

Prof. dr hab. Jerzy Woyke, SGGW, Warszawa
Pracownia Hodowli Owadów Użytkowych

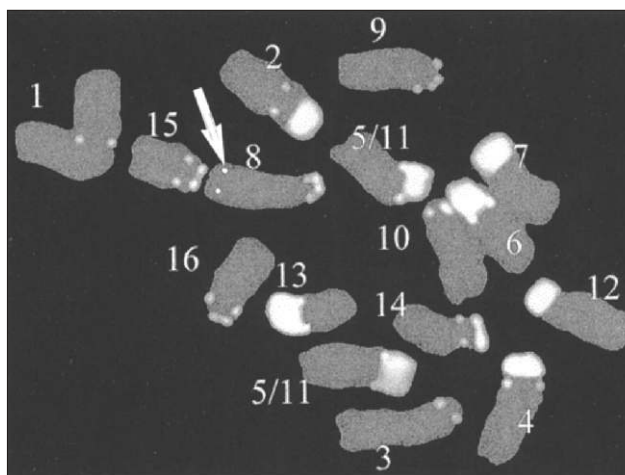
Tekst autoryzowany

Genetyka molekularna determinacji płci u pszczół

Dziedziczenie płci u pszczół miodnych zależy od genu płci, który znajduje się w miejscu (locus) X (ang. SDL – sex determination locus) pewnego chromosomu. Gen ten ma kilkanaście alleli, które oznaczano jako X_1 , X_2 , X_3 itd., lub X_a , X_b , X_c itd. Robotnice powstają z zapłodnionych jaj heterozygotycznych (posiadających dwa różne allele genu np. X_a/X_b , X_b/X_c lub prościej ab lub bc), natomiast haploidalne trutnie z jaj niezapłodnionych tylko z jednym allele np. X_a , X_b lub prościej a, b itd. Z zapłodnionych jaj homozygotycznych (posiadających dwa takie same allele genu X, np. aa lub bb) nie rozwijały się żadne pszczoły. Uznano, że takie jaja są letalne i dlatego allele genu locus X nazwano allelami letalnymi. Jednak Woyke (1962, 1963a) wykazał, że zapłodnione jaja homozygotyczne w locus X (np. aa, bb itd.) nie są letalne, lecz wylęgają się z nich diploidalne larwy trutowe. Tak więc udowodnił, że allele w locus X nie są letalne, lecz są allelami płci. Wcześniej nikt nie widział larw trutni diploidalnych, gdyż jak wykrył to Woyke (1963b) są one zjadane w ciągu 3 godzin po wylęgnięciu z jaj. Następnie Woyke (1963c, 1969) opracował metodę wychowu trutni diploidalnych do stadium imago.

Dotychczas nic nie było wiadomo o znajdującym się w locus X genie determinującym płeć pszczół. Nawet nie wiadano, w którym chromosomie znajduje się ten locus. Otóż istnieją tzw. markery genetyczne. Są to dowolne geny lub segment DNA o znanym położeniu w chromosomie. Obecność ich można łatwo zidentyfikować. Hunt i Page (1994, 1995) badali potomstwo matek unasienionych spokrewnionymi trutniami. Matki te produkowały rozstrzelony czerw. Badali oni 365 markerów trutni haploidalnych i sprawdzali, które z nich zawsze znajdują się w genomie (zestawie różnych genów) trutni pochodzących od matek produkujących rozstrzelony czerw. Otóż takim markerem okazał się tzw. marker Q. Oznacza to, że marker Q znajdował się w tym samym chromosomie, w którym znajdował się locus płci X. Marker Q jest więc sprzężony z locus X i z cechą rozstrzelonego diploidalnego czerw. Beye i in. (1994) stosując dokładniejszą metodę molekularną (tzw. „fingerprint”) stwierdzili, że marker Z był również sprzężony z genem determinacji płci. Tak więc locus determinacji płci pszczół znajduje się w pobliżu markerów genetycznych Q i Z. Markery te są heterozygotyczne u robotnic i matek, a homozygotyczne u diploidalnych trutni.

Beye i Moritz (1996) za pomocą markera Z stwierdzili, że locus płci X znajduje się w końcowej (subtelometric) części chromosomu 8 (ryc. 1). Tak więc chromosom 8 można obecnie nazywać chromosomem płci. Następnie Beye i in. (2003) określili dokładniej miejsce w locus X, w którym znajduje się gen determinujący płeć pszczół. Stwierdzili, że gen płci znajduje się między markerami Q i Z. Gen ten nazwali *complementary sex determiner (csd)* [komplementarny determinator płci]. Następnie opisali oni tzw. mapę genetyczną genu *csd*. Oznacza to, że ustalili położenie 4 podstawowych składników DNA, tzw. nukleotydów (A-adenina, C-cytozyna, G-guanina i T-tymina), w 1453 kolejnych miejscach nici DNA (Deoxyribonucleic acid



Ryc. 1. Haploidalny zestaw chromosomów pszczoły miodnej. 8 – chromosom płci. Strzałka locus genu płci *csd* (complementary sex determiner). Beye i Moritz, *Naturwissenschaften* 1996

– kwas deoksyrybonukleinowy) tego genu. Wskazali, że gen *csd* koduje 385 reszt aminokwasowych (aminokwasów). Składniki białek tworzy 20 aminokwasów (aminokwasy białkowe), ponad 200 innych nie spotyka się w białkach (aminokwasy niebiałkowe); są one substancjami macierzystymi wielu hormonów, witamin i in. Z biochemicznie liniowo połączonych aminokwasów powstają białka. Autorzy stwierdzili, że spośród białek powstających z aminokwasów kodowanych przez gen *csd*, przeważa białko arginina R oraz seryna S.

Wiadomo, że gen *csd* ma allele. Autorzy badali, na czym polega molekularna różnica między allelami. Określali kolejność nukleotydów nici DNA w różnych allelach genu *csd*. Stwierdzili, że allele genu *csd* różnią się między sobą kolejnością układu nukleotydów w łańcuchu DNA. Niektóre allele są bardziej podobne do siebie (w 86–90%), a inne mniej (51–69% podobieństwa).

Hasselmann i Beye (2004) starali się stwierdzić, ile różnych alleli uda się zidentyfikować techniką molekularną. Zbadali 200–300 embrionów pochodzących z 2–3 rodzin pszczelech z czterech geograficznych regionów: Niemiec, USA, Brazylii i Południowej Afryki. Znaleźli 15 linii różniących się allelami genu *csd*, czyli zidentyfikowali 15 alleli genu *csd*.

Ponieważ poznano już gen *csd*, który znajduje się w locus płci X (SDL), należy obecnie zamiast pisać locus X, po prostu podawać jedynie gen *csd*. Odpowiednio: pisząc o allelach płci, zamiast – X_a , X_b , X_c ... itd. należy pisać – csd^A , csd^B , csd^C ... itd. Omawiając krzyżowanie pszczół o różnych allelach płci, aby wciąż nie powtarzać symbolu *csd*, można pisać zamiast $csd^A/csd^B \times csd^C$, po prostu $A/B \times C$.

Badano również na czym polega ekspresja (uzewnętrznienie działania) pojedynczego allelu płci csd^A i dwu alleli w układzie homo-

zygotycznym csd^A/csd^A (diploidalny truteń) i heterozygotycznym csd^A/csd^B (samica).

Hunter (1999) opisał substancję (RNA inhibiting – RNAi), która blokuje (wycisza, wyłącza) ekspresję (uzewnętrznienie działania) genów. Beye i in. (2003) wstrzyknęli RNAi do zapłodnionych i niezapłodnionych jaj w 0–4 godzin po złożeniu ich do komórki plastra. Larwy wychowywali do stadium przedpoczwarki, a następnie sprawdzali rozwój organów rozrodczych. Wstrzyknięcie RNAi do niezapłodnionych jaj, nie spowodowało zmian w jądrach przedpoczwarek trutni. Jednak u poczwarek z jaj zapłodnionych, blokada genu csd spowodowała, że zamiast jajników rozwinęły się jądra trutni. Tak więc heterozygotyczny zestaw alleli csd^A/csd^B po wstrzyknięciu hamującej substancji RNAi zadziałał tak, jak gdyby jaja były homo- lub hemizygotyczne.

Wyniki te pokazują, że hemi- lub homozygotyczny zestaw alleli (csd^A lub csd^A/csd^A wytwarza nie działający (niefunkcyjny) produkt, w wyniku czego rozwija się truteń haploidalny lub diploidalny. Natomiast heterozygotyczny zestaw alleli (csd^A/csd^B) koduje substancję, która rozpoczyna rozwój samicy.

W locus determinacji płci X (SDL) znajduje się nie tylko ten jeden gen csd , lecz w sumie jest ich tam aż 5. Prócz genu csd znajdują się tam geny określone jako GB11211, GB13727, GB30480 oraz jeszcze jeden. Hasselmann i in. (2008) zbadali za pomocą blokady RNAi, czy któryś z nich ma jakiś związek z determinacją płci. Stwierdzili, że prócz znanego już genu csd taki związek wykazuje jeszcze ten jeden nienazwany gen, który nazwali *feminizer* – *fem* (gen żeńskości). Blokada molekularna genu *fem* spowodowała, że z zapłodnionych heterozygotycznych jaj csd^A/csd^B zamiast samic rozwinęły się trutnie. Bardzo wyraźnie uwidaczniało się to w wyglądzie głowy. Natomiast blokada genu *fem* nie spowodowała żadnych zmian u trutni rozwijających się z niezapłodnionych jaj csd^A czy csd^B . Wyniki te wskazują, że gen *fem* jest konieczny do prawidłowego rozwoju samicy, lecz nie jest potrzebny do rozwoju samca. Heterozygota csd^A/csd^B jedynie umożliwia (zezwała na) rozwój samicy. Aby jednak samica rozwinęła się, niezbędny jest gen *fem*. Tak więc samica rozwinięta tylko wtedy, gdy jej skład genetyczny będzie następujący:

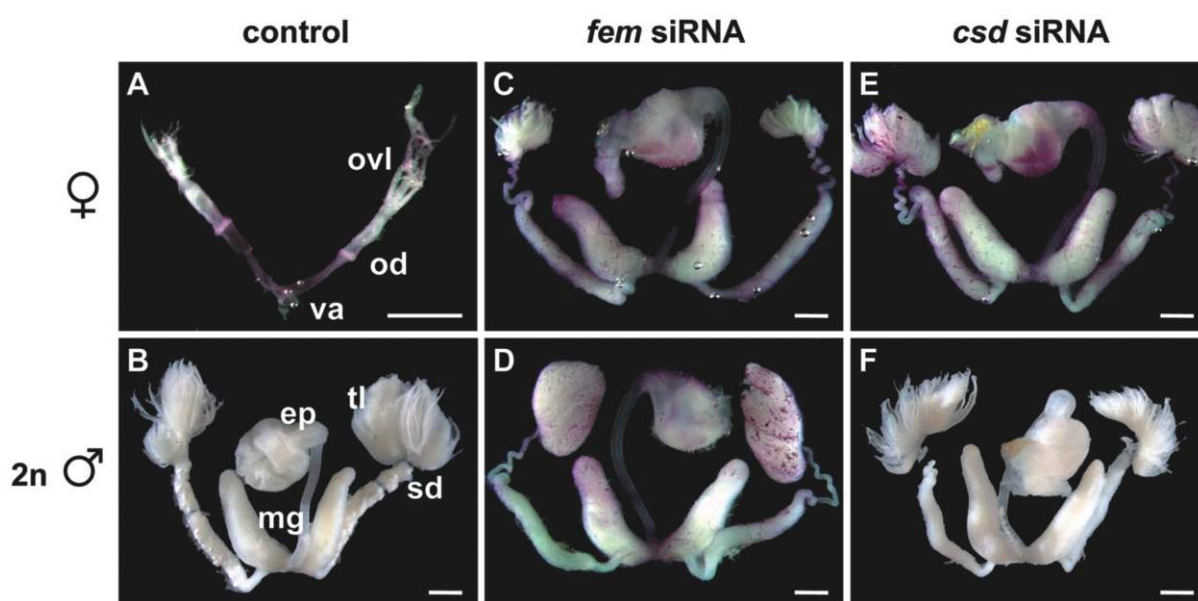
$csd^A/csd^B + fem/fem$. Gen *fem* koduje białko bogate w argininę i serozynę, które mają 70% podobnych reszt aminokwasów, jak białko kodowane przez gen *csd*.

Gdy zablokowano gen *csd* we wczesnym stadium embrionalnym heterozygotycznej samicy $csd^A/csd^B + fem/fem$, to z takich jaj rozwijały się trutnie, pomimo że miały genotyp *fem/fem*. Widać z tego, że genotyp *fem/fem* uaktywnia się jedynie w obecności sprawnie działających heterozygotycznych alleli csd^A/csd^B .

Autorzy pokusili się również o sprawdzenie związków ewolucyjnych. Badali obecność genu *csd* i *fem* u *Apis mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* oraz u trzmieła *Bombus terrestris*, pszczoły bezładnej *Melipona compressipes* oraz osy *Nosonia vitripennis*. Okazało się, że gen *csd* istnieje tylko u pszczoł z rodzaju *Apis*, natomiast gen *fem* – u wszystkich badanych gatunków. Porównanie z drzewem ewolucyjnym wykazało, że gen *csd* jest stosunkowo nowy. Pojawił się on po rozdeleniu się pszczoł bezładnych, trzmieeli i pszczoł około 70 milionów lat temu, lecz przed zróżnicowaniem się rodzaju *Apis* na różne gatunki, co nastąpiło około 10 milionów lat temu. Gen *csd* pojawił się prawdopodobnie na skutek duplikacji (podwojenia) i niewielkiej zmiany kolejności nukleotydów w DNA (mutacja). Tak więc ewolucyjnie pierwotnym jest gen *fem*, od którego pochodzi gen *csd*.

Gempe i in. (2009) blokowali geny *csd* lub *fem*, lecz tym razem oprócz robotnic i haploidalnych trutni badali również trutnie diploidalne. Zbadali rozwój organów rozrodczych w późnym stadium poczwarki (P3), gdyż organa rozrodcze trutni haploidalnych i diploidalnych w ostatnich stadiach rozwoju poczwarki różnią się, czego nie widać u przedpoczwarek. Blokada genu *fem* u robotnic csd^A/csd^B spowodowała, że rozwinęły się pseudotrutnie z trutowymi organami rozrodczymi (**ryc. 2 C**). Jądra tych pseudotrutni były jednak mniejsze niż u trutni diploidalnych. Natomiast blokada genu *csd* spowodowała, że z zapłodnionych heterozygotycznych csd^A/csd^B jaj rozwinęły się trutnie z jądrami normalnej wielkości (**ryc. 2 E**).

Natomiast blokada genu *fem* lub *csd* embrionów trutni diploidalnych csd^A/csd^A nie spowodowała żadnych zmian w rozwoju organów rozrodczych trutni diploidalnych (**ryc. 2 D, F**). ▷



Ryc. 2. Organa rozrodcze poczwarek pszczoł po zablokowaniu genu *fem* (żeńskości), lub genu płci *csd*. Lewa kolumna: ♀ – jaja zapłodnione heterozygotyczne – samica, 2n ♂ – jaja homozygotyczne – diploidalne trutnie. Nagłówki: control – kontrola, *fem* siRNA – zablokowany gen *fem*, *csd* siRNA – zablokowany gen *csd*. Gempe i inni, PLoS Biol 2009

▷ Zakończenie

Wyżej przedstawiłem dość szczegółowo historię molekularnej determinacji płci u pszczół. W celu ułatwienia czytelnikom zrozumienia tego trudnego zagadnienia, przedstawiam poniżej podsumowanie. Determinacją płci u pszczół oraz prawidłowym rozwojem płciowym osobnika kierują dwa geny: *csd* z około 15 allelami oraz gen *fem*. Z hemizygotycznych (niezapłodnionych) jaj $csd^A + fem$ rozwijają się trutnie haploidalne, a z homozygotycznych (zapłodnionych) $csd^A/csd^A + fem/fem$ trutnie diploidalne. Blokada zarówno genu *csd* jak *fem* nie powoduje żadnych zmian w rozwoju organów rozrodczych trutni.

Z heterozygotycznych jaj $csd^A/csd^B + fem/fem$ rozwijają się samice (robotnice lub matki). Jednak po zablokowaniu genu *fem* u samicy, rozwija się truteń. Widać z tego, że heterozygotyczny zestaw alleli płci csd^A/csd^B umożliwia jedynie rozwój samicy. Aby taka samica normalnie płciowo rozwinęła się, konieczny jest gen *fem/fem*.

Gen *fem* nie ma znaczenia w praktycznej hodowli pszczół, gdyż zawsze znajduje się w genomie pszczoły. Ma on znaczenie w badaniach naukowych, kiedy można zablokować jego działanie. W praktyce hodowlanej pszczół wystarczy posługiwać się genem *csd* wraz z jego allelami. Tak więc truteń haploidalny – csd^A , lub prościej A, truteń diploidalny – csd^A/csd^A , lub prościej AA, samica (robotnica lub matka) – csd^A/csd^B , lub prościej AB.

Spis literatury

- Beye M., Moritz R.F.A., Epplen C. (1994), Sex linkage in the honeybee *Apis mellifera* detected by multilocus DNA fingerprinting. *Naturwissenschaften* 81: 460–462.
- Beye M., Moritz R.F.A., Crozier R.H., Crozier Y.C. (1996), Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 83: 424–426.
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M.K., Page R.E., Omholt S.W. (2003), The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 14: 419–429.
- 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 Biol* 7(10): e1000222.
- Hasselmann M., Beye M. (2004), Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 4888–4893.
- 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: 519–522.
- Hunt G.J., Page R.E. (1994), Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular and General Genetics* 244: 512–514.
- Hunt G.J., Page R.E. (1995), Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 139: 1371–1382.
- Hunter C.P. (1999), RNA-mediated gene interference (RNAi), a rapid, convenient tool for inhibiting gene function in *Caenorhabditis elegans*, has recently been shown to work in other organisms. *Current Biology*. 9: 440–442.
- Woyke J. (1962), The hatchability of 'lethal' eggs in a two allele fraternity of honeybee. *Journal of apicultural Research* 1: 6–13.
- Woyke J. (1963a), Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of apicultural Research* 2: 19–24.
- Woyke J. (1963b), What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony *Journal of apicultural Research* 2: 73–76.
- Woyke J. (1963c), Rearing and viability of diploid drone larvae. *Journal of apicultural Research* 2: 77–84.
- Woyke J. (1969), A method of rearing diploid drones in a honeybee colony. *Journal of apicultural Research* 8: 65–71.

