

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SEQUENCIAMENTO DOS GENES *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* DE
ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

Autora: Arielen Patrícia Balista Casagrande Pozza
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki

MARINGÁ
Estado do Paraná
Novembro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SEQUENCIAMENTO DOS GENES *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* DE
ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

Autora: Arielen Patrícia Balista Casagrande Pozza
Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki
Co-orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Novembro – 2011

Folha de assinatura

Diploma! Sonho de todo aluno ... desejo de todo pai

Um dia na escola entrei,
meu sonho era estudar.

A sede do conhecer,
me deu prazer ao lutar.

Primeiro passo eu dei,
pegando o lápis na mão
e o diploma conquistei,
fazendo direito a lição.

Hoje devo preservar
o pouco que ainda resta.
Rios de águas cristalinas,
e o verde de nossas florestas.
Melhorar o ambiente
dos seres que o complementam,
a cadeia do universo
e a vida do nosso planeta.

O grande orgulho é dos pais
quando o filho é diplomado,
pois o sacrifício é idêntico
ao diploma conquistado.
E a consumação do desejo
envolve vontade e amor
da família, do aluno,
dos colegas e do professor.

Lição que me foi colocada.
No cumprimento do dever,
de quem sabe o que quer
e tem sede do saber.
E foi na Biologia e Zootecnia,
dentro da faculdade,
junto com as abelhas
a minha especialidade.

O poder da multiplicação
e o aumento da riqueza,
no cruzamento do pólen,
das flores, rara beleza.
Feito pelas abelhas
no maior gesto de nobreza,
garantindo para sempre
as espécies e a natureza.

Autor: Dirceu Casagrande

Aos

meus pais Dirceu Aparecido Casagrande e Elizabete de Fátima Balista Casagrande por acreditar, incentivar e por todo amor e dedicação.

Aos

meus avós Theótimo Ballista e Neiva Delacrossi Ballista pelas palavras amorosas e de incentivo.

À

minha irmã Ariane Aparecida Balista Casagrande por estar sempre ao meu lado.

Ao

meu sobrinho Gabriel Augusto Casagrande Montrezol pela alegria.

Ao

meu cunhado Juliano Augusto Montrezol por sempre me ajudar.

Ao

meu marido Rogério Pozza, minha metade, pelo amor, incentivo, compreensão e simplesmente por estar ao meu lado.

As

minhas amigas Cristiane Moraes e Priscila Cancian por fazerem parte da minha trajetória desde a graduação e por me incentivarem.

A

todos familiares por sempre torcerem por mim e incentivarem com palavras de apoio e sabedoria.

COM AMOR, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Á Deus que já conhecia todos os meus caminhos quando ainda me formava no ventre de minha mãe e pelas infinitas bençãos em minha vida, por sua bondade e persistência para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais, Dirceu Aparecido Casagrande e Elizabete de Fátima Balista Casagrande, pelo amor, dedicação, paciência e incentivo, pelo apoio emocional e financeiro, e pela imensa compreensão que tiveram em relação a minha ausência e por tudo que fazem e fizeram por mim.

Ao meu marido, namorado e amigo Rogério Pozza, com o qual compartilho todos os momentos de minha vida, e agradeço pela paciência e compreensão pela minha ausência. Te amo muito, por tudo que faz e fez por mim.

A toda a minha família que eu amo muito e sei que estão inteiramente felizes por essa realização, que sempre me incentivaram nessa jornada.

A minha orientadora, Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela confiança, incentivo, persistência, atenção e pela amizade, além de seus ensinamentos que foram fundamentais para a conclusão desta dissertação.

Ao meu co-orientador, Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pelos desafios propostos, incentivo e pela amizade.

As professoras Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pelos ensinamentos, amizade e profissionalismo.

A todos os meus professores de pós-graduação, pelo aprendizado que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Katia Regina Ostrovski e a Rejane Stubs Parpinelli pelo companheirismo e incentivo para a conclusão desse mestrado.

Aos vários colegas que conheci nas diferentes disciplinas cursadas durante esse período que incentivaram e apoiaram para que chegasse ao término desse projeto.

A “família” de alunos do laboratório que em momentos de desânimos sempre tinham uma palavra amiga e de incentivo que ajudam a concluir este tão sonhado e conquistado projeto, especialmente a Simone Aparecida dos Santos, pelos ensinamentos e ajuda na concretização desse projeto.

Aos técnicos, Sérgio Luiz Calvi e Leila Andréia Frota, por facilitarem a minha formação auxiliando da melhor forma possível.

À Universidade Estadual de Maringá e seus funcionários, por poderem realizar esse meu sonho que está se concretizando, por todos os funcionários que auxiliaram diretamente e indiretamente a minha formação acadêmica.

Ao grupo GPBee pelo companheirismo e colaboração na manutenção do “Projeto de melhoramento genético de *Apis mellifera* Africanizada para produção de geleia real”.

A CAPES, pelo auxílio financeiro que muito me ajudou na concretização deste trabalho.

E deixo o meu reconhecimento e agradecimento, a todos que estiveram diretamente e indiretamente envolvidos na realização desta dissertação.

BIOGRAFIA DA AUTORA

ARIELEN PATRÍCIA BALISTA CASAGRANDE POZZA, filha de Dirceu Aparecido Casagrande e Elizabete de Fátima Balista Casagrande, nasceu em Dracena, Estado de São Paulo, no dia 01 de setembro de 1988.

Formou-se em Ciências Biológicas pela União das Faculdades de Dracena (UNIFADRA) no estado de São Paulo em 2008.

Em 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração em Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Produção Animal - Apicultura.

No dia 30 de novembro de 2011, submeteu-se à banca para defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Abelha <i>A. mellifera</i> Africanizada.....	14
1.2. Geleia real	18
1.3. Composição protéica da geleia real: A família de proteínas principais da geleia real (MRJPs)	22
1.4. Melhoramento de abelhas Africanizadas para produção de geleia real e Marcadores Moleculares MRJPs	24
2. REFERÊNCIAS	27
I. SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>Mrjp3</i> , <i>Mrjp5</i> E <i>Mrjp8</i> DE ABELHAS <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADAS	
Resumo	33
Abstract	34
Introdução	35
Material e Métodos	37
Resultado	41
Discussão	42
Referências	45

LISTA DE TABELAS

SEQUENCIAMENTO DOS GENES *Mrjp3*, *Mrjp5* E *Mrjp8* DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

	Página
Tabela I. Condições da PCR para a amplificação dos locos das MRJPs de abelhas <i>A. mellifera</i> Africanizadas.....	49
Tabela II. Condições da PCR para o sequenciamento dos locos das MRJPs de abelhas <i>A. mellifera</i> Africanizadas.....	50
Tabela III. Tamanho e identificação dos alelos das proteínas principais da geleia real de <i>A. mellifera</i> Africanizadas sequenciados.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Pintura rupestre da retirada de mel de um enxame na Caverna das Aranhas, em Valencia – Espanha, realizada em torno de 6000 a.C. e encontrado em 1924	15
Figura 2. Mapa mostrando a expansão das abelhas Africanizadas ao longo do continente. As linhas indicam os anos que os enxames foram detectados na região	17
Figura 3. Diferenciação das castas de abelha <i>A. mellifera</i>	20

SEQUENCIAMENTO DOS GENES *Mrjp3*, *Mrjp5* E *Mrjp8* DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

Figura 1. Alinhamento de sequências similares do alelo <i>C</i> do loco <i>Mrjp3</i> através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: <i>A. mellifera</i> major royal jelly protein mRNA, complete cds (GU434675.1); <i>A. mellifera</i> major royal jelly protein 3(<i>Mrjp3</i>), mRNA (NM_001011601.1); <i>A. mellifera carnica</i> major royal jelly protein 3 (<i>Mrjp3</i>) gene, complete cds (AY663104.1) e PREDICTED: <i>A. mellifera</i> major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757).....	52
Figura 2. Alinhamento de sequências similares do alelo <i>D</i> do loco <i>Mrjp3</i> através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: <i>A. mellifera carnica</i> major Royal jelly protein 3 (<i>Mrjp3</i>) gene, complete cds (AY663104.1); PREDICTED: <i>A. mellifera</i> major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2)	53
Figura 3. Alinhamento de sequências similares do alelo <i>E</i> do loco <i>Mrjp3</i> através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: <i>A. mellifera carnica</i> major Royal jelly protein 3 (<i>Mrjp3</i>) gene, complete cds (AY663104.1) e PREDICTED: <i>A. mellifera</i> major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2)	54
Figura 4. Alinhamento das sequências similares do alelo <i>F</i> do loco <i>Mrjp3</i> através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: PREDICTED: <i>A. mellifera</i> major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2) e <i>A. mellifera carnica</i> major royal jelly protein 3 (<i>mrjp3</i>) gene, complete cds (AY663104.1)	55

- Figura 5. Alinhamento das sequências similares do alelo *G* do loco *Mrjp3* através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera carnica* major royal jelly protein 3 (*mrjp3*) gene, complete cds (AY663104.1) e PREDICTED: *A. mellifera* major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2) 56
- Figura 6. Alinhamento das sequências similares do alelo *D* do loco *Mrjp5* através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *Apis cerana* major royal jelly protein MRJP5 precursor (*MRJP5*) mRNA, complete cds (AY532369.1) 57
- Figura 7. Alinhamento das sequências similares do alelo *E* do loco *Mrjp5* através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *Apis cerana* major royal jelly protein MRJP5 precursor (MRJP5) mRNA, complete cds (AY532369.1); *A. mellifera* MRJP5 mRNA, complete cds (GU339164.1); *A. mellifera* major royal jelly protein 5(*Mrjp5*), mRNA (NM_001011599.1) e *A. mellifera* major royal jelly protein MRJP5 (MRJP5) mRNA, complete cds (AF004842.1) 58
- Figura 8. Alinhamento das sequências similares do alelo *F* do loco *Mrjp5* através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera* MRJP5 mRNA, complete cds (GU339164.1); *A. mellifera* major royal jelly protein 5 (*Mrjp5*), mRNA (NM_001011599.1) e *A. mellifera* major royal jelly protein MRJP5 (MRJP5) mRNA, complete cds (AF004842.1) 59
- Figura 9. Alinhamento das sequências similares do alelo *C* do loco *Mrjp8* através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: PREDICTED: *A. mellifera* carboxypeptidase B-like (LOC726391), mRNA (XM_001122133.2) 60
- Figura 10. Alinhamento das sequências similares do alelo *D* do loco *Mrjp8* através do programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: PREDICTED: *A. mellifera* carboxypeptidase B-like (LOC726391), mRNA (XM_001122133.2) 61

RESUMO

Sequenciamento dos genes *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de abelhas *A. mellifera* Africanizadas

No presente estudo, foi realizado o sequenciamento de alelos dos locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de *A. mellifera* Africanizadas, selecionadas para a produção de geleia real. O DNA genômico foi extraído de 20 operárias nutrizes provenientes de sete colmeias produtoras de geleia real do programa de melhoramento de abelhas para produção de geleia real da UEM, totalizando 140 amostras. Os locos microssatélites *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* foram amplificados utilizando *primers* específicos. Os três locos produziram um total de 16 alelos, e foram sequenciados 10 alelos em homozigose. O loco *Mrjp3* teve sequenciados os alelos *C*, *D*, *E*, *F* e *G*, o *Mrjp5* os alelos *D*, *E* e *F* e o *Mrjp8* os alelos *C* e *D*. Todos os alelos sequenciados e alinhados, apresentaram alta similaridade com aqueles já descritos anteriormente. Os alelos da *Mrjp3* que apresentam associação com a produção de geleia real estão sendo mantidos nas matrizes analisadas, este loco tem grande potencial para ser considerado um marcador molecular para produção de geleia real em *A. mellifera* Africanizada. Os alelos *C*, *D* e *E* da *Mrjp5* também estão sendo selecionados, contudo sua associação com a produção de geleia real precisa ser melhor analisada. A MRJP8 não tem papel direto na produção de geleia real, sua expressão tem sido detectada na glândula de veneno, assim, seus alelos não estão sendo selecionados. A manutenção das matrizes com os alelos selecionados das MRJP3 e MRJP5 deve ser realizada por meio de um programa de fecundação instrumental com análise da produção de geleia real das rainhas descendentes e dos marcadores moleculares selecionados.

Palavras-chaves: melhoramento genético, produção de geleia real, seleção de rainhas, polimorfismo.

ABSTRACT

Sequencing of the MRJP3, MRJP5 and MRJP8 genes from Africanized *Apis mellifera*

In the present study was performed the allele sequencing of the *Mrjp3*, *Mrjp5* and *mjp8* loci from Africanized *A. mellifera* selected to produce royal jelly. The genomic DNA was extracted from 20 nurse bees obtained from 7 hives producing royal jelly of the UEM's genetic bees improvement for royal jelly production, totaling 140 samples. The *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* microsatellite loci were amplified using specific primers. The three loci produced a total of 16 alleles, of which 10 homozygous alleles were sequenced. The *mrp3* locus had the *C*, *D*, *E*, *F*, *G* sequenced, the *Mrjp5* had the *D*, *E*, *F* alleles sequenced and the *Mrjp8* had the *C* and *D* alleles sequenced. All the sequenced and aligned alleles showed high similarity with the ones previously described. The *Mrjp3* alleles that show association with the royal jelly production are being kept in the analyzed matrixes, as the locus has great potential to be considered a molecular marker of the royal jelly production in Africanized *A. mellifera*. The *C*, *D* and *E* alleles from *Mrjp5* are also being selected, although their association with the production of royal jelly needs to be analyzed. The MRJP8 has no direct role in the royal jelly production its expression is being detected in the poison glandule and so, its alleles are not being selected. The maintenance of the matrixes carrying the selected alleles of MRJP3 and MRJP5 must be performed using an instrumental insemination program along with the analysis of the royal jelly production in the descending queens and of the selected molecular markers.

Key words: genetic improvement, royal jelly production, selection of queen, polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Apis mellifera* Africanizada

A abelha *A. mellifera* L. pertence à ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, dividida em oito famílias e composta aproximadamente de 20 mil espécies, das quais aproximadamente 3 mil espécies podem ser encontradas no Brasil (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

O enxame apresenta três tipos de membros: rainha, zangões e operárias, que apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas. A rainha reina sobre o enxame e é uma extraordinária máquina de botar ovos, sendo capaz de pôr milhares de ovos num só dia e elimina poderosos feromônios que são sinais químicos que controlam muitos dos comportamentos das operárias. As operárias executam diversas tarefas no enxame, para manter a colmeia em funcionamento. Os zangões cumprem a importante função de fecundar a rainha, e depois morrem (Winston, 2003).

A espécie colonizou uma vasta área num período relativamente curto. Características essenciais como o controle da temperatura do ninho, resistência a doenças e o comportamento de agrupar-se conferem aos indivíduos dessa espécie a capacidade de ocuparem desde regiões semidesérticas até zonas temperadas (Ruttner, 1988).

A abelha *A. mellifera* possui grande variedade de comportamentos que são dependentes da sua origem e da subespécie a que pertencem (Arias e Sheppard, 1996). Em relação à origem acredita-se que a *A. mellifera* se separou da *Apis cerana* na região da Ásia Central ou a Oeste daquele continente, expandindo-se em seguida para Europa e África (Sheppard e Meixner, 2003). Porém, dados baseados em *Single Nucleotide polymorphism* (SNP) sugerem que a *A. mellifera* originou na África, ocorrendo duas expansões para a Europa e Ásia (Whitfield et al., 2006).

A extensão natural de ocupação de *A. mellifera* abrange desde o Norte da Europa até o Sul da África e das ilhas britânicas aos montes Urais, Irã e Península Arábica (Ruttner, 1988). Com tal variedade de habitats, condições climáticas e de flora não é surpreendente encontrar subespécies de abelhas, cada uma com características distintas

e adaptadas a cada região, conhecidas como “raças geográficas” (Arias e Sheppard, 1996; Winston, 2003).

Desde os tempos da pré-história, o homem explora os recursos das abelhas melíferas. Os registros mais antigos são as pinturas rupestres datadas de aproximadamente 6 mil anos encontradas na Caverna das Aranhas, em Valência – Espanha (Figura 1) e em outros lugares no mundo. Se analisarmos toda existência da humanidade, podemos observar o quanto esse inseto foi e ainda é importante.

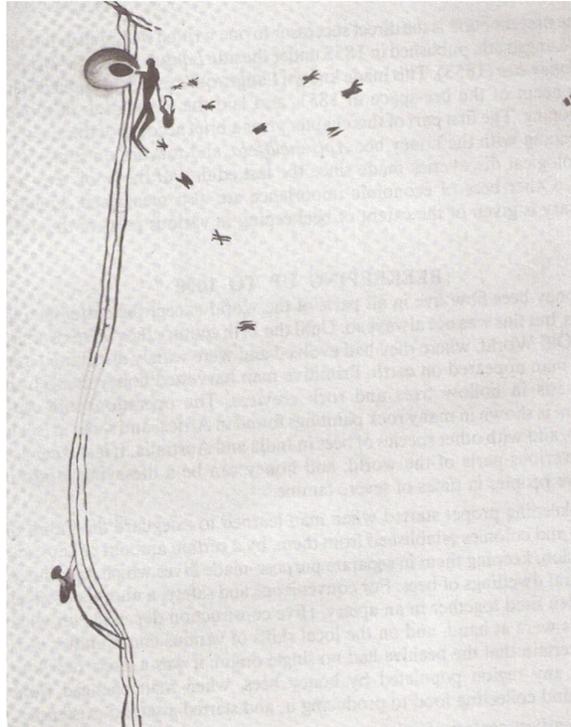


Figura 1. Pintura rupestre da retirada de mel de um enxame na Caverna das Aranhas, em Valência - Espanha, realizada em torno de 6000 a.C. e encontrada em 1924 (Extraído de Crane, 1992).

As primeiras introduções na América do Sul ocorreram com os imigrantes espanhóis e portugueses, que introduziram colmeias de *A. mellifera mellifera* e *A. mellifera iberiensis* (Nogueira-Neto, 1972). Para o Brasil, foram trazidas da Europa diferentes subespécies de *A. mellifera* e introduzidas pelos jesuítas, imigrantes europeus e pesquisadores, a partir de 1800, visando maior produção de mel (Nogueira-Couto e Couto, 2006), porém essas abelhas não eram adaptadas às condições ecológicas e climáticas do país (Sheppard et al., 1991).

Com a tentativa de melhorar a apicultura brasileira, que até então não era muito bem sucedida, em 1956, o geneticista Warwick Estevam Kerr, a pedido do governo brasileiro, trouxe da África rainhas de *A. mellifera scutellata* com o propósito de iniciar um programa de seleção onde os híbridos possuíssem a mansidão das abelhas europeias e a produtividade das africanas e, posteriormente, a distribuição de rainhas aos apicultores para aumentar a produção nacional de mel (Kerr, 1967; Gonçalves, 1974).

Das 133 rainhas importadas da Tanzânia e África do Sul, somente 33 rainhas sobreviveram e formaram o estoque genético inicial, que foi mantido em quarentena no Horto de Camacua, em Rio Claro-SP, até que no ano de 1957, 26 enxames de *A. mellifera scutellata* escaparam acidentalmente (Kerr, 1967).

Nesse mesmo ano, ocorreu o primeiro cruzamento entre as abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) e as espécies europeias (*A. mellifera ligustica*, *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica* e *A. mellifera caucasica*) existentes no Brasil, dando origem aos híbridos que sob ação da seleção natural nos cruzamentos, originou uma abelha com características próprias, a abelha *A. mellifera* Africanizada (Kerr e Bueno, 1970; Winston, 2003).

Embora esse híbrido possua características próprias, se assemelha muito com a subespécie *A. mellifera scutellata*, entre algumas características estão o rápido desenvolvimento e adaptação, rusticidade, prolificidade, alta capacidade de produção de mel e própolis, maior capacidade de identificação de fontes de alimento, eficientes polinizadores e resistente a doenças (Benson, 1985).

O processo de africanização ocorreu de forma extraordinariamente rápida, pelas condições ambientais que se assemelham com o seu local de origem, e de sua alta capacidade de reprodução que resultaram na quase completa colonização das Américas pelas abelhas Africanizadas em menos de 50 anos (De Jong, 1996), como podemos observar na Figura 2.

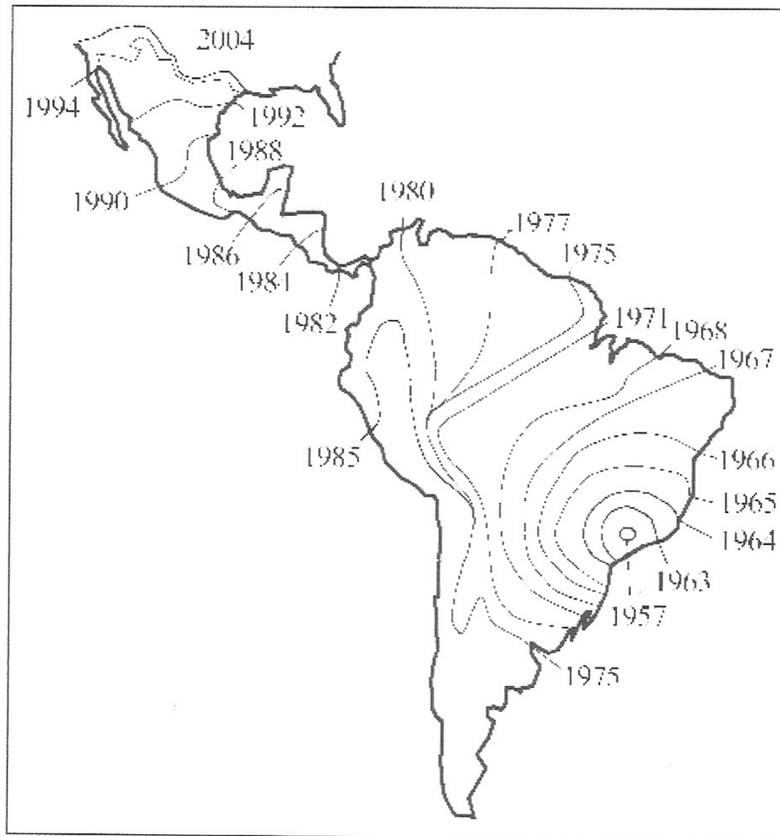


Figura 2. Mapa mostrando a expansão das abelhas Africanizadas ao longo do continente. As linhas indicam os anos que os enxames foram detectados na região (Extraído de Moritz et al., 2005).

A chegada em 1957 das abelhas Africanizadas no continente Americano, inicialmente não foi muito aceita pela falta de conhecimento de sua biologia, formas de manejos, a grande defensividade da colônia e de enxameação. Porém, essa visão foi se modificando pela alta produtividade de mel dessas abelhas (Garcia e Nogueira-Couto, 2005), contudo, como ainda não tinham sido desenvolvidas novas formas de manejo muitos apicultores abandonaram a atividade (Gonçalves, 1992; De Jong, 1996).

O surgimento das abelhas Africanizadas no Brasil e suas consequências na vida dos apicultores, comerciantes e pesquisadores foram considerados como marco divisório na história da apicultura (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

Por essas mudanças, foi necessária a realização de novos estudos sobre a biologia, comportamento e melhoramento das abelhas Africanizadas para suprir as necessidades da apicultura nacional, dessa maneira o apicultor teve que se adaptar a essas novas abelhas (Gonçalves, 1992; De Jong, 1996). A partir daí, a apicultura brasileira tem se

destacado como uma atividade em expansão, sendo um agronegócio em desenvolvimento permitindo que o nosso país seja conhecido como exportador e produtor de mel orgânico, própolis e geleia real (Queiroz et al., 2001).

A China contém aproximadamente 60% da produção mundial de geleia real, seguido por, Coreia, Taiwan e Japão (Rosmilah et al., 2008). Esta alta produção é consequência das seleções de abelhas *A. mellifera*, que envolve a substituição de rainhas melhoradas, inseminação instrumental e seleção assistida por marcadores moleculares (Harbo e Rinderer, 2005).

1.2. Geleia real

A geleia real é secretada pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas localizadas na cabeça das abelhas *A. mellifera*. Essa secreção é promovida pela ingestão de pólen com adição das regurgitações do papo das operárias, contendo principalmente açúcares (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999a; Nogueira-Couto e Couto, 2006). Essas glândulas têm o seu desenvolvimento completo aproximadamente entre o quinto e 14º dias de idade, secretando proteínas essenciais que é um dos produtos mais importantes da colmeia, pois faz parte da alimentação de todas as larvas em desenvolvimento e da rainha, nesse período as operárias são conhecidas como nutrizas (Schmitzová et al., 1998; Garcia-Amoeda e Almeida-Muradian, 2002; Koshio e Almeida-Muradian, 2003; Toledo e Mouro, 2005).

A atividade e a taxa de síntese de proteínas das glândulas hipofaríngeas variam de acordo com a idade da operária tendo maior atividade entre o décimo e 14º dias de idade (Takenaka e Kaatz, 1987; Crailsheim e Stolberg, 1989; Huang e Otis, 1989; Knecht e Kaatz, 1990; Naiem et al., 1999), quando o desenvolvimento das glândulas podem ser influenciados por fatores internos da colônia como cria e densidade populacional, e fatores externos como o forrageamento, permitindo às abelhas uma adaptação rápida às necessidades da colônia (Simpson et al., 1968; Brouwers, 1982; Silva de Moraes e Cruz-Landim, 1984; Huang et al., 1989; Huang e Otis, 1989).

Após esse período, a atividade das glândulas diminui e o volume decresce rapidamente, passando a secretar enzimas como a invertase, quando as abelhas se tornam campeiras (Huang e Otis, 1989), sendo que essa transição funcional e morfológica é controlada pelo hormônio juvenil (Rembold et al., 1974; Robinson, 1987; Huang et al., 1994, 1998).

As glândulas hipofaríngeas produzem uma secreção de coloração clara e rica em proteínas de consistência aquosa, enquanto a glândula mandibular produz uma secreção branca de consistência leitosa (Haydak, 1970; Beetsma, 1979).

A geleia real pode, então, ser descrita como uma substância viscosa, de coloração branco-amarelada, ou branco-acinzentada, levemente opalescente, de odor característico e pungente, porém não desagradável ou rançoso (Garcia-Amoeda e Almeida-Muradian, 2002; Koshio e Almeida-Muradian, 2003).

Essa secreção glandular das abelhas é um produto amplamente reconhecido pela sua composição complexa, contendo minerais, proteínas, aminoácidos, esteroides, fenóis, carboidratos, vitaminas, lipídios, acetilcolina e outras substâncias desconhecidas (Schmitzová et al., 1998; Garcia-Amoeda e Almeida-Muradian, 2007), sendo também importante no processo de reprodução e desenvolvimento.

O desenvolvimento das três castas das abelhas melíferas envolve a transição por quatro fases principais: ovo, larva, pupa e adulto. O processo de desenvolvimento da *A. mellifera* Africanizada varia para cada casta, os ovos que se tornarão rainha demoram 15 dias para emergir, enquanto a operária leva 20 dias para atingir a fase adulta e o zangão 24 dias (Kerr et al., 1972).

A determinação de castas pode ser expressa de forma simplificada, e os ovos não-fertilizados desenvolvem-se os machos, conhecidos como zangões, enquanto os ovos fertilizados originam operárias ou rainhas (Winston, 2003). Toda larva fêmea com menos de três dias de idade pode se desenvolver como operária ou rainha, dependendo da quantidade e qualidade de alimento fornecido (Silva et al., 2005). Podemos observar essas diferenças na Figura 3.

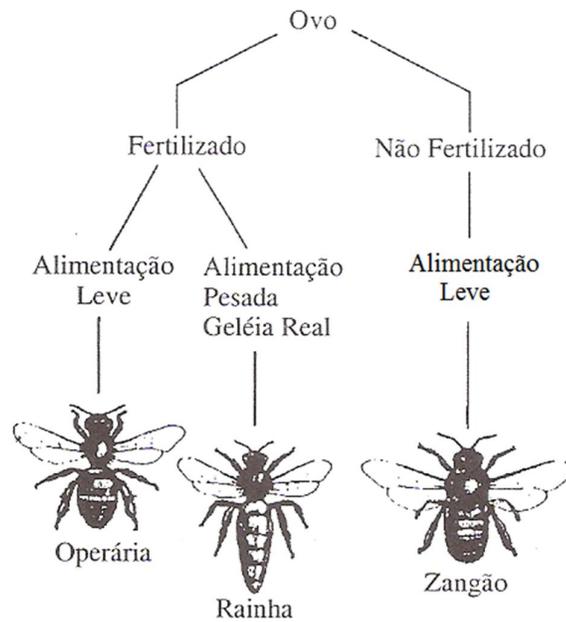


Figura 3: Diferenciação das castas de abelha *A. mellifera* (Modificado de Winston, 2003)

Todas as larvas até o terceiro dia do estágio larval recebem como alimento a geleia real, tornando-se alimento exclusivo da rainha ao longo de seu desenvolvimento, garantindo-lhe fertilidade e maior longevidade (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999a; Garcia-Amoeda e Almeida-Muradian, 2002, 2003, 2007, Winston, 2003; Drapeau et al., 2006). Enquanto as larvas destinadas a se tornarem operárias e zangões recebem como alimento uma mistura de mel, pólen e água, conhecido, como “pão de abelha”. Durante o estágio larval as três castas ganham enorme quantidade de peso, pela grande quantidade de alimento fornecido e crescem bastante em tamanho (Winston, 2003).

As diferenças nutricionais que envolvem a quantidade e qualidade do alimento oferecido atuam no sistema hormonal da larva definindo as características morfológicas e fisiológicas entre operárias e rainhas (Kerr, 1997). Esta diferenciação depende dos níveis de hormônio juvenil durante o período sensível do desenvolvimento larval (Asencot e Lensky, 1977; Wilde e Beetsma, 1982), esse estímulo nutricional impulsiona uma resposta endócrina que é manifestada pela alta produção de hormônio juvenil em larvas de rainhas quando comparadas com larvas de operárias (Hartfelder et al., 1993; Hartfelder e Engels, 1998).

Em média, a vida da rainha dura cerca de um ano em clima tropical e realiza seu voo nupcial em torno do quinto ao sétimo dias de vida, período que ocorre o

acasalamento com diversos zangões. Os machos são produzidos somente em determinados períodos na colmeia, normalmente, no verão, quando há abundância de alimentos. A partir do acasalamento, a rainha fecundada realiza posturas diárias de até 2.500 ovos, dependendo da necessidade da colmeia e dos fatores ambientais, enquanto, um grande número de fêmeas estéreis, as operárias são responsáveis pela manutenção da colmeia (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

Pela fertilidade e o longo período de vida das rainhas, que é atribuída a sua alimentação exclusiva com geleia real, tem despertado o interesse das pessoas acreditando-se que a geleia real produza efeitos similares em seres humanos. Alguns efeitos benéficos foram atribuídos a ingestão de geleia real, como eliminação do cansaço físico e mental, normalização do apetite, ativação das funções cerebrais, fortalecimento da energia vital, melhoria da visão, aumento da resistência frente a infecções virais e rejuvenescimento da pele (Koshio e Almeida-Muradian, 2003).

Em vários testes biológicos realizados com animais, a geleia real reduz os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, por terem ação anti-inflamatória (Koshio e Almeida-Muradian, 2003). E são atribuídos ao seu uso outros benefícios, tais como aumento de fertilidade, atividade antileucêmica e contra tumores ascíticos, atividade antibiótica, e hipocolesterolemiantes (Garcia-Amoeda e Almeida-Muradian, 2002). E o componente responsável pela ação antibiótica da geleia real é o ácido-10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA), que é o principal componente da fração lipídica e é considerado também o mais importante princípio ativo da geleia real. A presença do 10-HDA pode ser considerada como um indicador de qualidade e de frescor da geleia real (Koshio e Almeida-Muradian, 2003).

Por causa da atribuição dos efeitos terapêuticos da geleia real, pela sua rica composição química em vitaminas, ácidos orgânicos essenciais, elementos ativos proteicos e hormônios esteroides que proporcionam inúmeros benefícios funcionais à saúde (Vantoor e Littlejohn, 1994), despertou o interesse dos consumidores em adquirir este produto, o que torna esta atividade uma opção altamente atrativa (Vantoor e Littlejohn, 1994). A geleia real é utilizada na composição de diversos produtos, como cosméticos, suplementos alimentares e fármacos.

O Brasil está entre os países com potencial para obtenção de grande quantidade de produtos apícolas, pelas características climáticas favoráveis, ampla e variada vegetação silvestre (Sereia et al., 2010).

1.3. Composição proteica da geleia real: a família de proteínas principais da geleia real (MRJPs)

Na constituição química da geleia real encontram-se vários compostos que participam da atividade biológica como água (60 a 70%), proteínas brutas (12 a 15%), açúcares (10 a 16%), lipídeos (3 a 6%, principalmente o 10-HDA), minerais (2 a 3%, ferro e o cálcio) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina e riboflavina) (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999a; Bincoletto et al., 2005). As proteínas brutas da geleia real representam cerca de 50% da sua matéria seca (Shen et al., 2007), entre essas proteínas destacam-se as proteínas hidrossolúveis. As proteínas hidrossolúveis melhor caracterizadas são denominadas de proteínas principais da geleia real, as MRJPs (*Major Royal Jelly Proteins*) (Hanes e Simuth, 1992; Ohashi et al., 1997; Schmitzová et al., 1998; Simuth, 2001).

A classificação das proteínas principais da geleia real (MRJPs) de *A. mellifera*, tem sido relatada com base na sequência N-terminal de proteínas purificadas e sequências de cDNA disponíveis na biblioteca de cDNA. A família de proteínas principais da geleia real (MRJPs) apresenta peso molecular de 49 a 87 kDA (Schmitzová et al., 1998; Srisuparbh et al., 2003).

As MRJPs representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da geleia real (Schmitzová et al., 1998; Shen et al., 2007) Algumas regiões das MRJPs podem ser concentradas em aminoácidos ricos em nitrogênio (Shen et al., 2007, Schonleben et al., 2007) dessa forma, altos níveis de nitrogênio estariam estocados nas MRJPs.

A disponibilidade de nitrogênio nas MRJPs é utilizada para a nutrição das larvas e para o desenvolvimento da rainha (Drapeau et al., 2006). Essas observações reforçam a hipótese de que as MRJPs têm importante papel na nutrição das abelhas descrito anteriormente por Schmitzová et al. (1998).

Os genes das MRJPs codificam um grupo de proteínas que apresentam origem evolutiva correlacionada com as proteínas *Yellow* de *Drosophila melanogaster* (Albert et al., 1999a). O genoma da *Drosophila* codifica pelo menos sete membros da família *Yellow* (Maleszka e Kucharski, 2000), cujos locos estão envolvidos na pigmentação das larvas (Walter et al., 1991), enquanto as MRJPs estão envolvidas na nutrição das larvas.

Esses genes que codificam as MRJPs começaram a ser identificados nos estudos de Kludiny et al. (1994) e Albert et al. (1996), após esses estudos, vários trabalhos foram

publicados com o objetivo de identificar novos genes codificadores das MRJPs (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999a, 1999b; Albert e Klaudiny, 2004).

Com as informações publicadas do sequenciamento do genoma completo de *A. mellifera* (*The Honey Bee Genome Sequencing Consortium*, 2006) criaram-se novas perspectivas, desde a origem dessas abelhas à identificação de notáveis traços sociais ao nível genético-molecular e a possibilidade de identificar novos genes que codificam as MRJPs (Drapeau et al., 2006; Lobo, 2009).

Segundo, Schmitzová et al. (1998), Srisuparbh et al. (2003) e Drapeau et al. (2006) foram identificadas nove proteínas das MRJPs de *A. mellifera* que são: MRJP1 (57 kDA), MRJP2 (49 kDA), MRJP3 (60-70 kDA), MRJP4 e MRJP5 (77-87 kDA), MRJP6, MRJP8 e MRJP9, além de um polipeptídeo incompleto, MRJP ψ , codificado por um pseudogene. Os genes codificadores destas proteínas estão localizados no cromossomo 11.

Um dos primeiros estudos moleculares voltados para a obtenção de marcadores de DNA relacionados com a produção de geleia real foi realizado por Chen et al. (2005) que identificaram sete alelos, amplificados por locos microssatélites, que podem ser utilizados como marcadores de abelhas produtoras de grandes quantidades de geleia real.

As MRJPs têm sido sugeridas por vários pesquisadores como marcadores genéticos em diferentes estudos de abelhas *A. mellifera*, especialmente em relação às MRJP3 e MRJP5 pelas regiões repetitivas em tandem (VNTR) encontradas nestes genes que revela um elevado polimorfismo (Albert et al., 1999a, 1999b; Beye et al., 1998; Schmitzová et al., 1998). Por análises de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram verificados dez alelos de tamanhos distintos em amostras aleatórias de abelhas, que detectou alta variabilidade do *loco Mrjp3*, consequência do polimorfismo de uma região com número variável de repetições, localizado na parte C-terminal da região codificadora. Esta alta variabilidade genética revela o potencial de se utilizar essa proteína como marcador genético para estudos em abelhas *A. mellifera* (Albert et al., 1999b).

Além, das crescentes descobertas sobre as MRJPs de *A. mellifera* e de propiciar o interesse de identificar e caracterizar proteínas MRJPs em outras espécies do gênero *Apis* (Srisuparbh et al., 2003), essas proteínas são bem caracterizadas em *A. mellifera* (Albert et al., 1999a; 1999b; Schmitzová et al., 1998; Albert e Klaudiny 2004; Drapeau et al., 2006), bem como em outros gêneros de abelhas (Srisuparbh et al., 2003).

1.4. Melhoramento de abelhas africanizadas para produção de geleia real e Marcadores Moleculares MRJPs

O Programa de Melhoramento Genético visa selecionar linhagens que apresentem características de interesse econômico ao apicultor e usá-las como linhagens na próxima geração, a fim de incrementar a produção e aumentar a eficiência de produção (Rinderer, 2008).

Um primeiro método utilizado em populações que não sofreram nenhum melhoramento é o de seleção massal que em abelhas, resulta em bons ganhos iniciais, principalmente em abelhas Africanizadas, graças a sua grande variabilidade genética (Manrique e Soares, 2002), sendo esta causada por fatores genéticos e ambientais (Roberts e Mackensen, 1951). A produção de geleia real pode ser afetada pelos genes das abelhas e pelo ambiente interno e externo da colônia (Jianke et al., 2003) envolvendo interações biológicas e comportamentais intrínsecas às abelhas (Suwannapong et al., 2007; Weneger et al., 2009).

Em janeiro de 2006, foi iniciado pelo grupo de pesquisa sobre abelhas da UEM o Programa de Melhoramento Genético, visando ao aumento da produção de geleia real em abelhas Africanizadas. O programa atualmente tem 20 rainhas matrizes de abelhas Africanizadas que se encontra na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM), com genótipos conhecidos assistido por marcadores moleculares e com histórico de produção.

A China segue há mais de 25 anos com trabalhos de melhoramento genético visando à produção de geleia real em abelhas *Apis mellifera*, desde então a produção tem melhorado a cada ano, passando de 302 g de geleia real por colônia a cada três dias para 352 g após dois anos de pesquisas (Xianmin et al., 2003).

A seleção das rainhas é baseada na avaliação genética que depende da estimação dos componentes de (co) variância e dos parâmetros genéticos para identificação dos animais geneticamente superiores, porém este método nunca foi utilizado para a produção de geleia real (Faquinello et al., 2011).

Faquinello (2007) avaliou a produção de geleia real em abelhas Africanizadas, por meio de inferência Bayesiana, onde obteve uma alta estimativa de herdabilidade de 0,27 para porcentagem de aceitação, 0,10 para produção de geleia real por colônia e de 0,55 por cúpula.

As análises realizadas por Faquinello et al. (2011) mostraram que a correlação genética indica que a seleção de rainhas pode aumentar a produção de geleia real por colônia, aceitação de larvas e produção de geleia real por cúpula, sendo que a produção de geleia real sofre grande influência do ambiente.

A correlação genética permite a medida da direção da relação entre duas características possibilitando o uso de seleção indireta que, em alguns casos, permite altos ganhos (Cruz, 2001). Um exemplo, segundo Faquinello (2007), seria a seleção para a característica porcentagem de aceitação que promoverá aumento na produção de geleia real por colônia e por cúpula em abelhas Africanizadas, apresentando valores de correlação genética de 0,38 e 0,75, respectivamente.

No caso da China, os programas de seleção para geleia real têm como base a produção de mel e outras características desejáveis (Chen et al., 2002). Entretanto, Azevedo (1996) verificou que a produção de mel beneficia, porém, não serve como parâmetro para estimação da produção de geleia real, sendo a estocagem de pólen o fator importante para esta característica.

As análises de Baitala et al. (2010) realizadas por meio da Diferença Esperada na Progênie (DEP) representa a metade do valor genético do animal e indica a capacidade de transmissão genética. Os valores de DEP foram analisados em função da frequência dos alelos, em que os alelos *C*, *D* e *E* do loco *Mrjp3* explicam 36,85% da variação da DEP para a produção de geleia real, sugerindo que para se aumentar a produção de geleia real esses alelos devem ser intensificados.

Segundo Parpinelli (2011), houve alteração dos alelos detectados nos locos da *Mrjp3*, *Mrjp5* neste estudo em relação aos alelos identificados por Baitala et al. (2010), os alelos *A* e *B* do loco *Mrjp3* não foi observado, já o loco *Mrjp5* pode-se observar quatro novos alelos que foram denominados de *H* (650 pb), *I* (750 pb), *J* (780 pb) e *K* (800 pb).

Os valores de heterozigosidade observados nos locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* indicam elevado grau de diversidade genética e o índice de fixação (F_{is}) indica que as colônias analisadas apresentam excesso de homozigose, em que os alelos *D* e *E* do loco *Mrjp3* apresentam as maiores frequências 0,3357 e 0,3107, mostrando que no processo de seleção de rainhas produtoras de geleia real esses alelos estão sendo mantidos, e apenas o alelo *C* teve uma frequência pequena 0,0321. Esses alelos são potencialmente marcadores para a produção de geleia real e, provavelmente, apresentam maior

contribuição para a produção de geleia real e estão em seleção, já os alelos dos locos *Mrjp5* e *Mrjp8* não estão sendo selecionados (Parpinelli, 2011).

Segundo, Baitala et al. (2010), o loco *Mrjp3* e os respectivos alelos *C*, *D* e *E* exercem influência no valor genético para produção de geleia real, indicando que a maior produção de geleia real tem contribuição direta do produto desses alelos, isto foi confirmado pelo estudo de Parpinelli (2011). Desta forma, uma estratégia para intensificar a produção de geleia real seria aumentar a frequência dos alelos *C*, *D* e *E* do loco *Mrjp3* nas colmeias produtoras de geleia real, mostrando que esse loco tem potencial para ser usado como marcador molecular para seleção de rainhas *A. mellifera* Africanizadas para produção de geleia real.

REFERÊNCIAS

- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1996) Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein RJP57-1; longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster yellow* protein, *J. Apicult. Res.* 35, 63-68.
- Albert S., Bhattacharya D., Klaudiny J., Schitzová J., Simúth J. (1999a) The family of major royal jelly proteins and its evolution, *J. Mol. Evolut.* 49, 290-297.
- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1999b) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Insect Bioch. Mol. Biol.* 29, 427-434.
- Albert S., Klaudiny J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library, *J. Insect Physiol.* 50, 51-59.
- Arias M.C., Sheppard W.S. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence, *Mol. Phylog. Evolut.* 5, 557-566.
- Asecant M., Lensky Y. (1977) The effect of crystals in stored royal jelly and juvenile hormone on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens, in: VIII Congress of Iussi, Wageningen, pp.5-10.
- Azevedo A.L.G. (1996) Estudo de parâmetros relacionados com a produção de geleia real em colmeias de *Apis mellifera* mais e menos produtivas. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- Baitala T.V., Faquinello, P., Toledo, V.A.A., Mangolin, C.A., Martins, E.N., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C. (2010) Potencial use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies, *Apidologie* 41, 160-168.
- Beetsma J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee, *Bee World* 60, 24-39.
- Benson K. (1985) Africanized honey bees: Their tactics of conquest, *Am. Bee J.* 125, 435-437.
- Beye M., Neumann P., Schmitzová J., Klaudiny J., Albert S., Simúth J., Felder M., Moritz R.F.A. (1998) A simple, non-radioactive DNA Fingerprinting method for identification of patriline in honeybee colonies, *Apidologie* 29, 255-263.
- Bincoletto C., Eberlin S., Figueiredo C.A., Luengo M.B., Queiroz M.L. (2005) Effects produced by royal jelly on halmatopiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge, *Int. Immunopharmacol.* 5, 679-688.

- Brouwers E.V.M. (1982) Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee, *J. Apicult. Res.* 21, 193-198.
- Chen S, Su S., Lin X. (2002) An introduction to high yielding royal jelly production methods in China, *Bee World* 83, 69-77.
- Chen S., Li J., Zhong B., SU S. (2005) Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*), *Chin. J. Genet.* 32, 1037-1044.
- Crailsheim K., Stolberg E. (1989) Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.), *J. Insect Physiol.* 35, 595-602.
- Crane E. (1992) The world's beekeeping – past and present, in: Graham, J. M. (Ed.), *The hive and the honey bee*, Dadant and Sons, Hamilton, Illinois, pp. 1-20.
- Cruz C.D. (2001) Programa genes versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- De Jong, D. (1996) Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success, *Bee World* 77, 67-70.
- Drapeau M.D., Albert S., Kurcharski R., Prusko C., Maleszka R. (2006) Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bee, *Genome Res.* 16, 1385-1394.
- Faquinello P. (2007) Avaliação genética em abelhas *Apis mellifera* Africanizadas para produção de geleia real. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- Faquinello P., Toledo V.A.A., Martins E.N., Oliveira C.A.L., Sereia M.J., Costa-Maia F.M., Rúvolo-Takasusuki M.C.C. (2011) Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees, *Sociobiol.* 57, 1-15.
- Garcia R.C., Nogueira-Couto R.H. (2005) Produção de geleia real por abelhas *Apis mellifera* italianas, Africanizadas e descendentes de seus cruzamentos, *Acta Sci. Anim. Sci.* 27, 17-22.
- Garcia-Amoeda L.H., Almeida-Muradian L.B. (2002) Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geleia real, *Química Nova* 25, 676-679.
- Garcia-Amoeda L.H., Almeida-Muradian L.B. (2003) Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in royal jelly from São Paulo State, Brazil, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 23, 62-65.
- Garcia-Amoeda L.H., Almeida-Muradian L.B. (2007) Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly, *Química Nova* 30, 257-259.
- Gonçalves L.S. (1974) The introduction of the African bees (*Apis mellifera adansonii*)

- into Brazil and some comments on their spread on South America, *Am. Bee J.* 114, 414-419.
- Gonçalves L.S. (1992) Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético, *Naturalia*, edição especial, 126-134.
- Hanes J., Simuth J. (1992) Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.), *J. Apicult. Res.* 31, 22-26.
- Harbo J.R., Rinderer T.E. (2005) Breeding and genetics of honeybees, US Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. AH-335.
- Hartfelder K., Tozetto S.O., Rachinsky A. (1993) Sex-specific developmental profiles of juvenile hormone synthesis in honey bee larvae, *Develop. Genes Evolut.* 202, 176-180.
- Hartfelder K., Engels W. (1998) Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee, *Curr. Top. Dev. Biol.* 40, 45-77.
- Haydak M.H. (1970) Honey bee nutrition, *Ann. Rev. Entomol.* 15, 143-156.
- Huang Z.Y., Otis G.W. (1989) Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees, *Insectes Soc.* 36, 264-276.
- Huang Z.Y., Otis G.W., Teal P.E.A. (1989) Nature of brood signals activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera), *Apidologie* 20, 455-464.
- Huang Z.Y., Robinson G.E., Borst D.W. (1994) Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees, *J. Compar. Physiol.* 174, 731-739.
- Huang Z.Y., Plettner E., Robinson G.E. (1998) Invertase in the glands hypopharyngeal of the honeybee, *J. Apicult. Res.* 783, 143-152.
- Jianke L., Shenglu C., Boxiong Z., Songrun S. (2003) The optimal way of royal jelly production, *Am. Bee J.* 143, 221-223.
- Kerr W.E. (1967) The history of introduction of African bees to Brazil, South Africa, *Am. Bee J.* 39, 3-5.
- Kerr W.E., Bueno D. (1970) Natural crossing between *Apis mellifera adansonii* and *Apis mellifera ligustica*, *Evol.* 24, 145-148.
- Kerr W.E., Zucchi R., Nakadaira J.T., Butolo, J.E. (1972) Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae), *Entomol. Soc.* 70, 265-276.
- Kerr W.E. (1997) Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequences, Brazil, *J. Genet.* 20, 601-611.

- Klaudiny J., Hanes J., Kulifajova J., Albert S., Simúth J. (1994) Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly, *J. Apicult. Res.* 33, 105-111.
- Knecht D., Kaatz H.H. (1990) Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees, *Apidologie* 21, 457-468.
- Koshio S., Almeida-Muradian L. B. (2003) Aplicação da clae para determinação do ácido-10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geleia real pura e adicionada a mel brasileiro, *Quim. Nova* 26, 670-673.
- Lobo C.H. (2009) Determinantes moleculares do polietismo seqüencial em *Apis mellifera*. Thesis (Ph.D.), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP.
- Maleszka R., Kucharski R. (2000) Analysis of *Drosophila yellow-B* cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 773-776.
- Manrique A.J., Soares A.E.E.S. (2002) Início de um programa de seleção de abelhas Africanizadas para a melhoria na produção de própolis e seu efeito na produção de mel, *Interciência* 27, 312-316.
- Moritz R.F.A., Hartel S., Neumann P. (2005) Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity, *Écoscience* 12, 289-301.
- Naiem E.S., Hrasnigg N., Crailsheim K. (1999) Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.), *J. Compar. Physiol.* 169, 271-279.
- Nogueira-Couto R.H., Couto L.A. (2006) Apicultura: manejo e produtos. Funep, Jaboticabal.
- Nogueira-Neto P. (1972). Notas sobre a história da apicultura brasileira, in: Camargo, J.M.F. (Ed.), Manual de apicultura, Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 17-32.
- Ohashi K., Natori S., Kubo T. (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal glands cells with na age dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L., *Eur. J. Biochem.* 249, 797-802.
- Parpinelli R.S. (2011) Avaliação de marcadores microssatélites MRJPs em colônias de *Apis mellifera* Africanizadas selecionadas para a produção de geleia real. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- Queiroz M.L., Barbosa S.B.P., Azevedo M. (2001) Produção de geleia real e desenvolvimento de abelhas *Apis mellifera*, na região semi-árida de Pernambuco, *Rev. Bras. Zootec.* 30, 449-453.
- Rembold H., Czoppelt C., Rao P.J. (1974) Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*, *J. Insect Physiol.* 20, 1193-1202.

- Rinderer T.E. (2008) Selection, in: Rinderer, T.E., Bee genetics and breeding, Academic Press, Florida, pp. 305-319.
- Roberts W.C., Mackensen O. (1951) Bee breeding and animal breeding, Am. Bee J. 91, 292-294.
- Robinson G.E. (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone, Beh. Ecol. Sociobiol. 20, 329-338.
- Rosmilah M., Shahnaz M., Patel G., Lock J., Rahman D., Masita A., Noormalin A. (2008) Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*. Trop. Biomed. 25, 243-251.
- Ruttner F. (1988). Biogeography and taxonomy of honeybee, Springer Verlag, Berlin.
- Schmitzová J., Klaudivy J., Albert S., Schroder W., Schreckengost W., Hanes J., Judová J., Simúth J. (1998) A family of royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., Cell. Mol. Life Sci. 54, 1020-1030.
- Schonleben S., Sickmann A., Mueller M.J., Reinders J. (2007) Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly, Anal. Bioanal. Chem. 389, 1087-1093.
- Sereia M.J., Toledo V.A.A., Rúvolo-Takasusuki M.C.C., Sekine E.S., Faquinello F., Maia F.M.C. (2010) Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas Africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes, Acta Sci. Anim. Sci. 32, 467-474.
- Shen L., Xing L., Yang Y., Gao Q. (2007) Sequence analysis of functional *Apisimin-2* cDNA from royal jelly of Chinese honeybee and its expression in *Escherichia coli*, Asia Pac J Clin Nutr. 16, 222-226.
- Sheppard W.S., Meixner M.D. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, Apidologie 34, 367-375.
- Sheppard W.S., Soares A.E.E., De Jong D., Shimanuki H. (1991) Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil, Apidologie 22, 643-652.
- Silva I.C., Message D., Cruz C.D., Silva M.V.G.B. (2005) Aplicação de análises multivariadas para determinação da casta de abelhas *Apis mellifera* L. (Africanizadas), obtidas em laboratório, Rev. Bras. Zootec. 34, 635-640.
- Silva de Moraes R.L.M., Cruz-Landim C. (1984) Influência da densidade populacional no comportamento dos núcleos das glândulas hipofaringeanas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae), Naturalia 9, 27-33.
- Simpson J., Riedel I.B.M., Wilding N. (1968) Invertase in the glands hypopharyngeal of the honeybee, J. Apic. Res. 7, 29-36.

- Simuth U. (2001) Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Apidologie* 32, 69-80.
- Srisuparbh D., Klinbunga S., Wongsiri S., Sittipraneed S. (2003) Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*), *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 572-579.
- Suwannapong G., Seanbualuang P., Wongsiri S. (2007) A histochemical study of the hypopharyngeal glands of the dwarf honey bees *Apis andreniformis* and *Apis floreae*, *J. Apic. Res. and Bee World* 46, 260-263.
- Takenaka T., Kaatz H.H. (1987) Protein synthesis by hypopharyngeal glands of worker honey bees, in: Eder J., Rembold H. (Ed.), *Chemistry and biology of social insects*, Peperny, Munchen, pp.166-167.
- Toledo V.A.A., Mouro G.F. (2005) Produção de geleia real com abelhas Africanizadas selecionadas e cárnicas híbrida, *Rev. Bras. Zootec.* 34, 2085-2092.
- Vantoor R.F., Littlejohn R.P. (1994) Evaluation of management techniques in production on royal jelly honey bees in New Zealand, *J. Apic. Res.* 33, 160-166.
- Xianmin L., Jianke L., Cangqiang C. (2003) Factors affecting royal jelly production, *Am. Bee J.* 143, 969-972.
- Walter M.F., Black B.C., Afshar G., Kermabon A.Y., Wrigth T.R.F., Biessmann H. (1991) Temporal and spatial expression of the *yellow* gene in correlation with cuticle formation and DOPA decarboxylase activity in *Drosophila* development, *Develop. Biol.* 147, 32-45.
- Weneger J., Lorenz M.W., Bienefeld K. (2009) Physiological consequences of prolonged nursing in the honey bee, *Insectes Soc.* 56, 85-93.
- Wilde J., Beetsma J. (1982) The physiology of caste development in social insects, *Adv. Insect Physiol.* 16, 167-246.
- Whitfield C.W., Behura S.K., Berloker S.H., Clark A.G., Johnston J.S., Sheppard W.S., Smíth D.R., Suarez A.V., Weaver D., Tsutsui N.D. (2006) Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*, *Science* 314, 642-645.
- Winston M.L. (2003) *A biologia da abelha*, Magister, Porto Alegre, Traduzido por Carlos A. Osowski.

Sequenciamento dos genes *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de abelhas *Apis mellifera*
Africanizadas

Resumo

O sequenciamento dos alelos que estão sendo selecionados das *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de *Apis mellifera* Africanizada para a produção de geleia real foi realizado e analisado quanto à homologia e identidade com os bancos de dados biológicos para essas abelhas. Os cinco alelos *Mrjp3*, três alelos *Mrjp5* e dois alelos *Mrjp8* detectados apresentaram alta identidade com alelos depositados no sistema GenBank. Os alelos da MRJP3 *C*, *D* e *E*, estão sendo mantidos no genoma das rainhas matriz e tem apresentado associação com a produção de geleia real. Os alelos *Mrjp5* *D*, *E* e *F* também estão sendo selecionados, contudo, sua associação com a produção de geleia real precisa ser analisada. Os dois alelos da MRJP8 parecem não ter relação com a produção de geleia real, pois a expressão dessa MRJP foi descrita na glândula de veneno. A manutenção das matrizes com os alelos selecionados das *Mrjp3* e *Mrjp5* deve ser realizada por meio de um programa de fecundação instrumental com análise da produção de geleia real das rainhas descendentes e dos marcadores moleculares selecionados.

Palavras-chaves: melhoramento genético/ marcador molecular /proteínas principais da geleia real

Sequencing of the *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* genes from Africanized *Apis mellifera*

Abstract

The sequencing of the *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* alleles of Africanized *Apis mellifera* that are being selected for royal jelly production has been performed and analyzed for homology and identity with the biological database available for the bees. The five *mrjp3* alleles, the three *mrjp5* alleles and the two *mrjp8* alleles detected showed high identity with alleles deposited in the GenBank database. The MRJP3 *C*, *D* and *E* alleles are being kept in the matrixes queens' genome and have showed association with the royal jelly production. The *mrjp5* *D*, *E* and *F* are also being selected but their association with the royal jelly production needs to be studied. The two alleles of MRJP8 appear not to have association with the royal jelly production, as the expression of this MRJP was described in the poison glandule. The maintenance of the matrixes carrying the selected alleles of MRJP3 and MRJP5 must be performed with using an instrumental insemination programs combined with the analysis of the royal jelly of the descending queens and of the selected molecular markers.

Key words: genetic improvement/ molecular marker/ Major royal jelly proteins

1. Introdução

Dentre os diversos produtos das abelhas, a geleia real é alvo de inúmeros estudos, não somente em função de seu papel na alimentação, mas também por suas propriedades. Ao seu uso são atribuídos efeitos terapêuticos, tais como aumento de fertilidade, atividade antileucêmica e contra tumores ascíticos, atividade antibiótica, hipocolesterolemizante, eliminação do cansaço físico e mental, normalização do apetite, ativação das funções cerebrais, fortalecimento da energia vital, melhoria da visão, aumento da resistência frente a infecções virais, rejuvenescimento da pele e redução dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides (Garcia-Amoeda e Almeida-Muradian, 2002; Koshio e Almeida-Muradian, 2003).

A geleia real apresenta várias proteínas com peso molecular de 49 a 87 kDA (Schmitzová et al., 1998; Srisuparbh et al., 2003) e representam cerca de 50% da matéria seca (Shen et al., 2007), entre estas proteínas destacam-se as proteínas hidrossolúveis. As proteínas hidrossolúveis melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da geleia real, as MRJPs (*Major Royal Jelly Proteins*) (Peixoto, 2006) que representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da geleia real (Schmitzová et al., 1998; Shen et al., 2007). As MRJPs apresentam alta concentração de aminoácidos ricos em nitrogênio que reforça a hipótese de que as MRJPs têm importante papel na nutrição das abelhas (Schmitzová et al., 1998, Drapeau et al., 2006, Shen et al., 2007, Schonleben et al., 2007).

Foram realizados vários estudos para identificar, caracterizar e sequenciar as MRJPs de *A. mellifera* (Klaudiny et al., 1994; Albert et al., 1996; 1999a; 1999b; Schmitzová et al., 1998; Albert e Klaudiny, 2004). As MRJPs de *A. mellifera* também são identificadas e caracterizadas em outros gêneros de *Apis*, como em *A. cerana* (Srisuparbh et al., 2003).

Um dos primeiros estudos moleculares voltados para a obtenção de marcadores de DNA relacionados com a produção de geleia real foi realizado por Chen et al. (2005). Nesse estudo, foram analisados sete alelos de seis locos microssatélites relacionados com a produção de geleia real entre abelhas italianas nativas, chinesa-italianas e altamente produtoras de geleia real, e esses autores observaram variação na frequência dos alelos MRJPs sugerindo que há potencial para serem utilizados como marcadores moleculares para produção de geleia real.

Utilizando marcadores microssatélites para os locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* em abelhas *A. mellifera* Africanizadas produtoras de geleia real, Baitala et al. (2010) obtiveram elevado grau de variabilidade genética, indicando que esses locos podem ser utilizados como eficientes marcadores genéticos para estudos de genética de populações em abelhas Africanizadas.

Por meio de análises de variância o loco *Mrjp3* obteve-se efeito significativo em função dos alelos *C*, *D* e *E*, indicando que esse loco exerce influência no valor genética para produção de geleia real e os mesmos explicam 36,85% da DEP (Diferença Esperada da Progenie), porém os locos *Mrjp5* e *Mrjp8* não apresentaram efeito significativo, sugerindo que esses locos apresentam pouco efeito sobre o valor genético para a produção de geleia real (Baitala et al., 2010).

Parpinelli (2011) observou nas análises que os alelos *C*, *D* e *E* do loco *Mrjp3* apresentaram as maiores frequências 0,3357 e 0,3107, respectivamente, mostrando que o processo de seleção de rainhas produtoras de geleia real estão mantendo esses alelos e apenas o alelo *C* que também tem potencial como marcador para produção de geleia real teve frequência pequena (0,0321) e, provavelmente, esses alelos são os que apresentam maior contribuição para a produção de geleia real.

Os valores de heterozigosidade média observada por Parpinelli (2011) foi de 0,4905 para os locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* quando comparados com Baitala et al. (2010) que obtiveram heterozigosidade média observada de 0,5827, pode-se observar que o valor de heterozigosidade foi menor do que no estudo inicial do processo de seleção de abelhas *A. mellifera* Africanizadas produtoras de geleia real da UEM. Segundo, Parpinelli (2011), a seleção para a MRJPs e a produção de geleia real está levando a homozigose desses locos, em especial a MRJP3 que apresentou o menor valor de heterozigosidade observada, 0,4286.

O sistema de produção de geleia real utilizado, sendo ele recria ou minirecra, pode fornecer diferentes respostas ambientais internas às colônias em razão de característica próprias.

Faquinello et al. (2011) analisaram os parâmetros genéticos de produção de geleia real para *A. mellifera* Africanizadas. Os autores observaram correlações genéticas positivas entre a produção de geleia real por colônia e por cúpula de 0,29, para aceitação de larvas e produção de geleia real por colônia de 0,42. Estes resultados de correlação genética indicam que a seleção para aumentar a produção de geleia real por colônia aumentará a aceitação de larvas e a produção de geleia real por cúpula.

A seleção de rainhas *A. mellifera* Africanizadas por melhores produtoras de geleia real, a análise de parâmetros genéticos e dos marcadores moleculares MRJP3, MRJP5 e MRJP8 foi realizada por Faquinello et al. (2011), Baitala et al. (2010) e Parpinelli (2011). Pela importância dos marcadores moleculares no sentido de facilitar e agilizar a identificação de rainhas e zangões para o melhoramento da produção de geleia real, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de sequenciar os alelos da família da MRJP3, MRJP5 e MRJP8 detectados anteriormente por Baitala et al. (2010) e Parpinelli (2011).

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

Para este estudo, foram utilizadas operárias nutrizas de *A. mellifera* Africanizadas provenientes do Apiário Central da Fazenda Experimental Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM), pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de abelhas *A. mellifera* Africanizadas para produção de geleia real.

As operárias nutrizas foram coletadas de sete colmeias matrizes melhores produtoras de geleia real. De cada colmeia foram coletadas 20 nutrizas, que foram selecionadas por meio de coloração/idade e coletadas dos favos, totalizando 140 amostras.

Essas abelhas foram sacrificadas, armazenadas em frascos fechados, identificados com a matriz de origem e congeladas a -20°C .

2.2. Extração e quantificação do DNA genômico

O método para extração do DNA total, descrito por Bardacki e Skibinski (1994), foi adaptado para ser utilizado para *A. mellifera*. O tórax foi macerado em 400 μL do tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl e 1 % de SDS) e 10 μL de proteinase K (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As amostras foram mantidas a 55°C durante 4 horas. A purificação do DNA foi realizada com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A precipitação dos ácidos nucleicos foi feita usando acetato de sódio (3M) e etanol absoluto gelado na proporção de 0,25:2,5 em relação ao volume recuperado, permanecendo incubado a -20°C *overnight*. O DNA precipitado foi separado por

centrifugação a 10.300 xg por 10 min. O DNA foi ressuspensionado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e tratado com 3 µL de RNase (10 µg/mL).

A integridade e a quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema L-PIX HE molecular imaging.

2.3. Amplificação por PCR

As reações por PCR foram realizadas utilizando *primers* específicos sintetizados para amplificar os locos da *Mrjp3* (Albert et al., 1999b), *Mrjp5* (Albert et al., 1999a) e *Mrjp8* (Klaudiny et al., 1994): *Mrjp3* (*forward*: ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG; *reverse*: TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC); *Mrjp5* (*forward*: AGA CTC TTC AAA CGG TCG TTG C; *reverse*: CTG TAA TTT CAT ACT TAA AGC CAT) e *Mrjp8* (*forward*: TTG CGA AGT GAA TGG ATC; *reverse*: TTA TTT TTG GCA ACC ACT TCG).

Em um volume de reação de 20 µL foi utilizado tampão Tris-KCl 1X (tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 0,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Para a otimização das amplificações foram utilizadas concentrações específicas de MgCl₂ e do DNA molde em relação ao *primer* utilizado.

Para os *primers* MRJP3, MRJP5 e MRJP8 foram utilizadas as concentrações de 1,7; 1,5 e 3,0 mmol de MgCl₂ e a concentração do DNA molde empregada para o *primer* MRJP3 foi de 10 ng/µL e para os *primers* MRJP5 e MRJP8 foi de 20 ng/µL (Tab. I).

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e as condições de amplificações para os *primers* MRJP3 e MRJP5 foram baseadas na metodologia descrita por Albert e Schmitz (2002). A amplificação começou com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30s a 54°C e 1 min a 72°C, sendo completada com uma extensão final de 10 min a 72°C.

As reações de amplificação do *primer* MRJP8 foram baseadas na metodologia descrita por Albert e Klaudiny (2004). O processo iniciava com uma desnaturação em

94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 50s a 94°C, 50s a 50°C e 100s a 72°C com uma extensão final de 10 min a 72°C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2% preparado com tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris; 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Para o preparo deste gel foi utilizado 50% de agarose comum e 50% de agarose MetaPhor (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.). A separação foi realizada a 60V por 5h. Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA amplificadas foram visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema L-PIX HE molecular imaging. Para estimar o tamanho dos alelos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, Brasil).

2.4. Análise dos dados

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação das bandas de DNA genômico obtidas, e posterior sequenciamento dos alelos selecionados.

Foram escolhidos dez alelos em homozigose para o sequenciamento.

2.5. Amplificação por PCR para sequenciamento

As reações por PCR foram realizadas utilizando amostras em homozigose e *primers* específicos sintetizados para amplificar os locos da *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8*. Para o volume de reação de 20 µL foi empregado tampão 10X High Fidelity PCR (600 mM Tris-SO₄ pH8,9 e 180 mM Ammonium Sulfate), 0,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Brasil). Para a otimização das reações de amplificações foram utilizadas concentrações específicas de MgCl₂ e do DNA molde em relação ao *primer* utilizado. Para os *primers* MRJP3, MRJP5 e MRJP8 foram empregadas as concentrações de 1,7; 1,5 e 3,0 mmol/L de MgCl₂, respectivamente, e a concentração do DNA molde utilizada para o *primer* MRJP3 foi de 10 ng/µL e para os *primers* MRJP5 e MRJP8 de 20 ng/µL (Tab. II).

As reações de amplificações foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e as condições de amplificações foram as mesmas utilizadas anteriormente.

Os produtos das amplificações foram transferidos para tubos de 1,5 mL e homogeneizados com PEG (20% Polietileno Glicol, 2,5 M NaCl e H₂O) para a realização da purificação. Esse produto obtido pela homogeneização foi mantido a 37°C durante 15 min e centrifugado a 15.000 xg por 15 min, o sobrenadante foi descartado,

foi adicionado etanol 80% e centrifugado a 15.000 xg por 4 min e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi ressuspenso em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH8,0).

A integridade e quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 2% com tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Para o preparo deste gel foram utilizados 50% de agarose comum e 50% de agarose MetaPhor (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.). A separação foi realizada a 60 Volts por 2h e a quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema L-PIX HE molecular imaging.

2.6. Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (Amersham-Ge) com 50-100 ng de DNA do produto do PCR purificado. Para um volume de reação de 10 μ L foi utilizado 4 μ L de MIX (Amersham-Ge), 1 μ L do *primer* específico e 5 μ L de DNA produto do PCR purificado. As reações de amplificações do sequenciamento foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e as condições de amplificações para os *primers* MRJP3 e MRJP5 foram baseadas ao *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (Amersham-Ge) e a temperatura de anelamento do *primer* baseado na metodologia descrita por Albert e Schmitz (2002). O processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação inicial em 95°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 15s a 50°C, 1 min a 54°C e com temperatura final de 4°C.

Para a amplificação do DNA utilizando o *primer* MRJP8, as condições foram baseadas ao *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (Amersham-Ge) e a temperatura de anelamento do *primer* baseado na metodologia descrita por Albert e Kludiny (2004). O processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação inicial em 95°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 15s a 50°C, 1 min a 50°C e com temperatura final de 4°C.

A reação de sequenciamento foi purificada e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático Mega BACE 1000.

2.7. Análise dos dados do sequenciamento

A análise dos dados obtidos do sequenciamento foi realizada pelos alinhamentos das sequências obtidas com os programas Phred (Ewing et al., 1998), Phrap/Cross_match e Consed (Gordon et al., 1998) e o consenso gerado foi analisado quanto à homologia e identidade com os bancos de dados biológicos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando da ferramenta BLAST (Altschul et al., 1990) e o alinhamento da sequência de nucleotídeos foi realizado utilizando o programa ClustalW2 (Thompson et al., 1997).

3. Resultados

A análise de dados da sequência de nucleotídeos do loco da *Mrjp3* no GenBank, realizada com o auxílio do BLAST (Altschul et al., 1990), revelou que a sequência do alelo *C* (433 pb) apresenta 95% de identidade com *A. mellifera major royal jelly protein mRNA, complete cds* (GU434675.1); 95% com *A. mellifera major royal jelly protein 3 (Mrjp3), mRNA* (NM_001011601.1 - Drapeau et al., 2006); 94% com a *A. m. carnica major royal jelly protein 3 (Mrjp3) gene, complete cds* (AY663104.1 - Albertová et al., 2005) e 94% com *PREDICTED: A. mellifera major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA* (XM_001122757.2) (Tab. III e Fig. 1).

A sequência dos nucleotídeos do alelo *D* (454 pb) apresentaram 94% de identidade com a *A. m. carnica major Royal jelly protein 3 (Mrjp3) gene, complete cds* (AY663104.1 - Albertová et al., 2005) e 93% com *PREDICTED: A. mellifera major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA* (XM_001122757.2) (Tab. III e Fig. 2). A sequência dos nucleotídeos do alelo *E* (479 pb) apresentou 93% de identidade com a *A. m. carnica major Royal jelly protein 3 (Mrjp3) gene, complete cds* (AY663104.1 - Albertová et al., 2005) e 93% com *PREDICTED: A. mellifera major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA* (XM_001122757.2) (Tab. III e Fig. 3).

A sequência dos nucleotídeos do alelo *F* (431 pb) apresentou 97% de identidade *PREDICTED: A. mellifera major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA* (XM_001122757.2) e 97% com *A. m. carnica major royal jelly protein 3 (Mrjp3) gene, complete cds* (AY663104.1 - Albertová et al., 2005) (Tab. III e Fig. 4).

A sequência dos nucleotídeos do alelo *G* (456 pb) apresentou 99% de identidade *A. m. carnica major royal jelly protein 3 (Mrjp3) gene, complete cds* (AY663104.1 -

Albertová et al., 2005) e 97% com *PREDICTED: A. mellifera major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2)* (Tab. III e Fig. 5).

A análise de dados da sequência de nucleotídeos do loco *Mrjp5* do alelo *D* (554 pb) apresenta 81% de identidade *A. cerana major royal jelly protein MRJP5 precursor (MRJP5) mRNA, complete cds (AY532369.1)* (Tab. III e Fig. 6).

A sequência dos nucleotídeos do alelo *E* (657 pb) apresentou 81% de identidade *A. cerana major royal jelly protein MRJP5 precursor (MRJP5) mRNA, complete cds (AY532369.1)*; 80% com *A. mellifera MRJP5 mRNA, complete cds (GU339164.1)*; 80% com *A. mellifera major royal jelly protein 5(Mrjp5), mRNA (NM_001011599.1 - Albert et al., 1999b; Malecová et al., 2003; Drapeau et al., 2006)*; 80% com *A. mellifera major royal jelly protein MRJP5 (MRJP5) mRNA, complete cds (AF004842.1 - Albert et al., 1999b)* (Tab. III e Fig. 7).

A sequência dos nucleotídeos do alelo *F* (387 pb) apresentou 87% de identidade com *A. mellifera MRJP5 mRNA, complete cds (GU339164.1)*; 87 % com *A. mellifera major royal jelly protein 5 (Mrjp5), mRNA (NM_001011599.1 - Albert et al., 1999b; Malecová et al., 2003; Drapeau et al., 2006)*; 87% com *A. mellifera major royal jelly protein MRJP5 (MRJP5) mRNA, complete cds (AF004842.1 - Albert et al., 1999b)* (Tab. III e Fig. 8).

A análise de dados da sequência de nucleotídeos do loco *Mrjp8* do alelo *C* (290 pb) apresenta 95% de identidade com *PREDICTED: A. mellifera carboxypeptidase B-like (LOC726391), mRNA (XM_001122133.2)* (Tab. III e Fig. 9). A sequência de nucleotídeos do alelo *D* (329 pb) apresentou 95% de identidade com *PREDICTED: A. mellifera carboxypeptidase B-like (LOC726391), mRNA (XM_001122133.2)* (Tab. III e Fig. 10).

4. Discussão

As MRJPs estão intimamente relacionadas e partilham sequências homólogas com as proteínas *yellow* de *Drosophila* e outros insetos, juntamente com várias proteínas bacterianas. Em *Drosophila*, a proteína *yellow* participa da melanização da cutícula e no comportamento de cortejo do macho (Albertová et al., 2005).

Em abelhas *A. mellifera*, as MRJPs são altamente expressas nas glândulas hipofaríngeas e podem ser multifuncionais, desempenhando papel nutricional como componente da geleia real que tem alta concentração de nitrogênio e rica em aminoácidos podendo funcionar como depósito biologicamente acessível de nitrogênio,

sendo que os altos níveis armazenados de nitrogênio nas MRJPs podem ser cruciais para o rápido crescimento de larvas jovens e o desenvolvimento de rainhas férteis, além da execução de funções adicionais em vários tecidos, incluindo o cérebro (Albertová et al., 2005; Drapeau et al., 2006).

Baitala et al. (2010), por meio de análises do loco da MRJP3 em *A. mellifera* Africanizadas selecionadas para a produção de geleia real, observaram que os alelos *C*, *D* e *E* do loco *Mrjp3* contribuem para o aumento da produção de geleia real. Parpinelli (2011) verificou que esses alelos estão sendo mantidos nessas matrizes e suas descendentes, nesse estudo foram detectados ainda os alelos *F* e *G* para a MRJP3.

No presente estudo foi observado que os alelos *C*, *D*, *E*, *F* e *G* do loco *Mrjp3* apresentam alta porcentagem de identidade com os alelos das MRJP3 já descritos. Permitindo sugerir que estes alelos têm papel na qualidade ou quantidade da geleia real produzida pelas abelhas. Será necessário, portanto, realizar a inseminação instrumental para a manutenção desses alelos em rainhas melhores produtoras.

O alinhamento entre as sequências de consenso obtidas e as depositadas no *GenBank* é um procedimento pelo qual potenciais homologias podem ser inferidas e identificadas (Phillips et al., 2000; Page e Holmes, 2001). Uma pequena quantidade de *gaps* (espaços) foi necessária para alinhar as sequências completas das abelhas com o grupo externo, demonstrando que as sequências são conservadas.

A alta similaridade entre os alelos *Mrjp3*, presentes nas abelhas analisadas e aqueles descritos anteriormente, mostra que o loco *Mrjp3* é conservado entre as subespécies e espécies de *Apis*. Esses resultados são corroborados pelo estudo realizado por Albertová et al. (2005). Esses autores verificaram que há alta similaridade de sequências e a mesma estrutura íntron-éxon entre quatro espécies *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* e *A. florea*.

No estudo realizado por Albertová et al. (2005), as análises por PCR confirmaram a presença de uma extensa região repetitiva nos genes das espécies estudadas. Esses autores sugeriram que provavelmente essa região repetitiva apareceu no início da evolução da família dos genes *Mrjps*. O alongamento extremo da repetição é específico da *Mrjp3*, podendo diferir em até 115 aminoácidos de comprimento. Essas diferenças de tamanho podem refletir as exigências nutricionais das diferentes espécies. Utilizando como base o conteúdo de nitrogênio, os autores sugeriram que a presença da repetição ou aumenta a capacidade de armazenamento de nitrogênio, ou a proteína é a

consequência da seleção para um aumento na eficiência nutritiva dessas proteínas (Albertová et al., 2005).

Utilizando eletroforese 2D, Li et al. (2008) detectaram apenas uma isoforma de MRJP5 em duas linhagens analisadas de *A. mellifera carnica* e Santos et al. (2005) detectaram três isoformas em *A. mellifera* Africanizada. Nas abelhas analisadas no presente estudo foram sequenciados três alelos *Mrjp5* *D*, *E* e *F*. Esses resultados mostram que esse loco também possui grande polimorfismo.

A proteína MRJP5 possui um motivo tripeptídeo repetitivo (Albert et al., 1999b). Esses autores sugerem que as regiões repetitivas podem ter evoluído independentemente por duas vezes na família das MRJPs. O armazenamento de nitrogênio acessível é necessário para o rápido desenvolvimento das larvas, que é obtido pela presença dessas extensas regiões repetitivas das MRJP2, MRJP3 e MRJP5, compostas por aminoácidos ricos em nitrogênio (Albert et al., 1999b).

Os alelos *C* e *D* do loco *Mrjp8* codificam para a carboxypeptidase de *Apis mellifera*. A MRJP8 não é produzida nas glândulas hipofaríngeas (Santos et al., 2005). Peiren et al. (2008) associaram a MRJP8 com a glândula de veneno e as transcrições das sequências obtidas nas glândulas de veneno correspondem às (99% de idade) sequências obtidas a partir de bibliotecas de cDNA da cabeça de abelhas nutrizes (MRJP8, AY398690 – Albert e Kludiny, 2004). Baitala et al. (2010) verificaram que o loco *Mrjp8* possui baixo efeito sobre o valor genético para a produção de geleia real.

Drapeau et al. (2006), utilizando sequências dos genes *Mrjps* e *yellow* de insetos e espécies microbianas, verificaram que as MRJPs formam um grupo monofilético distinto que parece ter evoluído de um ancestral comum mais recente (inseto *yellow-like*), esses achados corroboram a ideia de que esse ancestral comum recente é o gene *Yellow-e3*. Resultados semelhantes foram obtidos em 2004 por Albert e Kludiny que propuseram ainda que a MRJP8 seria uma exceção, pela divergência filogenética detectada, provavelmente por ser esta a proteína mais antiga da família MRJP.

Os resultados obtidos até agora permitem inferir que a MRJP8 não influencia diretamente no aumento da produção de geleia real, diferentemente da MRJP3, cujos alelos podem ser usados como marcadores genéticos na população para o aumento da produção de geleia real. Assim, não há necessidade de considerar a MRJP8 como um marcador molecular para a produção de geleia real.

A seleção de rainhas produtoras de geleia real pode estar promovendo a seleção reprodutiva dessas abelhas que pode alterar as características genéticas de uma

determinada população que acaba sendo influenciada pelo processo de transmissão desses genes de geração em geração (Falconer, 1987). Porém, é importante manter um grau de variabilidade genética, que resulta em maior potencial de resposta para o melhoramento seletivo (Page e Kerr, 1991).

O programa de melhoramento genético das abelhas *A. mellifera* Africanizadas produtoras de geleia real da UEM vem mantendo as matrizes e suas descendentes desde 2006 por meio de fecundação natural. Pelos estudos realizados por Baitala et al. (2010), Faquinello et al. (2011) e Parpinelli (2011), foi mostrado que os alelos sequenciados no presente estudo podem ser empregados como marcados moleculares para produção de geleia real. Torna-se necessário, portanto, iniciar o processo de inseminação artificial para melhor entendimento e emprego desses marcadores moleculares para a produção de geleia real. A quantificação de geleia real produzida por essas matrizes, e a estimativa da associação entre a produção de geleia real e os alelos dos locos *Mrjp3* e *Mrjp5* selecionados é outra prerrogativa importante para o programa de melhoramento.

Referências

- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1996) Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein RJP57-1; longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster* yellow protein, *J. Apic. Res.* 35, 63-68.
- Albert S., Bhattacharya D., Klaudiny J., Schitzová J., Simúth J. (1999a) The family of major royal jelly proteins and its evolution, *J. Mol. Evol.* 49, 290-297.
- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1999b) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 427-434.
- Albert S., Klaudiny J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library, *J. Insect Physiol.* 50, 51-59.
- Albert S., Schmitz J. (2002) Characterization of major royal jelly protein-like DNA sequences in *Apis dorsata*, *J. Apic. Res.* 41, 75-85.
- Albertová V., Su S., Brockmann A., Gadau J., Albert S. (2005) Organization and potential function of the *Mrjp3* locus in four honeybee species, *J. Agric. Food Chem.* 53, 8075-8081.
- Altshul S.F., Gish W., Miller W., Meyers E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 142, 403-410.
- Baitala T.V., Faquinello P., Toledo V.A.A., Mangolin C.A., Martins E.N., Ruvolo-Takasusuki M.C.C. (2010) Potencial use of major royal jelly proteins (MRJPs) as

molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies, *Apidologie* 41, 160-168.

Bardacki F., Skibinski D.O. (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification, *Heredity* 73, 117-123.

BLAST, [online]
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/288872650?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=3&RID=6AUTGH1C01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/288872650?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=6AUTGH1C01R) (accessed on 04 November 2011).

BLAST, [online]
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/328794346?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RID=6AUTGH1C01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/328794346?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RID=6AUTGH1C01R) (accessed on 04 November 2011).

BLAST, [online]
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/42601245?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=4&RID=6AVEA78P014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/42601245?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=6AVEA78P014) (accessed on 04 November 2011).

BLAST, [online]
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/284812513?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=6AVEA78P014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/284812513?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=6AVEA78P014) (accessed on 04 November 2011).

BLAST, [online]
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/328779647?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=6AVPCUU6014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/328779647?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=6AVPCUU6014) (accessed on 04 November 2011).

Chen S., Li J., Zhong B., SU S. (2005) Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*), *Chin. J. Genet.* 32, 1037-1044.

Drapeau M.D., Albert S., Kurcharski R., Prusko C., Maleszka R. (2006) Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bee, *Genome Res.* 16, 1385-1394.

Ewing B., Hillier L., Wendl M., Green P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment, *Genome Res.* 8, 186-194.

Falconer D.S. (1987) *Introdução a genética quantitativa*, Universidade Federal de Viçosa, MG.

Faquinello P., Toledo V.A.A., Martins E.N., Oliveira C.A.L., Sereia M.J., Costa-Maia F.M., Rúvolo-Takasusuki M.C.C. (2011) Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees, *Sociobiol.* 57, 1-15.

Garcia-Amoeda L.H., Almeida-Muradian L.B. (2002) Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geleia real, *Quim. Nova* 25, 676-679.

Klaudiny J., Hanes J., Kulifajova J., Albert S., Simúth J. (1994) Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly, *J. Apic. Res.* 33, 105-111.

- Koshio S., Almeida-Muradian L.B. (2003) Aplicação da clae para determinação do ácido-10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geleia real pura e adicionada a mel brasileiro, *Quim. Nova* 26, 670-673.
- Malecová B., Ramser J., O'Brien J.K., Janitz M., Judová J., Lehrach H., Simuth J. (2003) Honeybee (*Apis mellifera* L.) *Mrjp* gene family: computacional analysis of putative promoters and genomic structure of *Mrjp1*, the gene coding for the most abundant protein of larval food, *Gene* 303, 165-175.
- Page R.D.M., Holmes E.C. (2001) *Molecular evolution: a phylogenetic approach*, Blackwell Science, Oxford.
- Page R.E., Kerr W.E. (1991) Honey bee genetics and breeding, in: Spivak M., Fletcher, D.J.C., Breed, M.D. (Ed.), *The "African" honey bee*, Westview Press, Colorado, pp.157-86.
- Parpinelli R.S. (2011) Avaliação de marcadores microssatélites MRJPs em colônias de *Apis mellifera* selecionadas para a produção de geleia real. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- Peiren N., Graaf D.C., Vanrobaeys F., Danneels E.L., Devreese B., Beeumen J.V., Jacobs F.J. (2008) Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage, *Toxicon* 52, 72-83.
- Peixoto L.G. (2006) Detecção e localização de proteínas relacionados às MRJPs e de suas possíveis proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngea da abelha *Apis mellifera*. Thesis (Ph.D.), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
- Phillips A., Janies D., Wheeler W. (2000) Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis, *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 317-330.
- Santos K.S., Dos Santos L.D., Mendes M.A., De Souza B.M., Malaspina O., Palma M.S. (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.), *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35, 85-91.
- Schmitzová J., Klaudivy J., Albert S., Schroder W., Schreckengost W., Hanes J., Judová J., Simúth J. (1998) A family of royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020-1030.
- Schonleben S., Sickmann A., Mueller M.J., Reinders J. (2007) Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly, *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1087-1093.
- Shen L., Xing L., Yang Y., Gao Q. (2007) Sequence analysis of functional *Apisimin-2* cDNA from royal jelly of Chinese honeybee and its expression in *Escherichia coli*. *Asia Pac J Clin Nutr.* 16, 222-226.
- Srisuparbh D., Klinbunga S., Wongsiri S., Sittipraneed S. (2003) Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*), *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 572-579.

Thompson J.D.; Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.

Legenda de tabelas

Tabela I. Condições da PCR para a amplificação dos locos das MRJPs de abelhas *A. mellifera* Africanizadas. °C = temperatura; S = tempo (segundos)

Loco	MgCl ₂ (mmol/L)	DNA (ng/μL)	PCR					
			Desnaturação		Anelamento		Extensão	
			°C	S	°C	S	°C	S
<i>Mrjp3</i>	1,7	10,0	94	30	54	30	72	60
<i>Mrjp5</i>	1,5	20,0	94	30	54	30	72	60
<i>Mrjp8</i>	3,0	20,0	94	50	50	50	72	100

Tabela II. Condições da PCR para o sequenciamento dos locos das MRJPs de abelhas *A. mellifera* Africanizadas. °C = temperatura; S = tempo (Segundos)

Loco	MgCl ₂ (mmol/L)	DNA (ng/μL)	PCR					
			Desnaturação		Anelamento		Extensão	
			°C	S	°C	S	°C	S
<i>Mrjp3</i>	1,7	10,0	95	30	54	30	60	60
<i>Mrjp5</i>	1,5	20,0	95	30	54	30	60	60
<i>Mrjp8</i>	3,0	20,0	95	30	50	50	60	60

Tabela III. Tamanho e identificação dos alelos das proteínas principais da geleia real de *A. mellifera* Africanizadas sequenciados.

<i>Mrjps</i>	Alelo	Pares de Bases (pb)	% Identidade	Identificação	Nº Acesso
<i>Mrjp3</i>	<i>C</i>	433 pb	95%	<i>A. mellifera</i> proteína	GU434675.1
			95%	<i>A. mellifera</i> proteína 3	NM_001011601.1
			94%	<i>A. m. carnica</i> proteína 3	AY663104.1
			94%	<i>A. mellifera</i> proteína 3-like	XM_001122757.2
	<i>D</i>	454 pb	94%	<i>A. m. carnica</i> proteína 3	AY663104.1
			93%	<i>A. mellifera</i> proteína 3-like	XM_001122757.2
	<i>E</i>	479 pb	93%	<i>A. mellifera</i> proteína3	AY663104.1
			93%	<i>A. mellifera</i> proteína 3-like	XM_001122757.2
	<i>F</i>	431 pb	97%	<i>A. mellifera</i> proteína 3-like	XM_001122757.2
			97%	<i>A. m. carnica</i> proteína 3	AY663104.1
			99%	<i>A. m. carnica</i> proteína 3	AY663104.1
	<i>G</i>	456 pb	97%	<i>A. mellifera</i> proteína 3-like	XM_001122757.2
<i>Mrjp5</i>	<i>D</i>	554 pb	81%	<i>A. cerana</i> proteína MRJP5	AY532369.1
	<i>E</i>	657 pb	81%	<i>A. cerana</i> proteína MRJP5	AY532369.1
			80%	<i>A. mellifera</i> MRJP5	GU3399164.1
			80%	<i>A. mellifera</i> proteína5	NM_001011599.1
			80%	<i>A. mellifera</i> proteína MRJP5	AF004842.1
	<i>F</i>	387 pb	87%	<i>A. mellifera</i> MRJP5	GU339164.1
			87%	<i>A. mellifera</i> proteína 5	NM_001011599.1
			87%	<i>A. mellifera</i> proteína MRJP5	AF004842.1
<i>Mrjp8</i>	<i>C</i>	290 pb	95%	<i>A. mellifera</i> carboxypeptidase	XM_001122133.2
	<i>D</i>	329 pb	95%	<i>A. mellifera</i> carboxypeptidase	XM_001122133.2

Legenda de figuras

A.m.protein	-----CAATCAGAATGCT	13
A.m.protein3	-----CAATCAGAATGCT	13
A.m.protein3-like	-----CTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCT	32
A.m.carnicaprotein3	-----GGAAGATATCACAATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCT	39
MRJP3-C	ATTATCATTTTGCTGTTTACCATTCTCTTGTATCATTCTGCTGTTACCATTTTGTCT	60
	* * * * *	
A.m.protein	GGCAATCAGAATGCTGACAATCA----GAATGCTGACAATCAGAATGCTAACAAATCAGAA	69
A.m.protein3	GGCAATCAGAATGCTGACAATCA----GAATGCTGACAATCAGAATGCTAACAAATCAGAA	69
A.m.protein3-like	GGCAATCAGAATGCTGACAATCA----GAATGTTGACAATCAGAATGCTAACAAATCAGAA	88
A.m.carnicaprotein3	GGCAATCAGAATGCTGACAATCA----GAATGCTGACAATCAGAATGCTAACAAATCAGAA	95
MRJP3-C	TGTTATCATTTTGTCTATTACCATTTTGTCTGTTATCATTCTGTTTGTACCATTTTGTCT	120
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.m.protein	TGCTGATAATCAGAATGCTAACAAACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAGACAGAA	129
A.m.protein3	TGCTGATAATCAGAATGCTAACAAACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAGACAGAA	129
A.m.protein3-like	TGCTGATAATCAGAATGCTAACAAACAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAGACAGAA	148
A.m.carnicaprotein3	TGCTGATAATCAGAATGCTAACAAACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAGACAGAA	155
MRJP3-C	TGTTACCATTTTGTCTGTTATCATTCTGTCTGTTACCATTTTGTCTGTTATCATTCTGTC	180
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.m.protein	TGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAA	189
A.m.protein3	TGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAA	189
A.m.protein3-like	TGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAA	208
A.m.carnicaprotein3	TGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAA	215
MRJP3-C	TGTTACCATTTTGTCTGTTATCATTCTGTCTGTTACCATTTTGTCTGTTATCATTCTGTC	240
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.m.protein	TGATAACA-----AGCAAAAAT-----GGTAACAGACAAAATGGTAACAA-----	228
A.m.protein3	TGATAACA-----AGCAAAAAT-----GGTAACAGACAAAATGGTAACAA-----	228
A.m.protein3-like	TGATAACA-----AGCAAAAAT-----GGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAA	253
A.m.carnicaprotein3	TGATAACA-----AGCAAAAAT-----GGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAA	260
MRJP3-C	TGTTATCATTTTGTCTATTACCATTTTGTGTTAGCATTCTGATTATCAGCATTCTGAT	300
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.m.protein	-----ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGAA	279
A.m.protein3	-----ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGAA	279
A.m.protein3-like	TAGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAACAGAA	313
A.m.carnicaprotein3	TGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAAAATGGTAACAACAGAA	320
MRJP3-C	TGTTAGCATTCTGATTGTACGATTCTGATTGTACGATTCTGATTGCCAGCATTCTGAT	360
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.m.protein	TGGTAACAGGCAAAAATGATAAT-----CAA-----	304
A.m.protein3	TGGTAACAGGCAAAAATGATAAT-----CAA-----	304
A.m.protein3-like	TGATAACAAGCAAAAATGGTAATA-----GACAAAATGATAACAAGCAAAAATGGTA	363
A.m.carnicaprotein3	TGATAACAAGCAAAAATGATAATA-----GACAAAATGATAACAAGCAAAAATGGTA	370
MRJP3-C	TGCCAGCATTCTGATTGCCAGTCTCTTCCGGTTGCCGAGCTGTT--CCTGCATTGTGATC	418
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.m.protein	-----	
A.m.protein3	-----	
A.m.protein3-like	ACAGACAGAATGATAA-----	379
A.m.carnicaprotein3	ACAGACAGAATGATAACAAGGAATGGTAACAGGCAAAAATGATAAT	417
MRJP3-C	ACTTCCCGAAGGGA-----	433

Figura 1. Alinhamento de seqüências similares do alelo *C* do loco *Mrjp3* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera* major royal jelly protein mRNA, complete cds (GU434675.1); *A. mellifera* major royal jelly protein 3 (*Mrjp3*), mRNA (NM_001011601.1); *A. mellifera carnica* major royal jelly protein 3 (*Mrjp3*) gene, complete cds (AY663104.1) e PREDICTED: *A. mellifera* major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as seqüências do alinhamento.

```

A.m.carnicaprotein3 -----ATCAGAATGCTGG-----CAATCA-GAATGCTGGCAATCAGAATGC-TG-A 43
A.m.protein3-like -----ATCAGAATGCTGG-----CAATCA-GAATGCTGGCAATCAGAATGC-TG-A 43
MRJP3-D GCTGCTTCATTAAATGTCAGTCTACACATACATGATTATCTGATATCATTITGCTGTA 60
          **  ****  *      **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 CAATCAGAATGCTGACAAATCAGAATGCTAACAAATCAGAATGC-----TG---ATAATCA 94
A.m.protein3-like CAATCAGAATGTTGACAAATCAGAATGCTAACAAATCAGAATGC-----TG---ATAATCA 94
MRJP3-D CCATTCTCTTGTATCATTCTGTCTGTTACCAATTTGCTTGTATCATTITGCTATTACCA 120
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 GAATGCTAACAA--AACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAAC-AGACAGAATGATAACAA 151
A.m.protein3-like GAATGCTAACAA--AACAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAAC-AGACAGAATGATAACAA 151
MRJP3-D TTTTGTCTGTATCATTCTGTGTTACCAATTTGCTAGTTACCAATTTGCTTGTATCAT 180
          ****  *  *      *  *  *  *  *      *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 GCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAA 211
A.m.protein3-like GCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAA 211
MRJP3-D TCTGTCTGTTACCAATTTGCTTGTATCATTCTGTCTGTTACCAATTTGCTTGTATCAT 240
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 GCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAAT-GATAACA 270
A.m.protein3-like GCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAAT-GATAACA 270
MRJP3-D TCTGTCTGTTACCAATTTGCTTGTATCATTCTGTCTGTTACCAATTTGCTTGTATCA 300
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 AGCAAAA-TGGTAACAGACAAAATGGTAACAACAGCAAAAATGATAACAAGCAAAAATGATAAT 329
A.m.protein3-like AGCAAAA-TGGTAATAGACAAAATGGTAACAACAGCAAAAATGATAACAAGCAAAAATGATAAT 329
MRJP3-D TTCTTGTCTGTTATCATTCTTGAC--TTATTACCAATTTGATTGTTAGCATTCTGATTAT 358
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 AGCAAAAATGATAA-CAAGCAAAAATGGT-----AACAGACAGAATGATAACAAGAGGAAT 383
A.m.protein3-like AGCAAAAATGATAA-CAAGCAAAAATGGT-----AACAGACAGAATGATAACAAGAGGAAT 383
MRJP3-D CAGCATTCTGATTGTCAGCATTCTGATTGTCAGCATTCTGATTGTCAGCATTCTGATT 418
          **  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

A.m.carnicaprotein3 GGTAACAGGCAAA-----ATGATAATCAAAAATAATCA 415
A.m.protein3-like GGTAACAGGCAAA-----ATGAT---CAGAATAATCA 412
MRJP3-D GCCAGCATTCTGATTGTCATAATCTCGATA-AGCCA 454
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 2. Alinhamento de seqüências similares do alelo *D* do loco *Mrjp3* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera carnica* major Royal jelly protein 3 (*Mrjp3*) gene, complete cds (AY663104.1); PREDICTED: *A. mellifera* major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2). “*” = nucleótídeos idênticos em todas as seqüências do alinhamento.

```

A.m.carnicaprotein3 -----CAATCAGAAT-GCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAAT- 40
A.m.protein3-like -----AGAATG--CTGGCAATCAGAAT-GCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAAT- 50
MRJP3-E AATTCAGAATGCTTGGCAATCAGAATTGCTGACAATCAAAATGCTGACAATCAGAATT 60
***** ** * ***** ***** *****

A.m.carnicaprotein3 GCTGACAATCAGAAT-GCTGACAATCAGAAT-GCTAACAATCAGAATGCTGATAATCAGA 98
A.m.protein3-like GCTGACAATCAGAAT-GTTGACAATCAGAAT-GCTAACAATCAGAATGCTGATAATCAGA 108
MRJP3-E GTTGACAATCAGAATTGCTAACAATCAGAATTGCTAACAATCAAAATGCTGATAATCAGA 120
* ***** * * ***** ***** *****

A.m.carnicaprotein3 ATGCTAAC-----AAACAAAATGG--TAAT---AGACAAAAT-GATAACAGACA-GAA 144
A.m.protein3-like ATGCTAAC-----AAACAAAATGG--TAAT---AGACAAAAT-GGTAACAGACA-GAA 154
MRJP3-E ATGCTAACCAAAACCAAAAATTTGGGTTAATTAGGAACAAAATTTGATAACAGACATGAA 180
***** ** * ** * ** * ***** * ***** **

A.m.carnicaprotein3 TGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAT-GGTAACAGACAGA 203
A.m.protein3-like TGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAT-GGTAACAGACAGA 213
MRJP3-E TGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAATTTGGTAACAGACAGA 240
***** *****

A.m.carnicaprotein3 ATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGA 263
A.m.protein3-like ATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAATAGTAACAGACAGA 273
MRJP3-E ATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGA 300
***** *****

A.m.carnicaprotein3 ATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAAAATGGTAACAACAGAAATGATAACAAGCAAA 323
A.m.protein3-like ATGATAACAAGCAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAACAGAAATGATAACAAGCAAA 333
MRJP3-E ATGATAACAAGCAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAACAGAAATGATAACAAGCAAA 360
***** *****

A.m.carnicaprotein3 ATGATAATAGACAAAATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGA 383
A.m.protein3-like ATGGTAATAGACAAAATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGA 393
MRJP3-E ATGGTAATAGACAAAATGATAACAAGCAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGA 420
*** *****

A.m.carnicaprotein3 ATGGTAACAGGCAAAATGATAATCAAAATAATCAGAATGATAATAATCGAAATGATAAT 442
A.m.protein3-like ATGGTAACAGGCAAAATGAT---CAGAATAATCAGAATGATAATAATCGAAATGATAAT 449
MRJP3-E ATGGTAACAGGCAAAATGATAATCAGAATAATCAGAATGATAATAATCGAAATGATAAT 479
***** ** *****

```

Figura 3. Alinhamento das seqüências similares do alelo *E* do loco *Mrjp3* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera carnica* major Royal jelly protein 3 (*mrjp3*) gene, complete cds (AY663104.1) e PREDICTED: *A. mellifera* major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as seqüências do alinhamento.

```

A.m.protein3-like      -TCGTTGCGGAAGATATCACA-ATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAAT 58
A.m.carnicaprotein3   -----CAATCAGAATGCTGGCAATCAGAAT 25
MRJP3-F               CCTGTTACCAATTCCTCTTGTTTATCATTCTGCTGTTACCAATTTGCTTGTATCATT 60
                        * **  **** *  **** *
A.m.protein3-like      GCTGGCAATCAGAATGCT-GACAAATCA-----GAATG-TTGACAATCAGAATGCTAACAA 111
A.m.carnicaprotein3   GCTGGCAATCAGAATGCT-GACAAATCA-----GAATG-CTGACAATCAGAATGCTAACAA 78
MRJP3-F               GTCTATTACCAATTTGCTTGGTTATCATTCTGTTGGTTACCAATTTGGTCTATTACCAT 120
                        *   * **  **** *  **** *  ** *  ** *  *  *  *  *  *  *  *
A.m.protein3-like      TCAGAATGCTGATAATCAGAATGCTAACAAACAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAG 171
A.m.carnicaprotein3   TCAGAATGCTGATAATCAGAATGCTAACAAACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAG 138
MRJP3-F               TTTGCTTGTATCATTCTGCTGTTACCAATTTGCTTGTATCATTCTGCTGTTACCAT 180
                        * *  * * *  *  * * *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
A.m.protein3-like      ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAG 231
A.m.carnicaprotein3   ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAG 198
MRJP3-F               TTTGCTTGTATCATTCTGCTGTTACCAATTTGCTTGTATCATTCTGCTGTTACCAT 240
                        *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
A.m.protein3-like      ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATAGTAACAG 291
A.m.carnicaprotein3   ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAG 258
MRJP3-F               TTTGCTTGTATCATTCTGCTGTTATCATTCTGCTATACCAATTTGTTTGTAGCAT 300
                        *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
A.m.protein3-like      ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAACAGAATGATAACAA 351
A.m.carnicaprotein3   ACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAAAATGGTAACAACAGAATGATAACAA 318
MRJP3-F               TCTGATTATCAGCATTCTGATTGTCAGCATTCTGATTGTCACATTCTGATTGTCAGCAT 360
                        *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
A.m.protein3-like      GCAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAA 411
A.m.carnicaprotein3   GCAAAATGATAATAGACAAAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAA 378
MRJP3-F               TCTGATTGCCAGCATTCTGATTGCCAGCATTCTGATTGCCAGCATTCTGATTGTTGA 416
                        *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
A.m.protein3-like      GAGGAATGGTAACAGG 427
A.m.carnicaprotein3   GAGGAATGGTAACAGG 394
MRJP3-F               TATCTTCCGCAACGA- 431
                        *      *  *  *

```

Figura 4. Alinhamento das sequências similares do alelo *F* do loco *Mrjp3* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: PREDICTED: *A. mellifera* major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_00112275.2) e *A. mellifera carnica* major royal jelly protein 3 (*mrjp3*) gene, complete cds (AY663104.1). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as sequências do alinhamento.

```

Mrjp3-G          AATCAGAATGCTGGCA-TCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGAC 59
A.m.carnica      -----A-TCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGAC 44
A.m.protein3-like AATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGGCAATCAGAATGCTGAC 60
                  * *****

Mrjp3-G          AATCAGAATGCTGACAATCAGAATGCTAACAATCAGAATGCTGATAATCAGAATGCTAAC 119
A.m.carnica      AATCAGAATGCTGACAATCAGAATGCTAACAATCAGAATGCTGATAATCAGAATGCTAAC 104
A.m.protein3-like AATCAGAATGTTGACAATCAGAATGCTAACAATCAGAATGCTGATAATCAGAATGCTAAC 120
                  *****

Mrjp3-G          AAACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAAC 179
A.m.carnica      AAACAAAATGGTAATAGACAAAATGATAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAAC 164
A.m.protein3-like AAACAAAATGGTAATAGACAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAAC 180
                  *****

Mrjp3-G          AAACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAA 239
A.m.carnica      AGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAG-AATGATAACAAGCAAAAATGGTAA 223
A.m.protein3-like AGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAG-AATGATAACAAGCAAAAATGGTAA 239
                  * *****

Mrjp3-G          CAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAA 299
A.m.carnica      CAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAA 283
A.m.protein3-like CAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATAGTAACAGACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAA 299
                  *****

Mrjp3-G          CAGACAAAATGGTAACAACAGAATGATAACAAGCAAAAATGATAATAGACAAAATGATAA 359
A.m.carnica      CAGACAAAATGGTAACAACAGAATGATAACAAGCAAAAATGATAATAGACAAAATGATAA 343
A.m.protein3-like TAGACAAAATGGTAACAACAGAATGATAACAAGCAAAAATGGTAATAGACAAAATGATAA 359
                  *****

Mrjp3-G          CAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGAATGGTAACAGGCAAAAATGATAA 419
A.m.carnica      CAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGAATGGTAACAGGCAAAAATGATAA 403
A.m.protein3-like CAAGCAAAAATGGTAACAGACAGAATGATAACAAGAGGAATGGTAACAGGCAAAAATGAT-- 417
                  *****

Mrjp3-G          TCAAAATAATCAGAATGATAATAATCGAAATGATAAT 456
A.m.carnica      TCAAAATAATCAGAATGATAATAATCGAAATGATAAT 440
A.m.protein3-like -CAGAATAATCAGAATGATAATAATCGAAATGATAAT 453
                  ** *****

```

Figura 5. Alinhamento das sequências similares do alelo *G* do loco *Mrjp3* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera carnica* major royal jelly protein 3 (*mrjp3*) gene, complete cds (AY663104.1) e PREDICTED: *A. mellifera* major royal jelly protein 3-like (LOC727045), partial mRNA (XM_001122757.2). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as sequências do alinhamento.

```

MRJP5-D          AATAGAGTTGAATAGAAATTGGATAGAATTGGATAGAATAGATAGGATGGATAGGATGGAT 60
A.ceranaproteinMRJP5 -----TAGGATGAATAGTATGAATAGAAATGGAT 28
                               *** **  **** **  **** **  **** **
MRJP5-D          ACGATGGATTCCATTGGATTAATGGGGTTTAAATGGATTGGAATGGATTGGATGGATGGA 120
A.ceranaproteinMRJP5 A-----GGA 32
*                               ***
MRJP5-D          TGGATAGAATAGATAGGATGGATACGATGGATACGATGGATACAATGGATACAACGGATT 180
A.ceranaproteinMRJP5 TGGATAGAATGGATAGGATGGATAGGATGGATAGGATGGATAGGATGGATAGGATGGATA----- 83
***** **  **** **  **** **  **** **  **** **  **** **
MRJP5-D          ACAATGGATTAGAATGGATAAGATGAATAGAATGGATAGGATGGATAGAATGGATACAGA 240
A.ceranaproteinMRJP5 -----GGATGGATAGGATGGATAGGATGGATAGGATGGATAGAATGGATA--GA 130
                               * **** **  **** **  **** **  **** **  **** **
MRJP5-D          GTGGATAGAATCGGATAACAATGAATAGAATCGGATAGATTGAATAGACATGGATAGGAT 300
A.ceranaproteinMRJP5 ATGGATAGGAT-----GGATAGGAT 150
                               ***** **
MRJP5-D          GGATACAATGGATACAGATGGATACAGATGGATACAGATGGATAGAATGGAATTAAGAA 360
A.ceranaproteinMRJP5 GGA----- 153
***
MRJP5-D          AATTGGGATTAAGAAAATTGGGATAAAGAAAATTGGGATCACCAAATTGGGATCAGAAGAT 420
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-D          CTGGATCACAATCGAAATTACGCAATCAAAATAAAATCATAATTCACAAGATCTGGAA 480
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-D          TCACAAGATGCGATCAAGACCCGAGATCACAAGATCGGATTA AAAACCGGAATTTAAAT 540
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-D          CGGAATAAACTCAG 554
A.ceranaproteinMRJP5 -----

```

Figura 6. Alinhamento das seqüências similares do alelo *D* do loco *Mrjp5* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. cerana* major royal jelly protein MRJP5 precursor (*MRJP5*) mRNA, complete cds (AY532369.1). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as seqüências do alinhamento.

```

A.m.protein5 -----GATGGATAGGATGGATACAATGGATACAATGGATAGAATAG 41
A.m.proteinMRJP5 -----GATGGATAGGATGGATACAATGGATACAATGGATAGAATAG 41
A.m.MRJP5 -----GATGGATAGGATGGATACAATGGATACAATGGATAGAATAG 41
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-E ATCTCCCAATCCAACAAGATGAATAGGATGCATAGGATGAATAGAGTGAATAGAGTGA 60

A.m.protein5 ATAGGATGGATAGGATGGATAGAATAGATAGGATAGATAGGATGCA-TACAATGGATACA 100
A.m.proteinMRJP5 ATAGGATGGATAGGATGGATAGAATAGATAGGATAGATAGGATGCA-TACAATGGATACA 100
A.m.MRJP5 ATAGGATGGATAGGATGGATAGAATAGATAGGATAGATAGGATGGA-TACAATGGATACA 100
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-E ATAGAATGGATAGAATGGATAGAATAGATAGGATGGATAGGATGGACTACAATGGATAGA 120

A.m.protein5 ATGGATACAATGGATAGAACAGA-TAAGATGAGTAGC-ATGGATAGGA-TGGATAGAATG 157
A.m.proteinMRJP5 ATGGATACAATGGATAGAACAGA-TAAGATGAGTAGC-ATGGATAGGA-TGGATAGAATG 157
A.m.MRJP5 ATGGATACAATGGATAGAACAGA-TAAGATGAGTAGC-ATGGATAGGA-TGGATAGAATG 157
A.ceranaproteinMRJP5 -----ATAGAA-----TGGATAGGA-TGGATAGAATG 26
MRJP5-E ATGGATAGAATGGATAGGATGGAATAGGATGGATAGAGATGGATAGGAATAGATAGGATG 180
*****

A.m.protein5 GATAGGGTGGATAGGATGGATACAATGGATA-GAAC-AGATAAGATGAGTAGCATGGATA 215
A.m.proteinMRJP5 GATAGGGTGGATAGGATGGATACAATGGATA-GAAC-AGATAAGATGAGTAGCATGGATA 215
A.m.MRJP5 GATAGGGTGGATAGGATGGATACAATGGATA-GAAC-AGATAAGATGAGTAGCATGGATA 215
A.ceranaproteinMRJP5 GATAGGATGGATAGGATGGATA-----GGATGGATA 57
MRJP5-E GATACCGATGGATACAATGGATACAATGGATACGAACTGGATAAAATGAATAA-ATGAATA 239
*****

A.m.protein5 GGATGGATAGAATGGATAGGGTGGATACA-ATGGATACAATGGATACAATGGATAGAATG 274
A.m.proteinMRJP5 GGATGGATAGAATGGATAGGGTGGATACA-ATGGATACAATGGATACAATGGATAGAATG 274
A.m.MRJP5 GGATGGATAGAATGGATAGGGTGGATACA-ATGGATACAATGGATACAATGGATAGAATG 274
A.ceranaproteinMRJP5 GGATGGATAGGATGGATAGG-----ATGGATAGGATG 89
MRJP5-E GGATGGATAGAATGGATAGAATGGATAGGGATGGATACGATGGATACAACGGATAAAATA 299
*****

A.m.protein5 GATAGGATGGATAGGATGGATAGAATGGATAGAATGGATAGGATGGATACAA----- 326
A.m.proteinMRJP5 GATAGGATGGATAGGATGGATAGAATGGATAGAATGGATAGGATGGATACAA----- 326
A.m.MRJP5 GATAGGATGGATAGGATGGATAGAATGGATAGAATGGATAGGATGGATACAA----- 326
A.ceranaproteinMRJP5 GATAGGATGGATAGAATGGATAGAATGGATAGGATGGATAGGATGGATATAA----- 141
MRJP5-E AATAACATGAATAGGATGGATAGAATGGATAGAATGGATACGGTGGATACAAGTGGATAC 359
*** **

A.m.protein5 ---TGGATAGAACAGATAAGATGAGTAG-GATAG--ATAGAATGGATAAAATAGATAGAA 380
A.m.proteinMRJP5 ---TGGATAGAACAGATAAGATGAGTAG-GATAG--ATAGAATGGATAAAATAGATAGAA 380
A.m.MRJP5 ---TGGATAGAACAGATAAGATGAGTAG-GATAG--ATAGAATGGATAGAATAGATAGAA 380
A.ceranaproteinMRJP5 ---TGGATAGGACGAATAA-----AA 159
MRJP5-E AAGTGGATAAAATGGATAAAATGGATAGAGATGAGAATAGAATGGATAAAATGGATAAAA 419
*****

A.m.protein5 TGGAT-AGGATGGATA---GGACAAATAGAATG-GATAGAAT--GAATAGGATGAATA- 431
A.m.proteinMRJP5 TGGAT-AGGATGGATA---GGACAAATAGAATG-GATAGAAT--GAATAGGATGAATA- 431
A.m.MRJP5 TGGAT-AGGATGGATA---GGACAAATAGAATG-GATAGAAT--GAATAGGATGAATA- 431
A.ceranaproteinMRJP5 TGGAT-AGGATGGATA---GGATGGATATAATG-GATAAGAT--GAATAAAATGGATA- 210
MRJP5-E TGGATCACAATGGATACAAAGGATAAAAAGATAAAGATNGAATACGAATGGGATANAAAA 479
*****

A.m.protein5 -----
A.m.proteinMRJP5 -----
A.m.MRJP5 -----
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-E CTGCGGAATTCGCCAATTCGCGAATTCGCGAANTTCGCGNAACTGCGNAATT 539

A.m.protein5 -----
A.m.proteinMRJP5 -----
A.m.MRJP5 -----
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-E TTCANAATCGCCGAATTTGCAATTCGCCGAATATTGCCAATCCCCACGCATCAGCCC 599

A.m.protein5 -----
A.m.proteinMRJP5 -----
A.m.MRJP5 -----
A.ceranaproteinMRJP5 -----
MRJP5-E ACCACNGGAGNNGNANACTTGCCGTGCCGAAGAGGGGCCATTACGACTGATTGCAA 657

```

Figura 7. Alinhamento das seqüências similares do alelo *E* do loco *Mrjp5* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. cerana* major royal jelly protein MRJP5 precursor (MRJP5) mRNA, complete cds (AY532369.1); *A. mellifera* MRJP5 mRNA, complete cds (GU339164.1); *A. mellifera* major royal jelly protein 5 (*Mrjp5*), mRNA (NM_001011599.1) e *A. mellifera* major royal jelly protein MRJP5 (MRJP5) mRNA, complete cds (AF004842.1). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as seqüências do alinhamento.

```

A.m.protein5          TATGAAAATGATGCATCTCCCACAATCCAACAAGA-TGAATAGGATGCATAGGATGAATA 59
A.m.proteinMRJP5     TATGAAAATGATGCATCTCCCACAATCCAACAAGA-TGAATAGGATGCATAGGATGAATA 59
A.m.MRJP5            TATGAAAATGATGCATCTCCCACAATCCAACAAGA-TGAATAGGATGCATAGGATGAATA 59
MRJP5-F              TATGAAAATGATGCATCTCCCACAATCCAACAAGAATGAATAGGATGCATAGGATGAATA 60
*****

A.m.protein5          GAGTGAATAGAGTGAATAGAATGGATAGAAT-GGATAGAATAGATAGGATGGATAGGATG 118
A.m.proteinMRJP5     GAGTGAATAGAGTGAATAGAATGGATAGAAT-GGATAGAATAGATAGGATGGATAGGATG 118
A.m.MRJP5            GAGTGAATAGAGTGAATAGAATGGATAGAAT-GGATAGAATAGATAGGATGGATAGGATG 118
MRJP5-F              GAGTGAATAGAGTGAATAGAATGGATAGAATGGATAGAATAGATAGGATGGATAGGATG 120
*****

A.m.protein5          GATAGGATGGATACAATGGATACAATGG-ATAGAATAGA--TAGGAT-GGAT-AGGA--T 171
A.m.proteinMRJP5     GATAGGATGGATACAATGGATACAATGG-ATAGAATAGA--TAGGAT-GGAT-AGGA--T 171
A.m.MRJP5            GATAGGATGGATACAATGGATACAATGG-ATAGAATAGA--TAGGAT-GGAT-AGGA--T 171
MRJP5-F              GATACGATGGATACAATGGATACAATGGGATAGAATGGGATTAGGATTGGATTAGGAATT 180
**** ***** *

A.m.protein5          GGA--TAGAA--TAGAT----AGGATAGA-TAGGATG-CATACAATGGATACAATGGATA 221
A.m.proteinMRJP5     GGA--TAGAA--TAGAT----AGGATAGA-TAGGATG-CATACAATGGATACAATGGATA 221
A.m.MRJP5            GGA--TAGAA--TAGAT----AGGATAGA-TAGGATG-GATACAATGGATACAATGGATA 221
MRJP5-F              GGAATTAGAAATTGGAATTAGAGAATAGAATAGGATGAGATACGATGGATACGATGGATA 240
*** ***** *

A.m.protein5          CAATGGATA-GAACAGATAAGATGAGTAGCA-TGGATAGGATGGATAGAATGGATAGGGT 279
A.m.proteinMRJP5     CAATGGATA-GAACAGATAAGATGAGTAGCA-TGGATAGGATGGATAGAATGGATAGGGT 279
A.m.MRJP5            CAATGGATA-GAACAGATAAGATGAGTAGCA-TGGATAGGATGGATAGAATGGATAGGGT 279
MRJP5-F              CAATGGATACAATGGATAC-ATGAATAGCAATGGATAG-ATGAATAGAAATGGATAGGAT 298
***** **

A.m.protein5          GGATAGGATGGATACAATGGATAGAACAGATAAAGATGAGTAGCAT-GGATAGGATGGATA 338
A.m.proteinMRJP5     GGATAGGATGGATACAATGGATAGAACAGATAAAGATGAGTAGCAT-GGATAGGATGGATA 338
A.m.MRJP5            GGATAGGATGGATACAATGGATAGAACAGATAAAGATGAGTAGCAT-GGATAGGATGGATA 338
MRJP5-F              GGATAGAATGGATACGATGGATAGAACAGATAACAATGAATA-CATCGGATAAGATGAATA 357
*****

A.m.protein5          GAATGGATAGGGTGGATACAATGGATACAATGGATACAATGGATA-- 383
A.m.proteinMRJP5     GAATGGATAGGGTGGATACAATGGATACAATGGATACAATGGATA-- 383
A.m.MRJP5            GAATGGATAGGGTGGATACAATGGATACAATGGATACAATGGATA-- 383
MRJP5-F              GAATGGATAGA-TGGATACAATGGATAC--TGGATACAATGGATACA 401
*****

```

Figura 8. Alinhamento das sequências similares do alelo *F* do loco *Mrjp5* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: *A. mellifera* MRJP5 mRNA, complete cds (GU339164.1); *A. mellifera* major royal jelly protein 5 (MRJP5), mRNA (NM_001011599.1) e *A. mellifera* major royal jelly protein MRJP5 (MRJP5) mRNA, complete cds (AF004842.1). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as sequências do alinhamento.

```

MRJP8-C          CAATGATGACGAAAGTTGAGTTTGCAGNCATAATAATAAAATGCTGGAGAATTCAGACTG 60
A.m.carboxypeptidase -----TAAATTGCTGGAGAATTCAGACTG 24
                      *****

MRJP8-C          GAIGATCTTGTCCTGTGCGGAATCCGGACGGGTACTGAGTTACAGTCTACACGATGCGAC 120
A.m.carboxypeptidase GAIGATCTTG-CCTGTGCGGAATCCGGACGGGTAC-GAGT-ACAGTC-ACACGA-GCGAC 79
                      *****

MRJP8-C          AGATTGTGGAGGAAGACGAGGAGCAATCACGAGGAGAATCAAGACGACAGTCTGGTACGA 180
A.m.carboxypeptidase AGATTGTGGAGGAAGACGAGGAGCAACCACGAGGAGAATCAAGACGACAGTC-GGTAC-- 136
                      *****

MRJP8-C          CGATCCTCGTTCGTCCTTATTTTTTTTTTTAGAAAATGGCTGAGTAGAACGATAAAACGT 240
A.m.carboxypeptidase -----

MRJP8-C          ATAACGTATATATAAAATATTTTTTCTCCTTTGGAATATGGGTAICNC 290
A.m.carboxypeptidase -----

```

Figura 9. Alinhamento das sequências similares do alelo *C* do loco *Mrjp8* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: PREDICTED: *A. mellifera* carboxypeptidase B-like (LOC726391), mRNA (XM_001122133.2). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as sequências do alinhamento.

```

MRJP8-D          GTCAGCCAGCTTAGTCGAGAAGAAGACTCGAGACTACGCTAAACTTGCTGGAGAATTCAGAC 60
A.m.carboxypeptidase  GTCAGCCAG-TTAGTCGAGAAGAAGACTCGAG-CTACGCTAAA-TTGCTGGAGAATTCAGAC 57
*****

MRJP8-D          TGGGATGATCTTGTCTGTCGCGAATCCGGACGGGTACGAGTACAGTCTACACGAIGCGA 120
A.m.carboxypeptidase  TGG-ATGATCTTG-CCTGTCGCGAATCCGGACGGGTACGAGTACAGTC-ACACGA-GCGA 113
***

MRJP8-D          CAGATTGTGGAGGAAGACGAGGAGCAATCACGAGGAGAATCAAGACGACAGTCGGTACGA 180
A.m.carboxypeptidase  CAGATTGTGGAGGAAGACGAGGAGCAACCACGAGGAGAATCAAGACGACAGTCGGTAC-- 171
*****

MRJP8-D          CGATCCTCGTCGTCCTATTTTTTTTTTTTAGCAAAATGGTGAGTAGGAACGATTAAAACG 240
A.m.carboxypeptidase  -----

MRJP8-D          TTAAACGTTAATTAAATTATATTTTTCTCTCTCTTGGCCTTAGGTTACACCGGATTACAG 300
A.m.carboxypeptidase  -----

MRJP8-D          AGCTTCCTTCAACTGTGTGGAACCTTACG 329
A.m.carboxypeptidase  -----

```

Figura 10. Alinhamento das seqüências similares do alelo *D* do loco *Mrip8* utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) com: PREDICTED: *A. mellifera* carboxypeptidase B-like (LOC726391), mRNA (XM_001122133.2). “*” = nucleotídeos idênticos em todas as seqüências do alinhamento.