de Am IF-2_{mt} son más abundantes en larvas de reinas durante el 4to. instar y durante la parte del quinto instar anterior a la operculación.

El hecho de que durante el desarrollo larvario de las reinas se produce un incremento significativo en el consumo de oxígeno con respecto a las obreras, (Shuel y Dixon, 1968) sugiere que las reinas tienen una mayor actividad mitocondrial. Por lo tanto, no fue del todo sorprendente encontrar que uno de los cDNAs que identificamos por RNA-DD codificara para el factor de iniciación de la traducción mitocondrial. Para confirmar si la expresión de este gen es mayor en larvas de reinas, realizamos un detallado análisis de su abundancia por medio de RT-PCRs. Para tal efecto, se purificó mRNA poli A⁺ a partir de larvas de 2.5 días (inicio del cuarto instar). Este tiempo fue elegido principalmente por razones prácticas, ya que antes de este tiempo el pesado de las larvas (un criterio de edad) es difícil, y porque es a partir del cuarto instar cuando son mayores las diferencias fisiológicas (ganancia de peso, respiración, niveles hormonales) entre ambas castas.

Para la realización de RT-PCRs cuantitativos, además de utilizar idéntica cantidad de mRNA poliA⁺, es importante tener un control interno cuya expresión sea lo más constitutiva posible. Aunque existen muy pocas secuencias reportadas de genes nucleares de abeja, encontramos que el factor de elongación de la traducción citoplasmática 1 α (EF-1 α) podría ser un buen control interno. La expresión de este gen, que tiene la función de unir los aminoacil tRNAs a los ribosomas, ha demostrado reflejar la síntesis de proteínas citoplásmicas (Webster y Webster, 1983; Webster y Webster, 1984), por lo tanto, al utilizar este gen como control, probablemente se podrá contrastar su expresión que al parecer refleja la síntesis de proteínas citoplásmicas, con respecto a IF-2mt, que refleja la síntesis de proteínas mitocondriales.

La Figura 3 del artículo, muestra que la expresión de IF-2mt desde el inicio del cuarto instar (60 h de desarrollo larval) hasta antes de la operculación, es significativamente mayor en reinas con respecto a obreras en cada tiempo analizado, sobre todo durante las últimas 18 horas antes de la operculación. Por ejemplo, de acuerdo a un análisis densitométrico de la autorradiografía obtenida de los productos del RT PCR transferidos e hidridados (Southern), encontramos que la abundancia del transcrito de IF-2mt a los cuatro días y medio es alrededor de 60 veces menor en obreras. Este resultado claramente explica porque mediante el análisis de RNA-DD PCR realizado con RNA de este estadio, se encontró como diferencial a IF-2mt.

La abundancia del transcrito de IF-2mt fue analizada también después de la operculación de las celdas, incluyendo la segunda parte del quinto instar, prepupa, pupa y adulto. A diferencia de lo observado antes de la operculación,

durante estos estadios, no encontramos diferencias significativas en la expresión de IF-2mt entre ambas castas. Estos resultados podrían ser esperados, ya que después de la operculación ya no hay diferencias metabólicas importantes entre ambas castas. (Figura 4, artículo). De hecho, los niveles de IF-2mt son bajos en la segunda parte del quinto instar y prepupa en reinas y continúan muy bajos en obreras. De manera general, los niveles de IF-2mt son mayores en pupas de ambas castas y de nuevo disminuyen en adultos. En general el patrón de abundancia del mRNA de EF-1 α RNA resultó ser un buen control, ya que su expresión es muy similar en todas las etapas analizadas, quizá con excepción de las dos primeras muestras de obreras. Sin embargo, después de la operculación los niveles de este transcrito cambian en el desarrollo, pero sin diferencias entre ambas castas: EF-1 α muestra bajos niveles en la segunda parte del quinto instar, pero luego en la metamorfosis, sufre un incremento considerable (de alrededor cinco veces) para luego volver a caer en adultos a una abundancia parecida a larvas.

6.4.- La expresión de otros genes involucrados en la función mitocondrial, tanto codificados en núcleo como en la mitocondria también es diferencial entre reinas y obreras.

El hecho de encontrar que el transcrito de IF-2mt es más abundante en larvas de reina durante el cuarto y quinto instar, nos llevó a preguntarnos si lo mismo sucedía con otros genes involucrados en la función mitocondrial. En primer lugar, dado que IF-2mt es codificado en el núcleo, nos preguntamos si los niveles de mRNAs de otros genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales tienen un comportamiento similar. Por otra parte, era lógico suponer que los transcritos mitocondriales sobre los cuales actúa IF-2mt,

también pudieran estar aumentados en larvas de reinas. Para contestar estas preguntas también se realizaron análisis de RT PCR. En el caso del análisis de otro gen nuclear, se eligió el citocromo c (*cytc*) ya que es conocida la secuencia de aminoácidos de la proteína. De esta manera, diseñamos oligonucleótidos degenerados para amplificar un fragmento de 275 pb que comprende la mayor parte de la región codificante del gen (ver material y métodos). En el caso del gen mitocondrial, se eligió amplificar un fragmento de 1044 pb de la subunidad 1 (COX-I) del citocromo oxidasa (COX), principalmente porque ya existía un reporte de la amplificación eficiente de este fragmento (Hall *et al.*, 1991). Otra razón para escoger *cytc* y COX, el penúltimo y último citocromos de la cadena respiratoria, es que su concentración refleja la eficiencia del metabolismo respiratorio, ya que fallas en estos dos proteínas repercuten directamente en la mayor generación de radicales libres (ver sección 9.2.2). Además, dado que de manera general son conocidos los niveles de estos dos citocromos durante el desarrollo larvario de la abeja (Osanai y Rembold, 1968; Ederet *et al.*, 1977), al conocer la abundancia de sus transcritos podríamos tener una apreciación más completa de la regulación de su expresión .

Citocromo C.

Los niveles del mRNA de *cytc* son bajos en ambas castas. (ver figura 5 del artículo panel C y D). En larvas de reinas pudieron ser detectados por tinción normal con bromuro de etidio, sólo después de 35 ciclos de amplificación (a diferencia de los 30 ciclos usados en los PCRs para los otros genes analizados); mientras que en las larvas de obreras, sólo fue posible detectar señal después de que los productos del RT-PCR fueron hibridados con una sonda radioactiva (elaborada utilizando como templado el propio fragmento purificado de *cytc*) y sometidos a exposición autoradiográfica (Southern) (ver figura 13, pag. 60) El

análisis de la relación entre los valores densitométricos obtenidos para cito con respecto al gen control (EF-1 α), son presentadas en la figura 5 del artículo, paneles C y D.

En este análisis se observa que la abundancia del mRNA de cytc en obreras es muy bajo comparado con reinas a lo largo del todo el desarrollo, especialmente en la etapa larvaria.. Por ejemplo, a las 108 horas de desarrollo larvario, la concentración del mRNA de cytc es al menos 100 veces menor en obreras comparada con reinas de la misma edad. No obstante a los bajos niveles de este mensajero en obreras, también pueden ser distinguidos un bajo nivel (0.02-0.1 ua) en los primeros estadios larvarios analizados (60-66 h) y durante las últimas 18 horas antes de la operculación (108-120 h) y un nivel mayor (0.75 ua) entre las 90 y 102 horas. La cantidad de mRNA del cytc después de la operculación en obrera es significativamente incrementada (promedio 1.33 u.a) con respecto a los niveles observados antes de la operculación. Estos niveles siguen siendo mayores en reinas, aunque la diferencia es menos dramática.

Citocromo c oxidase subunidad I (COX-I)

Mediante análisis de RT-PCRs encontramos que el transcrito mitocondrial de COX-I es abundante en la mayoría de los tiempos analizados en reinas. (Figura 5 del artículo, panel A Y B). De manera opuesta a lo observado en el transcrito de IF-2_{mt}, los niveles de COX-I fueron también altos en obreras, aunque no tanto como en reinas. Igual que en IF-2_{mt}, existe un nivel muy bajo del mRNA de COX-1 en las últimas 18 horas del desarrollo larvario de obreras que preceden a la operculación (figura 5 del artículo, panel A). Después de la operculación y durante los diferentes estados pupales, los niveles de COX-I son similares entre ambas castas. (Figura 5 del artículo, panel B).

Citocromo c

REINAS

OBRERAS

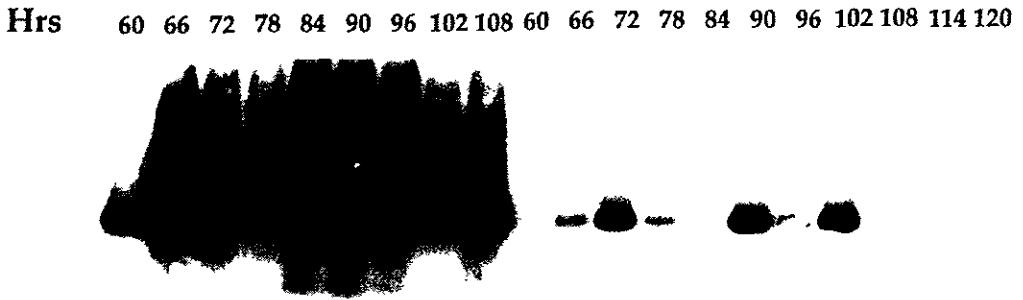


Figura 13.- *Southern blot* de los productos del RT-PCR de *cytc*. Los cDNAs se sintetizaron con RNA de larvas de reinas y obreras antes de opercular

6.5.- No existen diferencias significativas en el número de mitocondrias durante el desarrollo de ambas castas.

El hecho de que los niveles de los mRNAs de los genes analizados sean mayores en larvas de reinas, abre la posibilidad de que esto sea debido a la existencia de más mitocondrias con respecto a obreras. Con el propósito de contestar esta pregunta, medimos el número relativo de genomas mitocondriales con respecto al de los genomas nucleares durante el desarrollo de ambas castas. Para ello, purificamos DNA total de los diferentes estadios de ambas castas y lo hibridamos, en un experimento de "dot blot" (materiales y métodos), contra un gen codificado en núcleo (EF-1 α) y otro gen codificado en mitocondrias (COX-I). La figura 6 del artículo muestra que no ocurren cambios significativos en el número de genomas mitocondriales durante el desarrollo de cada casta en particular, ni entre castas.

6.6.- Genes de la familia de los receptores nucleares.

La mayor actividad del metabolismo respiratorio antes señalada, parece ser un proceso importante que ocurre durante el desarrollo larvario de las reinas. Sin embargo, alrededor del momento de la metamorfosis, debe ocurrir otra serie de procesos moleculares que permitan la diferenciación morfológica entre reinas y obreras. En un esfuerzo, por encontrar algunos de los genes que participan en este proceso, decidimos amplificar y estudiar la expresión de un grupo de genes que suponemos pudieran estar involucrados. Puesto que el proceso de determinación de castas es claramente controlado por hormonas (como la HJ y la ecdisona), elegimos estudiar a los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares (RN), ya que estos unen directamente a estas hormonas y

participen en las cascadas regulatorias por ellas inducidas (para introducción sobre RN, ver sección 2.7.1 y 2.7.2. de la introducción).

Como primer paso hacia tal objetivo, diseñamos oligonucleótidos degenerados en base a la secuencia de la región de unión DNA de los RN de *Drosophila*. Esta región es muy conservada entre todos los miembros de esta familia a lo largo de la escala filogenética. De esta manera, amplificamos y clonamos 4 diferentes fragmentos, dos de ellos a partir de cDNA de larvas de reina de 4.5 días y dos a partir de DNA genómico. Las secuencias obtenidas de estos fragmentos, mostraron tener considerable identidad con miembros de la familia de los RN previamente clonados en *Drosophila*. Los fragmentos amplificados a partir del DNA genómico mostraron tener secuencias muy parecidas a los genes USP (Oro *et al.*, 1990) y DHR3 (Koelle *et al.*, 1992). Mientras que los amplificados de cDNA de reinas de 4.5 días mostraron considerable identidad con los RN DHR78 (también conocido como XR78E; Fisk y Thummel, 1995) y E78A (Stone y Thummel, 1993) (figura 14). En el futuro se planea realizar un análisis detallado de la expresión de estos receptores durante el proceso de determinación de castas (ver sección 7.9 para una discusión sobre las perspectivas del estudio de los patrones de expresión de los RN durante la determinación de castas).

<u>AmDHR3</u>	CEGC	<u>KGFFRRSOSS</u>	<u>VVNYQ</u>	<u>.CPRNKNCVVDRVN</u>	<u>RNRCQYCRLO</u>	<u>KCL</u>
DHR3	CEGC	KGFFRRSQSS	VVNYQ	.CPRNKQCVVDRVN	RNRCQYCRLO	KCL
<u>AmE78A</u>	CEGC	<u>KGFFRRSIQK</u>	<u>OIEYR</u>	<u>.CLKDGNCLVIRIN</u>	<u>RNRCQYCRFK</u>	<u>KCL</u>
E78A	CEGC	KGFFRRSIQK	OIEYR	.CLRDGKCLVIRLN	RNRCQYCRFK	KCL
<u>AmUSP</u>	CEGC	<u>KGFFKRTVRK</u>	<u>DLSYA</u>	<u>.CROEKSCIIDKRO</u>	<u>RNRCQYCRYO</u>	<u>KCL</u>
USP	CEGC	KGFFKRTVRK	DLTYA	.CRENRNCIIDKRQ	RNRCQYCRYQ	KCL
DHR38	CEGC	KGFFKRTVQK	GSKYV	.CLADKNCVVDKRR	RNRCQFCRFQ	KCL
SVP	CEGC	KSFFKRSVRR	NLTYS	.CRGSRNCPIDQHH	RNQCQYCRLLK	KCL
DHR78	CEGC	KGFFKRSIRK	QLGYQ	.CRGAMNCEVTKHH	RNRCQFCRLQ	KCL
<u>AmDHR78</u>	CEGC	<u>KGFFKRSIRK</u>	<u>ELGYO</u>	<u>.CRGSKSCEVTKHH</u>	<u>RNRCQYCRLO</u>	<u>KCL</u>
E75A	CEGC	KGFFRRSIQQ	KIQYR	.PCTKNQQCSTLRIN	RNRCQYCRLLK	KCI
FTZa	CEGC	KGFFKRTVQN	KKVYT	.CVAERSCHIDKTQ	RKRCQYCRFQ	KCL
TLL	CDGC	AGFFKRSIRR	SRQYVCKSQKQGLCVVDKTH		RNQCACRLR	KCF
FTZb	CEGC	KGFFKRTVQN	RKNYV	.CVRGGPCQVSIST	RKKCPACRFE	KCL
ECR	CEGC	KGFFRRSVTK	SAVY	.CCKFGRACEMMYM	RRKCQECRLK	KCL

Figure 14.- Alineamiento de la región de unión a DNA de los genes pertenecientes a la familia de los receptores nucleares de *Drosophila melanogaster* y *Apis mellifera*. Las secuencias pertenecientes a los homólogos de *Apis mellifera* están subrayadas. Los fragmentos correspondientes a AmUSP y AmDHR3 fueron amplificados a partir de DNA genómico. Los correspondientes a AmDHR78 y AmE78A fueron amplificados a partir de mRNA de larvas de reinas de 4 días 6-18 h de desarrollo larvario, el cual incluye el tiempo de la operculación e inicio de la metamorfosis.

7.0.- DISCUSION

Durante la realización de este trabajo, hemos encontrado que la expresión de genes nucleares y mitocondriales involucrados en la función mitocondrial, es diferente entre reinas y obreras durante el proceso de determinación de castas. Por lo tanto, los genes analizados en este estudio pueden ser utilizados como marcadores para una caracterización más específica del efecto que ejercen determinadas moléculas, tales como la HJ, en la regulación genética durante el proceso de determinación de castas.

7.1. Análisis de la secuencia de IF-2_{mt} y sus implicaciones funcionales.

Durante el análisis de la secuencia de IF-2_{mt}, advertimos 2 características sobresalientes:

a) Composición nucleotídica.

Aunque, codificado en el núcleo, Am IF-2_{mt} contiene algunas características que denotan su origen mitocondrial. Tienen un muy alto porcentaje de A/T (72.3%) y una región 3' no traducida muy corta (48 pb., ver figura 12). El porcentaje de A/T es muy alto aún comparándolo con los demás homólogos de IF-2_{mt} (64.2%, levadura; 59.1%, bacteria; 58.7%, humano; 57.7%, bovino). Según Xia (1996) una composición alta de A/T favorece una mayor eficiencia transcripcional ya que aumenta la concentración de mRNA principalmente por medio de un aumento en la velocidad de elongación de la transcripción. Lo anterior debido a que el ribonucleótido más abundante es ATP y por lo tanto la RNA pol II usará menos tiempo en incorporarlo. Además, no se requiere un gasto adicional de energía

para convertirlo a otro ribonucleótido. Según este autor, una mayor composición de adeninas en determinado genoma refleja un mayor metabolismo de tal organismo. El mayor contenido en adeninas de los genomas mitocondriales con respecto al nuclear, podría ser explicado por el mayor contenido de ATP en este organelo con respecto al citoplasma. Es interesante hacer notar que de los genomas mitocondriales hasta ahora reportados, el de abeja es el más rico en A/T (84.8%, comparado por ejemplo con 78.6% de *Drosophila yakuba*) (Crozier y Crozier, 1993). Si la evolución favorece, en proporción a la concentración de ATP, una mayor cantidad de adeninas en el DNA, los cambios deben efectuarse en una posición que no repercuta en la composición de aminoácidos de las proteínas, como es la última posición de los tripletes codificantes. De hecho, en los genomas mitocondriales hay una mayor tendencia a tener T/A en esta posición. En *Apis* este porcentaje es de 95.2%, comparado al 93.8% de *Drosophila*. Incluso, de manera colateral, ésto podría explicar porque en mitocondrias el código genético cambió para metionina de ATG a ATT y triptofano de TGG a TGA.

Mediante un análisis del uso de codones particular de AmIF-2_{mt} (tabla 4 comparándolo con el general de abejas (tabla 5) , llegamos a las siguientes conclusiones :

1) IF-2_{mt} conserva en el uso de codones la tendencia a tener A en la última posición, a pesar de ser genómico (ver tablas 4 y 5). Las 3 únicas excepciones en las cuales el triplete terminado en A, no es el más usado (prolina serina e isoleucina) suceden cuando en el uso preferencial de codones general de abeja, el triplete que termina en A es poco usado.

2) Cuando un aminoácido es codificado por sólo 2 tripletes que terminan en T o C, es elegido el que termina en T (como es el caso de cisteína, fenilalanina, histidina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico)

3) Cuando un aminoácido tiene 6 tripletes que lo codifican, y dos de ellos terminan en A, se escoge como primera opción el que tenga otra(s) A, o en su defecto, otra(s) T. Ejemplos en arginina, es escogida AGA sobre CGA; en leucina, es elegida TTA, sobre CTA;

4) El codón más usado para varios aminoácidos es diferente cuando se compara el consenso general de los genes de abeja y el de Am IF-2_{mt}. Tal es el caso de tirosina, leucina, prolina, arginina, treonina, isoleucina.

5) Aunque dentro del consenso del uso preferencial de codones de la abeja, varios aminoácidos tienen un uso preferencial de tripletes terminados en A, la proporción de uso de tales codones es mayor en Am IF-2_{mt}.

Las anteriores observaciones nos llevan a una aparente conclusión paradójica: Por un lado, la alta composición de A, podría favorecer una mayor eficiencia transcripcional; sin embargo, un uso de codones que difiere de aquel más usado en los genes de abejas, conduciría a una menor eficiencia traduccional. Esta última conclusión es apoyada por los reportes en donde se demuestra que la frecuencia del uso de codones correlaciona positivamente con la disponibilidad de tRNAs (Gouy y Gautier, 1982) y que los mRNAs que contienen los codones más usados, son traducidos más rápido que mRNAs modificados artificialmente para contener codones raros (Sorensen et al., 1989).

b) Posible sitio de unión de receptor nuclear (HT-HJ)

A pesar de que los tres homólogos animales de AmIF-2mt hasta ahora conocidos, no tienen una homología apreciable hacia el extremo carboxilo terminal, comparten los últimos cinco residuos C-terminales. Además la secuencia que codifica para estos aminoácidos es conservada aún a nivel de DNA (**TGGGATCCAGGATTT**), no obstante la distancia evolutiva entre mamíferos e insectos. Lo anterior sugiere que esta región podría ser un importante sitio de reconocimiento.

Esta secuencia contiene una región de siete nucleótidos (en negritas) que es idéntica, pero en sentido complementario, al segundo elemento repetido de respuesta a hormona tiroidea (TRE) presente en el virus murino de leucemia (MLV) (Sap, 1989.)

5'CAGGGTCATTT**CAGGTCCTT** 3'.

3'GACCCAGTAAAG**TCCAGGAA** 5'

Aunque no existen reportes de algún RN que una RNA, se ha reportado que el receptor de la HT puede unir DNA como monómero (Schrader, 1994), y que, de manera desconocida, los receptores nucleares pueden prevenir degradación específica de mRNA (citado por Lodish, 1995). La protección contra degradación, podría ser un factor importante en la estabilidad del mRNA de IF-2_{mt} dado su muy corto extremo 3' no traducido y la presencia de secuencias AUUUA, que se ha reportado, promueven una degradación más activa de mRNAs (Shaw y Kamen, 1986), (ver éstas secuencias en negritas en la figura 12).

Aminoácido	Codón	Fracción	Aminoácido	Codón	Fracción
Gly	GGG	0.05	Trp	TGG	1.00
Gly	GGA	0.50	End	TGA	0.00
Gly	GGT	0.38	Cys	TGT	0.60
Gly	GGC	0.07	Cys	TGC	0.40
Glu	GAG	0.06	End	TAG	0.00
Glu	GAA	0.94	End	TAA	1.00
Asp	GAT	0.95	Tyr	TAT	1.00
Asp	GAC	0.05	Tyr	TAC	0.00
Val	GTG	0.09	Leu	TTG	0.06
Val	GTA	0.49	Leu	TTA	0.68
Val	GTT	0.40	Phe	TTT	0.76
Val	GTC	0.02	Phe	TTC	0.24
Ala	GCG	0.06	Ser	TCG	0.07
Ala	GCA	0.46	Ser	TCA	0.29
Ala	GCT	0.40	Ser	TCT	0.43
Ala	GCC	0.09	Ser	TCC	0.04
Arg	AGG	0.04	Arg	CGG	0.04
Arg	AGA	0.52	Arg	CGA	0.28
Ser	AGT	0.18	Arg	CGT	0.12
Ser	AGC	0.00	Arg	CGC	0.00
Lys	AAG	0.09	Gln	CAG	0.11
Lys	AAA	0.91	Gln	CAA	0.89
Asn	AAT	0.88	His	CAT	0.94
Asn	AAC	0.12	His	CAC	0.06
Met	ATG	1.00	Leu	CTG	0.03
Ile	ATA	0.40	Leu	CTA	0.05
Ile	ATT	0.55	Leu	CTT	0.15
Ile	ATC	0.06	Leu	CTC	0.03
Thr	ACG	0.06	Pro	CCG	0.00
Thr	ACA	0.55	Pro	CCA	0.47
Thr	ACT	0.36	Pro	CCT	0.53
Thr	ACC	0.03	Pro	CCC	0.00

TABLA 4.- Frecuencia del uso de codones de Am -IF-2mt. Obtenido con el programa *codon-frequency* del paquete de *Genetic Computer Group (GCG)* Version 9.1-UNIX de la Universidad de Wisconsin.

Aminoácido	Codón	Fracción	Aminoácido	Codón	Fracción
Gly	GGG	0.21	Tyr	TGG	1.00
Gly	GGA	0.50	End	TGA	0.52
Gly	GGT	0.21	Cys	TGT	0.53
Gly	GGC	0.08	Cys	TGC	0.47
Glu	GAG	0.41	End	TAG	0.20
Glu	GAA	0.59	End	TAA	0.28
Asp	GAT	0.64	Tyr	TAT	0.47
Asp	GAC	0.36	Tyr	TAC	0.53
Val	GTG	0.24	Leu	TTG	0.19
Val	GTA	0.33	Leu	TTA	0.09
Val	GTT	0.24	Phe	TTT	0.53
Val	GTC	0.20	Phe	TTC	0.47
Ala	GCG	0.22	Ser	TCG	0.34
Ala	GCA	0.33	Ser	TCA	0.25
Ala	GCT	0.29	Ser	TCT	0.11
Ala	GCC	0.16	Ser	TCC	0.12
Arg	AGG	0.22	Arg	CGG	0.10
Arg	AGA	0.20	Arg	CGA	0.22
Ser	AGT	0.11	Arg	CGT	0.17
Ser	AGC	0.07	Arg	CGC	0.08
Lys	AAG	0.43	Gln	CAG	0.41
Lys	AAA	0.57	Gln	CAA	0.59
Asn	AAT	0.61	His	CAT	0.59
Asn	AAC	0.39	His	CAC	0.41
Met	ATG	1.00	Leu	CTG	0.27
Ile	ATA	0.18	Leu	CTA	0.13
Ile	ATT	0.40	Leu	CTT	0.16
Ile	ATC	0.42	Leu	CTC	0.16
Thr	ACG	0.40	Pro	CCG	0.30
Thr	ACA	0.40	Pro	CCA	0.23
Thr	ACT	0.10	Pro	CCT	0.21
Thr	ACC	0.10	Pro	CCC	0.26

Tabla 5.- Frecuencia del uso de codones de *Apis mellifera*, Obtenido con el programa *codon frequency* del paquete de *Genetic Computer Group* (GCG) Version 9.1-UNIX de la Universidad de Wisconsin

7.2.- Estequiometría de RNAs mitocondriales y su implicación en la función de IF-2_{mt} en la síntesis de proteínas.

Dado la mayor ingesta de alimento y el incremento en el consumo de oxígeno observado en larvas de reinas, se espera que también su metabolismo mitocondrial esté aumentado con respecto a obreras. De esta manera, no fue del todo sorprendente encontrar que un gen que pudiera promover mayor actividad metabólica, como es el caso de IF-2_{mt} fuera expresado más en larvas de reinas. Esto además sugiere que la síntesis de proteínas mitocondriales puede ser mayor en reinas. En confirmación de lo anterior, hay una concentración mayor de cytc y COX-I en larvas de reina (Osanaí y Rembold, 1968; Eder, *et al.*, 1977).

Aún cuando hasta ahora no existen reportes con respecto a la estequiometría de RNAs mitocondriales en abeja u otro insecto, estos comparten con los mamíferos un genoma mitocondrial de tamaño similar (16,569 pb en humanos y 16, 343 pb en abeja) y una organización similar (aunque no idéntica) (Crozier y Crozier, 1993); por lo tanto, el análisis de la estequiometría en los mamíferos podría dar información valiosa de lo que sucede en insectos, o cuando menos, podrá ser una referencia importante.

Según el resultado de los análisis cuantitativos realizados por RT-PCRs, en el compartimiento mitocondrial de los mamíferos la concentración molar de todos los mRNAs que codifican para polipéptidos (13) excede la concentración de los ribosomas, lo cual constituye una situación fundamentalmente diferente de lo que sucede en el citoplasma (Garstka *et al.*, 1994; Harting y Wiesner 1997). El porcentaje de síntesis de proteínas depende tanto del porcentaje de iniciación de la traducción, como del porcentaje de elongación de la cadena

peptídica. El porcentaje de iniciación de la traducción, depende a su vez, de la concentración de mRNAs, ribosomas (Xia, 1996) y factores de iniciación de la traducción (Aloni *et al*, 1992). Debido a que en las mitocondrias, existe una menor concentración molar de los RNA ribosomales comparada con la concentración de los RNA mensajeros, se podría esperar que la iniciación de la traducción sea especialmente regulada en dichos organelos. IF-2_{mt} el único factor de iniciación mitocondrial reportado hasta la fecha, podría ser importante en la regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales. De esta manera, la regulación de la expresión de IF-2_{mt} sería un factor importante en el control general de la expresión mitocondrial.

7.3.- La mayor abundancia de algunos de los mRNAs involucrados en la función mitocondrial en larvas de reinas, sugiere que podría existir mayor abundancia del resto de los transcritos involucrados en esta función.

El mRNA de IF-2_{mt} es más abundante en larvas de reinas con respecto a obreras. Por lo tanto, pudieran ser también más abundantes los diferentes transcritos sobre los cuales IF-2_{mt} ejerce su actividad. Además, dado que los mRNAs mitocondriales codifican para sólo una parte de las subunidades de los complejos multiproteicos de la cadena respiratoria, podríamos esperar que los mRNAs que codifican para el resto de las subunidades codificadas en el núcleo fueran así mismo más abundantes.

Los resultados obtenidos mediante el análisis por RT-PCRs semi-cuantitativos confirmaron al menos de manera general, esta hipótesis. En primer lugar, aunque los niveles del mRNA mitocondrial de COX-I son altos en ambas castas,

este transcrito es más abundante en reinas cuando la larva es alimentada (antes de la operculación). En otros animales los genes mitocondriales que codifican para polipéptidos, son transcritos como un RNA policistrónico gigante, el cual es posteriormente procesado (Ojala et al., 1981, Montoya, 1983). De esta manera, aún y cuando sólo analizamos la expresión de un mRNA mitocondrial; es razonable esperar que si éste es abundante, el resto de los transcritos también lo sean. Por otro lado, cuando medimos la abundancia de un mRNA nuclear traducido en el citoplasma (cytc), encontramos que éste es también mucho más abundante en larvas de reina, sobre todo antes de la operculación.

La operculación o sellado de las celdas, separa los estados larvales de alimentación y no alimentación. De acuerdo con los resultados de los RT-PCRs, la operculación, es un punto importante que marca un cambio significativo en los niveles de expresión de los genes analizados. Puesto que el alimento estimula la secreción de HJ, un metabolismo respiratorio elevado y un mayor crecimiento larval, nuestros resultados constituyen una evidencia adicional de las relaciones entre el estado nutricional de la larva, su actividad fisiológica y su actividad mitocondrial.

Las concentraciones de los 3 mRNAs analizados son particularmente bajas durante los últimos 3 tiempos previos a la operculación. (108-113, 114-119 y 120-125 h). Curiosamente, este es el tiempo de "retardo" de la larva de obrera con respecto a la de reina relativo al momento de la operculación. En otras palabras, la reina tiene un período con la celda destapada de aproximadamente 4 días y 12 horas (118 h) y la obrera de 5 días y 5 horas. (125 h.) (ver figura 2). Esto sugiere que durante este período la transcripción de genes involucrados en la función mitocondrial está reprimida, o bien, aumenta la degradación de sus

mRNAs. Lo anterior debe de reflejarse en una menor generación de ATP y por lo tanto, podría explicar el menor tamaño alcanzado por la larva de obreras en el momento de la operculación. El motivo del atraso primero en la operculación y por consiguiente, en la pupación, podría deberse entre otras explicaciones, al retardo en alcanzar un peso crítico para la inducción de la señal que dé inicio a la metamorfosis; o bien, por consumir menos alimentos y secretar menos HJ, se retrasaría el tiempo en el cual se alcanza un nivel crítico de esta hormona para inducir la metamorfosis independientemente del tamaño.

7.4.- Posibles mecanismos de control de la expresión de genes mitocondriales.

La concentración absoluta de mRNAs mitocondriales depende principalmente del ritmo de su transcripción, su estabilidad y el número de genomas mitocondriales.

Los resultados que hemos obtenido en larvas de abejas, son similares a los que se observan en la transcripción mitocondrial activada por HT en hígado de rata, donde el tratamiento con HT no afecta los niveles de DNA mitocondrial (Van Itallie, 1990; Wiesner *et al.*, 1992). La mayor concentración del mRNA de COX-I (y quizá de todos los mRNAs mitocondriales) es lograda por un incremento en su transcripción, estabilidad del mensajero, o una combinación de ambos, pero no por dosis génica. Por otra parte, los bajos niveles del mRNA de COX-I observados en larvas de obrera durante las 18 horas previas a la operculación, puede deberse a una represión de la transcripción mitocondrial o a una mayor degradación del mensajero. Después de la operculación en obreras, el aumento en el mRNA de COX-I, a niveles similares a los observados en reinas, sería

consecuencia de la de-represión de su transcripción o bien, a una disminución en su degradación.

El control de la degradación de mRNAs es un factor cuya influencia no puede ser subestimada. En ratas, ha sido reportado que el control de la estabilidad de los mRNAs involucrados en la función mitocondrial, codificados tanto en el núcleo como en mitocondrias, es un mecanismo empleado usualmente en la regulación de la expresión mitocondrial (Connor *et al.*, 1996). Un posible mecanismo para lograr la protección de estos mRNAs es la existencia de proteínas que se unen a mRNAs que codifican para proteínas respiratorias, tales como la proteína que une al transcrito en forma L de la citocromo c oxidasa (COLBP, sei) (Chrzanowska *et al.*, 1994).

Se ha reportado que las concentraciones proteicas tanto de COX como de cytc son mayores en reina con respecto a obreras, aunque la concentración de cytc es mucho menor que la de COX (Osanai y Rembold 1968). Aunque nosotros sólo medimos la concentración de mRNA de una sola subunidad mitocondrial de COX, nuestros datos con respecto a la concentración relativa de mRNAs de este gen y cytc son similares a los obtenidos con las proteínas. Esta concordancia sugiere que la regulación de la expresión de al menos estos dos genes es lograda por control transcripcional o estabilidad de mRNA y no por control traduccional.

7.5.- ¿La HJ activa la expresión de genes involucrados en la actividad mitocondrial?. Correlaciones entre la concentración de HJ y los niveles de los mensajeros analizados.

La HJ parece ser secretada por la *corpora allata* de manera proporcional al alimento ingerido y su concentración correlacionan con un mayor metabolismo respiratorio y ganancia de peso de la larva. En base a estos antecedentes (y los presentados de manera exhaustiva en la sección 2.6) resulta evidente la propuesta de que la HJ podría activar el metabolismo respiratorio, que a su vez produciría un mayor crecimiento de la larva. Si esto es cierto, la siguiente cuestión por resolver es cómo la HJ logra activar el metabolismo respiratorio. Una opción es que la HJ actúe activando la transcripción de los genes involucrados en la función mitocondrial (codificados tanto en núcleo como mitocondria). En este caso, la concentración de estos mRNAs debería correlacionar con los niveles reportados de HJ.

Esta hipótesis tiene sentido si analizamos primeramente los niveles de la HJ durante el desarrollo. Los niveles de HJ son diferenciales entre ambas castas desde el segundo instar, lo cual es apoyado de manera indirecta por la observación de que el volumen de la *corpora alata* se incrementa a partir de este período (18-36 h) (Ulrich et al., 1983). Esto es consistente con la observación de que las larvas de obrera transferidas a celdas reales desarrollan una *corpora allata* activa poco después de que empiezan a recibir JR (Wirtz y Beetsma, 1972; Wirtz, 1973). La concentración de HJ se incrementa desde este momento, hasta alcanzar su pico máximo poco después del inicio del quinto instar (alrededor de 3 días y 18 h ó 90 h) . En este punto se ha reportado una concentración 15 veces mayor de HJ en larvas de reinas con respecto a obreras

y a continuación una disminución gradual en ambas castas hasta el momento de la operculación (4.5 días ó 108 h). Después, los niveles en ambas castas se incrementan otra vez de manera gradual, hasta alcanzar un segundo pico máximo (de aproximadamente la mitad de concentración del primero) a la mitad de la prepupa y entonces bajan a su menor nivel al comienzo de la pupación. El perfil de concentración de la HJ en larvas de obreras es similar al de las reinas, pero en una proporción mucho menor (Rachinsky *et al.*, 1990) (ver figura 6).

Al comparar este perfil de concentración de la HJ con respecto al obtenido mediante los RT-PCRS de los genes aquí analizados, resulta evidente que en general existe una correlación entre ambos, la cual a continuación analizaremos.

Antes de opercular

Los niveles de los dos transcritos codificados en el núcleo (IF-2mt y cytc) tienen, al igual que la HJ, un patrón de campana: bajo al inicio del 4to instar, alto después del quinto instar y bajo antes de opercular. Este patrón es similar en reinas y obreras, pero los niveles en obreras son más bajos. En el caso del gen codificado en la mitocondria (COX-I), el patrón en obreras es también de campana, aunque el pico es desplazado 12 horas después en relación a los otros dos genes analizados (ver figuras 3 y 5, paneles A y B, del artículo). En reinas, aunque bajo al principio, el nivel de COX-I se incrementa de manera gradual y no sufre descenso antes de la operculación (figura 5, panel C, del artículo).

Lo anterior probablemente ocurre debido a que la activación de COX-I, y quizá de todo el genoma mitocondrial, se produce después de que la HJ llega a cierto umbral de concentración. Después de este punto, diferencias en la concentración de HJ, no tendrían mayor influencia en activación de la transcripción. Por otra

parte, aún cuando los niveles de HJ pudieran bajar, no se produciría de inmediato un descenso en la abundancia del mRNA, sino que la concentración de éste se mantendría durante un tiempo determinado dependiendo de su abundancia y el ritmo de su degradación. Puesto que de los transcritos analizados, COX-I es el más abundante, lo anterior podría deberse a una transcripción activa o a una degradación lenta

Después de la operculación.

En obreras, inmediatamente después de la operculación, es observado un incremento en los niveles de los transcritos de COX-I y cytc. Estos niveles se mantienen altos hasta finalizar la última etapa larvaria analizada, para después descender en prepupa y pupa (ver figura 5, paneles B y D). En el caso de IF-2mt, también es observado un pico inicial, pero después el nivel del mensajero se mantiene sin cambios significativos. En reinas después de la operculación, tampoco se observan diferencias significativas en la abundancia de IF-2mt en las diferentes etapas. En contraste, los niveles de COX-I y cytc, muestran el patrón de campana, con el primer punto bajo después de la operculación, un pico máximo alrededor del inicio de la prepupa y un descenso en pupa.

Es necesario aclarar que el último estadio de larva que analizamos, posiblemente se sobrelapa con el inicio de la prepupa (prepupa 1, en trabajo de Rachinsky *et al.*, 1990) Además, el único estado de prepupa que analizamos, corresponde a un estado de prepupa avanzado (prepupa 2-3, en Rachinsky).

7.6.- El posible receptor de HJ y su mecanismo molecular de acción.

Si como suponemos la HJ actúa sobre la expresión de los genes mitocondriales, entonces ¿cuál es su receptor y su mecanismo de acción? Se ha propuesto como receptor de HJ a una proteína de 64 kDa (2 subunidades de 32 kDa) de la cucaracha *Leucophaea maderae* (Engelmann, 1995), la cual curiosamente es de idéntico peso molecular (32 kDa) a una proteína de unión a HJ aislada de la hemolinfa de *Manduca sexta* (Lerro *et al.*, 1990). Otro supuesto receptor de HJ es una proteína de 29 kDa también aislada de *Manduca sexta* (Palli *et al.*, 1994), la cual a pesar de ser nuclear, no tiene homología con los demás RN ni un dominio de unión a DNA; motivos por los cuales, no se ha aceptado como el verdadero receptor de HJ. Recientemente se ha propuesto que USP es el receptor de HJ (Jones y Sharp, 1997). Este RN actúa como heterodímero con EcR para formar el receptor funcional de ecdisona (Yao, *et al.*, 1992), y con DHR38 (Sutherland *et al.*, 1995); si se demostrara que USP funciona como receptor por sí sólo, entonces al igual que su homólogo en mamíferos RXR, podría actuar como homodímero (Mangelsdorf *et al.*, 1992).

Parece haber una relación entre la función de inducción de la actividad mitocondrial por HT y la inducida por un hipotético receptor de HJ. DHR78 es el RN de insecto que guarda mayor identidad con el receptor de HT (TR4), (32.4% de identidad en 411 aa, identidad total= 31.35 %) seguido por USP (51.2% en 125 aa, identidad total= 25.32%). USP podría funcionar como homodímero, pero además como heterodímero con DHR78 (u otro receptor), al igual que el receptor de HT, que puede funcionar como monómero, homodímero o heterodímero con RXR (Lazar *et al.*, 1991).

El mecanismo que utiliza el hipotético receptor de la HJ para inducir la expresión de los genes nucleares, podría ser parecido al que conocemos para el receptor de ecdisona u otro receptor nuclear. Sin embargo, es tema de polémica cómo este receptor podría activar la expresión del genoma mitocondrial. Aunque en mamíferos tampoco es claro el mecanismo por el cual la HT activa a los genes mitocondriales, se ha propuesto por una parte, que la HT y su receptor se unen directamente al genoma mitocondrial. Esta hipótesis es apoyada por tres evidencias principales: 1) Se han encontrado sitios de unión o elementos de respuesta de HT (y glucocorticoides) en el genoma mitocondrial (Sekeris, 1990; Iglesias *et al.*, 1995) 2) La adición de HT a mitocondrias aisladas induce la síntesis de RNA mitocondrial (Martino *et al.*, 1986). Lo anterior debido a que la HT actúa directamente sobre la modulación del sitio de inicio de la transcripción de la cadena pesada (Enriquez *et al.*, 1999). 3) Se ha encontrado que el receptor alfa de HT ($TR\alpha$) se transloca del citoplasma a las mitocondrias (Demonacos *et al.*, 1996). Otra posibilidad, es que el receptor funcional de HT se una a la región promotora de genes nucleares, que a su vez serían los que activarían la transcripción de los genes mitocondriales. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que el factor de iniciación de la traducción mitocondrial (mtTFA), que es una proteína limitante y al parecer suficiente junto con la RNA polímerasa para el inicio de la transcripción mitocondrial, es expresada en respuesta a HT (Garstka, 1994). De esta manera, el posible receptor de HJ, podría activar la expresión de los genes mitocondriales mediante alguno o ambos de estos mecanismos.

7.7.- El tamaño y su posible influencia en la metamorfosis.

Se ha sugerido que en insectos el tamaño de la larva es un factor importante en el inicio de la metamorfosis. En *Manduca sexta* (gusano cornudo del tabaco, orden Lepidoptera), la larva no sufre metamorfosis hasta no pesar 3 gramos y en algunos casos es necesario una muda extra para obtenerla (Safranek y Williams, 1984). En los insectos sociales, la metamorfosis debe estar necesariamente ligada a la expresión de las características morfológicas específicas de casta, debido a que es en este proceso donde la mayoría de las estructuras larvales son destruidas por histólisis y son reemplazadas por las estructuras adultas que se desarrollan a partir de los discos imaginales.

En varias colonias de himenópteros, la diferenciación fisiológica entre las castas es acompañada por dimorfismo en el tamaño del cuerpo, el cual es logrado por la calidad (o cantidad) del alimento ingerido por la larva (Brian, 1980), y en algunos casos, por extensión del período de alimentación larval, el cual puede involucrar una muda extra, como en el caso de las abejas *Hypotrigena braunsi* (Darchen y Delage-Darchen, 1974) y *Bombus terricola* (Plowright y Pendrel, 1977). Esta extensión del estado larval conduce a que la larva de reina coma por más tiempo y crezca más. Plowright y Pendrell han sugerido que al menos en *Bombus* el tamaño alcanzado por la larva en desarrollo determina el momento de la pupación y el destino de la casta (Plowright y Pendrell, 1977). En la abeja *Apis mellifera* también parece haber una relación directa entre el peso alcanzado por la larva, el tiempo de pupación y el desarrollo de características de reina. Las larvas tejientes (al tejer su capullo) que fueron alimentadas con JO y una cantidad variable de azúcares, se desarrollan en obreras si pesan menos de 180 mg; en reinas si pesan alrededor

de 220 mg, y en individuos intermedios o intercastas cuando su peso se encuentra entre los dos anteriores (Asencot y Lensky, 1976).

No obstante, el tamaño de la larva no es indispensable para la inducción de la pupación o para la generación de características de reinas. La aplicación de HJ a larvas de obrera de 3.5 días induce el desarrollo de características morfológicas de reinas, detiene la regresión de los ovarios y acorta el tiempo de desarrollo (de 20 días, en el control, tiempo normal de obreras, a 16 días, tiempo normal de reinas), pero el tamaño de los individuos al nacer es similar al de las obreras. Es importante notar que estos resultados se obtuvieron, no obstante al hecho de que las larvas tratadas fueron alimentadas con una cantidad normal de JO y crecieron en celdas normales (Wirtz y Beetsma, 1972). Este experimento confirma que una concentración alta de HJ es suficiente para activar el programa genético específico de reinas. Sin embargo, si esto no es acompañado por una mayor ingesta de alimentos, no se genera mayor tamaño

Por lo tanto, parecería que al menos en *Apis mellifera*., la HJ actúa como un mediador entre los alimentos ingeridos y la maquinaria metabólica necesaria para procesarlos en energía químicamente disponible, además de promover la diferenciación de castas. Una consecuencia de esta mayor actividad metabólica es un mayor tamaño, el cual correlaciona pero no determina, ni el inicio de la pupación, ni el desarrollo de características de reina. Aunque el tamaño no sea un factor determinante en la determinación de castas, en muchas especies de insectos sociales, la reina es de mayor tamaño. Esto hace suponer que la adquisición de esta característica es una ventaja adaptativa importante para la supervivencia de la reina y por lo tanto, de la especie.

7.8.- Posible mecanismo de inducción de características morfológicas diferenciales entre castas por la influencia de HJ.

En insectos como *Drosophila*, un alto título de ecdisona al final del último instar, seguido 10 horas después por un segundo pulso, inducen el inicio de la metamorfosis (Thummel, 1996). La ecdisona se une a su receptor funcional (EcR-USP) (Yao, 1992), para iniciar una cascada de activación genética (Ashburner, 1974) que culmina con la destrucción de los tejidos larvales y la formación de estructuras adultas a partir de los discos imagales (para más detalles del proceso ver sección 2.7.2). La ecdisona es secretada por las glándulas protorácicas (GP) debido a la estimulación de la hormona (PTTH sei,) que a su vez es secretada por las células neurosecretoras del cerebro (revisado por Gilbert *et al.*, 1981).

En la abeja *Apis mellifera*, niveles altos de HJ inducen pupación. Esto es diferente en otros insectos, donde parece que existe el efecto contrario (Locke, 1980). Aunque es desconocido el mecanismo de este proceso, existen dos observaciones que sugieren que es precisamente este alto nivel de HJ, lo que produce la señal neuroendócrina para la secreción de ecdisona y el inicio de la metamorfosis: a) El volumen y la actividad secretora de las GP están aumentadas en larvas de reinas en el quinto instar (Lukoschus, 1952, 1956,). Puesto que en este mismo estadio ocurre la mayor secreción de HJ, hay una correlación entre la mayor concentración de esta hormona y la de ecdisona (Rachinsky *et al.*, 1990). b) En larvas de obreras el tamaño de los núcleos de las glándulas protorácicas aumentan al mismo grado que las reinas después de la aplicación de HJ (Goorden, citado por Beetsma, 1979). Esta observación abre la posibilidad que una vez alcanzado un cierto valor crítico de HJ, se estimule la

secreción de ecdisona; y después de que la HJ ha bajado su concentración, se inicie la metamorfosis.

La otra pregunta importante por resolver, es saber cómo podría la HJ inducir el desarrollo de características morfológicas de reina, además del tamaño. Antes de sugerir alguna respuesta, analicemos primero las relaciones entre los patrones de concentración de ecdisona y la HJ:

A diferencia de lo que sucede con los niveles de la HJ, los niveles de ecdisona son muy bajos antes de la operculación (fase media, quinto instar) (ver figura 15). En contraste, después de la operculación los niveles de ecdisona se incrementan significativamente en ambas castas, pero sobre todo en reinas, donde su concentración es de aproximadamente el doble con respecto a obreras (ver los estadíos T2-3, figura 15). En ambas castas el perfil de concentración de ecdisona tiene un patrón similar a la de HJ, pero de alrededor de la mitad de concentración (ver figura 16). Comenzando con un bajo nivel al terminar la operculación, el nivel de ambas hormonas en ambas castas se incrementa gradualmente hasta alcanzar un pico máximo en la prepupa media; posteriormente, los niveles de ambas hormonas sufren una rápida disminución en la prepupa tardía, para después en la pupa ojos blancos, volver a incrementarse sobre todo en el caso de la ecdisona, ya que esta alcanza un nivel casi igual al alcanzado en prepupa media. En el caso de la HJ este incremento es mínimo (Rachinsky *et al.*, 1990).

Como hemos visto, en la prepupa de reinas ocurre un alto nivel de HJ al mismo tiempo que ocurre el primer pico de ecdisona. En otros insectos como *Drosophila*, la acción de la HJ parece ser antagónica a la acción de la ecdisona.

Lo anterior resulta claro en un sistema controlado como es el cultivo de células, donde se ha observado que la HJ inhibe algunos, pero no todos los aspectos de respuesta a ecdisona (Courgeon, 1975; Cherbas, 1989). De manera más particular, la respuesta de ecdisona sobre la inducción de los múltiples receptores nucleares involucrados en la cascada regulatoria que ocurre durante la metamorfosis, difiere en cierta medida si está presente la HJ. La presencia de esta hormona no tiene efecto sobre el incremento inicial del mRNA del receptor de ecdisona (EcR) pero provoca un incremento en los niveles del mRNA de E75 y previene los cambios posteriores de los mRNAs de EcR, USp y BRC (Riddiford, 1996). En apoyo a lo anterior, en la epidermis de *Manduca sexta* la HJ modula tanto el efecto de la ecdisona sobre la expresión de su receptor funcional (USP/EcR) (Hiruma *et al.*, 1999), como la expresión de otros genes (E75 y BRC) (Zhou *et al.*, 1998A y 1998B) inducidos en la cascada de activación genética durante la metamorfosis.

En base a las anteriores antecedentes, podemos suponer que en el caso de las reinas, las altas concentraciones de HJ presentes al mismo tiempo que las de ecdisona, podrían modificar la cascada regulatoria inducida por esta hormona. De esta manera, el tipo de RN inducidos, o el orden de su inducción podría ser afectada, produciéndose una activación diferente de los genes blanco secundarios. Lo anterior tendría como consecuencia que ocurriera un desarrollo diferente de los discos imaginales, a como podrían presentarlo cuando los niveles de estas hormonas son menores antes de la metamorfosis, como en el caso de las obreras (Una explicación parecida ha sido sugerida para explicar el desarrollo diferencial de los diferentes tejidos después de la metamorfosis en *Drosophila*. Ver "modelo de la coordinación tisular" en la sección 2.7.2.)

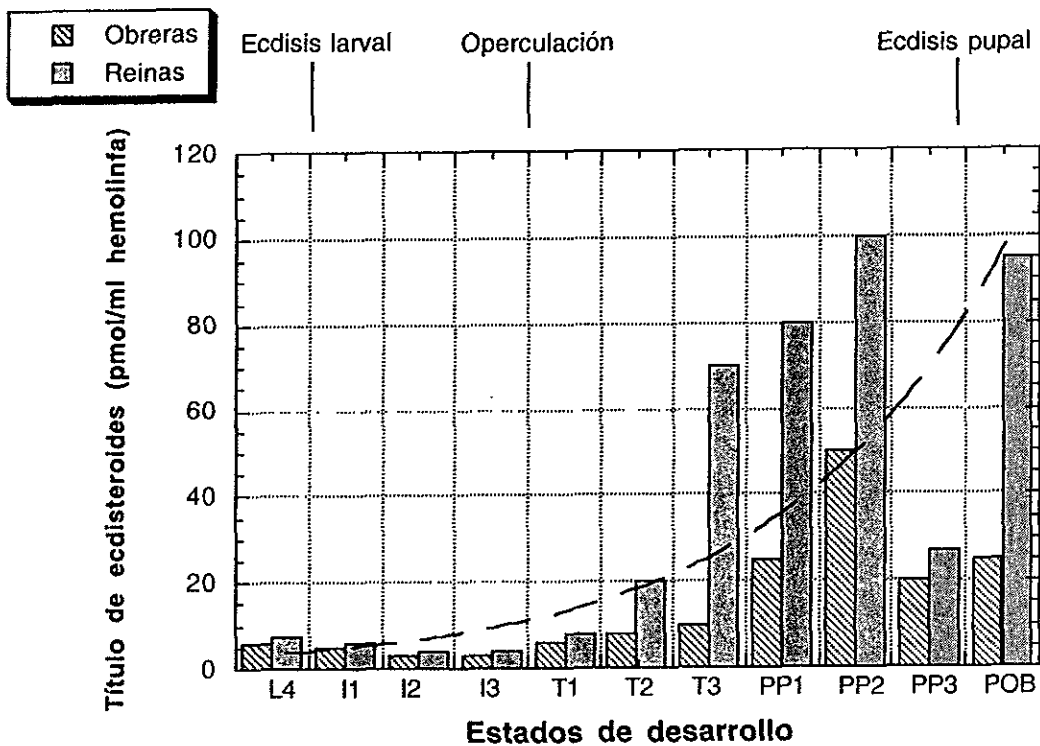


Figura 15.- Títulos de ecdisteroides (expresado como equivalentes de 20-hidroxiecdisona) en la hemolinfa de larvas hembras de abeja. L4 = larva cuarto instar; I = ingesta, I1, I2, e I3, son diferentes estadios de larvas que son alimentadas. PP = prepupa, POB = pupa ojos blancos. Modificado de Rachinsky *et al.*, 1990.

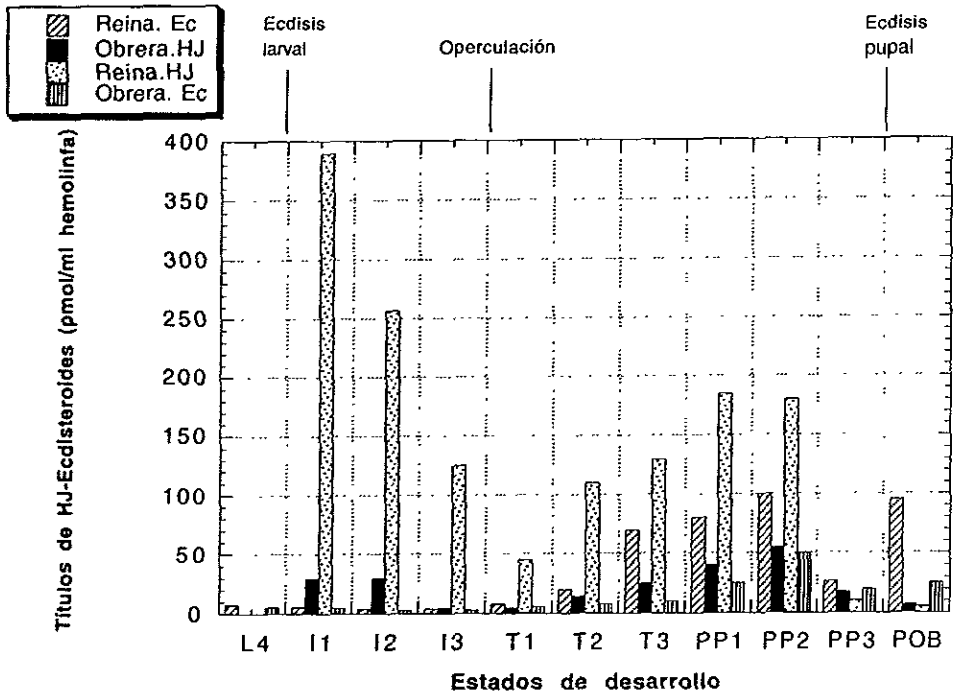


Figura 16.- Títulos de hormona juvenil y ecdisteroides en la hemolinfa de larvas hembras de abeja. En el recuadro Ec = ecdisona. Estadío L4 = larva cuarto instar. I = Ingesta, I1, I2, e I3, son diferentes estadíos de larvas que son alimentadas. PP = prepupa, POB = pupa ojos blancos. El título de HJ en reinas es representado con barras con puntos y el de obreras con barras llenas. El título de ecdisona en reinas es representado con rayas diagonales y el de obreras con rayas verticales. Modificado de Rachinsky *et al.*, 1990.

7.9.- Posibilidades del análisis del patrón de expresión de los RN durante el desarrollo de ambas castas.

Como se mencionó en la sección 6.6 de resultados, clonamos y secuenciamos 4 diferentes fragmentos de RN, dos fueron amplificados a partir de cDNA de reina de 4.5 días de desarrollo larvario (DHR78 y E78A) y dos a partir de DNA genómico (DHR3 y USP) (figura 14).

Es interesante notar que recientemente se ha propuesto que USP es el receptor de HJ (Jones y Sharp, 1997), por lo que sería interesante investigar los perfiles de expresión de este gen a lo largo del desarrollo en ambas castas y compararlo con los niveles reportados de HJ. Dado las grandes diferencias en la concentración de HJ entre ambas castas, el modelo de la abeja podría ser apropiado para proporcionar más evidencias con respecto al posible papel de USP como receptor de HJ.

Otro hecho por destacar es que encontramos varias clonas que codifican para E78A, lo cual muestra que este gen es expresado a los 4.5 días de desarrollo larvario de la reina (fase media del quinto instar). En contraste, en *Drosophila* este transcrito es expresado durante un breve intervalo en la prepupa media (Stone y Thummel, 1993). Dependiendo de cual sea el patrón de E78A en obreras, lo anterior podría sugerir diferentes posibilidades; todas con consecuencias interesantes para el entendimiento de los mecanismos evolutivos de la metamorfosis. Si el patrón de E78A en obreras es igual a reinas, entonces existirían diferencias entre especies en la cascada regulatoria inducida por ecdisona durante la metamorfosis. Si este patrón es igual a *Drosophila*, entonces las diferencias podrían ser específicas de casta.

8.0.- CONCLUSIONES

*Se identificó en *Apis mellifera* el gen que codifica para el homólogo del factor de iniciación de la traducción mitocondrial.

* Algunos de los transcritos que codifican para proteínas involucradas en la función mitocondrial, se expresan preferencialmente en larvas de reinas. Estos incluyen transcritos de genes nucleares (AmlF-2mt y cytc) y mitocondriales (COX-I). La expresión de estos genes en larvas, correlaciona con los niveles de la hormona juvenil, un mayor consumo de oxígeno y un mayor crecimiento larval.

*No se detectaron diferencias significativas en el número de genomas mitocondriales durante el desarrollo larvario de reinas y obreras. Lo anterior descarta que las diferencias en los niveles de los transcritos mitocondriales sean debido a dosis génica.

*La abundancia de los transcritos que codifican para el citocromo c y para la subunidad I de la citocromo c oxidasa, son similares a los niveles de estas proteínas previamente reportados, lo cual sugiere que el control de estos genes es logrado vía transcripcional y/o estabilidad de los mensajeros.

*Se identificaron 4 fragmentos de genes que codifican para miembros de la superfamilia de receptores nucleares.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Aloni, R., Peleg, D. y Meyuhas, O. (1992). Selective translational control and nonspecific postranscriptional regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2203-2212.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. y Hagen, T. M. (1995). Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**, 165-170
- Andres, A. J., Fletcher, J. C., Karim, F. D. y Thummel, C. S. (1993). Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. *Dev Biol.* **160**, 388-404
- Aristóteles, Anatomía de los animales. Editorial Schapire, Buenos Aires, Argentina, 1945. Libro cuarto. cap. VI 169-173.
- Asencot, M. y Lensky, Y. (1976). The effect of sugar and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens. *Life Science* . **18**, 693-700.
- Asencot, M. y Lensky, Y. (1988). The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochem.* **18** , 127-133.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. y Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 655-662.
- Bender, W., Spierer, P. y Hogness, D. S (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol.* **25**; 168, 17-33
- Beetsma, J. (1979). The process of queen-worker differentiation in the Honeybee. *Bee Word.* **60**, 24-39.
- Ber-Lin Chai y Shuel, R. W., (1970). Effects of supernumerary *corpora allata* and farnesol compounds on ovary development in the worker honeybee. *J. Apic. Res.* **9**, 19-27.

Bertholf, L. M. (1925). The moults of the honey bee. *J. econ. Ent.* **18**, 380-384.

Brian, M. V. (1974). Caste differentiation in *Myrmica*: The role of hormones. *J. Insect Physiol.* **20**, 1351-1365.

Brian, M. V. (1979). Caste differentiation and division de labor in social insects. Academic Press. **1**, 121-221.

Brian, M. V. (1980). Social control over sex and caste in bees, wasps and ants. *Biol. Rev.* **55**, 379-415.

Brown, W.H., Felauder, E. E. and Freure, R. J. (1961). Some new components of royal jelly. *Can. J. Chem.* **39**, 1086-1089.

Burtis, K. C., Thummel, C. S., Jones, C. W., Karim, F. D. y Hogness, D. S. (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell.* **61**, 85-99

Cherbas, L., Koehler, M. M. y Cherbas, P.(1989). Effects of juvenile hormone on the ecdysone response of *Drosophila* Kc cells. *Dev. Genet.* **10**, 117-188.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald R. J., y Rutter, WJ. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-9.

Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. Preiss T., y Lightowlers, R. N. (1994). Inhibition of protein synthesis promotes stability of nuclear-encoded respiratory gene transcripts. *J. Biol. Chem.* **269**, 27322-27328.

Courgeon, A. M. (1975) Combined action of juvenile hormone and ecdysterone on *Drosophila* cell lines in vitro. *C. R. Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D.* , **280**, 2563-2566

Connor, M. K., Takahashi, M., y Hood, D. A. (1996). Tissue-specific stability of nuclear- and mitochondrially encoded mRNAs. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 103-108.

Cooper, J. M., Mann, V. M. y Schapira, A. H. V. (1992). Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in skeletal muscle: effect of aging. *J. Neur. Sci.* **113**, 91-98.

Crozier, R. H. y Crozier, Y. C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization. *Genetics*. **133**, 97-117.

De Wilde, M. y Stegane, D. (1958). *Arch. Neerl. Zool.* **13**, Suppl. 1, 277-283. Citado por L'Helias, 1970.

De Wilde, J. y Wirtz, P. (1974). Hormone und polymorphismus der insekten. *Fortschr. Zool.* **22**, 93-98.

De Wilde, J. (1976). Juvenile hormone and caste differentiation in the honey-bee (*Apis mellifera* L.). Symposium on "Phase and caste determination in insects" (ed. M. Luscher). XV international Congress of Entomology, Washington. pp 5-20

Demonacos, C. V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D. A. y Sekeris, C. E., (1996). Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*. **61**, 226-232.

Dietz, A., y Lambreton, E. N. (1970). Caste determination in honey bees. II. Food consumption of individual honeybee larvae determined with P-labeled royal jelly. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **63**, 1342-45.

Dietz, A., Hermann, H. R. y Blum, M. S. (1979). The role of exogenous JHI, JHIII and ANTI-JH (precogene II) on queen induction of 4.5 days old worker honey-bee larvae. *J. Insect Physiology* . **25**, 503-512.

Dzierzon, J. (1845) Papers on fertilization and parthenogenesis in the honeybee. Eichstadt. *Bienen-Ztg.* 1-32.

Eder, J., Osanai, S., Mane, S. y Rembold, H. (1977). Immunoassay for honey bee cytochrome c in single animals with cytochrome c-coated bacteriophages: A sensitive tool for the study of caste formation in the honey bee, *Apis mellifera*. *Biochimica et Biophysica Acta* . **496**, 401-411.

Engelmann, F. (1995). The juvenile hormone receptor of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem Mol Biol.* **25**, 721-726.

Enriquez, J. A., Fernandez-Silva P., Garrido-Perez N, Lopez-Perez M. J., Perez-Martos A. y Montoya, J. (1999). Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol Cell Biol.* **19**, 657-670.

Evans, H. M., Emerson G. A. y Eckert, J. E. (1937). Alleged vitamin E content in royal jelly. *J. Econ. Entomol.* **30**, 642-46.

Evans, J. D., Wheeler, D. E. (1999). Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* . **96**, 5575-5580.

Fisk, G. J. y Thummel, C. S. (1995). Isolation, regulation, and DNA-binding properties of three *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10604-10608.

Friedrich, K., Brombach, M., y Pon, C. L. (1988). Identification, cloning and sequence of the *Streptococcus faecium* inB (translational initiation factor IF2) *Mol. & Gen. Genet.* **214**, 595-600.

Frohman, M. A., Dush, M. K. y Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 8998-9002.

Garstka, H. L., Facke, M., Escribano, J. R. y Wiesner, R. J. (1994). Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys. Res* **200**, 619-626.

Gilbert, L. y Schneiderman, H. A. (1961). *Am. Zoologist* . **1**, 11-51. Citado por L'Hélias, 1970.

Gilbert, L. I., Bollenbacher, W. E., Goodman, W., Smith, S. L., Aguí, N., Granger, N. y Sedlak, B. J. (1980). Hormones controlling insect metamorphosis. *Recent Prog Horm.* **36**, 401-49

Goorden, A., Goewie, E. A. y Beetsma, J. Effects of juvenile hormone application on development of the prothoracic gland and oenocytes of the honey-bee larva (*Apis mellifera* L.) citado by Beetsma, 1979.

- Gouy, M. y Gautier, C. (1982). Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* **10**, 7055-7064
- Hall, G. H. y Smith, D. R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matrelines using amplified mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4548-4552.
- Hamilton, W. D. (1966). The moulding of senescence by natural selection. *J. Theor. Biol.* **12**, 12-45.
- Harting, I. y Wiesner, R. J. (1997). Quantification of transcript-to template ratios as a measure a gene expression using RT-PCR. *Biotechniques.* **23**,450-455
- Hiruma, K, Shinoda T., Malone F. y Riddiford, L. M. (1999). Juvenile hormone modulates 20-hydroxyecdysone-inducible ecdysone receptor and *ultraspiracle* gene expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Genes Evol.* **209**, 18-30
- Hovemann, B., Richter, S., Walldorf, U. y Cziepluch, C. (1988). Two genes encode related cytoplasmatic factors 1a (EF-1a) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3175-3194.
- Haydak, M. H. y Palmer, L. S. (1942). Royal jelly and bee bread as sources of vitamin B1, B2, B6, C and nicotinic and pantothenic acids. *J. Econ. Entomol.* **35**, 319-320
- Haydak, M. H. y Vivino, A. E. (1950). The changes in the thiamine, riboflavin, niacin and patothenic acid contents in the food of female honeybees during growth with a note on the vitamin K activity of royal jelly and beebread. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **43**, 361-367.
- Iglesias, T., Caubin, J., Zaballos, A., Bernal, J. y Muñoz, A. (1995). Identification of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunidad 3 (ND3) as a thyroid hormone regulated gene by whole genome PCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 995-1000.
- Iltis, H., (1932). Life of Mendel. Unwin Hyman. Ltd.

Inoue, S., Matsubara, H. y Yamanaka, T. (1985). Complete amino acid sequence of cytochrome c from the honeybee, *Apis mellifera*, and evolutionary relationship of the honeybee to other insects on the basis of the amino acid sequence. *J. Biochem.* (Tokyo). **97**, 947-954.

Jones, G. y Sharp, P. A. (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13499-13503.

Karim, F., D. y Thummel, C. S. (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of E74A and E74B transcription in *Drosophila*. *Genes Dev.* **5**, 1067-1079.

Karim, F. D. y Thummel, C. S. (1992). Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* **11**, 4083-93.

Karim, F. D., Guild, G. M. y Thummel, C. S. (1993). The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development* **118**, 977-88

Keler, L. y Genoud, M. (1997). Extraordinary life spans in ants: a test of evolutionary theories of aging. *Nature.* **389**, 958-960.

Koelle, M. R., Segraves W. A. y Hogness, D. S. (1992). DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6167-6171.

Lazar, M. A., Berrodin, T.J. y Harding, H. P.(1991). Differential DNA binding by monomeric homodimeric, and potentially heteromeric form of the thyroid hormone receptor. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5005-5015.

Lensky, Y., Baehr, J. C., y Porcheron, P. (1978). Dosages radio-immunologiques des ecdysones et des hormones juvéniles au cours du développement post embryonnaire chez les ouvrières et les reines d' Abeille (*Apis mellifera* L. var *ligustica*) *C. R. Acad. Sci. Paris D* **287**, 821-824.

Lercker, G. P., Capella, Conte, L.S. Ruini, F. y Giordani, G. (1982). Components of royal jelly H. the lipid fraction, hydrocarbon and sterols. *J. Apic. Res.* **21**, 178-184.

- Lerro, K. A. y Prestwich, G. D. (1990). Cloning and sequencing of a cDNA for the hemolymph juvenile hormone binding protein of larval *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **265**, 19800-19806.
- Karaali, A., Meydanoglu, F. y Eke, D. (1988). Studies on composition, freeze-drying and storage of Turkish rojal jelly. *J. Apic. Res.* **27**, 182-185.
- Lavorgna, G., Karim, F., D., Thummel, C. S. y Wu, C. (1993). Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 3004-3008.
- L'Hélias, C. (1953). *Compt. Rend.* **236**, 2489-2491. Citado por L'Hélias, 1970.
- L'Hélias, C. (1954a). *Compt. Rend.* **238**, 2352-2354. Citado por L'Hélias, 1970.
- L'Hélias, C. (1954b). *Compt. Rend.* **238**, 2558-2559. Citado por L'Hélias, 1970.
- L'Hélias, C. (1954c). *Compt. Rend.* **239**, 778-780. Citado por L'Hélias, 1970.
- L'Hélias, C. (1970). Chemical Aspects of growth and development in insects. in Chemical Zoology. vol. V. Arthropod Part A. . Academic Press, New York. pp 343-39.
- Liang, P. y Pardee, A. B. (1992). Differential display of eucariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* . **257**, 967-971.
- Liang, P., Averbouk, L., y Pardee, A. B. (1993). Distribution and cloning of eucaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3269-3275.
- Limbach, K. J. y Wu, R. (1985). Characterization of two *Drosophila melanogaster* cytochrome c genes and their transcripts. *Nucleic. Acids Res.* **13** , 631-644.
- Lindaver, M. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vergl. Physiol.* **34** , 299-345.
- Locke, M. (1980). The cell biology of fat body development. In *Insect biology in the future* (Ed. M. Locke and D.S. Smith), . 227-252. Academic Press, New York.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L. y Darnel, J. Molecular cell biology. Third edition. Scientific american books. New, York. pp 856.

Lukoschus, F. (1952). Über die prothoraxdrüse der honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften* 39 , 116.

Lukoschus, F. (1956). Untersuchungen zur entwicklung der kastenmerkmale bei der honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Z. Morph. Okol. Tiere.* 45, 157-197.

Ma, L. y Spremulli, L.L. (1995) Cloning and sequence analysis of the human mitochondrial translational initiation factor 2 cDNA. *J. Biol. Chem.* 270, 1859-1865.

Ma, J. , Farwell, M. A., Burkhart, A. y Spremulli, L. L. (1995). Cloning and sequence analysis of the cDNA for bovine mitochondrial translational initiation factor 2. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1261, 321-324

Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A. y Evans R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* Mar. 6, 329-344.

Mangelsdorf, D.J., Thumel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P. Mark, M., Chambon, P. y Evans, R. M (1995).The nuclear receptor superfamily:The second decade. *Cell.* 83, 835-839.

Makrides, S. C. (1983). *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 58, 343-422.

Martino, G., Covello, C., De Giovanni, R., Filippelli, R. y Pitrelli G. (1986). Direct *in vitro* action of thyroid hormones on mitochondrial RNA-polimerase. *Mol. Biol. Rep.*, 11, 205-211.

Melampy, R. M. y Jones, D. B. (1939). Chemical composition and vitamin C content of royal jelly. *Proc. Soc. Rep. Biol. Med.* 41, 382-388

Meyerowitz, E. M. y Hogness, D. S. (1982). Molecular organization of a *Drosophila* puff site that responds to ecdysone. *Cell.* 28, 165-176.

Montoya, J., (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*. **34**, 151-9.

Muskavitch, M.A. y Hogness, D. S (1980). Molecular analysis of a gene in a developmentally regulated puff of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* ; **77**, 7362-7366.

Nation, J. L. y Robinson, F. Å. (1971). Concentration of some major and trace elements in honeybees, royal jelly and pollens, determined by atomic absorption spectrophotometry. *J. Apic. Res.* **10**, 35-43

Neugebauer, W. (1961). *Arch. Entwicklungsmech. Org.* **153**, 314-352. Citado por L'Hélias, 1970.

Nijhout, H. F. y Wheeler, D. E. (1982). Juvenile Hormone and the physiological basis of insect polymorphism. *Q. Rev. Biol.* **57**, 109-133.

Ojala, D., Montoya, J. y Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. **290**,470-474

Osanai, M. y Rembold, H. (1968). Development-dependent mitochondrial enzyme activities in honeybee castes. *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 22-31.

Oro, A. E., Mc Keown M. y Evans, R. M. (1990). Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature*. **347**, 298-301.

Oro, A. E., Mckeown M. y Evans R. M. (1992). The *Drosophila* nuclear receptors: new insight into the action of nuclear receptor in development. *Current opinion in genetic and development*. **2**, 269-274.

Ozawa, T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* . **1271**, 177-189.

Palli, S. R., Touhara, K., Charles, J. P., Bonning, B. C., Atkinson, J. K., Trowell, S. C., Hiruma, K., Goodman, W. G., Kyriakides, T., Prestwich, G. D., *et al.* (1994). A nuclear juvenile hormone-binding protein from larvae of *Manduca sexta*: a putative receptor for the metamorphic action of juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* . **91**, 6191-6195.

Partridge, L. y Fowler, K. Direct and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. **46**, 76-91.

Partridge, L. y Barton, N. H. (1996). On measuring the rate of aging. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **263**, 1365-1371.

Perez, J. (1889). Les abeilles. (see of traité de biologie de l' abeille Vol. 1, ed. R. Chauvin. 1968, pag. 47).

Pflugfelder, O. (1940). *Z. Wiss. Zool.* **153**, 108-133. Citado por L'Hélias, 1970.

Plinio, Historia Natural. L. XI.

Plowrigh, R.C. y Pendrel, B. A. (1977). Larval growth in bumble bees (hymenoptera: apidae). *Can Ent.* **109**, 967-973

Rachinsky, A., Strambi C., Strambi A. y Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysone in last instar honeybee larvae. *General and comparative endocrinology*, **79**, 31-38.

Rembold, H. (1965). Biologically active substances in royal jelly. *Vitamins and hormones* **23**, 359-382

Rembold, H. (1987). Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.*, **17**, 1003-1006.

Riddiford, I. M. (1996). Juvenile Hormone: the "status quo" action. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **32**, 271-286.

Rose, M. (1991). Evolutionary biology of aging . Oxford Univ. Press, Oxford.

Roseler, P. F. (1976). Juvenile hormone and queen rearing in bumble-bees. Symposium on "Phase and caste determination in insects" (ed. M.Luscher). XV International Congress of Entomology, Washington. pp-55-62.

Roseler, P. F. (1977). Endocrine control of polymorphism in bumble-bees. Proceeding VIII Congress IUSI, Wageningen, pp 22-23.

Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J. W, Plumbridge, J. A. y Grunberg-Manago, M. (1984). Sequence of the initiation factor IF2 gene: unusual protein features and homologies with elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81, 7787-7791.

Safranek, L., y Williams, C. M. (1984). Critical weights for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biol. Bull.* 167, 555-567.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sap, J., Muños, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H. y Vennstrom, B. (1989). Repression of a transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature*. 340, 242-244.

Segraves, W. A. y Hogness, D. S. (1990). The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 204-219

Sekeris, C. E., The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo*. 4, 317-320.

Shaw, G., y Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 46, 659-667.

Shepherd, J. C. Walldorf, U., Hug, P. y Gehring, W. J. (1989). Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 7520-7521.

Schrader, M., Becker-Andre, M. y Carlberg, C. (1994). Thyroid hormone receptor functions as monomeric ligand-induced transcription factor on octameric half-sites. *J. Biol. Chem.* 269, 6444-6449.

Shuel, R. W. y Dixon, S. E. (1959). Studies in the mode of action of royal jelly in honey bee development. II. Respiration of newly emerged larvae on various substrates. *Can. J. Zool.* **37**, 803-813.

Shuel, R. W. y Dixon, S. E. (1968). Respiration in developing honeybee larvae. *J. Apic. Res.* **7**, 11-19.

Shuel, R. W., Dixon, S. E. y Kinoshita, G. B. (1978). Growth and development of honey-bees in the laboratory on altered queen and worker diets. *J. Apic. Res.* **17**, 58-68.

Slama, K. y Hrubesova, H. (1963). *Zool. Jahrb., Abt. Allgem. Zool. Physiol. Tiere.* **70**, 291-300. Citado por L'Hélias, 1970.

Slama, K. y Janda, V. (1965). *Zool. Jahrb., Abt. Allgem. Zool. Physiol. Tiere.* **71**, 345-358. Citado por L'Hélias, 1970.

Sorensen, M. A., Kurland, C. G. y Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **207**, 365-377.

Stone, B. L. y Thummel, C. S. (1993). The *Drosophila* 78C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor super family. *Cell.* **75**, 307-320.

Sutherland, J. D., Kozlova, T., Tzertzinis, G. y Kafatos, F. C. (1995). *Drosophila* hormone 38: A second partner for *Drosophila* USP suggest an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc. Natl. Sci. USA.* **92**, 7966-7970.

Swammerdam, J. (1737-1738). *Biblia naturae*. Amsterdam.

Takai, D., Inoue, K., Shisa, H., Kagawa, Y. y Hayashi, J. I. (1995). Age-associated changes of mitochondrial translation and respiratory function in mouse brain. *Bioch. and Bioph. Res. comm.* **217**, 668-674.

Takenaka, T. (1984). Studies on proteins and carboxylic acids in royal jelly. *Bull. Fac. Agr. Tamagawa Univ.* **24**, 101-149. (jap. resumen en Inglés).

Talbot, W. S., Swyryd, E. A. y Hogness, D. S. (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*. **73**, 1323-37

Tata, J. R. (1963). Inhibition de la biological action of thyroid hormones by actinomycine D an puromicin. *Nature*. **197**, 1167-1168.

Tata, J. R. (1965). Turnover of nuclear and citoplasmatic ribonucleic acid at the onset of induced amphibian metamorphosis. *Nature*. **204**, 378-381.

Tata, J. R. (1966). Requirement of RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol.* **13**, 77-94.

Thomsem, E. (1952). *J. Exptl. Biol.* **29**, 137-149. Citado por L'Hélias, 1970.

Thummel, C. S., Burtis, K. C. y Hogness, D. S. (1990). Spatial and temporal patterns of E74 transcription during *Drosophila* development. *Cell*. **61**, 101-111.

Thummel, C. S. (1996). Flies on steroids *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *TIG*. **12**, 306-309.

Ulrich, G. M. y Rembold, H. (1983). Caste-specific maturation of the endocrine system in the female honey bee larva. *Cell Tissue Res.* **230**, 49-55

Vambutas, A., Ackerman, S. H. y Tzagoloff, A. (1991). Mitochondrial translational-initiation and elongation factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem* . **201**, 643-652

Van Itallie, C. M. (1990). Thyroid hormone and dexamethasone increase the levels of a messenger ribonuclei acid for a mitochondrially encoded subunit but no for a nuclear-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Endocrinology*. **127**, 55-62.

Virgilio, Geórgidas. Canto cuarto. L. III, XVI.

Vittek, J. y Slomiany, B. L. (1984). Testosterone in royal jelly. *Experientia*. **40**,104-106.

Walldorf, U. y Hovemann, B. T (1990). *Apis mellifera* cytoplasmic elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) is closely related to *Drosophila melanogaster* EF-1 alpha. *FEBS Lett.* **267**, 245-249.

Wang, D. I. (1965) Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *J. Apic. Res.* **4**, 3-5.

Weaver, N. (1966). Physiology of caste determination. *Ann. Rev. Entomol.* **11**, 79-102.

Webster, G. C. y Webster, S. L. (1982). Effects of age on the post-initiation stages of protein synthesis. *Mech. Aging Dev.* **18**, 369-378.

Webster, G. C. y Webster, S. L. (1983). Decline in synthesis of elongation factor one (EF-1) precedes the decreased synthesis of total protein in aging *Drosophila melanogaster*. *Mech. Aging Dev.* **22**, 121-128.

Webster, G. C. y Webster, S. L. (1984). Specific disappearance of translatable messenger RNA for elongation factor one in aging *Drosophila melanogaster*. *Mech. Aging Dev.* **24**, 335-342.

Wiesner, R. J., Kurowski, T. T. y Zak, R (1992). Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol.* **6**, 1458-67.

Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution.* **11**, 398-441.

Williams, C. (1959). *Biol. Bull.* **116**, 323-338.

Wirtz, P. y Beetsma, J. (1972). Induction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. *Entomol. Exp. Appl.* **15**, 517-520.

Wirtz, P. (1973). Differentiation in the honey bee larva. Meded. Landbouwhoges. Wageningen . 73-75.

Wojke, J. (1971). Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *J. Apic. Res.* **10**, 455-55.

- Woodard, C. T., Baehrecke, E. H. y Thummel, C. S (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell*. **79**, 607-15
- Xia, X., (1996). Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics*, **144**, 1309-20.
- Yamamoto, K. R.(1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network. *Ann. Rev. Genet.* **19**, 209-252.
- Yao, T. P., Segraves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M. y Evans R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*. **71**, 63-72.
- Yen, T.-C., Chen, Y.-S., King, K.-L., Yeh, S.-H. y Wei, Y.-H. (1989). Liver mitochondrial respiratory function decline with age. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 994-1003.
- Zelhof, A., Yao, T-P., Evans, R., McKeown, M. (1995). Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear receptor with the ability to inhibit the ecdysone response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 10477-10481.
- Zhou, Hiruma, K., Shinoda, T. y Riddiford, L. M. (1998). Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol.* **203**, 233-44.
- Zhou, B., Hiruma, K., Jindra, M., Shinoda, T., Segraves, W. A., Malone, F. y Riddiford, L. M (1998). Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Dev Biol.* **193**, 127-38.