

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Lokalizace genu *Jumonji* a jeho využití pro vývoj techniky
determinace pohlaví u okáče pýrového (*Pararge aegeria*)

Bakalářská práce

Eva Prchalová

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

Školitel specialista: Arjen E. Van't Hof, Dr.

České Budějovice 2023

Prchalová, E., 2023, Lokalizace genu *Jumonji* a jeho využití pro vývoj techniky determinace pohlaví u okáče pýrového (*Pararge aegeria*). [Localization of the *Jumonji* gene and development of a sexing technique in the Speckled Wood (*Pararge aegeria*) using this gene. Bc. Thesis, in Czech.], 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor's thesis provides basic information about the *Jumonji* gene, a potential sex-determining gene in the speckled wood, *Pararge aegeria*. Fluorescence in situ hybridization combined with genomic in situ hybridization showed that there are multiple copies on the W chromosome in this species. Based on the specific occurrence of multiple copies only in females, a PCR sexing technique has been developed as a tool for future studies of sex determination in this species.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích

Poděkování

Mé velké poděkování patří Magdě Zrzavé. Umožnila mi poznat, jak vypadá práce v molekulární laboratoři a ukázala mi směr studia. Ona a Arjen mě provázeli praktickou částí a později i procesem psaní velice trpělivě a laskavě. V neposlední řadě bych ráda vyjádřila vděčnost starším spolužačkám, které v době mého příchodu do laboratorní skupiny laboratoř dobře znaly. Své zkušenosti ochotně sdílely a pomohly mi si přivykat zcela novému prostředí.

Finanční podpora

Tato práce byla finančně podpořena GAČR z grantu č. 20-13784S.

Obsah

1.	Úvod.....	2
1. 1.	Pohlavní chromozomy	1
1. 2.	Evoluce pohlavních chromozomů	1
1. 3.	Haplodiploidie	2
1. 3. 1.	Determinace pohlaví u <i>Apis mellifera</i>	3
1. 4.	Pohlavní chromozomy motýlů.....	5
1. 4. 1.	Geny na samičím chromozomu W	5
1. 5.	Determinace pohlaví u <i>B. mori</i>	6
2.	Cíle práce	9
3.	Materiály a metody	10
3. 1.	Použitý hmyz	10
3. 2.	Izolace DNA pomocí CTAB.....	10
3. 3.	Izolace DNA – KIT.....	11
3. 4.	Multiplex PCR k determinaci pohlaví	11
3. 5.	Příprava hybridizačních sond.....	12
3. 6.	Nepřímá FISH.....	13
3. 7.	GISH	15
3. 8.	Prohlížení preparátů.....	15
4.	Výsledky	16
4. 1.	Přítomnost genu <i>Jumonji</i> v samčím a samičím jádře	16
4. 2.	Vizualizace genu <i>Jumonji</i> na bivalentu WZ	16
4. 3.	Determinace pohlaví pomocí multiplex PCR	18
5.	Diskuse.....	20
6.	Závěr	23
7.	Citovaná literatura.....	24

1. Úvod

Mechanismů determinujících pohlaví můžeme napříč mnohobuněčnými organismy najít nespočet. Geny účastníci se dráhy spřažené s determinací pohlaví mohou být lokalizovány na autozomech, ale často jsou přesunovány na specializované chromozomy, na pohlavní chromozomy. Existují dva základní gonozomální typy, XX/XY a WZ/ZZ (♀/♂), k jejichž vzniku v průběhu evoluce došlo několikrát a nezávisle na sobě (Charlesworth, 1991).

Pohlaví však nemusí být nutně determinováno geneticky. Druhý základní systém determinace je spojen s environmentálními vlivy. U některých druhů ryb vyšší teplota v okolí snůšek determinuje vznik jednoho pohlaví, zatímco nižší vznik druhého (Francis & Barlow, 1993). Teplotní vliv na determinaci byl popsán u některých druhů plazů, ryb a paryb (Crews et al., 1994). Mezi bezobratlými a rybami je znám fenomén sekvenčního hermafroditismu. Vývoj pohlaví jedinců je podmíněn přítomností jedince opačného pohlaví a dochází k němu v postembryonálním vývoji (Berec et al., 2005; Casas et al., 2016).

1. 1. Pohlavní chromozomy

Součástí genomů většiny živočichů jsou pohlavní chromozomy neboli gonozomy. Vyskytují se například u savců, ptáků, většiny bezobratlých nebo u některých dvoudomých cévnatých rostlin (Bull, 1985).

Tyto chromozomy rozhodují o pohlaví nového jedince a ovlivňují pohlavní vývoj. Rozlišujeme dva základní typy pohlavních chromozomů, od kterých jsou odvozeny různé numerické modifikace.

U savců a mnoha druhů hmyzu jsou pohlavní chromozomy X a Y. Tento systém tvoří heterogametičtí samci (XY) a homogametické samice (XX). Druhým základním typem jsou chromozomy Z a W, vyskytující se především u motýlů, ptáků a většiny druhů hadů. Oproti prvnímu mechanismu je zde heterogametickým pohlavím samice (WZ) a homogametickým samec (ZZ) (Charlesworth, 1991).

1. 2. Evoluce pohlavních chromozomů

Pohlavní chromozomy opakovaně vznikají a zanikají u mnoha druhů nezávisle na sobě (Mank et al., 2006). Původ často mají v páru autozomů (Charlesworth, 1991) nebo tuto funkci získávají původně nadpočetné, neesenciální B chromozomy (Hackstein et al., 1996).

Začátek vývoje pohlavních chromozomů je spojený s geny určujícími pohlaví. Geny výhodné pouze pro jedno pohlaví mohou být uloženy na pohlavní chromozom specifický

právě pro dané pohlaví (Y/W). Dále geny lokalizované na pohlavních chromozomech X (Z) získávají v heterogametické konstituci možnost projevu recesivních alel. Pokud je homogametický jedinec heterozygotní v alelách na gonozomech, nedojde k projevu recesivní alely. Pokud je ale recesivní alela přítomna v heterogametickém jedinci, dochází k okamžitému fenotypovému projevu. Tento mechanismus viditelnosti projevu v recesivní formě pro selekci přináší možnost rychlejšího vývoje.

Gonozomy daného pohlaví, které je podmíněné homogametickou konstitucí, se rekombinují podobně jako jakýkoli jiný autozomální pár chromozomů. Rekombinace chromozomu Y (W) v pokročilých degračních fázích, kdy se většina obsahu od obsahu svého homologu odlišuje, je značně omezena. Omezením rekombinace dochází k omezení reparačních mechanismů. Pokud je diverzifikace v rané fázi a vzhled chromozomů je stále podobný, jejich rekombinační schopnosti nejsou potlačeny. Postupným vývojem ale vzhled XY (ZW) začne být diametrálně odlišný. Rozšířením omezení rekombinace mezi nimi dochází k podpoře ztráty funkčních genů, šíření repetitivních sekvencí a zvýšení přítomnosti mobilních elementů. (Charlesworth & Charlesworth, 2000).

Existují mechanismy, které degeneraci chromozomů Y/W zpomalují. Jedním z nich je například přítomnost palindromtických repetit, kde si jsou sekvence sami sobě opravným templátem (Rozen et al., 2003). Nicméně zánik pohlavního chromozomu neznamena zánik pohlaví u druhů (Just et al., 2007). Existují organismy, u kterých pohlavní chromozomy opakovaně zanikají a zase vznikají. Jednou z cest pro bezpečný zánik pohlavních chromozomů je přesunutí funkčních genů na autozomy (Graves, 2005).

1. 3. Haplodiploidie

Haplodiploidie představuje alternativní systém determinace pohlaví závislý na oplodnění či neoplodnění vajíček. Tento mechanismus se vyvinul opakovaně a nezávisle u mnoha tříd bezobratlých, nicméně nejznámější haplodiploidní organismy patří do řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*). Diploidní samice vznikají z oplodněných vajíček, zatímco haploidní samci vznikají asexuálně, z neoplozených vajíček (Beye, 2004). Podle analýz z roku 2019 se pokládá za nejpravděpodobnější, že tento systém vznikl z heterogametické konstituce pohlavních chromozomů X0, kde nebyly pohlavní determinanty pro samčí vývoj vázány na chromozom Y, který je děděný pouze od otců (Ross et al., 2019).

1. 3. 1. Determinace pohlaví u *Apis mellifera*

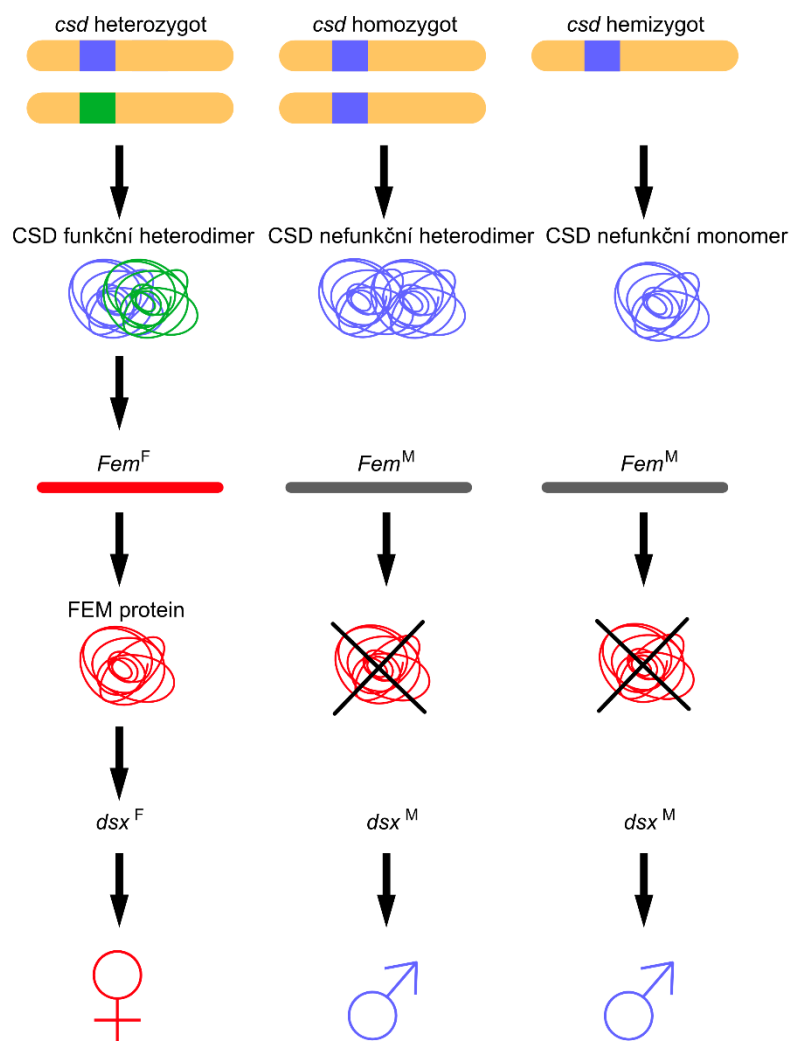
Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z haplodiploidních organismů z řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*). Pohlaví je determinováno mechanismem komplementárního určení pohlaví pomocí genu *complementary sex determiner (csd)*. Tento gen stojí na začátku signální kaskády rozhodující o vývoji pohlaví. Celosvětová diverzita genu *csd* v populaci *A. mellifera* se odhaduje na základě sekvenování na 87 alel, přičemž jsou modely, které navrhuji diverzitu 116–145 alel (Lechner et al., 2014). Gen *csd* se nachází u telomerické oblasti chromozomu 8 a skládá se ze třech exonových částí, které jsou rozděleny introny. Třetí část vykazuje hypervariabilitu počtem asparagintyrosinových repetitiv (Hasselmann et al., 2001). Produktem tohoto genu je protein CSD. Pokud došlo pomocí RNA i k umlčení alel *csd*, nastal vývojový přechod vytvářející samčí fenotyp, zatímco pokud byl stejný pokus proveden u samců, vliv na fenotyp to nemělo. Z těchto výsledků vyplývá, že CSD vznikající z různých alel *csd* podmiňuje samčí vývoj (Beye et al., 2002).

Zatímco geny stojící na počátku dráhy determinující pohlaví, jako je například zmiňovaný gen *csd*, jsou variabilní a různí se i u vysoce příbuzných druhů, geny stojící na konci této dráhy se vyznačují obdobným vzhledem i funkcí napříč taxony. Gen *dsx* je vysoce konzervovaný gen, který má samčí a samčí sestřihovou variantu. Stojí na konci kaskády podílející se na determinaci pohlaví a jeho ortology byly nalezeny v řadě dalších hmyzích taxonů a jeho funkce je u všech zkoumaných druhů obdobná. Tento gen byl dále popsán například u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*), mouchy domácí (*Musca domestica*), *Nasonia vitripennis* nebo u bource morušového (*Bombyx mori*) (Shukla & Nagaraju, 2010).

Samice vznikají z oplozených vajíček a vykazují heterozygotnost *csd*. Translací mRNA genu se vytvoří funkční dimer CSD, který aktivuje přepis genu *Feminizer (Fem)* do proteinu FEM (Hasselmann et al., 2008). Hemizygotní samci se líhnou z neoplozených vajíček s jednou alelou *csd*. Pokud je vajíčko oplozeno spermií, která nese stejnou alelu *csd* jako vajíčko, vzniká nefunkční dimer proteinu CSD, což povede k vývoji embrya v samečka. Nicméně diploidní samci jsou kastou dělnic vyhledáváni a zabíjeni (Cho et al., 2006; Kaskinova & Nikolenko, 2017).

Máme tedy tři situace: funkční heterodimer CSD, nefunkční homodimer CSD a nefunkční monomer CSD. V prvním případě dojde k sestřihu *Fem* pre-mRNA do aktivní formy. Vzniká protein FEM, který má jednak katalytickou, jednak autoregulační funkci, kdy podporuje alternativní sestřih *Fem* pre-mRNA do formy specifické pro samčí vývoj. Po vzniku FEM, protein dále katalizuje alternativní sestřih genu *Amdsx (doublesex)*.

Po vzniku funkčního proteinu FEM následuje sestřih *Amdsx* do samičí podoby. Ve zbylých případech nedojde k produkci proteinu FEM, a tak nastane sestřih *Amdsx* do samčí isoformy (Gempe et al., 2009; Hasselmann et al., 2008). Pohlavní determinace pohlaví prostřednictvím CSD je schematicky znázorněna na **Obrázek1**.



Obrázek 1: Na začátku dráhy determinace pohlaví u *A. mellifera* stojí gen *csd*. Ten v heterozygotním stavu dává za vznik heterodimeru proteinu CSD. Ten iniciuje alternativní sestřih genu mRNA genu *Fem*, do protein kódující samičí isoformy. Vzniklý FEM protein katalizuje alternativní sestřih genu *dsx* do samičí isoformy a vzniká fenotyp samice. Pokud je gen *csd* v jedinci přítomný v hemizygotním či homozygotním stavu, vznikají nefunkční SCD proteiny. Nedochází k alternativnímu splicingu *Fem*. *Dsx* je sestřižen do samčí isoformy a vzniká fenotyp samce. Obrázek upraven podle (Beye, 2004).

1. 4. Pohlavní chromozomy motýlů

Motýli (*Lepidoptera*) jsou monofyletickou skupinou hmyzu (*Insecta*). Evolučně nejbližší sesterskou skupinou jsou chrostíci (*Trichoptera*). Za bazální stav se považuje determinace pohlaví konstitucí ZZ/Z0 (samec/samice), která se vyskytuje u bazálních motýlů a sesterských chrostíků (Sahara et al., 2012).

Cytogenetický výzkum motýlích chromozomů byl ale dlouhou dobu značně omezený. Jednou ze základních cytogenetických metod, které se používají například u klinických cytogenetických testů člověka, je G – pruhování chromozomů. Jedná se o metodu, která specificky zbarví jednotlivé chromozomy. Díky tomu je možné v kombinaci s polohou centromery a velikostí chromozomů rozpoznat jednotlivé chromozomy a jejich případné abnormality. U motýlů nelze uplatnit ani jeden z mapovacích markerů. Jejich chromozomy bývají malé, uniformní a většinou ve vyšším počtu. Nevyskytuje se u nich primární konstrikce a nefungují u nich proužkovací techniky. Z těchto důvodů byly před příchodem moderních molekulárních metod známy převážně pouze počty chromozomů studovaných druhů. Dodnes je známo mnoho informací o struktuře chromozomů nebo o systému párování heterochromozomů (Provazníková et al., 2021).

Motýlí chromatidy nejsou spojeny centromerami. Chromozomy bez primární konstrikce jsou označovány jako holokinetické. Po celé délce chromatidy jsou roztroušena vazebná místa pro kinetochory a následnou vazbu dělicího vřeténka (Wolf et al., 1997). Mechanismus poskytuje například ochranu před ionizujícím zářením a jím indukovaným chybným rozchodem chromozomů. V případě vzniku dvojřetězcového zlomu dochází k odlomení části chromatidy a její ztrátě při dělení jádra. Pokud ale odlomená část obsahuje vazebné místo pro kinetochor, může dojít k připojení dělicího vřeténka a k jejímu správnému rozchodu (Marec et al., 2001; Wrensch et al., 1994).

Poslední zmíněnou specifickou vlastností týkající se motýlích chromozomů je samičí achiasmatická meióza. Jak už název vypovídá, jedná se o meiotické dělení, v kterém nedochází k tvorbě chiasmat, tudíž ke crossing-overu dochází pouze u samců. Achiasmatická meióza u heterogametického pohlaví může zrychlit diferenciaci pohlavních chromozomů, protože od jejich vzniku nedochází k jejich rekombinaci (Hawley et al., 1992; Traut, 1977).

1. 4. 1. Geny na samičím chromozomu W

Chromozom W motýlů je evolučně mladší než chromozom Z, ale podobně jako u chromozomu Y je jeho vývoj dynamičtější. Chromozom W bývá většinou tvořen velkým

množstvím heterochromatinu, tandemových repeticí a retranspozonů (Fuková et al., 2007; Goldsmith et al., 2005).

O aktivních genech na chromozomu W není moc známo. Nejpodrobněji je popsán gen *Fem* (*Feminizer*) u *B. mori*, který stojí na začátku genové kaskády vedoucí k vývoji samičího pohlaví (Kiuchi et al., 2014).

V roce 1999 byla publikovaná studie zaměřující se na gen *period* (*per*) u martináče čínského (*Antheraea pernyi*). Exprese genu spolu s dalšími, např. gen *timeless*, se podílí na řízení cirkadiálních rytmtů. U *A. pernyi* byly popsány tři lokusy s příbuznými sekvencemi, přičemž jeden z nich byl lokalizovaný na chromozomu W. Primárně popsán gen *per* je exprimován v tělech samců i samic. Nově popsáný *per*-like gen na chromozomu W vytváří protein specifický pouze pro samice. Jeho reverzní transkript odpovídal sekvenci cDNA genu *per* s několika odchylkami. Gen obsahuje tři možné čtecí rámce translace a vytváří proteiny, které mají kratší řetězec aminokyselin než proteiny vznikající z *per*. Proto se předpokládá, že gen na chromozomu W vznikl částečnou duplikací genu *per* (Gotter et al., 1999).

Dalším genem, jehož lokalizace byla navržena na chromozom W, je *egg size-determining* (*Esd*). Tento gen u *B. mori* determinuje velikost vajíčka. Výzkum popsal kvantitativní charakter genu, samice se stejným počtem chromozomů W produkovaly snůšky s podobně velikými vajíčky. A naopak velikost snůšek haploidních a diploidních samic pro W se různila (Kawamura, 1988). Moderními molekulárními metodami ale gen nebyl prozatím lokalizován či popsán. Ve spojitosti s tímto výzkumem byl na chromozomu Z nalezen gen *giant egg* (*Ge*). Po inzerci retranspozonu se jedná o mutantní alelu způsobující abnormální velikost vajíček (Fujii et al., 2015).

1. 5. Determinace pohlaví u *B. mori*

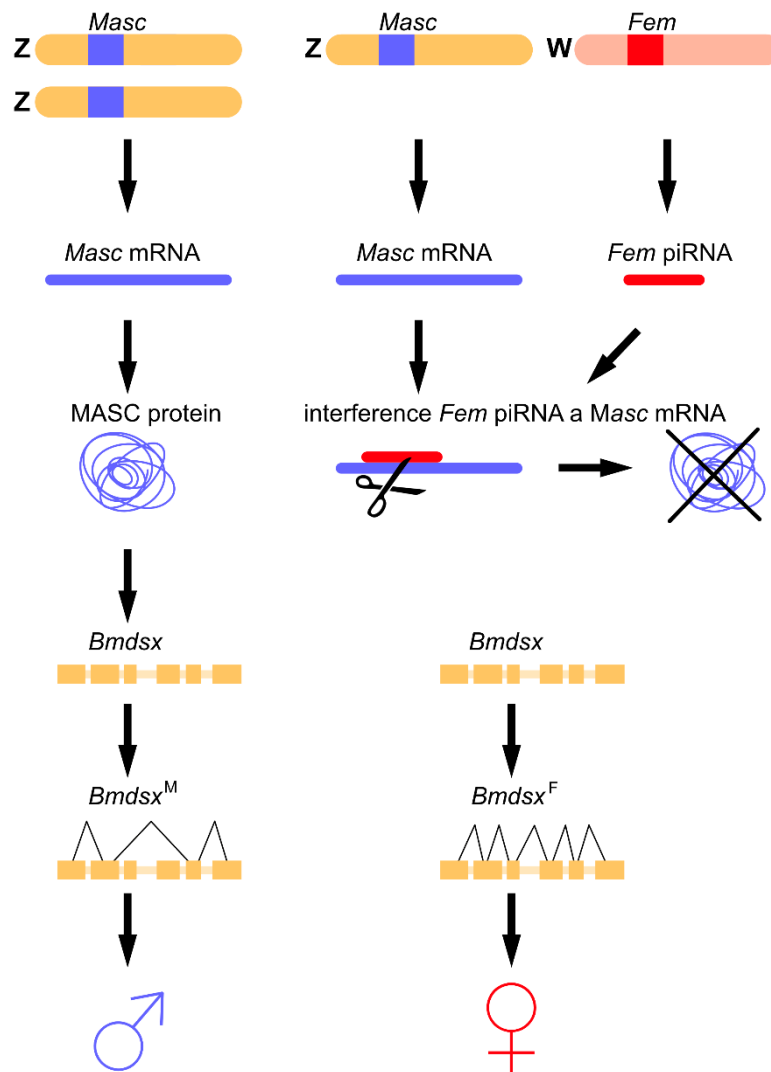
Bourec morušový je ekonomicky významným organismem v průmyslové produkci hedvábí. Díky tomu se stal objektem šlechtitelského zájmu, a tak je v dnešní době jediným druhem z řádu *Lepidoptera*, u kterého je dobře prozkoumán mechanismus determinace pohlaví. Určení pohlavní je vázáno na chromozom W, na kterém byla objevena sekvence produkující PIWI-interagující RNA (piRNA), která má esenciální roli v determinaci pohlaví (Kiuchi et al., 2014).

Pohlavní determinace *B. mori* je založena na interakci dvou genů. První gen byl nazván *Feminizer* (*Fem*). Gen se nachází na chromozomu W a je prekurzorem pro vznik piRNA o velikosti 29 bazí. Druhým genem je *Masculinizer* (*Masc*), lokalizovaný na chromozomu Z.

Jak z názvu vyplývá, tento gen iniciuje vývoj v samčí fenotyp. Nicméně u embryí, ve kterých byl experimentálně pomocí RNAi gen *Masc* vypnut, došlo k úhynu. Tento jev dal vzniknout hypotéze, že *Masc* se podílí i na kompenzaci genové dávky (Katsuma et al., 2019; Kiuchi et al., 2014). Tato teze se následně rozdělila na dvě dominantní hypotézy. Kompenzace genové dávky by mohla být řešena stejně intenzivní regulací obou chromozomů Z, nebo náhodným inaktivováním jednoho z chromozomů, jako je tomu například u lidí, kde inaktivovaný chromozom X vytváří Barrovo tělísko. První výsledek potvrzující hypotézu o downregulaci obou chromozomů Z byl získán pomocí metody FISH, která zobrazila oba chromozomy více heterochromatizované než zbytek chromozomů v jádře (Rosin et al., 2022). Následná analýza míry transkripce neukázala významnou transkripční nerovnováhu mezi oběma Z chromozomy. To potvrzuje, že jsou oba chromozomy podobně transkripčně potlačeny (Tomihara et al., 2022).

Gen *Masc* je u samců z obou chromozomů Z překládán do mRNA. Ta je dál translatovaná do MASC proteinu, který katalyzuje alternativní sestřih genu *doublesex* (*Bmdsx*), do samčí podoby (Kiuchi et al., 2014).

Stejně dochází k transkripci genu *Masc* do mRNA u samic. K sekvenci této mRNA je komplementární piRNA, transkribovaná z genu *Fem* na chromozomu W. Interference piRNA navodí rozštěpení mRNA, takže nemůže proběhnout syntéza proteinu MASC a dochází k sestřihu *Bmdsx* do samčí formy. Přesný mechanismus alternativního splicingu není doposud objasněný. Nicméně pomocí RNAi bylo prokázáno, že geny *Fem* a *Masc* hrají esenciální roli v determinaci pohlaví u *B. mori*. Pokud byl jeden z genů umlčen pomocí RNAi, nastala buď výše popsaná letalita samců, nebo došlo k vytvoření samčího fenotypu za přítomnosti chromozomu W (Kiuchi et al., 2014). Mechanismus pohlavní determinace je shrnut schématem na **Obr. 2**.



Obrázek 2: Pohlavní u *B. mori* je určováno karyotypem WZ/ZZ. Na chromozomu Z je lokalizovaný maskulinizační gen *Masc*, který kóduje mRNA translatovanou do MASC proteinu. Ten katalyzuje alternativní sestřih genu *Bmdsx* do samčí podoby a vzniká samčí genotyp.

Na chromozomu W je lokalizovaný gen *Fem*, který kóduje krátkou piRNA, která je komplementární k části *Masc* mRNA. Po komplementaci obou RNA dochází k navedení štěpících proteinů. *Masc* mRNA je rozštěpena, a tak nedochází k translaci proteinu MASC. Za jeho nepřítomnosti dochází k sestřihu genu *Bmdsx* do samičí isoformy a vzniká samičí fenotyp. Grafika upravena podle (Kiuchi et al., 2014).

2. Cíle práce

U většiny okáčů je pohlaví patrně určeno pomocí polymorfního lokusu *Masc* (van't Hof, osobní sdělení). U okáče pýrového (*Pararge aegeria*) však na základě analýzy genomu, kterou provedl školitel specialista, tento mechanismus nalezen nebyl. Podařilo se však nalézt gen *Jumonji* (*Jmj*), který je lokalizovaný na chromozomu Z, a podle analýzy veřejně dostupné sekvence genomu by se měl nacházet i na chromozomu W.

Cílem této práce je potvrdit lokalizaci genu *Jmj* na chromozomu W pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Protože se jedná o kandidátní gen, který by se u tohoto druhu mohl účastnit určení pohlaví, je dalším cílem navrhnout funkční molekulární metodiku pro determinaci pohlaví u zmíněného druhu, která je mimo jiné nutná pro budoucí výzkum celé signalizační kaskády determinace pohlaví v embryonálních a larválních stádiích vývoje.

3. Materiály a metody

3. 1. Použitý hmyz

Imága *P. aegeria* byla chytána v okolí Branišovského lesa (České Budějovice), v přírodní rezervaci Horní Lužnice, u obcí Kuří (Benešov nad Černou), Benešov a Halanky. Byl založen chov divokých jedinců v plastových boxech, kde samice kladly vajíčka. Živnou rostlinou housenek byl medyněk vlnatý (*Holcus lanatus*).

3. 2. Izolace DNA pomocí CTAB

Izolace DNA pomocí CTAB je metoda pro izolaci celogenomové DNA využívající vlastnosti cetyltrimetylamoniumbromidu vytvářet komplexy s nukleovými kyselinami. Látka také podporuje uvolnění nukleových kyselin z tkání. Za přítomnosti izopropanolu dochází k vysrážení relativně velkého množství DNA. Vysoké koncentrace DNA byly příhodné pro tvorbu genomových hybridizačních sond.

První den byl připraven extrakční pufr, jehož složení je zaznamenáno v **Tabulce I**. V 800 µl extrakčního pufru bylo rozdrceno tělo imága či larvy pomocí homogenizátoru v 1,5µl zkumavce. Ta byla inkubována přes noc při 60 °C a 300 rpm v termobloku.

Druhý den byl obsah zkumavky přelit do 2ml zkumavky. Bylo přidáno 800 µl chloroformu a směs byla 2 minuty míchána. Následovala desetiminutová centrifugace při 4 °C (14000 rpm, poloměr rotoru 9 cm). Horní část supernatantu obsahující DNA byla přepipetována do nové 2ml zkumavky a postup byl zopakován. Po druhém přepipetování horní části bylo přidáno 50 µg RNázy A, aby její výsledná koncentrace ve směsi byla 0,1 mg/ml a následovala inkubace v 37 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byly přidány 2/3 objemu vzorku izopropanolu, se kterými se vzorek nechal inkubovat při pokojové teplotě 30 minut. V této fázi došlo k viditelnému vysrážení DNA. Patnáctiminutovou centrifugací (4 °C, 14000 rpm, poloměr rotoru 9 cm) došlo na dně k vysrážení peletu. Tekutina byla odsáta, k peletu bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu, poté za stejných podmínek proběhla opět patnáctiminutová centrifugace. Tento krok byl zopakován a následně bylo provedeno kvalitní osušení peletu od supernatantu. K suchému peletu dle jeho velikosti bylo přidáno 30 – 50 µl sterilizované miliQ vody, ve které se DNA rozpustila. Kontrola kvality byla provedena pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu. Koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, USA) a na fluorometru Qubit 3.0 (ThermoScientific, Waltham, USA). Vyizolované vzorky DNA byly skladovány v -20 °C.

Tabulka I: Složení extrakčního pufru.

Chemikálie	Finální koncentrace
CTAB	2 %
1M Tris	100 mM
5M NaCl	1,4 M
0,5M EDTA, pH = 8	40 mM
β – mercapthoethanol	0,2 %
Proteináza K (Macherey - Nagel, Německo)	0,1 mg/ml
Sterilizovaná voda	-

3. 3. Izolace DNA – KIT

Vzorky nutné pro testování metody molekulárního rozpoznání pohlaví *P. aegeria* byly izolovány komerčně dostupným kitem NucleoSpin® DNA Insect Macherey-Nagel. DNA byla izolována z thoraxů dospělců dle pokynů výrobce s následnou úpravou: vzorky byly rozdrceny v 2ml mikrozkuřavkách pomocí tloučku v 100 µl elučního roztoku. Vyizolované vzorky DNA byly skladovány při teplotě -20 °C. Jejich koncentrace byla měřena na fluorometru Qubit 3.0 (ThermoScientific, Waltham, USA).

3. 4. Multiplex PCR k determinaci pohlaví

Pro determinaci pohlaví jedinců v larvální či dospělé vývojové fázi byla využita multiplexová polymerázová řetězcová reakce (PCR). Jedna z dvojice primerů amplifikuje mnohočetné kopie genu *Jmj* na chromozomu W a je markerem specifickým pro samice. Primery pro gen *Windpipe*, vyskytující se na autozomu, plní funkci pozitivní kontroly. Informace o vlastnostech primerů, jejich sekvencích a počtu bazí očekávaných produktů (pb) jsou zaznamenány v **Tabulce II**. Primery byly navrženy Arjenem E. Van 't Hofem a vyrobeny firmou Geneti Biotech (Hradec Králové).

Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala vždy 10 ng genomové DNA (gDNA). Dalšími komponentami směsi byly: 1x OneTaq Quick-Load pufr (New England, BioLabs, USA), 0,2 µM od obou primerů, 200 µM každého z nukleotidů (TaKaRa, Japonsko) a 0,04 U/µl OneTaq Quick-Load polymerázy (New England, BioLabs, USA). K reakci byl vždy namíchán beztemplátový vzorek navíc, který sloužil jako negativní kontrola, pokud by došlo v průběhu tvorby reakční směsi ke kontaminaci. PCR probíhala v termocycleru (TProfessional TRIO PCR Thermocycler, Biometra, Německo) dle následujícího protokolu.

Po počáteční třiminutové denaturaci při 95 °C následovalo 37 opakování fází: 30 s denaturace při 95 °C, 30 s nasedání primerů při 62 °C a 2 min elongace při 72 °C. PCR produkty byly separovány elektroforézou 50 minut v 1,5% agarózovém gelu. Gel byl 15 minut barven v 0,005% ethidium bromidu a výsledek vyhodnocen pod UV pomocí dokumentačního zařízení (Gel Documentation SMART5, VWR).

Tabulka II: Primery použité v multiplex PCR reakci.

Gen	Sekvence primerů 5'-3'		Nasedací teplota (°C)	Velikost očekávaného produktu (pb)
<i>Jumonji</i>	F	TAGACACTTTCGCAGATCGACCA	62°	559
	R	GCGACGATACTAAAGGCAATGGA		
<i>Windpipe</i>	F	GGTGGGCCTGATTGGCATATAA	62°	715
	R	TGATAAGCGGTTGAGATACGTC		

3. 5. Příprava hybridizačních sond

Sonda k lokalizaci genu *Jmj* pomocí nepřímé fluorescenční in situ hybridizace (FISH) byla vytvořena amplifikací pomocí PCR z gDNA izolované pomocí CTAB. V této reakci byly použity primery uvedené v **Tabulce III**. Reakční směs o objemu 25 µl obsahovala: 1x OneTaq Quick-Load pufr (New England, BioLabs, USA), 0,2 µM primerů, 200 µM každého z nukleotidů (TaKaRa, Japonsko), 0,5 µM dNTP a 1 U OneTaq Quick-Load polymerázy (New England, BioLabs, USA). Reakce probíhala v termocycleru, počáteční třiminutovou denaturaci při 95 °C následovalo 40 cyklů: 30 s denaturace při 95 °C, 30 s nasedání primerů při 59 °C a 2 min elongace při 72 °C. Velikost výsledného PCR produktu byla zkontrolována elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu, identita produktu byla ověřena Sangerovým sekvenováním u firmy SEQme (Dobříš, ČR). PCR produkt byl přečištěn přidáním 2 µl ExoSap-IT™ (Thermo Fisher Scientific) k 5 µl DNA. Tato směs byla vložena do cycleru na následující program: 15 minut na 37 °C, 15 minut na 80 °C. Přečištěný PCR produkt byl použit jako templát do následující značící PCR reakce (25 µl): 1x ExTaq pufr, dNTPs pro značení (0,04 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,014 mM dTTP, 0,025 mM dUTP - biotin) (Jena Bioscience, Německo), 1 µM primeru forward i reverse (viz **Tabulka III**), 0,2 ng DNA a 2 U Ex Taq polymerázy. Profil značící PCR reakce byl stejný jako ten, který byl použit pro amplifikaci fragmentu z gDNA. Výsledná koncentrace sondy byla změřena na fluorometru Qubit.

Tabulka III: Primery použité v PCR reakci pro vytvoření hybridizační sondy.

Gen	Sekvence primerů 5'-3'		Nasedací teplota (°C)	Velikost očekávaného produktu (pb)
<i>Jumonji</i>	F	ACTTGTTGCAGGTGATCTATCATT	59°	764
	R	GGTGTGCAGGATATTCAGGTTGT		

K tvorbě samičí celogenomové sondy pro genomovou in situ hybridizaci (GISH) byla použita DNA vyizolovaná metodou CTAB. Sonda byla naznačena pomocí kitu Atto488 NT Labeling Kit od Jena Bioscience (Malchin, Německo) dle protokolu výrobce.

Poslední připravovanou směsí byl samčí kompetitor pro GISH. 3 µg samčí DNA bylo vloženo do termocycleru na 99 °C, 40 min, aby došlo k rozfragmentování DNA na úseky o průměrné velikosti 1000 bazí. Velikost fragmentů byla zkontrolována odebráním 1 µl DNA a jeho zobrazením v 1% agarózovém gelu pomocí gelové elektroforézy.

3. 6. Nepřímá FISH

Nepřímá FISH je jednou z mnoha variant cytogenetických fluorescenčních detekčních metod. Nepřímá FISH poskytuje výhodu emitace intenzivnějšího signálu díky možnosti amplifikace hybridizačního signálu pomocí značených protilátek. Sonda v tomto případě není značena přímo fluorochromem, ale bílkovinou biotinem. Na ten se váže protein streptavidin konjugovaný s fluorochromem Cy3. Znásobení signálu se děje pomocí interakce protilátky antistreptavidinu. Preparáty, na kterých byla metoda provedena, byly vytvořeny školitelkou podle protokolu uvedeného v publikaci Martiny Hejníčkové a kol. z roku 2019 (Hejníčková et al., 2019).

Hybridizační směs byla připravena smícháním následujících složek v 1,5ml mikrokumavce: 50 ng biotinové sondy, 25 µg DNA z lososích spermií, 0,1 celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8,0) a dva a půlkrát násobné množství chlazeného 100% etanolu (-20 °C). Následně byla směs uložena na 10 minut do -20 °C pro podpoření srážení DNA. Následovala centrifugace (4 °C, 14000 rpm, poloměr rotoru 9 cm) po dobu 15 minut. Poté byl odsát supernatant a k peletu bylo přidáno 200 µl 70% etanolu. Zvortexovaná směs byla 5 minut centrifugována (4 °C, 14000 rpm, poloměr rotoru 9 cm). Znovu byl odsát supernatant, pelet se nechal oschnout a nakonec se zalil 5 µl deionizovaného formamidu předeřátého na 37 °C. Následovala inkubace v 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí

inkubační doby bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu v 4x SSC a vzorek byl denaturován 90 °C po dobu 5 minut a následně okamžitě přenesen na led.

Paralelně k denuraci sondy bylo připravováno sklíčko s chromozomálním preparátem. Začalo se postupným odvodňováním pomocí vzestupné etanolové řady (70%, 80% a 100% po dobu 30 vteřin, 30 vteřin, 30 vteřin v uvedeném pořadí roztoků. Poté bylo sklíčko zbaveno kontaminace RNA působením 25 µg RNázy A v 2x SSC. Po přikrytím krycím sklíčkem byl preparát vložen do uzavřeného boxu s papírovou utěrkou s 2x SSC a inkubován 1 hodinu v 37 °C. Po odstranění krycího sklíčka následovala dvě promytí po pěti minutách v 2x SSC při pokojové teplotě. Na preparát bylo nanášeno 100 µl 70% deionizovaného formamidu v 2x SSC. Po překrytí krycím sklíčkem a přenesení do termobloku na 3,5 minuty při 68 °C došlo k denuraci preparátu. Následovalo okamžité zchlazení a odvodnění 70% etanolem (-20 °C) po dobu 1 minuty, 80% a 100% etanolem pokojové teploty po dobu 30 vteřin v každém.

Na dokonale oschlý preparát byla nanášena hybridizační směs. Po přikrytí krycím sklíčkem 24x32 mm byly hrany zalepeny lepidlem Rubbercement (Marabu) a celý preparát byl inkubován ve vlhké komůrce do 37 °C do druhého dne.

Druhý den po odstranění krycího skla byl preparát omýván v kyvetách v následujícím pořadí: dvakrát 5 minut v 2x SSC při 42 °C, dvakrát 5 minut v 0,1x SSC při 42 °C, jednou 5 minut v 2x SSC, při 42 °C, jednou 10 minut v 2x SSC při pokojové teplotě, jednou 15 minut v WBB při pokojové teplotě. WBB roztok byl připraven smícháním 160 ml 20x SSC, 630 ml miliQ vody, 800 µl Tweenu-20 a 8 g sušeného mléka. Následně bylo na preparát nanášeno 100 µl roztoku streptavidinu (Jackson ImmunoRes. Labs. Inc, USA) ve WBB o koncentraci 9 µg streptavidinu/ml WBB, poté byl preparát zakryt krycím sklem (24 x 50 mm) a inkubován ve vlhké komůrce 30 minut při 37 °C.

Po odstranění skla se opakovalo promývání třikrát 5 minut při 45 °C ve WBB. Poté se nanášelo 50 µl roztoku 2 µl antistreptavidinu (Vector Labs. Inc, USA) v 50 µl WBB, které byly přikryty krycím sklem. Následná inkubace trvala 30 minut v 37 °C. Po odstranění skla se opakovalo promývání třikrát 5 minut při 45 °C ve WBB. Zopakovala se inkubace streptavidinu popsaná v předešlém odstavci. Nakonec byl preparát omyt třikrát ve WBB po dobu 5 minut při 45 °C.

Na preparát bylo nanášeno 25 µl DAPI v DABCO (4, 6-diamidino-2-fenylindole dihydrochloride) (500 ng/µl) (obojí Sigma-Aldrich, USA). Preparát byl přikryt krycím sklem 24x40 mm. Přebytečné DAPI bylo vytlačeno přes filtrační papír. Hrany krycího sklíčka byly zalepeny lakem na nehty. Preparát byl uchováván při teplotě 4 °C.

Pokud byla FISH prováděna na sklíčku, které bylo nejprve značeno pomocí GISH, platil uvedený protokol s následovnými úpravami. Preparát byl inkubován v kyvetě s 0,1x SSC s 1% Tritonem-X při pokojové teplotě do doby, než lak na nehty a krycí sklo mohly být odstraněny. Poté byl preparát očištěn v kyvetě s čistým roztokem 0,1x SSC s 1% Tritonem-X po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Následovalo omytí v 2x SSC a denaturace v 70% formamidu v 2x SSC při 68 °C 3,5 minuty podle protokolu pro FISH. Po odvodnění preparátu v etanolové řadě (viz protokol pro FISH) byl preparát připraven na hybridizaci se sondou pro gen *Jumonji*.

3. 7. GISH

Postup prvního dne hybridizace GISH je stejný jako u předešlé metody nepřímé FISH s rozdílem složení hybridizační směsi, které bylo následující: 300 ng samičí celogenomové sondy, 3 µg neznačené fragmentované samčí DNA sloužící jako kompetitor a 25 µg DNA z lososích spermií. DNA byla vysrážena přidáním 0,1 objemu 3M octanu sodného a 2,5 objemu předchlazeného 100% etanolu (-20 °C). Hybridizace byla prováděna po tři dny. Po uplynutí této inkubační doby bylo z preparátu odstraněno lepidlo a krycí sklo vymyto v roztoku 0,1x SSC s 1% Tritonem-X při pokojové teplotě. Následovalo pětiminutové promývání při 42 °C v roztoku 0,1x SSC s 1% Tritonem-X. Následovalo omytí v kyvetě s 1% Kodak PhotoFlo (Kodak) v miliQ vodě 1 minutu při pokojové teplotě. Preparát se nechal okapat a na stále vlhké sklo bylo nanášeno 25 µl DAPI v DABCO. Preparát byl přikryt krycím sklem 24x 40 mm, byl odstraněn přebytek DAPI v DABCO, kraje krycího skla byly přilakovány lakem na nehty a po jeho uschnutí byl preparát skladován při 4 °C.

3. 8. Prohlížení preparátů

Preparáty byly vyhodnocovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Jena, Německo) pod objektivy 63x a 100x za použití příslušných barevných filtrů. Modrý filtr snímal podbarvení chromozomů DAPI. Červený filtr při FISH snímal naznačenou sondu proti sekvencím genu *Jmj*. Při metodě GISH zelený filtr snímal celogenomovou samičí sondu.

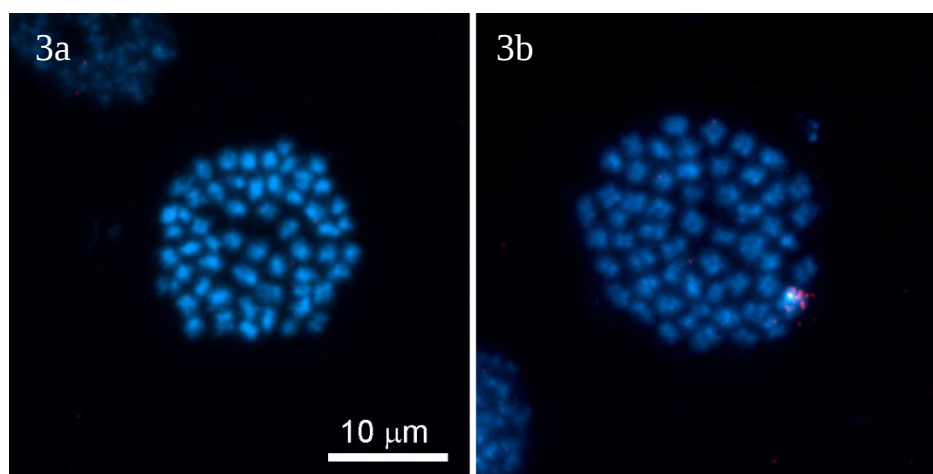
Preparáty byly černobíle dokumentovány kamerou Olympus CCD XM10 s programem cellSens 1.9. Pořízené fotografie byly upravovány v grafickém programu Adobe Photoshop CS6, 13.0.

4. Výsledky

4. 1. Přítomnost genu *Jumonji* v samčím a samičím jádře

Úkolem FISH se sondou pro gen *Jmj* bylo lokalizovat případné kopie tohoto genu na chromozomu W. FISH byla prováděna na mitotických i meiotických preparátech samců a samic. Zatímco na samčích mitotických jádrech se nepodařilo detekovat žádný hybridizační signál, u samice byly pozorovány mnohočetné signály na chromozomu W.

K vizualizaci genu *Jmj* pomocí FISH byla použita samičí DNA, ze které byly pomocí PCR amplifikovány fragmenty tohoto genu. Hybridizace proběhla na samčím a samičím mitotickém preparátu. Na **Obr. 3** lze pozorovat, že na samčím jádře nebyl detekován žádný signál (**Obr. 3a**), zatímco na samičím jádře byl detekován mnohočetný signál na jediném chromozomu. Tyto výsledky dokazují, že výskyt *Jmj* je specifický pro samice.



Obrázek 3: FISH na mitotických jádrech *P. aegeria* v rané anafázi. Chromozomy byly pro vizualizaci celého jádraobarveny DAPI. Samčí jádro bez červeného signálu genu *Jmj* (a). Samičí jádro s mnohočetným signálem na chromozomu W (b).

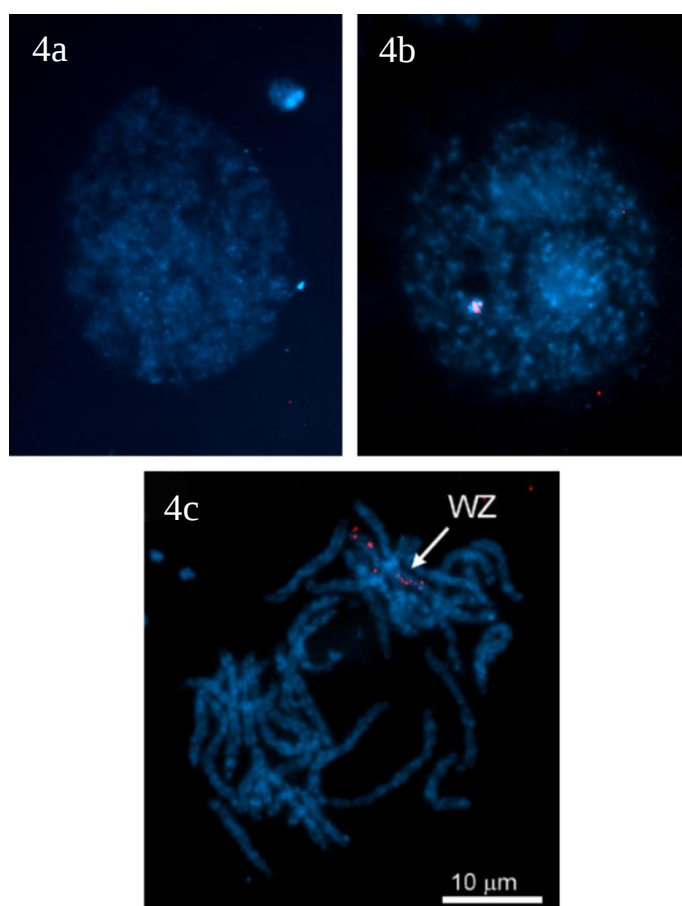
4. 2. Vizualizace genu *Jumonji* na bivalentu WZ

Analogicky jako na mitotických jádrech bylo možné pozorovat hybridizační signály na meiotických a interfázních samičích jádrech. V interfázi je většina chromozomů dekonzenzovaná, až na chromozom W, který u většiny druhů motýlů vytváří kompaktní tělísko, tzv. sex chromatin (**Obr. 4**). Umístění všech hybridizačních signálů do oblasti sex chromatinu dále dokazuje, že kopie tohoto genu jsou umístěny na chromozomu W.

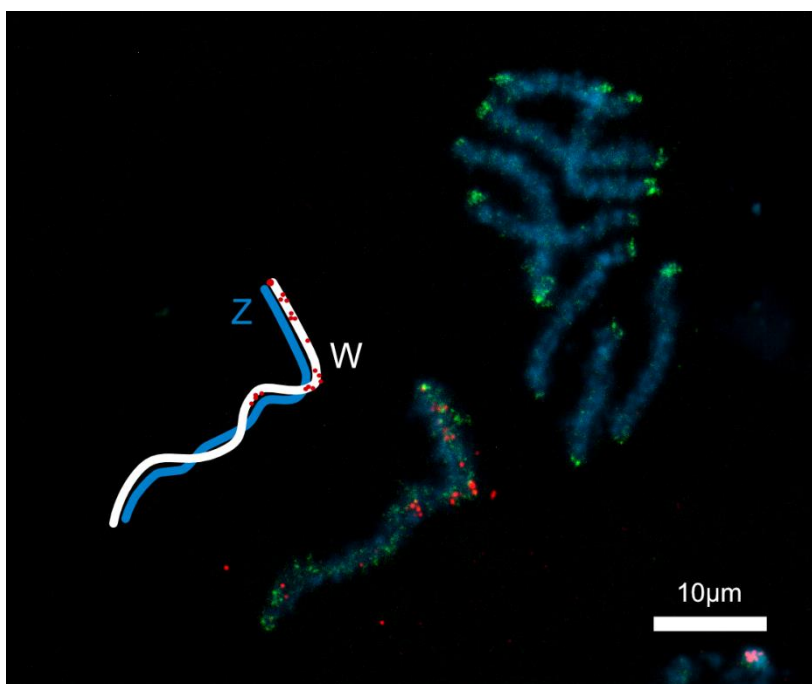
Podrobnější informace o lokalizaci kopií genu *Jumonji* na chromozomu W poskytla FISH na meiotických jádrech ve stádiu pachytene, kdy jsou chromozomy ještě málo kondenzované, takže je na nich lépe vidět umístění mnohočetných hybridizačních signálů. Na

pachytenních bivalentech samic se ukázalo, že drtivá většina signálů je umístěna jen v jedné polovině chromozomu W, zatímco druhá polovina tohoto chromozomu kopie *Jumonji* téměř neobsahuje.

Jako další důkaz, že se kopie genu *Jmj* nacházejí na chromozomu W, byla použita GISH, díky které bylo možné přesně určit pozici chromozomu W v bivalentu pohlavních chromozomů. Na **Obr. 5** je patrné, že hybridizace samičí sondy byla sice poměrně slabá, ale jasně detekovala chromozom W. Její hybridizační signál kolokalizoval s hybridizačním signálem sondy pro gen *Jumonji*, která byla na preparát aplikována dodatečně v rámci tzv. reprobingu. Všechny výsledky tedy shodně dokazují, že gen *Jumonji* má na chromozomu W mnohočetné kopie.



Obrázek 4: FISH na meiotických chromozomech a interfázních jádrech *P. aegeria*, pro vizualizaci celého jádra dobarveny DAPI. Samčí interfázní jádro bez heterochromatinu a bez signálu *Jmj* (4a). Samičí interfázní jádro, kde chromozom W vytváří heterochromatin, produkující silný pozitivní signál DAPI. Na heterochromatinu jsou lokalizovány červené signály pro gen *Jmj* (4b). Samičí jádro meiotické profáze I. ve fázi pachytene, kde jsou vidět rozvolněné chromozomy včetně WZ bivalentu s pozitivními signály sondy pro gen *Jmj* (4c).



Obrázek 5: GISH na meiotických chromozomem samice *P. aegeria*, pro vizualizaci jádra dobarveny DAPI. Slabé zelené signály hybridizace patří samičí sondě, která zvýrazňuje polohu chromozomu W, na jehož jedné polovině jsou lokalizovány mnohočetné signály genu *Jmj*.

4. 3. Determinace pohlaví pomocí multiplex PCR

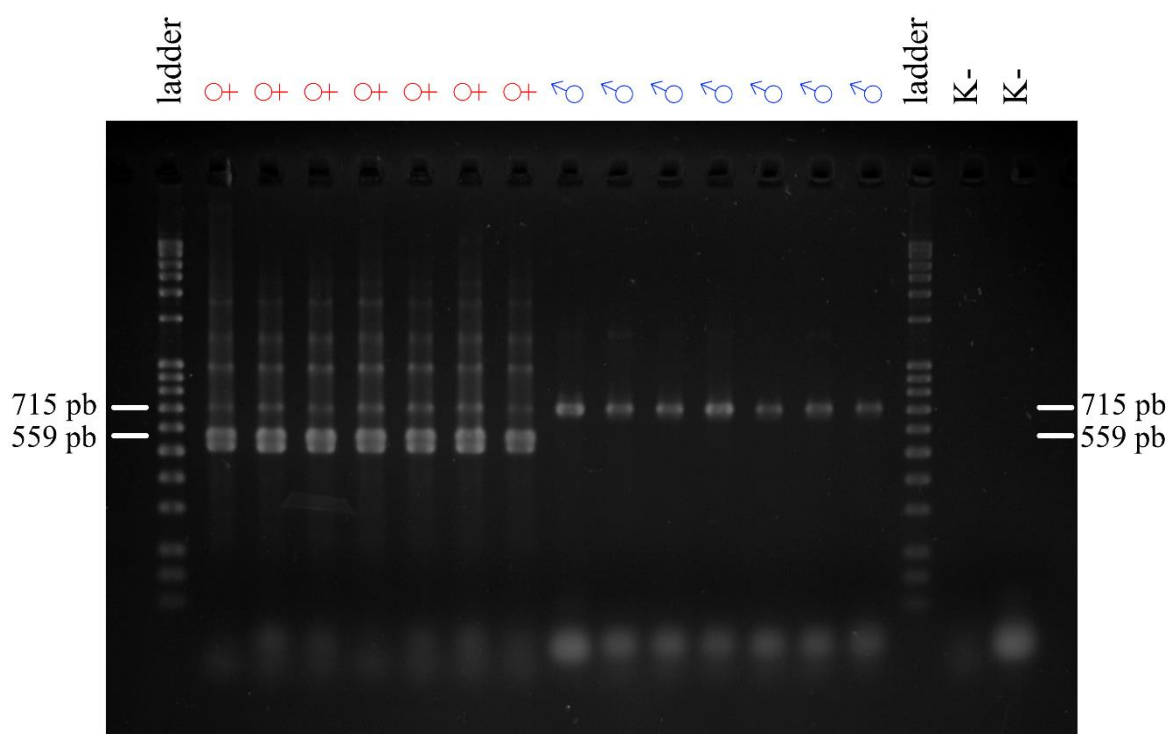
Multiplex PCR byla metoda navržená pro molekulární zjištění, zda je daný jedinec samec či samice. Metoda byla vyvíjena na vzorcích, u kterých bylo pohlaví určeno na základě pohlavně dimorfních znaků. Bylo náhodně vybráno sedm samic a sedm samců, kdy žádní dva zástupci daného pohlaví nebyli ze stejné rodiny.

Determinace spočívá v rozdílu amplifikace rozdílných produktů pomocí dvou párů primerů. U samic dochází k amplifikaci produktů vymezených oběma páry primerů, zatímco u samců je přítomen pouze produkt amplifikovaný z autozomálního genu.

Volba kombinace primerů prošla dlouhým procesem. Vzhledem k repetitivnímu charakteru sekvenace genu *Jumonji* bylo důležité designovat primery, které budou specificky amplifikovat pouze *Jmj* alely. Primery pro pozitivní kontrolu byly limitovány dvěma faktory. Prvním byla relativně vysoká nasedací teplota PCR reakce. Druhým pak to, že produkt musel vykazovat signifikantně odlišnou velikost než produkty prvních primerů. První slibně vypadající kombinací byly primery pro *Jmj* a gen *Kettin*. Výsledky samců nicméně vykazovaly občasné přítomný proužek navíc, vzniklý nežádoucí vzájemnou interakcí primerů z obou párů.

Sekvence primerů, které se ukázaly pro určení pohlaví jako nejlepší, je uvedena v **Tabulaci II**, kdy se využila kombinace s autozomálním genem *windpipe*.

Na **Obr. 6** jsou výsledky PCR na 1,5% agarózovém gelu. U samců je vidět silný produkt primerů *wdp* o velikosti 715 párů bazí. U některých vzorků je patrný slabý produkt shodný s *Jmj* produkty, kdy je pravděpodobné, že se jedná o zachycení samčího genu *Jmj* na chromozomu Z. U samic je vidět nejintenzivnější signál *Jmj* v rozmezí velikosti produktů 500-600 bazí. Dále je vidět signál specifický pro produkt *wdp* primerů o velikosti 715 bazí. Na základě výsledků PCR a metody FISH, která potvrdila charakter vícečetných kopií genu *Jmj*, se předpokládá, že ostatní produkty u samic jsou tyto další kopie s odlišnou velikostí, způsobenou insercemi nebo delecemi. Žebříkovité uspořádání produktů PCR naznačuje, že alespoň některé kopie jsou usprádané tandemově.



Obrázek 6: Elektroforetická separace produktů multiplex PCR pro determinaci pohlaví u *P. aegeria*. Na gelu je patrný patern proužků specifický pro obě pohlaví *P. aegeria*. Sedm vzorků samic s PCR produkty obou párů primerů, tj. pro geny *Jumonji* a *windpipe*, následované sedmi vzorky samců s PCR produktem pouze z autozomálního genu *windpipe*. Negativní kontroly (-K) jsou bez kontaminace.

5. Diskuse

Mechanismy determinace pohlaví u motýlů nejsou prozatím z velké části prozkoumány. Prozatím jsou známá data pouze u *B. mori* (Kiuchi et al., 2014) a dílčí informace ohledně zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) a zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*) (Visser, 2021; Visser et al., 2021), martináče pajasanového (*Samia cynthia*) (Yoshido et al., 2016) a *Bicyclus anynana* (van't Hof, ústní sdělení).

Při determinaci pohlaví bource morušového byla popsána regulace exprese genu *Masc* přes mnohočetné tandemové kopie feminizačních piRNA na chromozomu W (Kiuchi et al., 2014). Jedná se o determinaci pohlaví, kdy mnohočetné kopie piRNA z chromozomu Z regulují produkt z alely na chromozomu W, která se podílí na vývoji samčího pohlaví. V disertační práci S. Vissera z roku 2021 byl popsán gen *EkMasc* (ortolog genu *Masc* u *B. mori*) u *E. kuehniella*. Dále byly u *E. kuehniella* a *P. interpunctella* objeveny kandidátní geny pro feminizační piRNA. Na základě těchto dat se předpokládá, že u zmíněných druhů bude determinace pohlaví fungovat na podobném principu jako právě u *B. mori*.

I z omezeného množství informací je jasné, že se mezi motýly nacházejí druhy, které mají určení pohlaví založené na jiném principu, než je přítomnost genu určující samičí pohlaví na chromozomu W. U *S. cynthia* bylo pozorováno, že přítomnost chromozomu W není pro vývoj samčího pohlaví potřeba, protože některé samice ho nemají (Yoshido et al., 2016). V nedávno publikované práci se pak podařilo zjistit, že pohlaví je určováno podle poměru pohlavních chromozomů Z vůči autozomům (Yoshido & Marec, 2023). U okáče *Bicyclus anynana* je pohlaví určeno prostřednictvím mnohočetných alel genu na chromozomu Z, což je systém, který opět nepotřebuje chromozom W a je patrně přítomen u většiny okáčů (van't Hof, ústní sdělení).

P. aegeria je v České republice hojně rozšířený druh okáče. Podobně jako u drtivé většiny druhů motýlů i u *P. aegeria* nebyla známa většina informací o karyotypu ani o pohlavních chromozomech, kromě počtu chromozomů. Od roku 2021 je však k dispozici vysoce kvalitní sekvence genomu složená na úroveň jednotlivých chromozomů (identifikátor složeného genomu je GCA_905163445.1) a čtení z osekvenovaných genomů několika dalších jedinců včetně dvou samic, jehož autorem je iniciativa Darwin Tree of Life (<https://www.darwintreeoflife.org/>). Na základě bioinformatické analýzy těchto dat byl u *P. aegeria* předběžně vytipován odlišný způsob determinace pohlaví než u většiny druhů okáčů. U nich je předpokládaným systémem komplementární determinace pohlaví (csd). Zároveň bioinformatická analýza odhalila přítomnost genu *Jmj* na chromozomu Z i jeho

mnohočetné kopie na chromozomu W. *Jmj* by tak mohl být novým primárním spouštěčem determinace pohlaví.

Chromozom W bývá u většiny motýlů tvořen heterochromatinem. Obsahuje často mnoho mobilních elementů, retranspozonů nebo repetitivních nekódujících sekvencí (Fuková et al., 2007). Redukce přítomnosti funkčních genů může být také podpořena nemožností rekombinace tohoto chromozomu kvůli achiasmatické meióze motýlích samic. Studovaný gen *Jmj* tak představuje nový potenciálně funkční gen, kterých na tomto chromozomu prozatím není popsáno mnoho. Mezi takové geny patří například *per* popsáný u *A. pernyi* nebo *Fem* u *B. mori* (Gotter et al., 1999; Kiuchi et al., 2014).

Funkce genu *Jmj* u motýlů není známa. Geny z rodiny *Jmj* se nacházejí nejen u eukaryotických organismů jako jsou živočichové, houby a rostliny, ale dokonce i u bakterií. Jejich funkcí je represe transkripce, mají schopnost vázat se na DNA a ovlivňují modulaci chromatinu (Takeuchi et al. 2006). O obratlovců bylo prokázáno, že se účastní přeměny pohlaví u agamy australské (*Pogona vitticeps*) (Deveson et al., 2017) a pyskouna novozélandského (*Notolabrus celidotus*) (Muncaster et al., 2023), čili potenciál k tomu ovlivňovat pohlaví nepochybně mají.

V této práci se podařilo ověřit přítomnost mnohočetných kopií *Jmj* na chromozomu W pomocí FISH. Z důvodu nedostatečné citlivosti metody nebyl detekován signál jedné kopie tohoto genu na chromozomu Z, která byla popsána na základě bioinformatických dat Arjen E. Van't Hofem. Podobná lokalizace genu, jako vidíme u *P. aegeria* a *Jmj*, byla popsána u *A. pernyi*. Ten má na chromozomu Z jednu řádnou kopii genu *per*, zatímco na chromozomu W jsou lokalizovány mnohočetné kopie, které se přepisují do mRNA s modifikovanými čtecími rámci a rozdílnou délkou řetězců aminokyselin (Gotter et al., 1999). Gen *per* však nezodpovídá za pohlavní determinaci, ale jeho rozložení na pohlavních chromozomech vytváří analogii právě s *Jmj*.

Mnohočetné kopie *Jmj* byly též detekovány při vývoji multiplex PCR pro determinaci pohlaví *P. aegeria*. Primery pro tento gen byly designované pouze pro kopie na chromozomu W. Výsledky PCR na agarózovém gelu u všech samic vykazovaly řadu různě dlouhých produktů. Může se jednat o tandemové repetice, které se na gelu vyznačují jako přibližně dvojnásobné délky produktů jedné kopie. Pokud jsou kopie genu lokalizovány v těsné blízkosti za sebou, nelze ovlivnit, kolik kopií primery zduplikují. Tento jev vysvětluje vznik mnohočetných pravidelných proužků v agarózovém gelu. Přítomnost tandemových repetitív by vysvětlovala i silné hybridizační signály při FISH, navzdory poměrně krátké cílové sekvenci *Jmj*, která tvořila cca 700 bp. Takto krátké cílové sekvence bývají u netandemově

uspořádaných kopií patrně pod detekční schopnosti použité metody FISH, jak tomu bylo pravděpodobně i v tomto případě, pokud kopie nebyla v klastru repetitivní.

Další postup

A) Měření míry exprese genu *Jmj* v embryonálním vývoji pomocí RT PCR

Pokud se kandidátní gen, v tomto případě *Jmj*, podílí na determinaci pohlaví, jeho exprese dosáhne relativně vyšší míry v raných fázích embryonálního vývoje než v pozdějších vývojových stádiích. Bude tomu před expresí genů stojících na konci dráhy determinace pohlaví, které bývají napříč druhy velice konzervované. Takovým genem je gen *doublesex*, který je u hmyzu vysoce konzervativní a typicky může být sestřižen do dvou podob typických pro jednotlivá pohlaví. V okamžiku, kdy se tyto formy objeví u embryí příslušného pohlaví, byla determinace pohlaví již provedena. Proto je pro zjištění profilu exprese kandidátního genu v kritickém období potřeba provést qPCR u raných samčích a samičích embryí, tedy v době, kdy neexistují žádné morfologické znaky, podle kterých by se dalo určit pohlaví jedince. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda determinace pohlaví pomocí PCR, kdy je možné určit pohlaví u embryí.

V genomu *P. aegeria* se též vyskytují čtyři ortology genu *Masc*. Tento gen se u prozatím známých druhů motýlů podílí na determinaci pohlaví. Z tohoto důvodu se domnívám, že kromě mnou navrhovaného dalšího postupu při výzkumu genu *Jmj* by bylo vhodné se soustředit i na výzkum těchto čtyř kopií *Masc* (van't Hof, ústní sdělení).

B) Degradace transkriptů genu *Jmj* pomocí RNAi.

Pro získání finálního důkazu o roli genu *Jmj* v determinaci pohlaví u *P. aegeria*, je potřeba buď gen vyřadit např. pomocí CRISPR-Cas9, nebo narušit jeho expresi pomocí RNA interference injekcí siRNA do vajíček. Po injekci dochází k degradaci produktů transkribovaných z genu. Pokud je gen zodpovědný za determinaci pohlaví, degradace jeho produktů by vedla k omezení tvorby jednoho pohlaví. Tato část experimentu je ale invazivní a u většiny vajíček způsobí poškození vedoucí k letalitě. Pro zajištění dostatku jedinců, na kterých bude experiment probíhat, je nutné mít stabilní laboratorní chov zkoumaného organismu. Z tohoto důvodu byl v průběhu tvorby mé bakalářské práce založen chov *P. aegeria*, kdy probíhala optimalizace podmínek pro chov a rozmnožování. Výhodou tohoto druhu je to, že ve volné přírodě ve srovnání s většinou dalších druhů okáčů žijících v České republice vytváří až tři generace za rok. V laboratorních podmínkách bylo provedeno křížení divokých rodičů až do druhé filiální generace.

6. Závěr

Motýli jsou nejvíce druhově bohatou skupinou organismů, kde je determinace pohlaví podmíněná chromozomální konstitucí WZ. Navzdory tomuto jevu a dlouhotrvajícímu výzkumu na bourci morušovém (*B. mori*) není známo mnoho funkčních genů lokalizovaných na chromozomu W. V genomu okáče pýrového (*P. aegeria*) z podčeledi okáčovití (*Satyrinae*) byl nalezen gen *Jumonji*, který se vyskytuje na chromozomu Z a v mnohočetných kopiích na chromozomu W. Tento gen byl navržen jako kandidátní gen podílející se na dosud nepopsané dráze determinace pohlaví u motýlů, která je alternativou k determinaci popsané u *B. mori*. Pomocí FISH a GISH byla potvrzena lokalizace jeho mnohočetných kopií na chromozomu W v mitotických, meiotických i interfázních jádrech.

Specifická přítomnost genu *Jmj* u samic byla použita jako marker pro vytvoření multiplex PCR metody rozpoznání pohlaví u jedinců *P. aegeria*. Tato metoda bude klíčová v budoucím výzkumu exprese tohoto a případně i dalších genů účastnících se determinace pohlaví v raných embryonálních stádiích.

7. Citovaná literatura

- Berec, L., Schembri, P. J., & Boukal, D. S. (2005). Sex determination in *Bonellia viridis* (Echiura: Bonelliidae): Population dynamics and evolution. *Oikos*, 108(3), 473–484. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13350.x>
- Beye, M. (2004). The dice of fate: The *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. In *BioEssays* (Vol. 26, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/bies.20098>
- Beye, M., Härtel, S., Hagen, A., Hasselmann, M., & Omholt, S. W. (2002). Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Molecular Biology*, 11(6), 527–532. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00361.x>
- Bull, J. (1985). Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia*, 41, 1285–1296. <https://doi.org/10.1007/BF01952071>
- Casas, L., Saborido-Rey, F., Ryu, T., Michell, C., Ravasi, T., & Irigoien, X. (2016). Sex Change in Clownfish: Molecular Insights from Transcriptome Analysis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep35461>
- Charlesworth, B. (1991). The Evolution of Sex Chromosomes. *Science*, 251(4997), 1030–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1998119>
- Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1403), 1563–1572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0717>
- Cho, S., Huang, Z. Y., Green, D. R., Smith, D. R., & Zhang, J. (2006). Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: Balancing selection and trans-species polymorphisms. *Genome Research*, 16(11), 1366–1375. <https://doi.org/10.1101/gr.4695306>
- Crews, D., Bergeron, J. M., Bull, J. J., Flores, D., Tousignant, A., Skipper, J. K., & Wibbels, T. (1994). Temperature-dependent sex determination in reptiles: proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Developmental Genetics*, 15(3), 297–312. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020150310>
- Deveson, I. W., Holleley, C. E., Blackburn, J., Graves, J. A. M., Mattick, J. S., Waters, P. D., & Georges, A. (2017). Differential intron retention in Jumonji chromatin modifier genes is implicated in reptile temperature-dependent sex determination. *Science Advances*, 3(6). <https://doi.org/doi.org/10.1126/sciadv.1700731>
- Francis, R. C., & Barlow, G. W. (1993). Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid (sex determination/growth/social dominance/teleost). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(22), 10673–10675. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10673>
- Fujii, T., Abe, H., Kawamoto, M., Banno, Y., & Shimada, T. (2015). Positional cloning of the sex-linked giant egg (Ge) locus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 24(2), 213–221. <https://doi.org/10.1111/imb.12150>
- Fuková, I., Traut, W., Vítková, M., Nguyen, P., Kubíčková, S., & Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma*, 116(2), 135–145. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0086-0>

- Gempe, T., Hasselmann, M., Schiøtt, M., Hause, G., Otte, M., & Beye, M. (2009). Sex determination in honeybees: Two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biology*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000222>
- Goldsmith, M. R., Shimada, T., & Abe, H. (2005). The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 50, pp. 71–100). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130456>
- Gotter, A. L., Levine, J. D., & Reppert, S. M. (1999). Sex-Linked period Genes in the Silkworm, *Antheraea pernyi*: Implications for Circadian Clock Regulation and the Evolution of Sex Chromosomes. *Neuron*, 24(4), 953–965. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81042-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81042-9)
- Graves, J. A. (2005). Genomics. Recycling the Y chromosome. *Science*, 307(5706), 50–51. <https://doi.org/10.1126/science.1107295>
- Hackstein, J. H., Hochstenbach, R., Hauschteck-Jungen, E., & Beukeboom, L. W. (1996). Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 18(4), 317–323. <https://doi.org/10.1002/bies.950180410>
- Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., & Beye, M. (2001). Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Molecular Biology*, 10(6), 605–608. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00300.x>
- Hasselmann, M., Gempe, T., Schiøtt, M., Nunes-Silva, C. G., Otte, M., & Beye, M. (2008). Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454(7203), 519–522. <https://doi.org/10.1038/nature07052>
- Hawley, R. S., Irick, H., Haddox, D. A., Whitley, M. D., Arbel, T., Jang, J., McKim, K., Zitron, A. E., New, C., Childs, G., & Lohe, A. (1992). There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Developmental Genetics*, 13(6), 440–467. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020130608>
- Hejníčková, M., Koutecký, P., Potocký, P., Provazníková, I., Voleníková, A., Dalíková, M., Visser, S., Marec, F., & Zrzavá, M. (2019). Absence of W chromosome in psychidae moths and implications for the theory of sex chromosome evolution in lepidoptera. *Genes*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/genes10121016>
- Just, W., Baumstark, A., Süß, A., Graphodatsky, A., Rens, W., Schäfer, N., Bakloushinskaya, I., Hameister, H., & Vogel, W. (2007). *Ellobius lutescens*: Sex determination and sex chromosome. In *Sexual Development* (Vol. 1, Issue 4, pp. 211–221). <https://doi.org/10.1159/000104771>
- Kaskinova, M. D., & Nikolenko, A. G. (2017). csd gene of honeybee: Genetic structure, functioning, and evolution. *Russian Journal of Genetics*, 53(3), 297–301. <https://doi.org/10.1134/S1022795417010070>
- Katsuma, S., Shoji, K., Sugano, Y., Suzuki, Y., & Kiuchi, T. (2019). Masc-induced dosage compensation in silkworm cultured cells. *FEBS Open Bio*, 9(9), 1573–1579. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12698>
- Kawamura, N. (1988). The egg size determining gene, Esd, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica*, 76, 195–201. <https://doi.org/10.1007/BF00140224>

- Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Ishihara, G., Kawaoka, S., Sugano, S., Shimada, T., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., & Katsuma, S. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. In *Nature* (Vol. 509, Issue 7502). <https://doi.org/10.1038/nature13315>
- Lechner, S., Ferretti, L., Schöning, C., Kinuthia, W., Willemsen, D., & Hasselmann, M. (2014). Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee *Apis mellifera*. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 272–287. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst207>
- Mank, J. E., Promislow, D. E. L., & Avise, J. C. (2006). Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87, 83–93. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00558.x>
- Marec, F., Tothova, A., Sahara, K., & Traut, W. (2001). Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity*, 87, 659–671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00958.x>
- Muncaster, S., Goikoetxea, A., Lokman, P. M., De Farias e Moraes, C. E., Damsteegt, E. L., Edgecombe, J., Gemmell, N. J., & Todd, E. V. (2023). Genes involved in sex differentiation, epigenetic reprogramming, and cell fate regulate sex change in a wrasse. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 33(1), 281–294. <https://doi.org/10.1007/s11160-022-09755-2>
- Provazníková, I., Hejníčková, M., Visser, S., Dalíková, M., Carabajal Paladino, L. Z., Zrzavá, M., Voleníková, A., Marec, F., & Nguyen, P. (2021). Large-scale comparative analysis of cytogenetic markers across Lepidoptera. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91665-7>
- Rosin, L., Chen, D., Chen, Y., & Lei, E. (2022). Dosage compensation in *Bombyx mori* is achieved by partial repression of both Z chromosomes in males. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2113374119>
- Ross, L., Davies, N. G., & Gardner, A. (2019). How to make a haploid male. In *Evolution Letters* (Vol. 3, Issue 2, pp. 173–184). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/evl3.107>
- Rozen, S., Skaletsky, H., Marszalek, J. D., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., & Page, D. C. (2003). Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*, 423(6942), 873–876. <https://doi.org/10.1038/nature01723>
- Sahara, K., Yoshido, A., & Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9262-z>
- Shukla, J. N., & Nagaraju, J. (2010). Two female-specific DSX proteins are encoded by the sex-specific transcripts of *dsx*, and are required for female sexual differentiation in two wild silkworm species, *Antheraea assama* and *Antheraea mylitta* (Lepidoptera, Saturniidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(9), 672–682. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.06.008>
- Tomihara, K., Kawamoto, M., Suzuki, Y., Katsuma, S., & Kiuchi, T. (2022). Masculinizer-induced dosage compensation is achieved by transcriptional downregulation of both copies of Z-linked genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biology Letters*, 18(9). <https://doi.org/10.1101/2022.03.06.483149>

- Traut, W. (1977). A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genetica*, 47, 135–142. <https://doi.org/10.1007/BF00120178>
- Visser, S. (2021). *Evolution of the sex determination pathway in the Mediterranean flour moth, Ephestia kuehniella*. Disertační práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, Entomologický ústav AV. Vedoucí práce prof. RNDr. František Marec, CSc.
(dostupné na <https://wstag.jcu.cz> od 11. 11. 2024.)
- Visser, S., Voleníková, A., Nguyen, P., Verhulst, E. C., & Marec, F. (2021). A conserved role of the duplicated Masculinizer gene in sex determination of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *PLoS Genetics*, 17(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009420>
- Wolf, K. W., Novak, K., & Marec, F. (1997). Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity*, 79, 135–143. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.136>
- Wrench, D. L., Kethley, J. B., & Norton, R. A. (1994). Cytogenetics of Holokinetic Chromosomes and Inverted Meiosis: Keys to the Evolutionary Success of Mites, with Generalizations on Eukaryotes. Houck, M.A. (Eds) *Mites*. Springer, Boston. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2389-5_11
- Yoshido, A., & Marec, F. (2023). Deviations in the Z:A ratio disrupt sexual development in the eri silkmoth, *Samia cynthia ricini*. *Genetics*. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad023>
- Yoshido, A., Marec, F., & Sahara, K. (2016). The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmooths, *Samia cynthia* ssp.: No role in sex determination and reproduction. *Heredity*, 116(5), 424–433. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.110>