

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Mapování exprese genu *Masc* u obaleče jablečného
(*Cydia pomonella*)**

Bakalářská práce

Renata Kružíková

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

Školitel specialista: Sander Visser, MSc.

České Budějovice 2020

Kružíková, R., 2020: Mapování exprese genu *Masc* u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). [Mapping of *Masc* gene expression in the codling moth (*Cydia pomonella*). Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera) is a major pest species of pome fruit, causing great economic losses in the temperate regions of the world. Investigation of the sex determination genes in pest species is important as it can provide new targets for insect pest control. This thesis focuses on the analysis of two sex determination genes, *Masculinizer* (*Masc*) and *doublesex* (*dsx*) in the codling moth. The relative expression of *Masc* was measured during early embryo development in females and males using quantitative reverse-transcription PCR (RT-qPCR) while simultaneously the sex-specific splicing of *dsx* was investigated by reverse-transcription PCR (RT-PCR). The results obtained by RT-qPCR showed higher *Masc* expression levels in females than in males, contrary to the pattern observed in other lepidopteran species. The splicing pattern of *dsx* shows that sex is determined during the window studied (12-20 hours past oviposition). Therefore, these results indicate a different mechanism of sex determination from the one identified in the silkworm, *Bombyx mori*.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 13. 5. 2020

.....

Renata Kružíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila velké díky Magdě a Sanderovi, kteří mě po celou dobu výzkumu a sepisování této práce odborně vedli, rádi se mnou sdíleli své myšlenky a předávali zkušenosti. Zároveň děkuji i všem ostatním členům naší laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí se vždy skvělou náladou. Za neustálou podporu, vlídná slova i upřímnost děkuji celé své rodině a všem svým přátelům.

Finanční podpora

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky z grantu č. 17-13713S.

1 Úvod	1
1.1 <i>Environmentální určení pohlaví</i>	1
1.2 <i>Genetické určení pohlaví</i>	2
1.2.1 Haplodiploidie	2
1.2.2 Pohlavní chromosomy	2
1.2.3 Evoluce pohlavních chromosomů.....	3
1.2.4 Pohlavní chromosomy motýlů.....	3
1.3 <i>Molekulární podstata pohlavní determinace</i>	5
1.3.1 Pohlavní determinace octomilky obecné	5
1.3.2 Pohlavní determinace mouchy domácí	7
1.3.3 Pohlavní determinace včely medonosné.....	9
1.3.4 Pohlavní determinace vosičky <i>Nasonia vitripennis</i>	11
1.3.5 Pohlavní determinace bource morušového	11
1.4 <i>Pohlavně determinační geny hmyzu</i>	14
2 Cíle práce	15
3 Materiál a metody	16
3.1 <i>Pokusný organismus</i>	16
3.2 <i>Izolace nukleových kyselin</i>	16
3.2.1 Izolace RNA	16
3.2.2 Izolace DNA	17
3.3 <i>Přečištění vyizolované RNA</i>	17
3.4 <i>Reverzní transkripce RNA do cDNA</i>	17
3.5 <i>PCR</i>	18
3.5.1 Multiplex PCR k identifikaci pohlaví.....	18
3.5.2 RT-PCR k identifikaci pohlavně specifického sestříhu <i>dsx</i>	18
3.6 <i>Kvantitativní RT-PCR</i>	19
4 Výsledky	22
4.1 <i>Identifikace pohlaví jednotlivých embryí</i>	22
4.2 <i>Stanovení relativní míry exprese genu <i>Masc</i></i>	23
4.3 <i>Analýza pohlavně specifického genu <i>dsx</i> pomocí RT-PCR</i>	24
5 Diskuze	26
5.1 <i>Míra exprese genu <i>Masculinizer</i></i>	26
5.2 <i>Analýza genu <i>doublesex</i></i>	28
6 Závěr	30
7 Seznam použité literatury	31

1 Úvod

Určení pohlaví jedince je proces, který je mezi organismy velice diverzifikovaný. Procesy determinující pohlaví pracují přes molekulární signalizační kaskády a vyúsťují ve vývoj samičího či samčího jedince. Podněty této pohlavně determinační kaskády mohou být genetického či environmentálního původu. Existují ovšem i organismy, u kterých se hranice mezi genetickým a environmentálním způsobem determinace pohlaví stírají a systémy se vzájemně doplňují a tvoří kontinuum (Sarre et al. 2004; Pen et al. 2010; Changwei et al. 2014).

1.1 Environmentální určení pohlaví

Při environmentálním určení pohlaví jedinci nedědí pohlavně specifické chromosomy od svých rodičů, nýbrž je jejich pohlaví určeno stimulem z prostředí (Crews et al. 1994). Tyto environmentální faktory určující pohlaví jsou mezi organismy různorodé. Nejčastějším takovým faktorem je teplota okolí.

Teplotní určení pohlaví bylo poprvé popsáno u ještěřů a želv, později i u dalších druhů například u aligátorů, hatérie a ryb (shrnutí v Beukeboom and Perrin 2014). Okolní teplota ovlivňuje odlišné živočichy různě, například u ryby menidie kanadské (*Menidia menidia*) vede nižší inkubační teplota k vývoji samic a vyšší k samcům. Tím, že se samice vylihnu díky nízké teplotě dřív než samci, získají delší dobu pro růst a vývoj své tělesné stavby (Conover and Heins 1987). U dalšího rybího zástupce, kančíka citrónového (*Cichlasoma citrinellum*) se setkáváme s opačným principem, kde je velikost výhodnější pro samce než samice, poněvadž větší samci mají vyšší šance k ubránění svého pářícího teritoria, a tak jsou samicemi upřednostňováni. U kančíka citrónového vede tedy nižší teplota inkubace k vývoji v samce (Francis and Barlow 1993). Teplota při inkubaci ovlivní expresi genů kódujících steroidogenní enzymy a receptory steroidních hormonů, které společně navedou diferenciaci embryonálních gonád buď v testes nebo v ovária (Crews et al. 1994).

Dalším faktorem ovlivňujícím pohlaví může být fotoperioda, jako je tomu u některých svijonožců a různonožců (Walker 2005; Guler et al. 2012). Příkladem různonožce jehož pohlaví ovlivňuje fotoperioda budiž *Gammarus duebeni*, který se vyvíjí v samce pokud je dlouhá denní perioda a v samice při krátkodenní periodě (Naylor et al. 1988). Pohlaví jedince může být rovněž ovlivněno přítomností či absencí opačného pohlaví jako je tomu u rypohlavce dvouhlavého (*Bonellia viridis*) (Bachtrog et al. 2014).

1.2 Genetické určení pohlaví

Při genetickém určení pohlaví záleží pohlaví jedince na genetické informaci zděděné od rodičů. Druhy s genetickým určením pohlaví mají často jeden nebo několik málo pohlavních determinantů. Existují ovšem i jiné typy genetického určení pohlaví. Například u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) byl identifikován polygenní determinační systém. To znamená, že pohlaví není určeno pouze jedním řídicím determinantem, ale je determinováno mnoha lokusy genomu jejichž účinek se akumuluje (Bradley et al. 2011; Liew et al. 2012).

1.2.1 Haplodiploidie

Haplodiploidie je podtyp genetického určení pohlaví, při němž nehrají roli pohlavní chromosomy, nýbrž záleží na tom, zda je vajíčko oplozeno či ne. Samice se vyvíjí z vajíčka oplozeného a samci z vajíčka neoplozeného. Samice dědí polovinu genetického materiálu jak od matky, tak od otce a jsou tedy diploidní, zatímco samci dědí pouze polovinu matčina genomu a jsou tak haploidní. Udává se, že haplodiploidní organismy tvoří 12 % druhů živočišné říše, haplodiploidie je však nejlépe prostudována u blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera) (Beukeboom 1995; Beye et al. 2003; Bachtrog et al. 2014; Blackmon et al. 2017; Ross et al. 2019). Haplodiploidie se vyvinula z chromosomálního systému, kde heterogametický je samec, nejpravděpodobněji ze systému X0 (shrnut v Ross et al. 2019). Molekulární podstata haplodiploidie je založená minimálně na dvou různých principech, které budou popsány dále, viz kapitoly 1.3.3 a 1.3.4.

1.2.2 Pohlavní chromosomy

Za genetickým určením pohlaví stojí ve většině případů pohlavní chromosomy. Rozlišujeme v zásadě dva systémy lišící se v tom, které pohlaví, samice nebo samec, je heterogametické. Pokud je heterogametický samec, pak se jedná o chromosomální konstituci s pohlavními chromosomy XX/XY (♀/♂) a pokud je heterogametická samice, tak hovoříme o konstituci WZ/ZZ (♀/♂). Pohlavní chromosomy, které určují vývoj v samici či samce, dědí jedinci od svých rodičů (Charlesworth 1996). Systém XX/XY, spolu s jeho početními variantami včetně X0, nacházíme například u všech savců, většiny hmyzu, korýšů, některých plazů, ryb, několika obojživelníků. Systém WZ/ZZ se včetně numerických obměn vyskytuje u všech ptáků, chrostíků, motýlů, většiny hadů, některých ryb, obojživelníků a korýšů (shrnut v Bachtrog et al. 2014).

1.2.3 Evoluce pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy vznikly v průběhu evoluce mnohokrát a nezávisle na sobě, buď z páru autosomů nebo adopcí chromosomu B. Celý proces vzniku pohlavního chromosomu z páru autosomů začíná tak, že se na jeden z těchto chromosomů přemístí pohlavní determinant (Hackstein et al. 1996; Carvalho 2002; Bachtrog 2006). Na onen chromosom, W anebo Y, se postupně přemístí geny, které jsou výhodné právě pro pohlaví určené determinantem. Jelikož je selekcí upřednostněno dědění takových genů společně, začnou mezi sebou tvořit těsnou vazbu a omezí se mezi nimi rekombinace inverzí. Represí rekombinace však nevyhnutelně dochází ke ztrátě funkcí mnoha genů na chromosomu. Vzniká tak chromosom unikátní pro heterogametické pohlaví, Y nebo W, který zpravidla nese velmi nízký počet funkčních genů, je z velké části degenerovaný, často heterochromatizovaný a obsazený repetitivními sekvencemi. Tyto degenerační procesy mohou vést až k úplné ztrátě onoho chromosomu, tedy vzniku konstitucí X0 a Z0, a celý cyklus se může od začátku opakovat. Chromosomy, které mají v homogametickém pohlaví partnera pro rekombinaci, X a Z, nedegenerují, neboť se rekombinací ozdravují a jsou tak více podobné autosomům (Charlesworth 1991; Bachtrog 2013; Wright et al. 2016).

1.2.4 Pohlavní chromosomy motýlů

Motýli (Lepidoptera) a jejich nejbližší příbuzní chrostíci (Trichoptera) sdílí společný samičí heterogametický chromosomální systém. Motýli jsou zároveň největším žijícím taxonem s heterogametickými samicemi. Pro samice je charakteristická chromosomální konstituce WZ nebo Z0, zatímco samce definuje konstituce ZZ (Traut and Marec 1996).

Přítomnost chromosomu W v genomu je typická pro pokročilé druhy z taxonu Ditrysia obsahující 98 % všech recentních druhů motýlů (Traut and Marec 1996). Byl však nalezen i u některých bazálních skupin motýlů. Například Voleníková ve své diplomové práci z roku 2015 prokázala výskyt chromosomu W u druhu hrotnokřídlece (Hepialidae), *Phymatopus californicus*. Chromosom W nese malý počet genů a je z velké části tvořen mobilními elementy, u samic tvoří často heterochromatinové tělíčko, které je transkripčně málo aktivní a které je možno pozorovat během interfáze jako takzvaný sex chromatin (Traut and Scholz 1978; Traut and Marec 1996; Fuková et al. 2005; Traut et al. 2007).

Konstituce Z0/ZZ je charakteristická pro bazální druhy motýlů a pro všechny skupiny chrostíků, které byly dosud zkoumány a lze tedy považovat tuto konstituci za původní (Traut and Marec 1996; Marec and Novák 1998; Traut et al. 2007). I přes tento fakt lze nalézt systém

Z0/ZZ u druhů patřících k odvozenějším pokročilejším skupinám, například u *Samia cynthia ricini* (Saturnidae), poddruhu martináče pajasanového. V tomto případě vznikl systém Z0/ZZ druhotnou ztrátou chromosomu W (Yoshido et al. 2005).

Není výjimečné setkat se i s numerickými variantami těchto chromosomálních konstitucí (Traut and Marec 1996; Traut et al. 2007). Typickým rodem disponujícím numerickými variantami těchto systémů je rod bělásků *Leptidea* u něž byly v roce 2015 zkoumány tři druhy a byly odhaleny počty jejich pohlavních chromosomů. U *Leptidea juvernica* byla objevena konstituce $W_1W_2W_3Z_1Z_2Z_3Z_4$, u *Leptidea sinapis* $W_1W_2W_3Z_1Z_2Z_3$ a u třetího zkoumaného druhu *Leptidea reali* $W_1W_2W_3W_4Z_1Z_2Z_3Z_4$ (Šíchová et al. 2015).

U většiny druhů motýlů nebyly pohlavní chromosomy doposud dostatečně prostudovány (Traut et al. 2007). Zřídka objasněné jsou také mechanismy určení pohlaví motýlů. Primární signál pro spuštění specifické pohlaví determinující dráhy u druhů s chromosomální konstitucí WZ/ZZ může být teoreticky utvořen buď maskulinizačním genem/geny na chromosomu Z nebo feminizačním genem na W. V případě prvním, kdy je pohlaví určeno chromosomem Z, by nejspíše záleželo na počtu tohoto chromosomu v embryu. Jeden chromosom Z by inicioval vývoj v samici a dva v samce. Takový způsob určení pohlaví se pravděpodobně vyskytuje u druhů s konstitucí Z0/ZZ (Traut et al. 2007), ale jeho molekulární podstata nebyla u žádného druhu dosud prokázána. Druhý zmíněný způsob by znamenal, že v přítomnosti chromosomu W se z embrya vyvine samice a v nepřítomnosti samec. Druhem reprezentujícím tento způsob určení pohlaví - tedy W disponující feminizačním genem, je bourec morušový (*Bombyx mori*), u kterého byl na chromosomu W nalezen samičí faktor *Feminizer (Fem)* (Kiuchi et al. 2014), viz kapitola 1.3.5.

Jak ukázali Yoshido, Marec a Sahara ve své studii, při které křížili dva poddruhy martináče pajasanového *Samia cynthia ssp.* (Yoshido et al. 2016), ne vždy má přítomnost chromosomu W přímý vliv na pohlaví jedince. Reciprokým křížením poddruhu *S. c. walkeri* a poddruhu *S. c. pryeri* vzniklo hybridní potomstvo, mezi nímž byly pomocí metody FISH nalezeny samice bez chromosomu W, a naopak samci, kteří chromosom W měli. Je tedy zřejmé, že pohlaví martináče pajasanového určuje odlišný mechanismus, než jaký byl nalezen u bourece morušového (kapitola 1.3.5) (Kiuchi et al. 2014; Yoshido et al. 2016).

Dalšími motýly, u nichž byl částečně prostudován mechanismus určení pohlaví jsou *Trilocha varians* (Bombycidae) (Lee et al. 2015), rod zavíječů *Ostrinia* (Crambidae) (Fukui et al. 2015), osenice ypsilonová, *Agrotis ipsilon* (Noctuidae) (Wang et al. 2019) a záředníček polní, *Plutella xylostella* (Plutellidae) (Harvey-Samuel et al. 2020).

1.3 Molekulární podstata pohlavní determinace

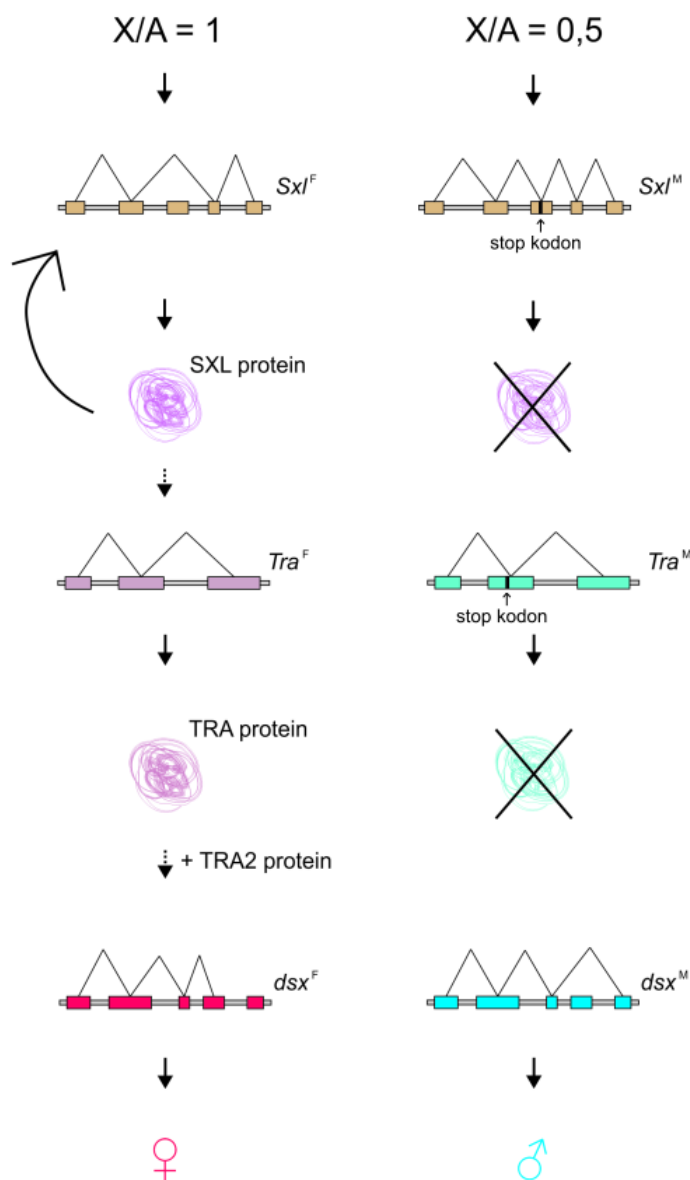
Mechanismy určení pohlaví jsou mezi organismy velice různorodé. U octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) záleží na poměru počtu chromosomů X vůči autosomům, u blanokřídlých (Hymenoptera) závisí pohlaví na ploidii (Beukeboom 1995), některé druhy hmyzu mají pohlaví určené autosomálním genem (Baker and Sakai 1976), samčím faktorem na chromosomu Y (Traut 1994; Sievert et al. 1997) a u motýlů určuje pohlaví buď přítomnost chromosomu W nebo počet chromosomů Z (Traut et al. 2007). Existence takto velkého spektra mechanismů určení pohlaví indikuje rychlou evoluci genů zapojených v pohlavní determinaci (Marín and Baker 1998).

1.3.1 Pohlavní determinace octomilky obecné

Octomilka obecná (*D. melanogaster*) je organismem s nejlépe prostudovanou molekulárně genetickou podstatou určení pohlaví (Burtis and Baker 1989; Schütt and Nöthiger 2000). Primárním signálem pohlavně determinační kaskády je genová dávka z chromosomu X a autosomů, chromosom Y v tomto případě pohlaví neovlivní (Cline 1993).

Pokud se poměr počtu X ku počtu autosomů rovná jedné (konstituce XX), zaktivuje se pomocí XSE (X-linked signal elements), což jsou transkripční faktory, hlavní feminizující gen *Sex-lethal* (*Sxl*). Při konstituci XY je počet XSE poloviční, což je nedostačující pro aktivaci genu *Sxl*, a tak z něj nemůže vzniknout funkční protein (Cline 1993; Schütt and Nöthiger 2000; Erickson and Quintero 2007).

Zaktivovaný *Sxl* funguje autoregulačně tak, že protein SXL indukce aktivní transkripci a samičí sestřih mRNA genu *Sxl* (Bell et al. 1991). SXL se v samici váže na pre-mRNA genu *transformer* (*tra*), čímž dojde k pohlavně specifickému sestřihnutí a produkci proteinu. Protein TRA se následně, společně s proteinem kódovaným genem *transformer-2*, naváže na pre-mRNA genu *doublesex* (*dsx*) (Baker and Wolfner 1988; Amrein et al. 1988; Hoshijima et al. 1991; Inoue et al. 1992). mRNA genu *dsx* má dva možné alternativní sestřihy, pro každé pohlaví jeden. Oba proteiny, přeložené z *dsx*, pracují jako transkripční faktory, ale chovají se pohlavně specificky. Váží se se na různá místa v genomu, čímž ovlivňují genovou expresi a pohlavní diferenciaci (Burtis and Baker 1989; Burtis et al. 1991; Jursnich and Burtis 1993; An and Wensink 1995; Clough et al. 2014). Tato dráha je schematicky shrnuta na **Obrázku 1**.

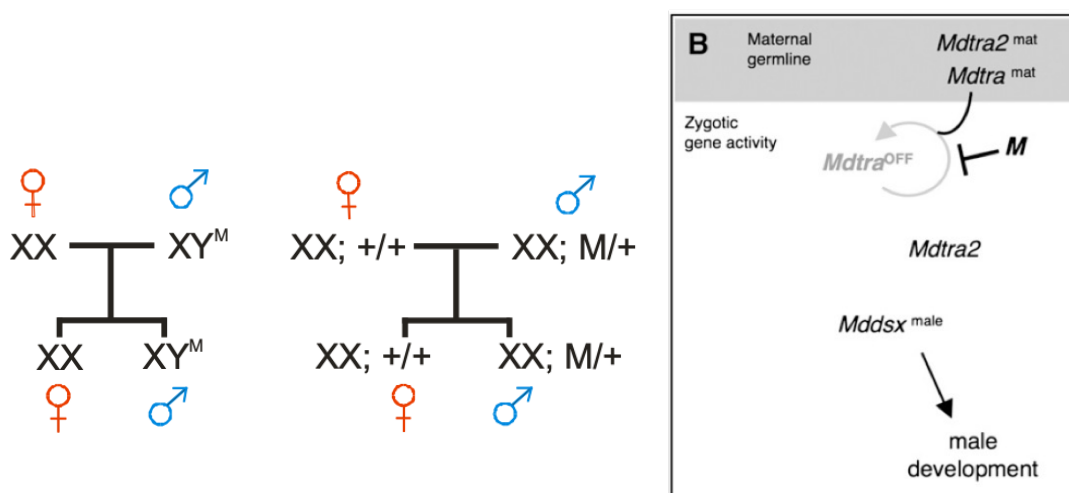


Obrázek 1: Určení pohlaví u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Pokud se v jedinci nachází dva chromosomy X, je jejich poměr vůči autosomům jedna, tím se iniciuje sestřížení mRNA genu *Sxl* do samičí formy. Gen *Sxl* pracuje autoregulačně a dává vznik proteinu SXL. Protein SXL ovlivní sestřížení mRNA genu *tra* do samičí varianty, a ten se přeloží do proteinu. Protein TRA společně s proteinem TRA2 působí na sestřížení mRNA genu *dsx* do samičí formy. V případě, kdy se poměr počtu X vůči autosomům rovná polovině, se gen *Sxl* vyskytuje v samčí podobě, která se kvůli předčasnému stop kodonu přeloží do nefunkčního proteinu. mRNA genu *tra* tak není ovlivněna proteinem SXL a vzniká z ní nefunkční protein, rovněž kvůli předčasnému stop kodonu. mRNA genu *dsx* se tak sestříhne do své výchozí podoby a přeloží se do samčího proteinu DSX indukujícího vývoj samce. Schéma upraveno podle Cline and Meyer 1996.

1.3.2 Pohlavní determinace mouchy domácí

Moucha domácí (*Musca domestica*) je druhem ukazujícím širokou diverzitu a rychlou evoluci mechanismů určujících pohlaví u hmyzu. Moucha totiž disponuje hned několika mechanismy determinujícími pohlaví (Hediger et al. 2010). Běžně se u ní vyskytují nediferencované pohlavní chromosomy XY, které určují pohlaví, ovšem v některých populacích byly nalezeny dominantní alely umístěné na různých chromosomech s účinkem jak feminizačním, tak maskulinizačním. V populacích mouchy domácí tedy koexistuje řada systémů určujících pohlaví, které jsou shrnuty v práci Dübendorfer et al. 2002.

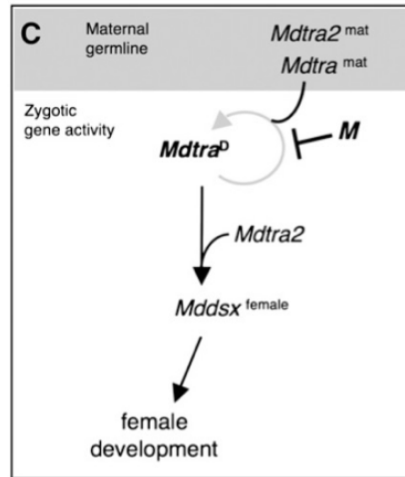
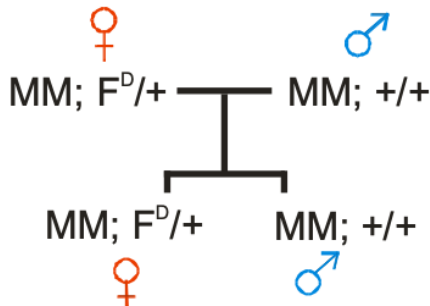
Prvním ze systémů determinujících pohlaví je přítomnost dominantního faktoru *M* na chromosomu Y či na libovolném autosomu, který určuje vývoj v samce. Samice pak charakterizuje chromosomální konstituce postrádající chromosom Y nebo autosom nesoucí *M*. Faktor *M* určuje samčí vývoj tím, že aktivně inhibuje aktivitu genu *Mdtra* (ortolog *tra* *D. melanogaster*), čímž nedojde k vytvoření aktivního proteinu TRA, který neovlivní sestřih pre-mRNA genu *Mddsx* (ortolog *dsx* *D. melanogaster*). *dsx* se tak sestřihne do své výchozí formy a vzniká samčí potomek. Systémy jsou vyobrazeny na **Obrázku 2**.



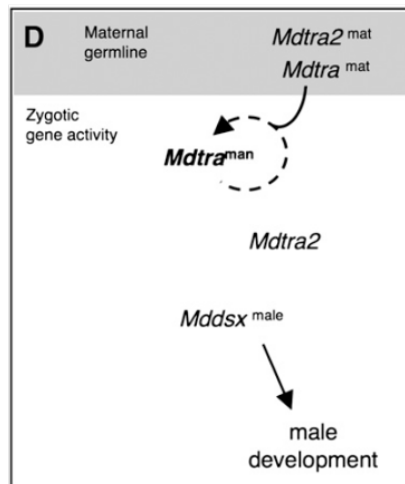
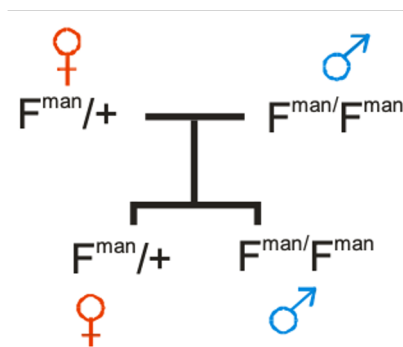
Obrázek 2: Přítomnost faktoru *M* na chromosomu Y (schéma vlevo) či na autosomu (schéma uprostřed) mouchy domácí indukuje vývoj v samce kaskádou, která je zobrazena vpravo. Schémata upravena dle Dübendorfer et al. 2002 a poskytnuta Magdou Zrzavou.

Dalším alternativním způsobem určení pohlaví u mouchy je přítomnost mutantní dominantní alely genu *F* (= F^D), která udává vývoj jedince v samici, a to i za přítomnosti dominantního *M*. Bylo ukázáno, že gen *F* může mít i „loss of function“ alelu F^{MAN} , kdy se homozygotní jedinci F^{MAN}/F^{MAN} vyvíjí v samce a jedinci s normální alelou *F* v samice. Gen *F* je ortologem genu *transformer* *D. melanogaster*. Maternální *tra* aktivuje zygotický *tra*, který

ovlivní specifický sestřih genu *dsx* v samičí formu. Dominantní alela *F* nevyžaduje pro svoji aktivaci maternální *tra* a nevykazuje žádnou odezvu na *M*. Systém s dominantní alelou *F* je schematicky vyobrazen na **Obrázku 3** a systém s alelou F^{MAN} na **Obrázku 4**.



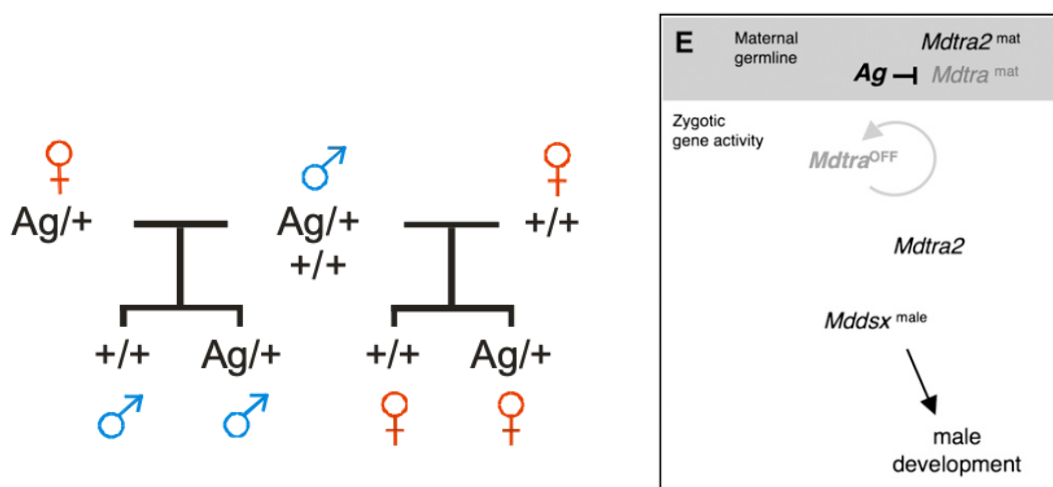
Obrázek 3: Přítomnost dominantního faktoru $F (= Mdtra^D)$ v genomu mouchy domácí. Vlevo dědičnost faktoru. Vpravo genová kaskáda vedoucí k samičímu vývoji. Schéma bylo upraveno dle Dübendorfer et al. 2002 a bylo poskytnuto Magdou Zrzavou.



Obrázek 4: Vlevo dědičnost alely F^{MAN} , vpravo genová podstata určení pohlaví alelou $F^{MAN} (= Mdtra^{man})$ u mouchy domácí. Expres $Mdtra^{man}$ je nízká a nedokáže stimulovat sestřih mRNA genu *dsx* v samičí verzi. Schéma bylo upraveno dle Dübendorfer et al. 2002 a poskytnuto Magdou Zrzavou.

Dále bylo objeveno, že existuje linie, jejíž pohlaví určuje determinant *Ag* (*Arrhenogenic*) děděný od matky, přičemž otec nemá na pohlaví potomka vliv. Heterozygotní samice pro tento determinant produkují syny, homozygotní jedinci umírají. Samičímu

potomstvu dávají vznik matky s divokými alelami. Alela *Ag* inhibuje maternální *tra*, čímž nedojde k aktivaci zygotického *tra*, a tak se mRNA genu *dsx* sestříhne do své samčí formy. Schéma funkce determinantu *Ag* je naznačeno na **Obrázku 5**.



Obrázek 5: Dědičnost alely *Ag* u mouchy domácí vlevo, pohlavně determinační dráha napravo. *Mdtra* = *tra*, *Mdtra2* = *tra2*. Schémata upravena dle Dübendorfer et al. 2002 a poskytnuta Magdou Zrzavou.

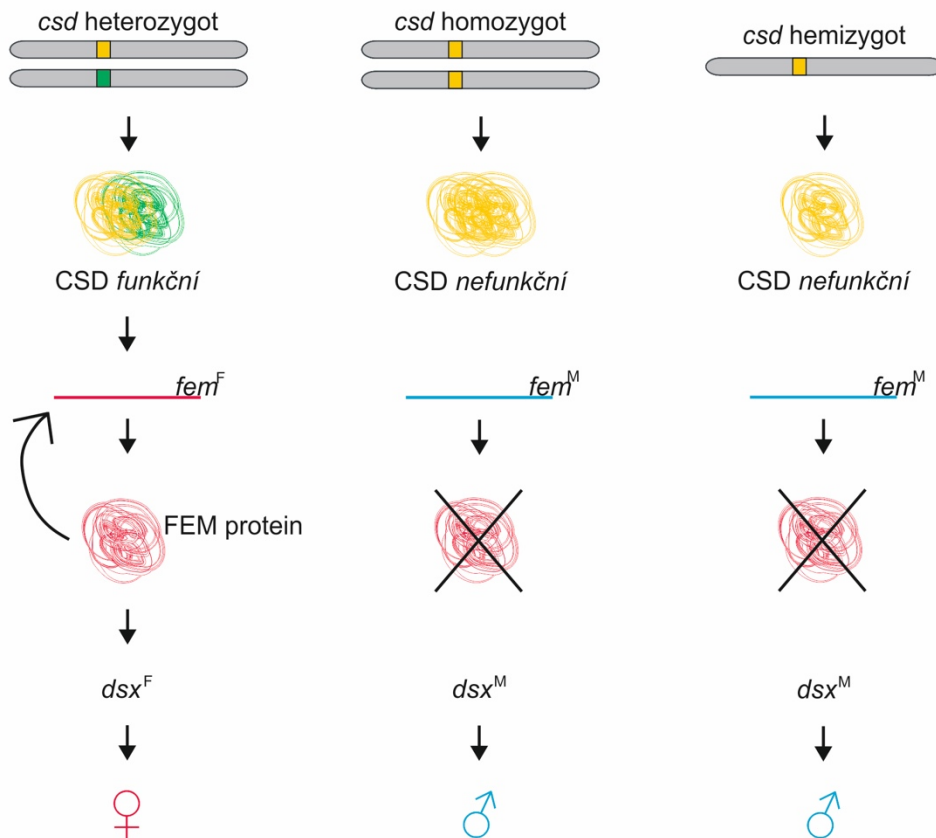
1.3.3 Pohlavní determinace včely medonosné

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z modelových druhů řádu blanokřídlých (Hymenoptera), u kterého je, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.1, haplodiploidní systém určení pohlaví. Primárním signálem pro vývoj v samici či samce je gen *csd*, který byl nalezen pouze u rodu *Apis* a v populacích existuje v 19 alelách (Cook 1993; Hasselmann and Beye 2004). Gen *csd* pravděpodobně vznikl duplikací genu *tra*, který ovlivňuje specifický sestřih transkriptu genu *dsx* u dvoukřídlých (Diptera) (Hasselmann et al. 2008).

Heterozygozita pro tento gen, která nastává v případě oplodnění vajíčka otcem s odlišnou alelou pro *csd* než má matka, dává vznik funkčnímu heterodimeru proteinů CSD, a tak samičímu potomstvu. Pokud se v embryu sejdou dvě stejné alely nebo pouze jedna, tak gen *csd* svým přepisem a překladem tvoří proteiny, které funkční heterodimer netvoří a jedinec se vyvine v samce (Beye et al. 2003; Beye 2004). V případě homozygozity samec většinou hyne nebo dává vznik triploidnímu potomstvu, které je zlikvidováno dělnicemi (Cook 1993).

U včely ovlivňují pohlaví také další geny jako je *feminizer* (ortolog *tra* *D. melanogaster*) a *Amdsx* (ortolog *dsx* *D. melanogaster*) (Cho et al. 2007; Hasselmann et al. 2008). Na počátku navržené pohlavně determinační molekulární kaskády včely stojí primární signál z *csd*, ten je ve formě funkčního heterodimeru proteinů CSD a ovlivňuje sestřihnutí pre-

mRNA genu *feminizer* (*fem*). Produkt sestřížené mRNA genu *fem* pak kontroluje sestřih mRNA genu *Amdsx*. Výchozí verzi dráhy určující pohlaví je pohlaví samčí, jelikož nevyžaduje funkční heterodimer přeložený z genu *csd*, funkční protein FEM a pohlavně specifický sestřih *Amdsx*, zatímco samičí dráha je regulována aktivním specifickým sestřihem (Gempe et al. 2009). Tyto procesy jsou schematicky popsány na **Obrázku 6**.



Obrázek 6: Molekulární dráha určení pohlaví u včely *Apis mellifera*. Jestliže se v jedinci sejdou heterozygotní alely pro lokus *csd*, tak proteiny přeložené z onoho lokusu tvoří funkční heterodimer. Heterodimer proteinů CSD ovlivní sestřížení pre-mRNA genu *fem*, který dá vznik proteinu FEM a který funguje autoregulačně. Protein FEM ovlivní gen *dsx*, jehož mRNA, a tím pádem i protein, bude samičí formy. DSX tak indukuje samičí vývoj. V případě, že je jedinec v genu *csd* homozygotní nebo hemizygotní, netvoří CSD proteiny funkční heterodimer. Z genu *fem* pak nevzniká protein, který by ovlivnil *dsx*. *dsx* se přeloží do výchozí samčí formy a dává vznik samčímu jedinci. Schéma upraveno podle Sánchez 2008.

1.3.4 Pohlavní determinace vosičky *Nasonia vitripennis*

Nasonia je parazitická vosička řádu Hymenoptera, u které roli primárního pohlavně determinativního signálu nezastává lokus *csd*, poněvadž homozygotní diploidi se vyvíjí v samice, a ne v samce. Je tedy zřejmé, že haplodiploidie může fungovat i na jiném principu než na jakém funguje u včely *A. mellifera* (Verhulst et al. 2010a).

Bylo experimentálně ukázáno, že podnětem pro vývoj jednoho z pohlaví není stupeň ploidie, nýbrž přítomnost či absence genomu otce. Mechanismus, který určuje pohlaví je založen na principu maternálního genového imprintingu genu *Nvtra* (ortolog *D. melanogaster tra*). Při oplodnění se do vajíčka dostává imprintovaná alela genu *Nvtra* od matky a neimprintovaná od otce. Funkční alela přichází tedy do vajíčka pouze při oplodnění otcem. Pokud je gen *Nvtra* funkční, etabloje autoregulační smyčku a svým produktem ovlivní sestřih pre-mRNA genu *Nvdsx* (ortolog *dsx D. melanogaster*), a tak určí vývoj v samici (Verhulst et al. 2010a).

Vajíčka, která nejsou oplodněna, nesou pouze imprintovanou a tedy nefunkční verzi *Nvtra* od matky. Neprobíhá v nich tedy zygotická exprese genu *Nvtra* a nenastolí se jeho autoregulační smyčka. Embrya jsou tak předurčena k vývoji samčího potomstva (Verhulst et al. 2010a). Výsledky dosažené studiem haplodiploidních druhů ukazují, že oproti diploidním organismům je samčí vývoj závislý na paternálním genomu, který ovlivní, aktivně či pasivně, aktivitu genu *tra* (Verhulst et al. 2010b).

1.3.5 Pohlavní determinace bource morušového

Bourec morušový (*B. mori*) se díky své ekonomické důležitosti stal modelovým organismem v genetickém výzkumu motýlů (Goldsmith et al. 2005). Bourec je jediným motýlem, u kterého byla odhalena téměř celá pohlavně determinativní dráha, včetně primárního iniciačního signálu.

Pohlavní chromosomy bource vykazují konstituci WZ/ZZ ($\text{♀}/\text{♂}$), kde je pohlaví určeno přítomností či absencí chromosomu W. Navíc bylo ukázáno, že nezáleží na numerických variantách systému a že jeden jediný chromosom W určuje vývoj v samici i za přítomnosti několika kopií chromosomu Z. Tento poznatek vedl k úvahám, že chromosom W pravděpodobně nese gen determinující vývoj samice a že tento dominantní feminizační gen hraje hlavní roli v pohlavně determinativní kaskádě (Traut et al. 2007; Fujii and Shimada 2007). Ovšem po dlouhou dobu byly na chromosomu W nacházeny pouze transpozibilní elementy a nebyly známy žádné genové přepisy či protein kódující geny (Abe

et al. 1998, 2005; Sahara et al. 2003). Až v roce 2011 se podařilo identifikovat specifickou samičí PIWI-interacting RNA (piRNA), u které bylo zjištěno, že se nachází na chromosomu W a je zodpovědná za determinaci pohlaví (Kawaoka et al. 2011; Kiuchi et al. 2014).

piRNAs jsou malé molekuly RNA o délce 23-30 nukleotidů, které ve zvířecích gonádách navádí, díky specifické sekvenci, PIWI proteiny k umlčení aktivity transpozibilních elementů. piRNA pracuje prostřednictvím takzvaného ping-pong mechanismu, který zahrnuje dva rozdílné PIWI proteiny. Mezi "sense" a "antisense" piRNA se utvoří desetinukleotidový překryv, v jehož místě katalyzují PIWI proteiny štěpící reakci, a tak je komplementární cílová sekvence rozštěpena (Brennecke et al. 2007; Gunawardane et al. 2007; Jinek and Doudna 2009).

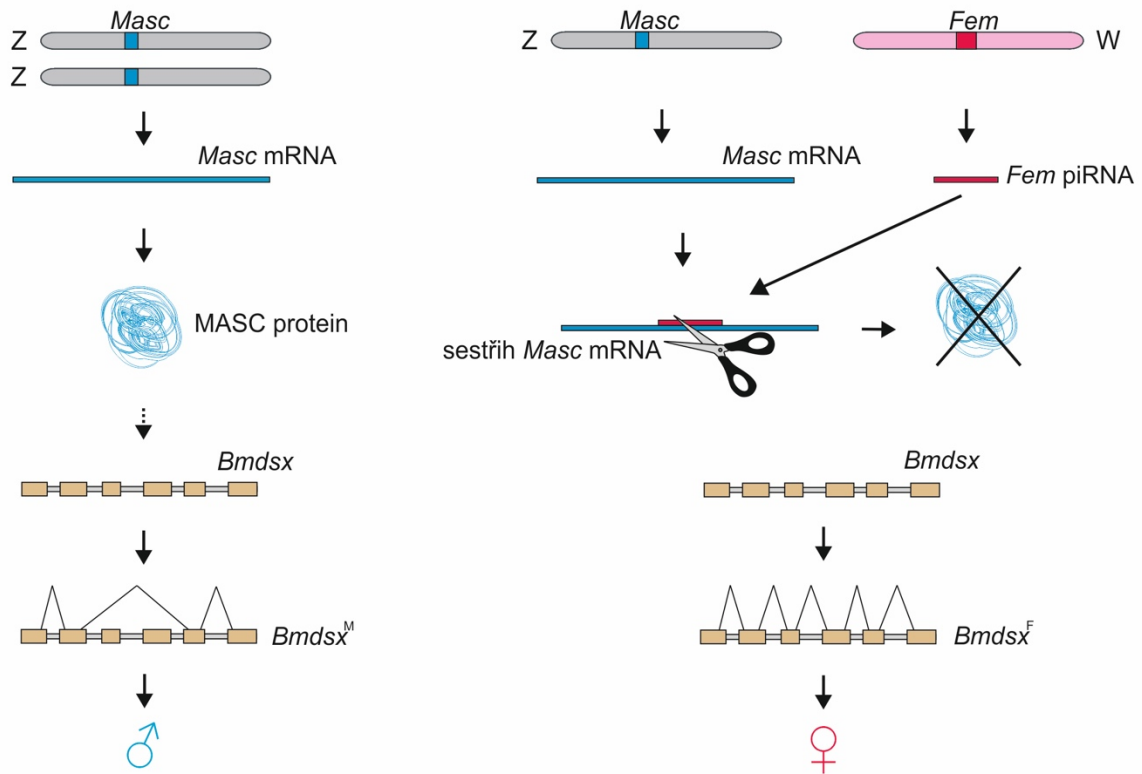
Ve studii zabývající se identifikací specifické samičí piRNA (Kiuchi et al. 2014) bylo odhaleno pomocí sekvenování RNA z různě starých embryí a následným prošetřením knihoven piRNA tří různých linií *B. mori*, že je tato piRNA produktem oblastí chromosomu W determinující pohlaví. Dále bylo zjištěno, že je tato piRNA vyžadována pro degradaci mRNA dalšího genu, a tím nepřímo ovlivňuje specifický sestřih samičí varianty mRNA genu *Bmdsx*. Jelikož má zmíněná piRNA feminizační účinek, byl její gen nazván *Feminizer (Fem)*. Tak se stal bourec morušový vůbec prvním objeveným živočišným druhem, u kterého není pohlaví určováno proteinem, nýbrž pomocí nekódující RNA (shrnutí v Katsuma et al. 2018).

Komplementární sekvence k *Fem* piRNA byla nalezena v IX. exonu neznámého genu lokalizovaném na chromosomu Z. Onen gen byl pojmenován *Masculinizer (Masc)* (Kiuchi et al. 2014). Prokázalo se, že piRNA odvozená od *Masc* mRNA (*Masc* piRNA) je komplementárním partnerem *Fem* piRNA během ping-pong mechanismu, který zahrnuje dva PIWI proteiny, Siwi a BmAgo3 (popsáno v Kawaoka et al. 2009; Katsuma et al. 2018).

Interakce mezi *Fem* piRNA a *Masc* mRNA způsobí rozštípnutí *Masc* mRNA, což vede ke specifickému sestřihu mRNA *Bmdsx* do samičí isoformy. Jakým přesným způsobem ovlivňuje *Masc* sestřih *Bmdsx* nebylo dosud objasněno. Pomocí RNAi bylo potvrzeno, že *Fem* piRNA je primárním determinantem pohlaví bouřce a je esenciální pro jeho feminizaci, a že je gen *Masc* nezbytný pro vývoj samců. Ukázalo se, že tento gen *Masc* je také zodpovědný za kompenzaci genové dávky, čímž se bourec morušový stal prvním motýlem, u něž byl objeven tento mechanismus (Kiuchi et al. 2014).

Gen *B. mori doublesex (Bmdsx)*, ortolog genu *dsx* nalezeného u drozofily (*D. melanogaster*), je specificky sestřihán dle pohlaví a překládán do pohlavně specifického proteinu, který následně ovlivní tělesný vývoj buď v samce nebo samici (Ohbayashi et al. 2001; Clough et al. 2014). Během rané fáze embryonálního vývoje je samičí verze *Bmdsx*

verzí primární, samčí verze se začíná objevovat 21 hodin po naklazení vajíček. To koreluje s hypotézou, že feminizační faktor *Fem* je transkribován před 21 hodinovým stářím naklazených vajíček (Katsuma et al. 2018). Molekulární podstata určení pohlaví u bource morušového je schematicky vyobrazena na **Obrázku 7**.



Obrázek 7: Pohlavně determinační kaskáda bource morušového (*Bombyx mori*). Na chromosomu Z se nachází gen *Masc*, který se běžně přepisuje do mRNA. U samců, kteří mají chromosomy Z dva, se mRNA tohoto genu překládá do funkčního proteinu, který ovlivní sestřížení pre-mRNA genu *Bmdsx* do samčí formy. Samčí mRNA genu *Bmdsx* se překládá do samčího proteinu, který určuje vývoj v samce. Samice mají jeden chromosom Z a jeden chromosom W. Na chromosomu W je umístěn lokus *Fem*, který se přepisuje do piRNA. Tato *Fem* piRNA indukuje rozstřížení mRNA genu *Masc* z chromosomu Z, a tak z něj nemůže vznikat funkční protein. Sestřížení *Bmdsx* tedy není ovlivněno a vzniká výchozí samičí verze proteinu BMDSX, která indukuje vývoj embrya v samici. Schéma upraveno podle Kiuchi et al. 2014.

1.4 Pohlavně determinační geny hmyzu

Geny určující pohlaví spolupracují přes molekulární signalizační kaskády, vzájemně se ovlivňují a působí na geny, které mají přímý vliv na vývoj samičího či samčího těla. Na počátku těchto kaskád stojí primární signál. Tento signál je velice variabilní, podléhá rychlé evoluci a může být různého původu. Pohlavní chromosomy tak mohou i nemusí mít vliv na pohlaví (Sánchez 2008). U octomilky obecné (*D. melanogaster*) zastává roli primárního signálu počet chromosomů X (Erickson and Quintero 2007), druhý pohlavní chromosom, chromosom Y, nemá na určení pohlaví vliv. Naopak u mnoha jiných druhů hmyzu pohlavní chromosom unikátní pro heterogametické pohlaví roli hraje. Tak tomu může být například u mouchy domácí (*M. domestica*) (Dübendorfer et al. 2002) a je tomu tak i u bource morušového (*B. mori*) (Kiuchi et al. 2014). U včely medonosné (*A. mellifera*) je primárním determinantem lokus *csd* ovlivňující pohlaví dle toho v jakém alelovém složení se nachází (Beye et al. 2003). Primární spouštěče se často rekrutují z genů, které se již v některé pohlavně determinační dráze nachází. Takovým případem je například právě zmíněný gen *csd*, který vznikl duplikací genu *tra*, jež se nachází v pohlavně determinační kaskádě u octomilky obecné a působí na gen *dsx* (Hasselmann et al. 2008). Dalším příkladem primárního determinantu, který je ortologem genu *tra* *D. melanogaster* je gen *F*, jehož dominantní alela určuje samičí pohlaví u mouchy domácí (Dübendorfer et al. 2002).

Jak se v kaskádě postupuje níže, geny začínají být mezi druhy konzervativnější (shrnuto v Sánchez 2008). Nejkonzervativnějším identifikovaným genem je gen *dsx*, jehož funkce byla nejprve objevena u octomilky obecné, ale od té doby byly jeho ortology nalezeny ke konci téměř každé pohlavně determinační dráhy. Na gen *dsx*, působí geny, které jsou v pohlavně determinační kaskádě postaveny výše. Tímto působením se mRNA genu *dsx* sestříhává do specifické samičí či samčí formy a z ní přeložený protein působí jako transkripční faktor ovlivňující vývoj jedince v samici nebo samce (shrnuto v Verhulst and van de Zande 2015).

Studium pohlavně determinačních kaskád je přínosné pro vývoj programů kontrolujících hmyzí škůdce. Mohou se tak vyvinout dostupnější a udržitelnější programy s přímým zacílením na geny determinující pohlaví. Obaleč jablečný, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) je významným škůdcem plodů ovocných stromů, především pak jablek a hrušek. V temperátních oblastech světa působí svým počínáním velké ekonomické ztráty, a proto je snahou omezit jeho rozmnožování (Marec and Vreysen 2019). Výsledky získané touto bakalářskou prací mohou přispět k využití genů determinujících pohlaví v eliminaci tohoto škůdce.

2 Cíle práce

Navzdory tomu, že jsou motýli (Lepidoptera) jedním z nejpočetnějších hmyzích řádů, molekulární mechanismy stojící za jejich určením pohlaví nebyly dosud dostatečně prostudovány. Jediným motýlím druhem, u kterého je molekulární podstata determinace pohlaví částečně známá, je modelový organismus bourec morušový (*B. mori*). Klíčovým primárním genem, který nasměruje vývoj jedince v samčí pohlaví, je *Masculinizer (Masc)*. Ten je u samic bourece inaktivován prostřednictvím *Fem*-piRNA lokalizované na chromosomu W. Gen nacházející se na konci této molekulární pohlavně determinační dráhy, *doublesex (dsx)*, je konzervativní a jeho ortology byly nalezeny u mnoha studovaných druhů hmyzu.

Cílem této bakalářské práce je zmapovat expresi genu *Masc* a určit, zda má mRNA genu *dsx* pohlavně specifické varianty u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), zástupce čeledi obalečovití (Tortricidae), a přispět tak

- 1) k odhalení mechanismu determinace pohlaví u dalšího motýlího druhu,
- 2) k porozumění, do jaké míry je mechanismus determinace pohlaví u motýlů univerzální.

3 Materiál a metody

3.1 Pokusný organismus

Veškeré experimenty byly provedeny na laboratorním chovu Krym-61 obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), významného škůdce z čeledi Tortricidae. Chov byl do laboratoře uveden v roce 2005 a další informace o něm jsou popsány ve studii Fuková et al. 2005. Pro experimentální účely posloužila tkáň z vajíček obaleče, tkáň z dospělce byla použita pouze jako pozitivní kontrola správně proběhlých pokusů.

3.2 Izolace nukleových kyselin

K extrakci RNA a DNA z vajíček byla využita metoda sekvenční izolace, při které z jednoho vzorku získáváme jak RNA, tak i DNA. Vajíčka byla sbírána a pomocí sterilního tloučku homogenizována v 500 μ l TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich, USA) 12, 16, 20, 24 a 48 hodin po jejich naklazení. Bylo sesbíráno 16 vzorků z každého času, dohromady tedy 80 vzorků. Zkumavky s rozmělněnou tkání byly uchovávány v -80 °C. Izolace DNA a RNA probíhala do získání tří jedinců samičího i samčího pohlaví od každého stáří. Celkově byla DNA a RNA izolována z 69 jedinců. Pohlaví vajíček bylo určeno dle postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.

3.2.1 Izolace RNA

Povrchy pracovních ploch byly ošetřeny inhibítorem RNáz RNaseZAP (Sigma-Aldrich, USA), aby se předešlo poničení izolované RNA. Zkumavky obsahující jednotlivé vzorky homogenizované v 500 μ l TRI Reagent[®] byly vyjmuty z -80 °C a k nim bylo přidáno 100 μ l 100% chloroformu. Směs byla rázně protřepána po dobu 15 sekund, následně ponechána 3 minuty při pokojové teplotě a poté centrifugována 15 minut při 4 °C na 12 000 g. Oddělená horní vrstva, obsahující RNA, byla přenesena do čisté zkumavky, spodní vrstva v dalších krocích posloužila pro izolaci DNA.

K vrstvě obsahující RNA byl přidán 1 μ l glykogenu ve vodném roztoku o koncentraci 5 μ g/ μ l, směs byla promíchána pipetou, poté k ní bylo přidáno stejné množství 100% isopropanolu a nechala se 10 minut inkubovat. Po inkubaci byla směs centrifugována 10 minut při 4 °C na 12 000 g. Následně byla odstraněna vodná vrstva a utvořený pelet byl 2x promyt 75% etanolem vyrobeným z vody zbavené RNázy pomocí DEPC (diethylpyrokarbonát). Po druhém promytí nebyl etanol odsát, ale byl ponechán ve zkumavce

společně s peletem. Tímto způsobem byla RNA uchovávána v -80 °C do dalšího použití. Před použitím byl etanol odsát a pelet byl rozpuštěn v 10 µl vody ošetřené DEPC.

3.2.2 Izolace DNA

Ke spodní organické vrstvě získané při izolaci RNA bylo přidáno stejné množství pufru pro zpětnou extrakci. Pufre pro zpětnou extrakci obsahoval 4 M guanidin thiokyanátu, 50 mM citronanu sodného a 1 M Trizma® base (Sigma-Aldrich, USA), jeho objem byl doplněn na 100 ml MiliQ vodou a jeho pH bylo pomocí HCl upraveno na 9. Směs organické vrstvy obsahující DNA a pufru pro zpětnou extrakci byla důkladně protřepána, ponechána 15 minut inkubovat a centrifugována 5 minut na 12 000 g. Poté byla horní vrstva přenesena do nové zkumavky a k ní bylo přidáno 5 µg glykogenu. Směs byla promíchána a bylo k ní přidáno stejné množství 100% isopropanolu. Směs byla opět zlehka promíchána a inkubována 5 minut. Následně proběhla centrifugace po dobu 10 minut při 12 000 g, utvořený pelet byl dvakrát promyt ledovým 70% etanolem. Po odsátí posledních zbytků etanolu bylo přidáno 20 µl sterilní MiliQ vody a v ní byl pelet rozpuštěn. Koncentrace získané DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, USA).

3.3 Přečištění vyizolované RNA

Vyizolovaná RNA byla následně podrobena působení DNázy, přičemž se redukovala případná kontaminace genomovou DNA (gDNA). K přečištění RNA od gDNA byl použit komerční kit TURBO DNA-*free*™ Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Při přečištění se postupovalo dle pokynů od výrobce, při vstupním objemu reakce 10 µl. Koncentrace takto ošetřené RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop 2000 a tato RNA byla ihned použita pro reverzní transkripci do komplementární DNA (cDNA).

3.4 Reverzní transkripce RNA do cDNA

RNA přečištěná od zbytku gDNA byla pomocí komerčního kitu ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, USA) zpětně přepsána do cDNA za využití Oligo(dT) a náhodných primerů z kitu. Celková koncentrace iontů Mg²⁺ v reakci činila 3 mM. Pro zvýšení účinnosti transkripce byl do reakce přidán RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega, USA). Reakce byla provedena v objemu 20 µl dle pokynů výrobce a obsahovala cca 400 ng RNA. Získaná cDNA byla třikrát zředěna na výslednou koncentraci 5-7 ng/µl.

3.5 PCR

3.5.1 Multiplex PCR k identifikaci pohlaví

Metodou polymerázové řetězové reakce s dvěma páry primerů byla zjištěna pohlaví jednotlivých embryí. K tomu byly využity dva páry primerů, jeden jakožto marker pro chromosom W a druhý pro gen nacházející se na chromozomu Z *Per* (Fuková et al. 2009). Sekvence primerů, včetně jejich teploty nasedání a délky očekávaného produktu jsou zaznamenány v **Tabulce I**.

Reakce v celkovém objemu 25 μ l obsahovala 20-55 ng gDNA, 1x OneTaq Quick-Load pufr (New England, BioLabs, USA), 200 μ M každého z nukleotidů (TaKaRa, Japonsko), 0,5 μ M od každého primeru a 0,04 U/ μ l OneTaq Quick-Load polymerázy (New England, BioLabs, USA). Do každé reakční směsi byla také započítána negativní kontrola, která neobsahovala žádnou templátovou DNA a posloužila jako indikátor případné kontaminace. Amplifikace probíhala v termocycleru (TProfessional TRIO PCR Thermocycler, Biometra, Německo) dle následujícího protokolu: 2 minuty počáteční denaturace DNA při 94 °C, 35 cyklů opakujících 20 s denaturace při 94 °C, 20 s nasedání primerů při 60 °C a 20 s elongaci při 72 °C, po dokončení 35 cyklů proběhla postelongace při 72 °C na 3 min. Výsledné PCR produkty byly elektroforeticky separovány v 1,5% agarózovém gelu v TAE pufru a po barvení v ethidium bromidu vizualizovány pod UV detekčním zařízením.

3.5.2 RT-PCR k identifikaci pohlavně specifického sestřihu *dsx*

K identifikaci pohlavně specifického sestřihu mRNA genu *dsx* byla využita metoda reverzně transkripční PCR (RT-PCR). Jako templát reakce byla využita cDNA z jednotlivých embryí, u kterých bylo předem stanoveno pohlaví pomocí PCR metody popsané v kapitole **3.5.1**. Sekvence genu byla získána bioinformatickou analýzou provedenou Sanderem Visserem. Primery, viz **Tabulku I**, byly navrženy v programu Geneious 7.1.5 a vyhotoveny firmou Generi Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika).

Reakční směs o celkovém objemu 10 μ l zahrnovala 20-25 ng templátové cDNA, 1x ExTaq pufr (TaKaRa, Japonsko), 200 μ M od každého nukleotidu (TaKaRa, Japonsko), 0,2 μ M od obou primerů a 0,025 U/ μ l ExTaq polymerázy (TaKaRa, Japonsko). Reakce probíhaly vždy společně s negativní kontrolou. Amplifikace byla provedena v termocycleru (TProfessional TRIO PCR Thermocycler) a začala počáteční dvouminutovou denaturací při 94 °C, poté proběhlo 35 cyklů, které opakovaly 30 s denaturace při 94 °C, 30 s nasedání primerů při 62 °C a 30 s elongace při 72 °C, následovala konečná tři minutová postelongace

při 72 °C. Analýza amplifikovaných fragmentů proběhla elektroforeticky v 1,5% agarózovém gelu v TAE pufru obarveném ethidium bromidem a prosvíceným pod UV světlem.

Tabulka I: Přehled primerů použitých při PCR.

Úsek	Sekvence primerů 5'-3'	Nasedací teplota (°C)	Velikost očekávaného produktu (bp)	Původ primerů
<i>dsx</i>	CGCTCGTGCTGGTCATCCTCAA	62	cca 250 u samic cca 550 u samců	tato práce
	CGCGGTGTGGGGCTACAAGT			
<i>Cpper</i>	CCAATGAGGCGATTGAAGA	60	202	(Fuková et al. 2009)
	CTGCCTTGCTTGACGATG			
W-marker	TTCTCACATACCCCGATGGT	60	401	(Fuková et al. 2009)
	TGCTTTCTCGGGATAACGTC			

3.6 Kvantitativní RT-PCR

Kvantitativní reverzní transkriptázová PCR, označována jako RT-qPCR, je metoda, která byla v této práci využita pro stanovení relativní míry exprese zkoumaného genu ve vzorcích. Byla srovnávána relativní úroveň exprese genu *Masculinizer* mezi samicemi a samci v různých fázích embryonálního vývoje. Relativní úroveň exprese genu mohla být stanovena díky porovnání s referenčním genem, v našem případě *rp49*.

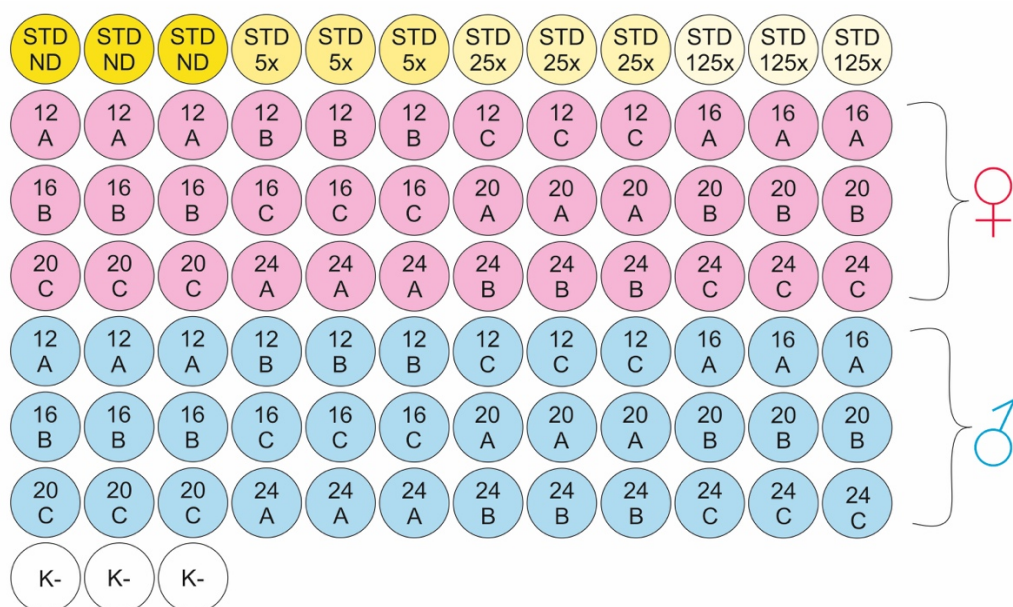
Jako templát posloužila cDNA získaná z jednotlivých různě starých embryí obaleče jablečného. Stáří embryí bylo 12, 16, 20 a 24 hodin po naklazení vajíčka (hpo). Pro stanovení standardní křivky byla použita cDNA z 10-15 embryí dohromady. Pro postup přípravy cDNA viz kapitolu 3.4.

Sekvence genů *Masc* a *rp49* byly zjištěny bioinformatickou analýzou, kterou provedl Sander Visser. Primery pro oba geny byly navrhnuty v programu Geneious 7.1.5, tak aby daly vznik produktu o stejné velikosti a měly podobnou ideální nasedací teplotu. Přehled použitých primerů je zaznamenán v **Tabulce II**. Vhodné primery byly zhotovené firmou Geneti Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika).

Tabulka II: Přehled primerů použitých při RT-qPCR.

Gen	Sekvence primerů 5'-3'	Nasedací teplota (°C)	Velikost očekávaného produktu (bp)
<i>Masc</i>	TCCGTTTCTCAACTTCGCCC	60	97
	TTTCCGGTACCACAATCGCC		
<i>rp49</i>	TTCGTCACCAGTCAGACCGA	60	97
	TACTGGCCCTTGAAGCGC		

Každý z genů byl analyzován na jedné destičce s 96 jamkami společně s reakcí pro stanovení standardní křivky a negativní kontrolou. Analýza genů *Masc* a *rp49* probíhala ve třech nezávislých biologických i technických replikátech pro obě pohlaví. Do první řady qPCR destičky byly v ředící řadě naneseny vzorky pro určení standardní křivky. První tři kolonky obsahovaly neředěnou cDNA, další tři 5x ředěnou, následující tři 25x ředěnou a poslední tři 125x ředěnou cDNA. Do dalších řad byly naneseny zkoumané samičí a samčí vzorky v triplikátech. Do posledního řádku destičky byla nanesena negativní kontrola, tedy reakce bez templátové cDNA. Schéma rozvržení vzorků na destičce je možné vidět na **Obrázku 8**.



Obrázek 8: Rozvržení experimentu na qPCR destičce. V první řadě se nachází vzorky pro stanovení standardní křivky. Samicí vzorky jsou v druhém až čtvrtém řádku, samčí v pátém až sedmém. Čísla označují stáří vajíčka v hodinách, písmena od sebe odlišují jednotlivé biologické triplikáty. Osmý řádek obsahuje negativní kontroly.

Standardní křivka pro ověření účinnosti reakce RT-qPCR byla připravena v ředící řadě v technických triplikátech, kdy byla cDNA získána z 10-15 obalečích embryí. Původní koncentrace cDNA pro standardní křivku byla 10-15 ng/μl, ta byla dále ředěná 5x, 25x a 125x.

Reakční směs pro RT-qPCR o celkovém objemu 10 μl obsahovala 1x Xceed SG qPCR Mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Praha, Česko), 0,4 μM od obou primerů z jednoho páru a 10-15 ng cDNA. Na destičku byla nanášena reakční směs, poté byla zakryta ochrannou fólií a následně krátce zcentrifugována. Reakce byla provedena v termocycleru CFX Connect RealTime system (Bio-Rad, California, USA) dle následujícího protokolu: počáteční denaturace po dobu tří minut při 95 °C, 45 cyklů 30 vteřinové denaturace při 94 °C, 20 vteřinové nasedání primerů a elongace při 60 °C, po každém z těchto cyklů byla zaznamenána úroveň fluorescence. Po uběhlých 45 cyklech se teplota zvýšila na 95 °C po dobu 15 vteřin a poté klesla na 65 °C. Následným postupným zvyšováním teploty po 0,5 °C až na 95 °C byla získána křivka tání.

Výsledky proběhlé reakce byly analyzovány programem Bio-Rad CFX Manager 3.1. Relativní počet kopií genu *Masc* (R) byl stanoven výpočtem z účinnosti reakce (E) a hodnoty Ct pomocí vzorce:

$$R = \frac{(1 + E^{Ref})^{Ct_{Ref}}}{(1 + E^{Tar})^{Ct_{Tar}}}$$

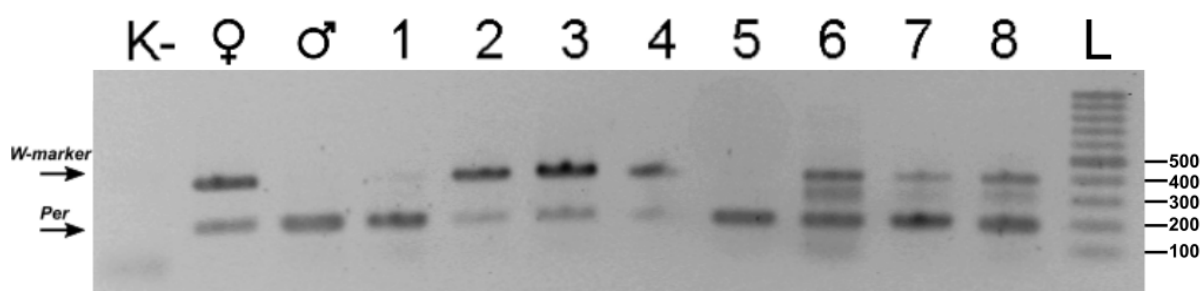
kde index Ref stojí za referenčním genem a index Tar za genem studovaným. Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno dvouvýběrovým t-testem v programu RStudio.

4 Výsledky

4.1 Identifikace pohlaví jednotlivých embryí

Pro identifikaci pohlaví jednotlivých embryí bylo využito metody multiplex PCR. Byly použity dva páry primerů, viz **Tabulku I**. Díky prvnímu z páru primerů, W-markeru, bylo možné amplifikovat sekvenci unikátní pro chromosom W. Primer tvořil u samic produkt o velikosti cca 400 párů bází, u samců se produkt netvořil, jelikož nedisponují chromosomem W. Druhý pár primerů amplifikoval úsek na chromosomu Z, gen *Per*, a tvořil produkt o cca 200 párů bází.

Velikosti výsledných produktů PCR reakce byly ověřeny elektroforetickou separací v 1,5% agarózovém gelu. Jako velikostní standard byl použit PCR BIO Ladder I (PCR Biosystems, Velká Británie). Příklad výsledku pohlavní identifikace je ukázaný na **Obrázku 9**. Jde vždy o dvě embrya staré 12 hodin, dvě staré 16 hodin, 20 hodin a 24 hodin.



Obrázek 9: Elektroforetický snímek jedné z PCR reakcí určených pro identifikaci pohlaví jedinců. Čísla 1-8 odpovídají jednotlivým vzorkům z různých jedinců. "K-" = negativní kontrola, ♀ = samičí pozitivní kontrola, ♂ = samčí pozitivní kontrola, "L" = velikostní žebříček, v tomto případě PCR BIO Ladder I (PCR Biosystems, Velká Británie). Samičí pohlaví vykazují vzorky číslo 2, 3, 4. Naopak samčího pohlaví jsou vzorky číslo 1, 5. U vzorků číslo 6, 7 a 8 nelze pohlaví s jistotou určit.

Bylo ověřeno, že i u velmi raných embryí obaleče jablečného je dostatek DNA na to, aby při PCR reakci, v kombinaci s použitými primery, bylo možné identifikovat jejich pohlaví. Díky určení pohlaví embryí bylo možné porovnávat samice a samce v relativním množství exprese genu *Masc* v různých časech po naklazení a také identifikaci pohlavně specifických variant mRNA genu *dsx*.

4.2 Stanovení relativní míry exprese genu *Masc*

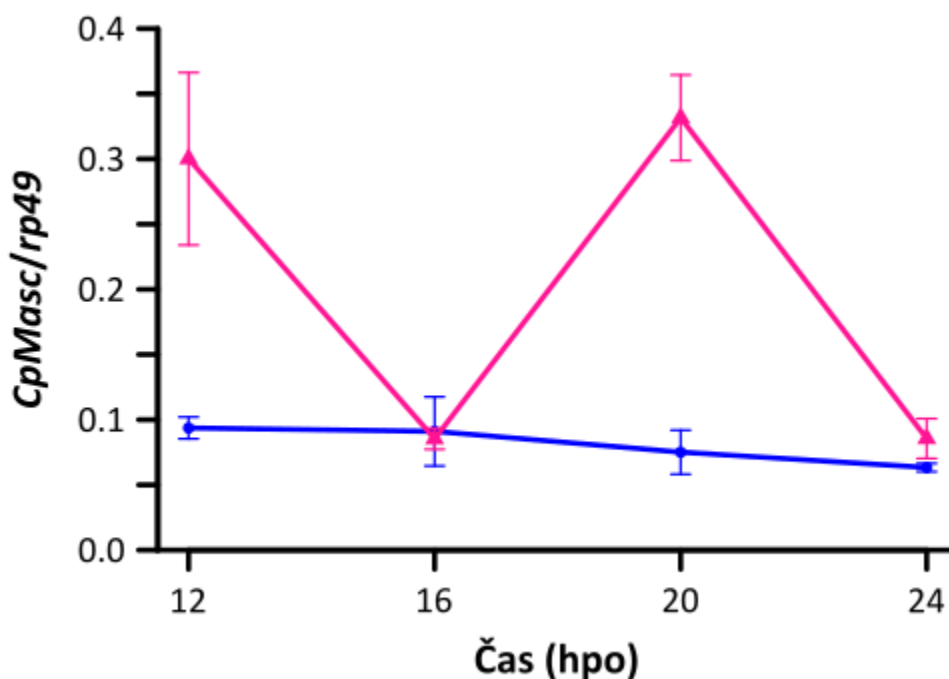
Porovnání míry exprese genu *Masc* mezi pohlavími různě starých embryí bylo provedeno kvantitativní reverzně transkripční polymerázovou řetězovou reakcí. Pro stanovení relativního množství mRNA genu *Masc* byl využit autosomální referenční gen *rp49*, u nějž se předpokládá, že se během embryonálního vývoje exprimuje stále stejnou měrou. Bioinformatickou analýzou, kterou provedl Sander Visser bylo ověřeno, že se gen *rp49* u obaleče jablečného nenachází na pohlavním chromosomu.

Kvůli případnému tvoření nespecifických produktů a tvorbě primer-dimerů byla při analýze zohledněna křivka tání, která by tyto případné nežádoucí produkty odhalila. Díky sklonu standardní křivky bylo možné vykalkulovat účinnost reakce. Účinnosti reakce pro každý gen byly zahrnuty do finálního výpočtu, jehož vzorec je uveden v kapitole 3.6. Účinnost reakce referenčního genu *rp49* byla stanovena na 98 % a genu *Masc* na 94,2 %.

Nulová hypotéza, že se míra exprese genu *Masc* v jednotlivých časech mezi samicemi a samci neliší, byla testována dvouvýběrovým t-testem na 5% hladině významnosti. Experimenty ukázaly signifikantní variabilitu míry exprese genu *Masc* mezi samicemi a samci v časech 12 ($p = 0,0309$) a 20 ($p = 0,001249$) hodin po naklazení, bylo u nich tedy možné nulovou hypotézu zavrhnout. Co je ovšem na výsledcích zajímavé je to, že v těchto časech se exprimuje gen *Masc* ve větší míře u samic než u samců, což je, jak bude dále diskutováno, v rozporu s analýzami provedenými u bource morušového. Výsledky shrnuje **Tabulka III** a graficky znázorňuje **Obrázek 10**.

Tabulka III: Souhrnný výsledek RT-qPCR porovnávající relativní úroveň exprese genu *Masc* vůči genu *rp49* mezi pohlavími různě starých embryí. **Hpo** = stáří embrya v hodinách, **F** = samice, **M** = samec, **S. D.** = směrodatná odchylka. Průměrná relativní exprese byla vypočtena zprůměrováním Ct hodnot, tedy relativních počtu kopií genu biologických triplikátů. Hodnoty byly zaokrouhleny na desetitisíciny.

Hpo	Pohlaví	Průměrná relativní exprese genu <i>Masc</i>	S. D.
12	F	0,1868	0,0431
	M	0,0556	0,0052
16	F	0,0508	0,0047
	M	0,0536	0,0152
20	F	0,2072	0,0203
	M	0,0445	0,0103
24	F	0,0501	0,0097
	M	0,0371	0,0019



Obrázek 10: Graf vyobrazující výsledné hodnoty RT-qPCR. Na ose x je vyneseno stáří vajíček v jednotkách hodin (hpo). Osa y reprezentuje průměrnou relativní míru exprese genu *Masc* vůči *rp49*. Samice reprezentuje křivka růžová se symboly trojúhelníků, samce křivka modrá se symboly teček. Nulovou hypotézu, že se exprese genu *Masc* neliší mezi samicemi a samci, bylo možné zavrhnout v časech 12 a 20 hodin po naklazení ($p < 0,05$). V grafu jsou také znázorněny chybové úsečky směrodatné odchylky od průměru. Schéma bylo vytvořeno v programu RStudio.

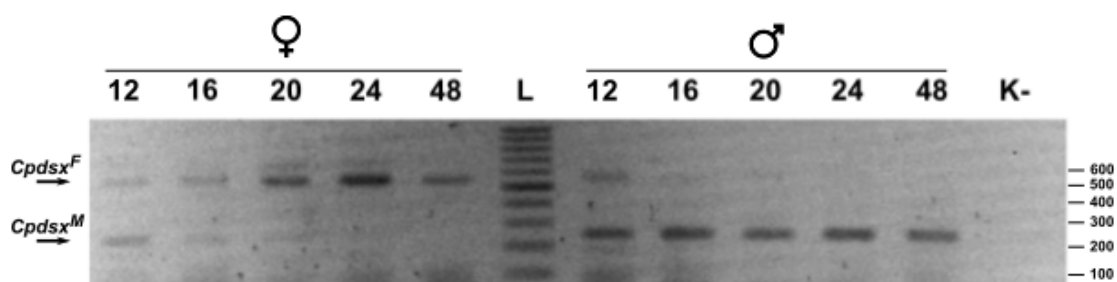
4.3 Analýza pohlavně specifického genu *dsx* pomocí RT-PCR

Pro analýzu alternativního sestřihu pre-mRNA genu *doublesex* do samičí a samčí mRNA bylo použito metody polymerázové řetězové reakce s genově-specifickými primery. Pro sekvenci primerů viz **Tabulku I**. Jako templát reakce byla použita komplementární DNA, jelikož cDNA neobsahuje introny, protože pochází z mRNA, která je již sestřižena. Postup získání cDNA je popsán v kapitole 3.4.

Pokud by k pohlavně specifickému sestřihu mRNA genu *dsx* docházelo, tvořila by PCR reakce rozdílně velké produkty u samičích a samčích vzorků. Z obrázku (**Obr. 11**) elektroforetické separace PCR produktů je zřejmé, že jinak velký produkt vzniká u samic a jinak velký u samců. Samičí specifický produkt je o velikosti přibližně 550 bp. Samčí produkt se tvoří menší, a to o velikosti cca 250 bp.

Lze také vidět, že produkt, který není unikátní pro dané pohlaví, postupně slábne. Je možné se tedy domnívat, že pohlavně specifický sestřih mRNA genu *dsx* se stabilizuje kolem

20. hodiny po naklazení vajíčka (hpo). To lze pozorovat z **Obrázku 11**, kde embrya stará 12, 16 a 20 hodin tvoří produkty dva, kdežto embrya stará 24 hodin již ukazují pouze jeden produkt, specifický pro své vlastní pohlaví. Lze tak tvrdit, že pohlavní determinace mezi 12. a 20. hpo již začala. Jelikož se v nejmladším studovaném embryu nachází oba sestřihy, nelze určit, který sestřih je sestřihem výchozím.



Obrázek 11: Snímek agarózového gelu s elektroforeticky separovanými vzorky RT-PCR reakce genu *dsx*. V levé části jsou naneseny samičí vzorky, v pravé samčí. Vzorky pochází z jednotlivých embryí starých 12, 16, 20, 24 a 48 hodin. "K-" = negativní kontrola. Velikost žebříčku PCR BIO Ladder I ("L") je uvedena po stranách v jednotkách párů bází.

5 Diskuze

5.1 Míra exprese genu *Masculinizer*

Hlavním cílem této práce bylo zmapování míry exprese genu *Masculinizer* (*Masc*) v různých stádiích embryonálního vývoje u samic a samců obaleče jablečného (*C. pomonella*). Gen *Masc* byl u obaleče jablečného zkoumán jakožto potenciální primární pohlavně determinální gen. Gen *Masc* stojí na vrcholku kaskády a hraje klíčovou roli v určení pohlaví u druhu s nejlépe prostudovanou pohlavně determinální dráhou v řádu motýlů, bource morušového. Zda je *Masc* univerzálním klíčovým genem určujícím pohlaví mezi motýly není dosud dostatečně prozkoumané. Ovšem u některých motýlů byly již ortology genu *Masc* identifikovány. Například u druhu blízce příbuzného bourci (*B. mori*) *Trilocha varians* (Bombycidae) byla potvrzena klíčová funkce genu *Masc* v pohlavní determinaci (Lee et al. 2015). Stejně tak byly ortology genu *Masc* objeveny i u příbuzně vzdálenějších druhů, a to u rodu zavíječů *Ostrinia* (Crambidae) (Fukui et al. 2015), osenice ypsilonové, *Agrotis ipsilon* (Noctuidae) (Wang et al. 2019) a záředníčka polního, *Plutella xylostella* (Plutellidae) (Harvey-Samuel et al. 2020).

Gen *Masc* kóduje protein s motivem tandemového zinkového prstu. Takové proteiny navázáním na mRNA a její následnou degradací regulují genovou expresi (Blackshear 2002). V případě bource (*B. mori*) bylo zjištěno, že pro maskulinizaci nejsou esenciální domény zinkových prstů na N konci proteinu, nýbrž v oblasti nacházející se na C konci (Katsuma et al. 2015). Jak bylo ukázáno v nedávných studiích, gen *Masc* je u bource morušového vyžadován nejen pro samčí vývoj, ale také pro kompenzaci genové dávky z chromosomu Z u samců, přesný mechanismus kompenzace dosud není znám. Nicméně bylo potvrzeno, že produkt genu *Masc* je jaderný protein, což podporuje hypotézu jeho role v kompenzaci genové dávky, jelikož ta by se měla odehrávat právě v jádře (Katsuma et al. 2015). Role tohoto genu v kompenzaci genové dávky byla objevena u rodu zavíječů *Ostrinia* v souvislosti s manipulací pohlaví indukovanou endosymbiotickou bakterií *Wolbachia*. Tato endosymbiotická bakterie cílí na gen *Masc* a skrz jeho inaktivaci znemožní kompenzaci genové dávky u samců, což u infikovaných samců vede ke smrti (Fukui et al. 2015).

K účelu stanovení relativní exprese genu *Masc* během embryonálního vývoje obaleče jablečného byla využita metoda kvantitativní RT-PCR. Tato metoda byla zvolena z toho důvodu, že umožňuje stanovení relativní míry exprese studovaného genu porovnáním s expresí genu, který se v genomu studovaného organismu exprimuje stále stejnou měrou. Pro tuto analýzu byla použita vajíčka stará 12, 16, 20 a 24 hodin. Tyto časy byly vybrány

z důvodů domněnek, že právě mezi 12. a 24. hodinu po naklazení se pohlaví jedince determinuje, jak je tomu například u bource morušového (*B. mori*) (Kiuchi et al. 2014), či zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) (Sander Visser, nepublikováno).

Jako referenční gen, jehož exprese byla porovnáována s expresí genu *Masc*, byl vybrán autosomální gen kódující ribozomální protein, *rp49*. Tento gen byl zvolen podle vzoru studia genu *Masc* u bource morušového (*B. mori*) (Kiuchi et al. 2014), kde právě *rp49* sloužil jako gen referenční. Tento gen byl jakožto vnitřní standard použit i při analýzách míry exprese genu *Masc* u zavíječe moučného, *E. kuehniella* (Lepidoptera) (S. Visser, nepublikováno). Špatná volba referenčního genu by mohla zapříčinit ovlivnění výsledků pokusu. V případě, kdy by se gen použitý jako vnitřní standard exprimoval jinak u samic a jinak u samců, tak by zmanipuloval výsledky exprese genu *Masc*, jehož expresi právě mezi samicemi a samci porovnáваме.

Výsledky v této práci, dosažené metodou RT-qPCR, ukazují, že relativní exprese genu *Masc* je během embryonálního vývoje mezi samicemi a samci rozdílná. Statistické zhodnocení dat prokázalo na 5% hladině významnosti odlišnou míru exprese v embryích starých 12 a 20 hodin. V časech 16 a 24 hodin po naklazení vajíčka rozdíly signifikantní nejsou. Z **Obrázku 10** v kapitole 4.2 je zřejmé, že u samic se gen *Masc* exprimuje ve větší míře než u samců, a to v embryích starých 12 a 20 hodin. Relativní exprese studovaného genu se u samců v průběhu času téměř nemění, od 16. hodiny po naklazení (hpo) mírně klesá. Naopak u samic se exprese mění rapidně. V čase 12 hpo je exprese vyšší, poté prudce klesá, od 16. do 20. hodiny stárí znovu stoupá, následně mezi 20. a 24. hodinou opět klesá. Tyto výsledky jsou v rozporu se závěry získané studiem mechanismu pohlavní determinace u bource morušového. U tohoto motýlího druhu byla zanalyzována exprese genu *Masc* vědeckou skupinou Kiuchi et al. v roce 2014 a byl určen jakožto primární faktor zodpovědný za samčí vývoj. Gen *Masc* byl u bource morušového studován v embryích starých 15, 18, 21 a 24 hodin. Výsledky ukázaly, že se exprese genu *Masc* v samčích embryích mezi 15 a 18 hpo překotně zvyšuje a následně mezi 18 a 21 hpo prudce klesá. U samic je situace jiná, od 15 hpo exprese klesá a nadále zůstává mírná. V porovnání s výsledky analýz v této práci lze jasně říci, že exprese genu *Masc* u obaleče (*C. pomonella*) a bource (*B. mori*) vykazuje odlišné schéma. Je tedy možné se domnívat, že pohlaví u obaleče jablečného a u bource morušového je určeno rozdílným způsobem. Výsledky získané v této práci by teoreticky bylo možné vysvětlit i tím, že se gen *Masc* u obaleče (*C. pomonella*) exprimuje dříve než ve 12 hpo. V takovém případě by byl tento gen stále potenciálním klíčovým genem v určení pohlaví obaleče jablečného. Takovou situaci nelze nyní posoudit, neboť v této práci byla nejmladší studována embrya stará 12 hodin.

U bource (*B. mori*) byl později identifikovaný i jiný maskulinizační gen, *Bmznf-2*. Tento gen dává vznik CCCH prstovému zinkovému proteinu, který ovlivňuje pohlavně specifické sestřizení mRNA genu *dsx*. Funkce tohoto proteinu byla studována v buněčné linii in vitro, kdy v samičích buňkách protein funkční nebyl, kdežto v samčích funkční byl a indukoval sestřizení mRNA genu *dsx* do samčí formy (Gopinath et al. 2016). Je tedy možné, že se takový gen nachází i v genomu obaleče (*C. pomonella*) a převzal maskulinizační funkci genu *Masc*.

5.2 Analýza genu *doublesex*

Gen *doublesex* (*dsx*) je oproti primárním spouštěčům pohlavně determinačních drah mezi živočišnými druhy konzervativní. Poprvé byl objeven u octomilky obecné (*D. melanogaster*) (Nagoshi et al. 1988) a od té doby byly jeho ortology identifikovány u mnoha jiných hmyzích druhů. *dsx* je dosud jediným objeveným pohlavně determinačním genem s konzervativní funkcí v řádu motýlů. *dsx* je gen, jehož mRNA má pohlavně specifické alternativní sestřihy. Který alternativní sestřih vznikne záleží na tom, zda na pre-mRNA *dsx* působí produkty jiných pohlavně determinačních genů. Proteiny přeložené ze sestřizené mRNA pracují jako transkripční faktory ovlivňující mnoho míst v genomu a tím dávají vznik jednomu z pohlaví (Verhulst and van de Zande 2015). Bourec morušový (*B. mori*) byl prvním hmyzím druhem, u kterého byl ortolog genu *dsx* nalezen (Nagoshi et al. 1988). U bource byly identifikovány alternativní sestřihy jak pro samici, tak pro samce.

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zjistit, zda se pohlavně specifické mRNA genu *dsx* vyskytují i u obaleče jablečného (*C. pomonella*). K tomu bylo využito metody RT-PCR, do které se jako templát k amplifikaci používá cDNA. Tato cDNA byla izolována z jednotlivých embryí starých 12, 16, 20, 24 a 48 hodin a postup jejího získání je popsán v kapitole 3.4. Úspěšně se podařilo identifikovat dva produkty o různé velikosti, viz **Obrázek 11**. Větší z produktů se typicky tvořil u vzorků se samičí tkání, menší produkt se tvořil u samců. To zhruba odpovídá i situaci u bource morušového, kde se větší z produktů také tvořil u samic a menší u samců (Kiuchi et al. 2014).

U bource (*B. mori*) bylo ukázáno, že výchozí variantou mRNA genu *dsx* je varianta specifická pro samice a její velikost byla stanovena na 475 bp. U embryí starých 15 a 18 hodin se nachází pouze samičí varianta. Samčí varianta se objevuje až 21 hpo a vykazuje velikost 226 bp. U samic se v časech 21 a 24 hpo tvoří velmi slabé samčí produkty. U samců se síla samčího produktu od 21. hodiny po naklazení postupně zvyšuje, zatímco samičí produkt slábne. Z těchto výsledků lze vyvodit, že samičí *Fem* piRNA začíná působit právě před 21 hpo (Kiuchi et al. 2014). Jako výchozí byl samičí sestřih mRNA genu *dsx* objeven i u motýla

T. varians z čeledi bourcovitých. U tohoto blízkého příbuzného bource (*B. mori*) se ve 12 hodin starých embryích ukazuje pouze samičí sestřih. V embryích starých 16 a 24 hodin se nachází oba sestřihy jak samičí, tak i samčí. V době 48 hpo je již produkt ustálen na variantu daného pohlaví embrya (Lee et al. 2015).

Z výsledků analýzy exprese genu *dsx* u obaleče jablečného získaných v této práci, nelze určit, která forma sestřihu, samičí či samčí, je výchozí. Na **Obrázku 11** je totiž možné vidět, že nejmladší zkoumaná embrya byla 12 hodin stará a v tomto čase vykazují vzorky již oba pohlavní sestřihy. V čase 24 hpo se již vyskytuje pouze jeden produkt specifický pro dané pohlaví. Je tedy zřejmé, že kaskáda genů ovlivňující gen *dsx* se u obaleče (*C. pomonella*) aktivuje dříve než ve 12 hodinách po naklazení. Tento výsledek poukazuje na odlišný mechanismus regulace sestřihu mRNA *dsx* v raných fázích embryonálního vývoje obaleče (*C. pomonella*) a bource (*B. mori*).

Může se jednat o stejný případ jako u osenice ypsilonové (*P. xylostella*), kde bylo v práci z roku 2020 zjištěno, že se pohlavně specifický produkt genu *dsx* ustálí již 24 hodin po naklazení. U embryí starých tři hodiny se nachází pouze samičí varianta, je tudíž variantou výchozí. U embryí starých 6 hodin se nachází obě formy a u 24 hodin starých embryí jen varianta charakteristická pro pohlaví jednotlivých embryí. Stejně vzorky byly použity i pro analýzu genu *Masc*. Bylo ověřeno, že se samčí varianta genu *dsx* nachází pouze ve vzorcích, u kterých se gen *Masc* exprimuje (Harvey-Samuel et al. 2020).

6 Závěr

Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*) je ekonomicky výrazný škůdce jádrového ovoce, k jeho eliminaci se vyvíjí kontrolní programy, které se pokouší cílit na pohlavně determinační kaskádu. Tato bakalářská práce se zabývala analýzou dvou pohlavně determinačních genů, *Masculinizer* (*Masc*) a *doublesex* (*dsx*), obaleče jablečného. Ke studiu genu *Masc* byla použita metoda kvantitativní reverzně transkripční PCR (RT-qPCR) a ke studiu genu *dsx* reverzně transkripční PCR (RT-PCR).

Díky metodě RT-qPCR bylo odhaleno, že se u samců hladina exprese genu *Masc* v raném embryonálním vývoji nemění a je nízká. Oproti tomu u samic se míra exprese překotně mění, v průběhu času se zvyšuje a poté zase klesá. Tyto výsledky nepodpořily schéma pohlavní determinace bource morušového (*B. mori*), kde během raného embryonálního vývoje je míra exprese genu *Masc* vyšší u samců nežli u samic. Byly identifikovány pohlavně specifické sestřihy mRNA genu *dsx*, jeden samičí a jeden samčí. V námi studovaném časovém okně (12-48 hpo) se nepodařilo určit, který sestřih je pro obaleče výchozím, jelikož již v nejmladším embryu se ukázaly oba sestřihy. Je tedy pravděpodobné, že pohlavní determinace začíná u obaleče dříve než ve stáří 12 hodin.

Přestože jsou motýli (Lepidoptera) druhově nejpočetnějším hmyzím řádem a nejpočetnější skupinou živočichů disponující heterogametickými samicemi, o molekulárních mechanismech určení jejich pohlaví existují pouze kusé informace. Výsledky získané v této práci mohou pomoci k identifikaci pohlavně determinační kaskády u druhu z čeledi obalečovití (Tortricidae), obaleče jablečného (*C. pomonella*).

7 Seznam použité literatury

- Abe H, Kanehara M, Terada T, et al (1998) Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes Genet Syst* 73:243–254.
<https://doi.org/10.1266/ggs.73.243>
- Abe H, Seki M, Ohbayashi F, et al (2005) Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* 14:339–352.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00565.x>
- Amrein H, Gorman M, Nöthiger R (1988) The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* 55:1025–1035.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90247-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90247-4)
- An W, Wensink PC (1995) Three protein binding sites form an enhancer that regulates sex- and fat body-specific transcription of *Drosophila* yolk protein genes. *EMBO J* 14:1221–1230. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07105.x>
- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 16:578–585. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.10.007>
- Bachtrog D (2013) Y-chromosome evolution: Emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat Rev Genet* 14:113–124.
<https://doi.org/10.1038/nrg3366>
- Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, et al (2014) Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol* 12:e1001899. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899>
- Baker BS, Wolfner MF (1988) A molecular analysis of *doublesex*, a bifunctional gene that controls both male and female sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Dev* 2:477–489. <https://doi.org/10.1101/gad.2.4.477>
- Baker RH, Sakai RK (1976) Male determining factor on chromosome 3 in the mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *J Hered* 67:289–294.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108733>
- Bell LR, Horabin JI, Schedl P, Cline TW (1991) Positive autoregulation of *Sex-lethal* by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell* 65:229–239. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90157-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90157-T)
- Beukeboom LW (1995) Sex determination in Hymenoptera: A need for genetic and molecular studies. *BioEssays* 17:813–817. <https://doi.org/10.1002/bies.950170911>

- Beukeboom LW, Perrin N (2014) *The Evolution of Sex Determination*. Oxford University Press
- Beye M (2004) The dice of fate: The *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays* 26:1131–1139.
<https://doi.org/10.1002/bies.20098>
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, et al (2003) The Gene *csd* Is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein. *Cell* 114:419–429. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00606-8)
- Blackmon H, Ross L, Bachtrog D (2017) Sex Determination, Sex Chromosomes, and Karyotype Evolution in Insects. *J Hered* 108:78–93.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esw047>
- Blackshear PJ (2002) Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans* 30:945–952.
<https://doi.org/10.1042/BST0300945>
- Bradley KM, Breyer JP, Melville DB, et al (2011) An SNP-Based Linkage Map for Zebrafish Reveals Sex Determination Loci. *G3 Genes, Genomes, Genet* 1:3–9.
<https://doi.org/10.1534/g3.111.000190>
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, et al (2007) Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* 128:1089–1103.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
- Burtis KC, Baker BS (1989) *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56:997–1010. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90633-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90633-8)
- Burtis KC, Coschigano KT, Baker BS, Wensink PC (1991) The *doublesex* proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO J* 10:2577–2582. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07798.x>
- Carvalho A (2002) Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 12:664–668. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00356-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00356-8)
- Changwei S, Qiye L, Songlin C, et al (2014) Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. *Genome Res* 24:604–615.
<https://doi.org/10.1101/gr.162172.113.604>
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* (80-) 251:1030–1033.
<https://doi.org/10.1126/science.1998119>

- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol* 6:149–162. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00448-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00448-7)
- Cho S, Huang ZY, Zhang J (2007) Sex-Specific Splicing of the Honeybee *doublesex* Gene Reveals 300 Million Years of Evolution at the Bottom of the Insect Sex-Determination Pathway. *Genetics* 177:1733–1741. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.078980>
- Cline TW (1993) The *Drosophila* sex determination signal: how do flies count to two? *Trends Genet* 9:385–390. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90138-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90138-8)
- Cline TW, Meyer BJ (1996) VIVE LA DIFFÉRENCE: Males vs Females in Flies vs Worms. *Annu Rev Genet* 30:637–702. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.637>
- Clough E, Jimenez E, Kim Y-A, et al (2014) Sex- and Tissue-Specific Functions of *Drosophila Doublesex* Transcription Factor Target Genes. *Dev Cell* 31:761–773. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.021>
- Conover DO, Heins SW (1987) Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature* 326:496–498. <https://doi.org/10.1038/326496a0>
- Cook JM (1993) Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity (Edinb)* 71:421–435. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.157>
- Crews D, Bergeron JM, Bull JJ, et al (1994) Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Dev Genet* 15:297–312. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020150310>
- Dübendorfer A, Hediger M, Burghardt G, Bopp D (2002) *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 46:75–79. <https://doi.org/10.1387/ijdb.11902690>
- Erickson JW, Quintero JJ (2007) Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol* 5:2821–2830. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050332>
- Francis RC, Barlow GW (1993) Social control of primary sex differentiation in the *Midas cichlid*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10673–10675. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10673>
- Fujii T, Shimada T (2007) Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Semin Cell Dev Biol* 18:379–388. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.02.008>
- Fuková I, Neven LG, Bárcenas NM, et al (2009) Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and larvae. *J Appl Entomol* 133:249–261. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01352.x>

- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* 48:1083–1092. <https://doi.org/10.1139/g05-063>
- Fukui T, Kawamoto M, Shoji K, et al (2015) The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Selectively Kills Male Hosts by Targeting the Masculinizing Gene. *PLOS Pathog* 11:e1005048. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005048>
- Gempe T, Hasselmann M, Schiøtt M, et al (2009) Sex determination in honeybees: Two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biol* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000222>
- Goldsmith MR, Shimada T, Abe H (2005) The Genetics and Genomics of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Annu Rev Entomol* 50:71–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130456>
- Gopinath G, Arunkumar KP, Mita K, Nagaraju J (2016) Role of *Bmzmf-2*, a *Bombyx mori* CCCH zinc finger gene, in masculinisation and differential splicing of *Bmtra-2*. *Insect Biochem Mol Biol* 75:32–44. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.05.008>
- Guler Y, Short S, Kile P, Ford AT (2012) Integrating field and laboratory evidence for environmental sex determination in the amphipod, *Echinogammarus marinus*. *Mar Biol* 159:2885–2890. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2042-2>
- Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, et al (2007) A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* (80-) 315:1587–1590. <https://doi.org/10.1126/science.1140494>
- Hackstein JHP, Hochstenbach R, Hauschteck-Jungen E, Beukeboom LW (1996) Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *BioEssays* 18:317–323. <https://doi.org/10.1002/bies.950180410>
- Harvey-Samuel T, Norman VC, Carter R, et al (2020) Identification and characterization of a *Masculinizer* homologue in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Mol Biol* 29:231–240. <https://doi.org/10.1111/imb.12628>
- Hasselmann M, Beye M (2004) Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci* 101:4888–4893. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307147101>
- Hasselmann M, Gempe T, Schiøtt M, et al (2008) Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454:519–522. <https://doi.org/10.1038/nature07052>

- Hediger M, Henggeler C, Meier N, et al (2010) Molecular Characterization of the Key Switch *F* Provides a Basis for Understanding the Rapid Divergence of the Sex-Determining Pathway in the Housefly. *Genetics* 184:155–170.
<https://doi.org/10.1534/genetics.109.109249>
- Hoshijima K, Inoue K, Higuchi I, et al (1991) Control of *doublesex* alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science* (80-) 252:833–836.
<https://doi.org/10.1126/science.1902987>
- Inoue K, Hoshijima K, Higuchi I, et al (1992) Binding of the *Drosophila transformer* and *transformer-2* proteins to the regulatory elements of *doublesex* primary transcript for sex-specific RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8092–8096.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8092>
- Jinek M, Doudna JA (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457:405–412. <https://doi.org/10.1038/nature07755>
- Jurnsich VA, Burtis KC (1993) A positive role in differentiation for the male *doublesex* protein of *Drosophila*. *Dev Biol* 155:235–249. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1021>
- Katsuma S, Kiuchi T, Kawamoto M, et al (2018) Unique sex determination system in the silkworm, *Bombyx mori*: current status and beyond. *Proc Japan Acad Ser B* 94:205–216. <https://doi.org/10.2183/pjab.94.014>
- Katsuma S, Sugano Y, Kiuchi T, Shimada T (2015) Two Conserved Cysteine Residues Are Required for the Masculinizing Activity of the Silkworm Masc Protein. *J Biol Chem* 290:26114–26124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685362>
- Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y, et al (2009) The *Bombyx* ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA* 15:1258–1264.
<https://doi.org/10.1261/rna.1452209>
- Kawaoka S, Kadota K, Arai Y, et al (2011) The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs. *RNA* 17:2144–2151. <https://doi.org/10.1261/rna.027565.111>
- Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, et al (2014) A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* 509:633–636.
<https://doi.org/10.1038/nature13315>
- Lee J, Kiuchi T, Kawamoto M, et al (2015) Identification and functional analysis of a *Masculinizer* orthologue in *Trilocha varians* (Lepidoptera: Bombycidae). *Insect Mol Biol* 24:561–569. <https://doi.org/10.1111/imb.12181>
- Liew WC, Bartfai R, Lim Z, et al (2012) Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS One* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397>

- Marec F, Novák K (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *Eur J Entomol* 95:197–209
- Marec F, Vreysen MJB (2019) Advances and Challenges of Using the Sterile Insect Technique for the Management of Pest Lepidoptera. *Insects* 10:1–26
- Marín I, Baker BS (1998) The Evolutionary Dynamics of Sex Determination. *Science* (80-) 281:1990–1994. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.1990>
- Nagoshi RN, McKeown M, Burtis KC, et al (1988) The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in *D. melanogaster*. *Cell* 53:229–236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90384-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90384-4)
- Naylor C, Adams J, Greenwood P (1988) Population Dynamics and Adaptive Sexual Strategies in a Brackish Water Crustacean, *Gammarus duebeni*. *J Anim Ecol* 57:493. <https://doi.org/10.2307/4920>
- Ohbayashi F, Suzuki MG, Mita K, et al (2001) A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 128:145–158. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00304-3](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00304-3)
- Pen I, Uller T, Feldmeyer B, et al (2010) Climate-driven population divergence in sex-determining systems. *Nature* 468:436–438. <https://doi.org/10.1038/nature09512>
- Ross L, Davies NG, Gardner A (2019) How to make a haploid male. *Evol Lett* 3:173–184. <https://doi.org/10.1002/evl3.107>
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, et al (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* 112:48–55. <https://doi.org/10.1007/s00412-003-0245-5>
- Sánchez L (2008) Sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 52:837–856. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072396ls>
- Sarre SD, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26:639–645. <https://doi.org/10.1002/bies.20050>
- Schütt C, Nöthiger R (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127:667–77
- Šíchová J, Voleníková A, Dincă V, et al (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evol Biol* 15:89. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0375-4>

- Sievert V, Kuhn S, Traut W (1997) Expression of the sex determining cascade genes *Sex-lethal* and *doublesex* in the phorid fly *Megaselia scalaris*. *Genome* 40:211–214.
<https://doi.org/10.1139/g97-030>
- Traut W (1994) Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics* 136:1097–1104
- Traut W, Marec F (1996) Sex Chromatin in Lepidoptera. *Q Rev Biol* 71:239–256.
<https://doi.org/10.1086/419371>
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera. *Sex Dev* 1:332–346. <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Traut W, Scholz D (1978) Structure, replication and transcriptional activity of the sex-specific heterochromatin in a moth. *Exp Cell Res* 113:85–94.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(78\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(78)90090-3)
- Verhulst EC, Beukeboom LW, van de Zande L (2010a) Maternal Control of Haplodiploid Sex Determination in the Wasp *Nasonia*. *Science* (80-) 328:620–623.
<https://doi.org/10.1126/science.1185805>
- Verhulst EC, van de Zande L (2015) Double nexus-*Doublesex* is the connecting element in sex determination. *Brief Funct Genomics* 14:396–406.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/elv005>
- Verhulst EC, van de Zande L, Beukeboom LW (2010b) Insect sex determination: it all evolves around *transformer*. *Curr Opin Genet Dev* 20:376–383.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.05.001>
- Voleníková A (2015) Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlcovití (Lepidoptera: Hepialoidea). Jihočeská univerzita
- Walker G (2005) Sex determination in the larvae of the parasitic barnacle *Heterosaccus lunatus*: An experimental approach. *J Exp Mar Bio Ecol* 318:31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.008>
- Wang YH, Chen XE, Yang Y, et al (2019) The *Masc* gene product controls masculinization in the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Insect Sci* 26:1037–1044.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12635>
- Wright AE, Dean R, Zimmer F, Mank JE (2016) How to make a sex chromosome. *Nat. Commun.* 7
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2016) The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmoths, *Samia cynthia ssp.*: no role in sex determination and reproduction. *Heredity* (Edinb) 116:424–433. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.110>

Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005) Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* 114:193–202.
<https://doi.org/10.1007/s00412-005-0013-9>