



**WROCŁAWSKA SZKOŁA DOKTORSKA
INSTYTUTÓW POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

**Różnorodność oraz funkcjonalna heterozygotyczność alleli genu
komplementarnej determinacji płci pszczoły miodnej (*Apis mellifera*)**

Robert Mroczek

**Promotor:
dr hab. Małgorzata Cebrat**

Praca doktorska
wykonana w Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk



Wrocław 2025

Streszczenie

U owadów haplodiploidalnych, takich jak pszczoły miodne, płeć determinowana jest genetycznie: samce rozwijają się z niezapłodnionych jaj i są haploidalne, a samice z zapłodnionych jaj – są diploidalne. Kluczowym mechanizmem jest determinacja płci zależna od pojedynczego *locus* (*Single Locus Complementary Sex Determination*, sl-CSD), w której płeć zależy od heterozygotyczności w *locus* genu *csd* (z ang. complementary sex determiner). Osobniki heterozygotyczne rozwijają się jako samice, podczas gdy hemizygotyczne (haploidalne) jako samce. Homozygoty rozwijają się w bezpłodne samce diploidalne, co stanowi obciążenie genetyczne, szczególnie w populacjach małych lub spokrewnionych. Z tego względu różnorodność genetyczna *csd* stanowi jeden z kluczowych czynników dla przetrwania populacji.

W pracy przedstawiono nową metodę genotypowania w celu analizy różnorodności genu *csd* w rodzinach pszczoły miodnej, opartą na analizie robotnic, a nie trutni. Metoda ta pozwala na uchwycenie większej różnorodności wśród alleli, lecz wymaga dużych rozmiarów próby, by zminimalizować błędy i zapewnić reprezentację rzadkich linii ojcowskich. Zwiększenie wydajności analizy osiągnięto poprzez opracowanie nowej metody opartej na polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych (T-RFLP).

Nowo opracowana metoda umożliwiła analizę 2668 larw robotnic, ujawniając 137 unikalnych alleli *csd* w próbkach z 19 kolonii pochodzących z trzech lokalizacji: pasieki HIRSZ we Wrocławiu, pasieki ASP w centrum Wrocławia oraz pasieki PISZ w rejonach Piszkwawy. Analiza funkcjonalna parowania alleli *csd* miała na celu wykrycie genotypów, które są niedoreprezentowane ze względu na letalność lub częściową niefunkcjonalność w determinacji płci żeńskiej. Zidentyfikowano 118 unikalnych kombinacji alleli, z których większość była równomiernie reprezentowana. Dwa genotypy o minimalnej różnicy sekwencyjnej (1 i 4 aminokwasy) zostały eksperymentalnie potwierdzone jako funkcjonalne na podstawie ekspresji transkryptu genu *double-sex (dsx)* specyficznego dla samic. Odkrycie to dostarcza nowych informacji na temat kryteriów funkcjonalnej heterozygotyczności pomiędzy allelami *csd*.

W celu zbadania funkcjonalności *csd* na poziomie białkowym, wykorzystano predykcje strukturalne AlphaFold2. Pokazały one, że domeny N-końcowa i bogata w argininę i serynę (RS) tworzą stabilne α -helisy, natomiast region hiperzmienny (HVR) oraz region bogaty w prolinę (PR)

pozostają w dużej mierze nieuporządkowane w formie monomerów. Predykcje dotyczące formowania homotrimerów wykazały istotne przekształcenia strukturalne, w tym formowanie struktur β i zwiększoną liczbę wiązań wodorowych, szczególnie w obrębie HVR. Dla porównania, heterotrimery zawierały zwykle mniej wiązań wodorowych w tym regionie. Dodatkowo, zidentyfikowano dwa allele, które stanowiły wyjątek od tej reguły. Ich kompleksy homotrimerów tworzyły mniej wiązań wodorowych niż kompleksy heterotrimerów, co może wskazywać na specyficzne dla alleli mechanizmy funkcjonalnej heterozygotyczności.

Równolegle zbadano zmienność mutacyjną regionu HVR genu *csd* przy użyciu sekwencjonowania DNA nasienia trutni. Sekwencjonowanie Illumina wykazało wysoki poziom artefaktów związanych z PCR, co ograniczyło możliwość wykrycia rzadkich wariantów. Dla porównania, sekwencjonowanie Oxford Nanopore z minimalną liczbą cykli PCR dały mniej zanieczyszczone odczyty, które były bardziej dopasowane do alleli referencyjnych. Przy użyciu algorytmu DADA2 zidentyfikowano kilka rzadkich wariantów sekwencji, które mogły powstać na wskutek mutacji.