

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Živočišné biotechnologie  
Katedra: Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat  
Vedoucí katedry: Doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**POLYMORFISMUS GENU PRO SERICIN 2 U BOURCE  
MORUŠOVÉHO (*BOMBYX MORI*)**

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.  
Konzultanti diplomové práce: Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

Autor: Bc. Helena Tyllerová

České Budějovice, duben 2010

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG na internetových stránkách Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

České Budějovice, 29. 4. 2010

Helena Tyllerová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat Doc. RNDr. Michalu Žurovcovi CSc., že mi umožnil pracovat v jeho laboratoři, navštívit vědecké pracoviště v zahraničí, poskytl mi mnoho cenných rad a velkou trpělivost při psaní této práce. Obzvláště chci poděkovat vedoucímu katedry „Genetiky, šlechtění a výživy zvířat.“ Doc. Ing. Jindřichu Čítkovi CSc., bez jehož souhlasu bych nemohla tuto práci dělat v Biologickém centru AVČR, v.v.i. Mé poděkování míří také ke všem členům Laboratoře molekulární genetiky, děkuji Vám za cenné rady a za úžasnou pracovní atmosféru a to zejména Lucii Kučerové a Olze Jedličkové. A v neposlední řadě za psychickou podporu mých přátel Jitky Kosňovské a Kristýny Kotlanové.

**Tato práce byla financována z grantu MŠMT LC06077**

## ANOTACE

Studovali jsme polymorfismus genu *Ser2* u vybraných kmenů *B. mori* a *B. mandarina*. Předlohou pro tuto studii byla restriční mapa alely C, zdokumentovaná u hybrida evropského *B. mori* kmenů 200 a 300 (Michaille et al. 1990a) a alela D polyvoltinního hybrida kmene Daizo p50 (Kludkiewicz et al. 2009), u kterého je již známa sekvence celého genu *Ser2*. Na základě této publikované sekvence genu *Ser2* jsme navrhli celou řadu PCR primerů a provedli sekvenční analýzu 4 různých alel genu *Ser2*, včetně alely C (až na dva úseky obsahující repetitivní DNA). Sekvence genů jsme mezi sebou porovnali a zjistili značné rozdíly jak v délkách intronů a exonu 9, tak ve struktuře uspořádání exonů. U alely C bylo zjištěno celkem 12 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 9, 10, 11, 8b) a u alely D 13 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 10a, 9b, 10b, 11). Alela C se ukázala jako nejzajímavější, neboť obsahovala ojedinělý typ uspořádání exonů, jenž mohl představovat původní (ancestrální) formu genu *Ser2*. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli analyzovat pomocí PCR a elektroforézy uspořádání exonů na 3' konci genu *Ser2* u 70 kmenů bource. V další analýze jsme se snažili najít mezi dostupnými kmeny blízkou alelu alele C. Pro tuto studii bylo vybráno 55 kmenů bource z různých geografických oblastí, ze kterých jsme amplifikovali a sekvenovali úsek o délce 2 kb. Získané sekvence jsme vyhodnotili fylogenetickým testem, abychom získali představu o historii genu *Ser2*. Na základě provedených analýz usuzujeme, že alela C, pocházející z dnes již zřejmě vyhynulého Evropského hybrida 200 a 300, obsahovala zřejmě uspořádání exonů, které vzniklo složitými sekundárními přestavbami a není ancestrální formou genu *Ser2*.

**Klíčová slova:** bourec morušový (*Bombyx mori*), *Ser2* gen, polymorfismus, domestikace

## ANNOTATION

In our study, we examined the polymorphism of gene *Ser2* from domesticated silkworm *Bombyx mori* and its closest wild relative *B. mandarina*. As a starting material for our work, we used the restriction map of allele *C* isolated from hybrid lineages 200 and 300 of European silkworm *B. mori* (Michaille et al. 1990a). We also used the published sequence of allele *D* which was isolated from „Daizo“ p50 strain of *B. mori* (Kludkiewicz et al 2009). Based on the published sequence, we designed PCR primers and performed sequence analysis of 4 different alleles of gene *Ser2*, including the almost complete genomic sequence of allele *C* (except for two short regions containing repetitive DNA). We then compared the sequences and found that the alleles differ significantly not only in intron lengths and the sizes of exon 9, but also in exon arrangements. While the allele *C* contains 12 exons (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 9, 10, 11, 8b), the allele *D* and other alleles analysed have 13 exons (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 10a, 9b, 10b, 11). Allele *C* showed very unique arrangement of exons, which suggested that it may represent an ancestral form of *Ser2* gene. We analysed the arrangement of exons located at the 3' end of the *Ser2* gene by PCR and electrophoresis in 70 available strains of *B. mori* and *B. mandarina*. We also tried to find a similar allele to the allele *C* and we amplified and sequenced 2 kb region from 55 *Bombyx* strains. Phylogenetic analysis of gene *Ser2* gene suggested that the *C* allele of now probably extinct European silkworm hybrids 200 and 300 does not seem to be an ancestral form of *Ser2* gene, but it rather seems to be the result of complex secondary rearrangements.

**Keywords:** Silkworm (*Bombyx mori*), *Ser2* gene polymorphism, domestication

## OBSAH

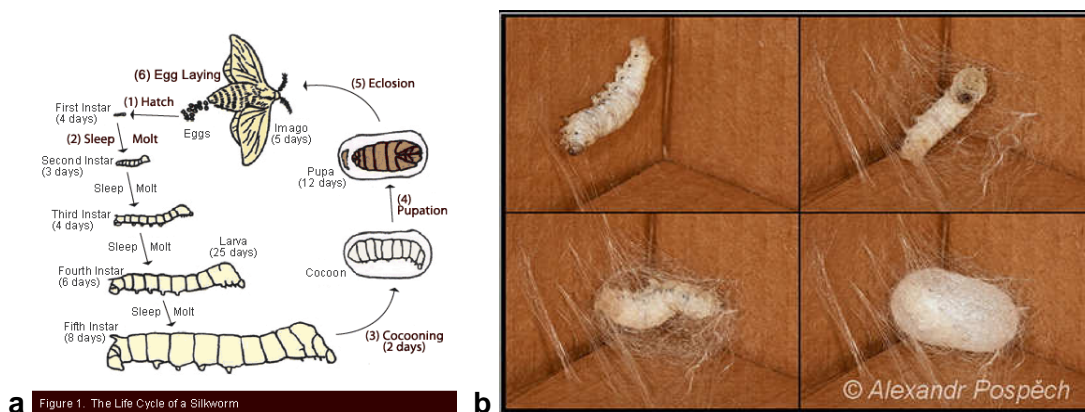
1. ÚVOD .....	7
1.1 Obecná charakteristika bource morušového ( <i>Bombyx mori</i> ).....	7
1.2 Historie domestikace bource morušového ( <i>Bombyx mori</i> ) za účelem produkce hedvábí.....	8
1.3 Fylogeneze Bource morušového ( <i>Bombyx mori</i> ) .....	9
1.4 Produkce hedvábí .....	11
1.5 Struktura genu <i>Ser2</i> .....	12
1.6 Polymorfismus genu <i>Ser2</i> a stanovení cílů práce .....	13
2. MATERIÁL A METODY .....	15
2.1 Pokusný materiál.....	15
2.2 Laboratorní metody .....	15
2.2.3 Izolace DNA .....	15
2.2.3.1 Fenol chloroformová izolace DNA .....	15
2.2.3.2 Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel).....	16
2.2.4 Výběr primerů.....	17
2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	17
2.2.5.1 Složení PCR směsi.....	17
2.2.5.2 PCR program .....	17
2.2.6 Gelová elektroforéza .....	18
2.2.7 Přečištění PCR produktu.....	18
2.2.7.1 Přečištění PCR produktu pomocí QIAquick PCR Purification Kit .....	18
2.2.7.2 Přečištění PCR produktu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit .....	19
2.2.7.3 Přečištění PCR produktu pomocí Sephadexu.....	19
2.2.8 Analýza sekvencí .....	19
2.2.8.1 Zpracování získaných sekvencí.....	20
2.2.8.2 Fylogenetické vyhodnocení .....	20
3. VÝSLEDKY.....	21
3.1 Mapování genomických klonů 2001, 2002 a 2004 .....	21
3.2 Struktura genu <i>Ser2</i> u <i>B. mandarina</i> .....	22
3.3 Struktura genu <i>Ser2</i> u evropského kmene 301 a čínského kmene Chahan..	23
3.4 Srovnání 3' konců genu <i>Ser2</i> u jiných kmenů bource se zaměřením na evropské kmeny .....	24
3.5 Fylogenetická analýza .....	25
4. DISKUSE.....	28
4.1 Rozdíly v délkách intronů a exonu 9 mezi zkoumanými alelami.....	28
4.2 Rozdíly v uspořádání exonů na 3' konci genu .....	28
4.3 Fylogenetická analýza genu <i>Ser2</i> .....	29
5. ZÁVĚR .....	31
6. SEZNAM LITERATURY .....	32
7. PŘÍLOHY .....	36

# 1. ÚVOD

## 1.1 Obecná charakteristika bource morušového (*Bombyx mori*)

Bourec morušový, *Bombyx mori* (dále jen *B. mori*), je taxonomicky řazen do třídy hmyzu *Insecta*, řádu motýlů *Lepidoptera* a čeledi bourcovitých *Bombycidae*. *B. mori* je hybridní druh motýla, který byl vyšlechtěn v Číně. Tento noční motýl prochází při vývoji přeměnou dokonalou, tzn. od vývojového stadia vajíčka přes larvu a kuklu až po stadium dospělého (Obr. č. 1a). Z vajíčka se líhne nedospělé stádium – larva, která se několikrát svléká. Posléze se mění v klidové stádium – kuklu, uloženou v kokonu, kde dochází k přestavbě tkání a orgánů. Po ukončení proměny kukla praská a vylézá imago (u bource se imágo musí ještě dostat z pevného hedvábného kokonu pomocí enzymu kokonázy). Pouze larvální stádia intenzivně rostou a konzumují výhradně listy moruše (*Morus*). Životní cyklus trvá 6-8 týdnů v závislosti na podmínkách chovu a kmeni *B. mori*. Univoltinní (monovoltinní) kmeny mají pouze jednu generaci do roka, bivoltinní dvě a multivoltinní (polyvoltinní) mají několik generací a krátký životní cyklus (Kislingová 2006).

*B. mori* se stal pro svou schopnost produkce hedvábí při spřádání kokonu hospodářsky významným druhem a díky tomu též jedním z nejvíce domestikovaných zvířat.



Obr. č 1: a) Životní cyklus *B. mori* (URL č. 2). b) Hedvábí motýlů *B. mori* je produkováno v průběhu posledního larválního instaru, tj. těsně před zakuklením (autorem snímku je Mgr. Alexandr Pospěch).

## 1.2 Historie domestikace bource morušového (*Bombyx mori*) za účelem produkce hedvábí

První zmínky o výrobě hedvábí se objevují v Číně již kolem roku 2600 př. n. l. (URL č. 1). K samotnému objevu hedvábného vlákna se vztahují různé legendy. Jednou z nich je legenda o manželce žlutého císaře Lei Zu. Legenda vypráví, že jednoho krásného dne seděla císařovna Lei Zu pod moruší a pila čaj. V tom jí spadl do šálku kokon bource. Snažila se jej vytáhnout ven, ale kokon se v horké vodě rozpustil a císařovna měla na prstech dlouhá hebká vlákna hedvábí. Dostala nápad namotat vlákna na cívku a později je i spříst. Zmínka o této legendě byla uvedena v Shiji „Záznamy velkého historika“ – napsal ji známý historik Sima Qian v období západní dynastie Han (206 př. n. l. - 8. n. l.; URL č. 1).

Po celá staletí střežili Číňané tajemství výroby hedvábí pod pohrůzkou smrti. Hedvábí bylo velmi cenným obchodním artiklem. Od starověku se hedvábné látky šířily po tzv. Hedvábné cestě do Střední a Přední Asie. Postupně se dostaly až do Persie či Říma, kde byly s oblibou používány. S úpadkem císařství se technologie výroby hedvábí rozšířila za hranice Číny, ve 3. století n. l. se přes Koreu dostala do Japonska a v 6. století do Evropy. Traduje se, že roku 552 n. l. propašovali z Číny vajíčka bourců dva mniši v duté holi až do Cařihradu, kde založili tradici evropského chovu. Díky Benátčanům se hedvábí rozšířilo po celé jižní Evropě. Na konci 6. století n. l. se hedvábnictví rozvíjelo v Řecku, v 8. století ve Španělsku a v 15. století ve Francii (Hyde 1984). Zajímavostí je, že i v Čechách byl zaveden chov bource morušového a to v 17. století Albrechtem z Valdštejna (Hyršl, 2003).

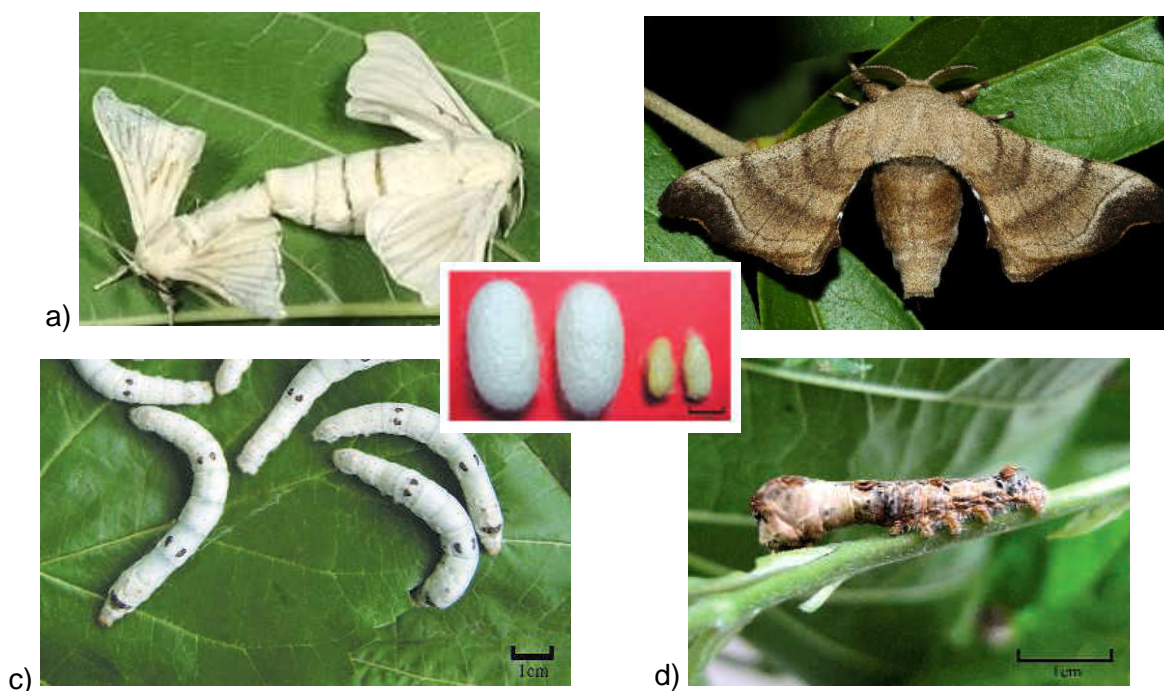
Chov *B. mori* je důležitým hospodářským zdrojem příjmů rodin v oblastech zemí, jako je Čína, Indie, Vietnam a Thajsko. Kromě toho je *B. mori* významným modelovým organismem pro studium vlastností motýlích škůdců důležitých pro zemědělství a lesnictví. Rozvoj biotechnologií podnítil využití bource jako bioreaktoru pro produkci rekombinantních proteinů (Tomita 2003; Tamura 2000). Ale i jeho samotný produkt – hedvábné vlákno – má velký přínos pro naši konzumní společnost. Hedvábí se stalo nepostradatelnou součástí kosmetického, farmaceutického, potravinářského a medicínského průmyslu. Hedvábné proteiny sericiny mají zvlhčující, UV-absorpční, antioxidační, a do určité míry antimikrobiální vlastnosti (Padamwar et al. 2005, Sarovart et al. 2003; Zhaorigetu et al. 2003a). Pro tyto vlastnosti se přidávají do tělových krémů, vlasových přípravků atd. Hedvábná vlákna našla uplatnění i v biomedicině. Nejen jako chirurgické nitě, ale i jako vhodný materiál pro tkáňové inženýrství (Chang et al. 2007).



V posledních letech dosáhl intenzivní genetický výzkum *B. mori* úspěchu v podobě přečtení genomové sekvence a stal se tak po octomilce obecné (*Drosophila melanogaster*) druhým hmyzem se známou sekvencí všech genů.

### 1.3 Fylogeneze bource morušového (*B. mori*)

Dosavadní archeologické, genetické a imunologické výzkumy podporují hypotézu, že divoký druh bource *Bombyx mandarina* je předkem současných kmenů *B. mori*. Zajímavé je, že kříženci mezi těmito druhy jsou plodní. Samotný vývoj vzniku tohoto druhu má dvě hypotézy. První je multifyletický původ, podle kterého byl na základě archeologických záznamů a historických důkazů bourec domestikován nezávisle v různých oblastech a obdobích (Jiang 1982). Druhá hypotéza je monofyletický původ, kdy se všechny zeměpisné kmeny vyvinuly v jedné oblasti (Yoshitake 1967).



Obr. č. 2: a+b) Na levé straně nahoře jsou motýli *B. mori* (větší z nich je samička) a na pravé straně je imago *B. mandarina* (URL č. 2). Uprostřed je ukázka rozdílné velikosti kokonů – větší pochází od *B. mori*. c+d) Vlevo dole jsou housenky *B. mori* a v pravo dole je housenka *B. mandarina* (URL č. 5).

V současné době jsou kmeny *B. mori* zařazeny do čtyř hlavních skupin podle zeměpisných oblastí: do čínské, japonské, evropské a tropické (Xia et al. 1998). Dříve bylo obtížné studovat jejich fylogenezi a genetickou rozmanitost. Až s příchodem nových molekulárních technologií je možné poodhalit tajemství domestikace rodu *Bombyx*.

Molekulární fylogeneze *B. mori* a původního *B. mandarina* odhalila několik zajímavých rysů evoluční historie těchto dvou druhů. Oba dva jsou morfologicky a fyziologicky podobní (Obr. č. 2). Rozdíly jsou v chování, kladení vajíček, velikosti kokonu a ochranného zbarvení (Kawaguchi 1928; Astaurov et al. 1959; Yoshitake 1968; Chikushi 1972). *B. mandarina* je schopen letu, zatímco *B. mori* se sotva pohybuje a dokonce i jeho reprodukce je odkázána na péči člověka. Tato závislost se považuje za důsledek dlouhodobé domestikace.

Chromozomální studie těchto druhů zjistily, že čínský *B. mandarina* má  $n = 28$  párů chromozomů jako *B. mori* (Astaurov et al. 1959; Nakamura et al. 1999), kdežto jedinci *B. mandarina* z Japonska a Jižní Koreje mají  $n = 27$  párů chromozomů (Kawaguchi 1928; Nakamura et al. 1999). Rozdíl v počtu chromozomů u *B. mandarina* vznikl (podle jedné hypotézy) pravděpodobně fúzí chromozomů, tj. dva z 28 chromozomů kontinentálního *B. mandarina* mohly být ztraceny během expanze z původního území do Japonska (Astaurov et al. 1959; Maekawa et al. 1988). Studie spermatogeneze F1 hybridů ♀ *B. mori* a ♂ japonského *B. mandarina* odhalila, že spermatogonie všech F1 jedinců obsahovala  $2n = 55$  chromozomů a následně primární spermatocyty v metafázi I měly 27 párů chromozomů, které zahrnovaly 26 bivalentních chromozomů a jeden velký trivalentní (Banna 2004). Ten je pravděpodobně složen z jednoho velkého chromosomu, označovaného písmenem „M“, od *B. mandarina* a chromozomy  $m_1$ ,  $m_2$  z *B. mori* (Kawaguchi 1928; Murakami a Imai 1974).

Studie založená na sekvenční analýze 3 mitochondriálních genů 12S rRNA, 16S rRNA a COI s kontrolním regionem CR poukazuje na to, že čínská *B. mandarina* je pravděpodobný předek druhů *B. mori* (Arunkumar 2006). Dokazuje to i velký rozdíl v počtu nukleotidů v sekvencích mitochondriální DNA. A to konkrétně v kontrolním regionu CR, kdy byl nalezen třikrát se opakující 126bp dlouhý element pouze u japonského kmene. Což poukazuje na domněnku o jeho izolaci. Předpokládaná izolace japonské *B. mandarina* proběhla asi před 20 tisíci lety (Minato 1966; Maekawa et al. 1988). Nedávná studie tentokrát celého mitochondriálního genomu u 41 kmenů (*B. mori* a čínské a japonské *B. mandarina*) podporuje hypotézu, že dnešní *B. mori* má původ v čínském *B. mandarina* a následně se rozšířil díky člověku do dalších částí světa, kde je dále cíleně šlechtěn, především pro kvalitu hedvábí (Li 2010).

## 1.4 Produkce hedvábí

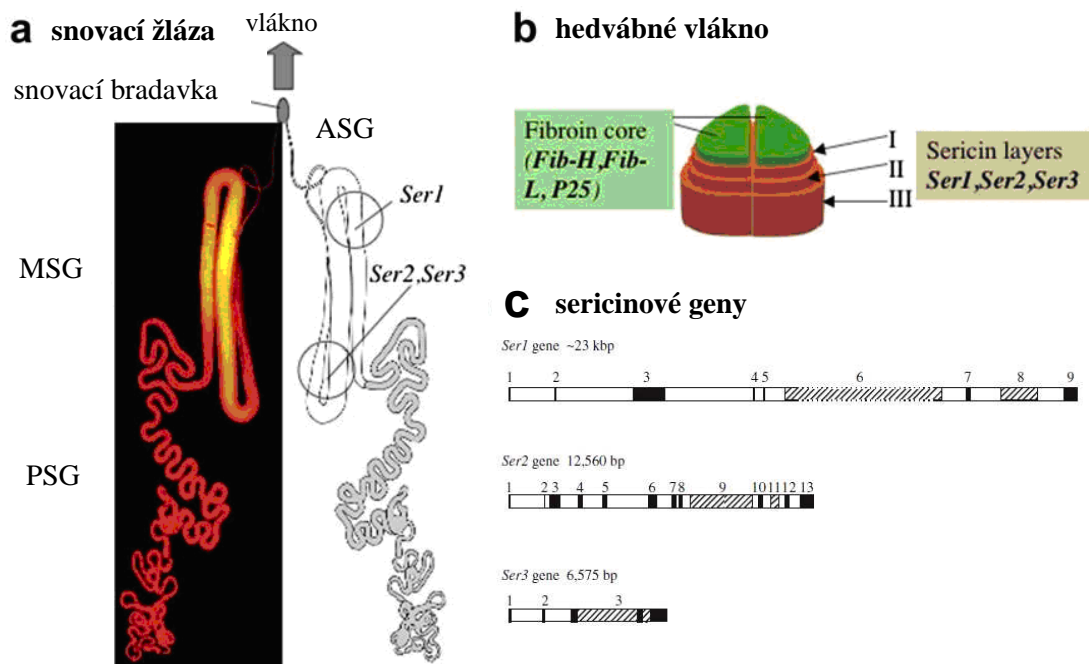
Hedvábí motýlů *B. mori* se vytváří v průběhu spřádání kokonu (Obr. č. 1b), který chrání vyvíjející se imago před nepříznivými vlivy okolního prostředí. Je produkováno ve snovacích žlázách (Obr. č. 3a).

Snovací žlázy jsou obvykle párový útvar trubicového tvaru vzniklý přeměnou labiálních žláz, které byly původně slinnými a jsou dobře přizpůsobené k mohutné syntéze a sekreci hedvábí. Z hlediska intenzity produkce je to nejvýkonnější syntetický systém v celé živočišné říši (Kodrík 2000). Všechny žlázy produkující hedvábí jsou ektodermálního původu. Funkce snovacích žláz je stimulována hormonálně, a to konkrétně ekdysteroidy a neurohormony (Sehnal a Akai, 1990). Můžeme je z morfologického a fyziologického hlediska rozdělit na tři základní části: přední úsek – anterior silk gland (ASG), střední úsek – middle silk gland (MSG) a zadní úsek – posterior silk gland (PSG) (Sehnal 2008, Žurovec 1998).

Po chemické stránce je hedvábné vlákno složeno z několika druhů bílkovin. Základní složkou je mohutná bílkovina fibroin, tvořící hedvábné vlákno ze 76 %. Fibroin má charakteristickou strukturu i aminokyselinové složení, které zajišťuje jeho obrovskou pevnost a pružnost (Kodrík 2000). Je známo, že fibroin je vylučován ve velkém množství z PSG. Obsahuje tři komponenty – těžký řetězec fibroin-H (200-500 kDa), lehký řetězec fibroin-L (25 kDa) a glykoprotein P25, který se vyskytuje ve dvou formách (27 a 31 kDa), lišících se obsahem cukrů (Tanaka et al. 1999). Tyto složky vznikající v buňkách PSG se seskupují do základní jednotky v endoplazmatickém retikulu, tvoří mikrovlákná ve vakuolách Golgiho aparátu a následně jsou vylučovány jako sekreční granula do snovacích žláz, kde se hromadí jako vysoce koncentrovaný gel (Akai 1993, Inoue et al. 2004). Ten tvoří sloupec, který je tlačěn do MSG.

V MSG jsou syntetizovány proteiny sericiny, které jsou bohaté na aminokyselinu serin a fungují jako lepidlo, jenž se postupně nabaluje na fibroin a zpevňuje ho. Později se také podílí na adhezi fibroinových vláken z levé a pravé snovací žlázy (Kodrík 2000). Bylo prokázáno, že MSG se skládá ze tří funkčních oblastí – distální, centrální a proximální – produkující různé druhy sericinů umožňujících spleení fibroinových filamentů v jedno vlákno, které se dále vlepuje do stěny kokonu. Proteiny sericinové frakce jsou zastoupeny v hedvábném vláknu z 22 %. Jsou rozpustné v horké vodě, čehož se využívá při přípravě komerčního surového hedvábí, kdy se musejí odstranit aby zbyla samotná fibroinová vlákna.

Další složky hedvábného vlákna jsou např. tuky a vosky, zastoupené pouze v minoritním množství 1,5% (URL č. 3).



Obr. č 3: a) Snovací žlázy mají tři základní části: přední úsek – anterior silk gland (ASG), střední úsek – middle silk gland (MSG) a zadní úsek – posterior silk gland (PSG) (Sehnal 2008). b) Na kolmém průřezu hedvábným vláknem můžeme vidět dvě fibroinová vlákna stmelena a obalena sericinovými proteiny. c) Exon-intronová struktura tří genů *Ser1*, *Ser2* a *Ser3* – kódují sericinové proteiny (Takasu et al. 2007).

### 1.5 Struktura genu *Ser2*

Geny pro tvorbu sericinů jsou u *B. mori* lokalizovány na chromosomu 11 (Takasu et al. 2007). Doposud byly popsány tři: *Ser1*, *Ser2* a *Ser3* (Obr. č. 3c).

Gen *Ser1* byl objeven jako první (Okamoto et al. 1982). Jeho struktura byla popsána Garelovou (1997). Bylo zjištěno, že gen je dlouhý 23 kb, skládá se z 9 exonů a vznikají z něj 4 různé mRNA (2,8, 4, 9 a 10.5 kb) (Garel et al. 1997).

*Ser2* byl poprvé popsán Michaille et al. (1990a), kteří s použitím restričních enzymů objevili pět haplotypů: C, L, mC, mCL a Cv. Pouze tři alely byly zmapovány důkladně a to konkrétně C, L a mC. Lišily se mezi sebou celkovou délkou genu. Jako pokusný materiál byly použity evropské kmene 200 a 300. Později byla určena přesná struktura genu *Ser2* s použitím jiného kmene a to polyvoltinního hybrida Daizo p50 (Kludkiewicz et al. 2009). Zdá se, že u tohoto kmene se vyskytuje pouze jeden haplotyp, který Kludkiewicz a kol. (2009) označili jako alelu D. Alela D *Ser2* genu je 12 560 bp dlouhá a má 13 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 10a, 9b, 10b, 11), které mají velikost v rozmezí 28-2574 bp (Obr. č. 3c). Gen produkuje proteiny o velikosti 220 a 130 kDa vyznačující se vysokou lepivostí a přilnavostí k povrchu

(Kludkiewicz et al. 2009). Aminokyselinová sekvence zkoumaných proteinů byla porovnána pomocí algoritmu BLAST s proteiny v databázi GenBank a ukázalo se, že repetitivní sekvence kódovaná exonem 9a vykazuje pozoruhodnou podobnost se sekvencí proteinů izolovaných ze škeblí (Filpula et al. 1990). Jedná se o proteiny mořského mlže slávky jedlé (*Mytilus edulis*), které jsou slouží k pevnému přichycení schránky mlže k podkladu.

Gen *Ser3* byl nalezen nedávno (Takasu et al. 2007) jako třetí gen sericinu. Vzniká v přední části *MSG* během pátého instaru. Je dlouhý 6 575 bp a má 3 exony (Takasu et al. 2010).

Rozdíly v expresi a sestřihu sericinových genů v různých částech *MSG* se promítají do typů sekretovaných sericinů. Zadní část *MSG* sekretuje protein o velikosti 150 kDa (sericin P), střední část protein o 400 kDa (sericin M). Oba jsou kódovány genem *Ser1*. Gen *Ser2* vytváří protein o velikosti 250 kDa (sericin A), v proximální oblasti *MSG* (Takasu et al. 2002). Transkript genů *Ser1* a *Ser2* se v největší koncentraci objevuje v posledním instaru larválního stadia *B. mori*. Z toho vyplývá, že směs sericinů produkovaných na začátku spřádání kokonu má jiné složení než na konci (Michaille et al. 1989, 1990; Takasu et al. 2002).

## 1.6 Polymorfismus genu *Ser2* a stanovení cílů práce

Dosavadní mapování *Ser2* u evropských kmenů 200 a 300 ukázalo vysokou úroveň polymorfismu (Michaille et al. 1990a). Většina podrobně studovaných genů se v populacích vyskytuje v mnoha variantách a alelách, lišících se přinejmenším přítomností bodových mutací.

Genetický polymorfismus populace je definován jako „společný výskyt dvou nebo více samostatných forem jednoho druhu na stejné lokalitě, a to v takovém poměru, že nejvzácnější z nich nemůže být uchována opakovanou mutací nebo migrací“ (Ford 1940). Genetický polymorfismus můžeme využít pro zjišťování populační struktury, Hardy-Weinbergovy rovnováhy, migrace, selekce, příbuznosti jedinců v rámci populace či druhu i pro rekonstrukci fylogeneze druhů s pomocí metod molekulární fylogenetiky.

V předložené práci jsem se zaměřila na studium polymorfismu genu *Ser2* u několika kmenů bource *B. mori* a *B. mandarina*.

Hlavním cílem práce bylo přesné mapování genomických klonů genu *Ser2*, které byly před několika lety získány z genomové knihovny hybridů vzniklých křížením evropských kmenů *B. mori* 200 a 300 (Michaille et al. 1990a) a tuto mapu srovnat se strukturou několika dostupných kmenů *B. mori* a *B. mandarina*. Součástí

práce bylo navrhnout primery pro PCR a namnožit a sekvenovat jednotlivé úseky genu pro protein hedvábí *Ser2* z těchto kmenů bource morušového:

- evropského kmene *B. mori* (European 301)
- japonského kmene *B. mandarina* (Sapporo)
- čínského kmene *B. mori* (Chahan)
- japonského kmene *B. mori* (Dazao p50)

Dalším cílem pak bylo vybrat úsek DNA o velikosti kolem 2 kb ze *Ser2* genu vhodný pro PCR amplifikaci z většího množství kmenů *B. mori* a *B. mandarina* a použít jej pro zpracování některým fylogenetickým testem.

Výsledky této práce budou využity v rámci připravovaného projektu výzkumu domestikace bource morušového.

## 2. MATERIÁL A METODY

### 2.1 Pokusné organismy

#### Výchozí kmeny:

**M** – japonský divoký kmen *B. mandarina* (**Sapporo**) – nasbíraný Dr. Kenem Saharou v roce 2009

**E** – evropský kmen *B. mori* (**European 301**) z Lyonu od profesora Gérarda Chavancyho

**C** – čínský kmen *B. mori* (**Chahan**) ze sbírky Dr. Tamury

**D** – japonsko-čínský kmen *B. mori* (**Daizo p50**) – použit, jako kontrola

**K** – genomické klony **2001**, **2002** a **2004**, které byly odvozeny z hybridů mezi evropskými *B. mori* kmenů **200** a **300** (Michaille et al. 1990a). Klony byly poskytnuté Dr. A. Garelem z University Claude Bernard, Lyon (Francie). Klony pokrývají téměř celý gen.

**Ly6** – evropský kmen, který byly také odvozen z hybridů mezi evropskými *B. mori* kmeny **200** a **300** – v září 2009 byla poskytnuta vajíčka tohoto kmene profesorem Gérardem Chavancym. Tento vzorek byl použit pouze ke kontrole 3' konce a fylogenetické studii.

Ostatní vzorky genomové DNA pochází ze sbírky Dr. Tamury z National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japonsko (URL č. 4)

Pro lepší orientaci jsem si výchozí vzorky označila velkými písmeny dle jejich původu (**M**, **E**, **C**, **D**, **K**). U ostatních jsem ponechala původní značení.

### 2.2 Laboratorní metody

#### 2.2.3 Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována z housenek v posledním larválním instaru (u kmenů **E**, **D**, **Ly6**), které byly humánně usmrceny – znečtivěny ponořením do vody. DNA kmene **M** byla získána ze zmraženého imaga, které bylo uchováno v -80 °C.

##### 2.2.3.1 Fenol-chloroformová izolace DNA

Izolace byla provedena dle Sambrook J et al. 2000, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third edition) s malými úpravami. Prvním krokem byla

homogenizace tkáně housenek v 500 µl extrakčního pufru o složení s výslednými koncentracemi: 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl o pH 8,0; 50mM EDTA o pH 8,0; 100 µg/ml proteinázy K; 0,5% Sarkosyl. Proteináza K byla přidána až těsně před použitím. Zhomegenizovaná tkán se ponechala 1 hodinu inkubovat při teplotě 37°C a poté k němu bylo přidáno 10 µl RNázy A (o koncentraci 10 mg/ml) a směs se nechala další hodinu inkubovat při 37°C. Po inkubaci následovalo přidání 500 µl fenolu, vortexování 10 s a centrifugace 15 minut při 5 000 rcf. Vzniklá vrchní vodná fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky a spolu s 500 µl fenolu byla opět zvortexována 10 s a centrifugována 15 minut při 5 000 rcf. Vrchní fáze byla následně přenesena do čisté mikrozkušavky a k roztoku bylo přidáno 400 µl směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol. Následovalo opět vortexování 10 s a centrifugace 15 minut při 5 000 rcf. Následujícím krokem bylo opět přenesení vrchní fáze do čisté mikrozkušavky, zalití 400 µl směsi chloroform-isoamylalkohol, vortexování 10 s a centrifugace 15 minut při 5 000 rcf. Další vzniklá vrchní fáze byla v čisté mikrozkušavce zalita 1/10 objemu 3M octanu sodného, promíchána a zalita 7/10 objemu isopropanolu a znovu promíchána. Nakonec byla tato směs centrifugována 10 minut na nejvyšší rychlost, čímž se vytvořil pelet obsahující DNA. Ten byl posléze ještě 2x promyt 1 ml 70% ethanolu při centrifugaci 5 minut na nejvyšší rychlost, osušen a rozpuštěn ve 20 µl miliQ H<sub>2</sub>O. Vyizolovaná DNA byla zkontrolována elektroforeticky na 1% agarozovém gelu.

### **2.2.3.2 Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel)**

Postup byl proveden podle protokolu výrobce, s drobnými úpravami. 25 mg homogenizované tkáně motýla bylo vloženo spolu s 180 µl pufru T1 a 25 µl proteinázy K do mikrozkušavky. Vzorek byl důkladně zvortexován po dobu 10 sekund. Takto připravená suspenze se ponechal inkubovat při teplotě 56°C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byl vzorek opět zvortexován a přidalo se 200 µl pufru B3. Opět byl vzorek důkladně zvortexován a inkubován po dobu 10 minut při teplotě 70 °C. Následně bylo přidáno 210 µl 96-100% etanolu. Poté byl vzorek přenesen do kolonky nové eppendorfky a centrifugován po dobu 1 minuty při 11 000 rcf. Proteklá kapalina byla z eppendorfky odstraněna a na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru BW. Opět byl vzorek centrifugován po dobu 1 minuty při 11 000 rcf. Získaná kapalina byla odstraněna a do kolonky bylo přidáno 600 µl pufru B5, vzorek stočen při 11 000 rcf po dobu 1 minuty, kapalina odstraněna a kolonka byla opět stočena při stejných otáčkách a čase. Kolonka byla přendána do nové eppendorfky a byl přidán eluční pufr BE o objemu 50 µl. Po dobu 5 min se vzorek nechal inkubovat při



pokožkové teplotě, poté byl stočen při 11 000 otáčkách 1 minutu. Nakonec byla provedena kontrola vyizolované DNA na 1% agarozovém gelu.

#### 2.2.4 Výběr primerů

Primery byly navrženy na základě známé sekvence *Ser2* genu polyvoltinního hybrida Daizo p50 (Kludkiewicz et al. 2009). Seznam primerů je v příloze č. 2.

#### 2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je nejpoužívanější metoda pro amplifikaci studovaných genů. Jedná se o citlivou metodu sloužící k získání obrovského množství kopií specifického vzorku DNA. Namnožená DNA pak slouží pro navazující analýzy.

##### 2.2.5.1 Složení PCR směsi

Příprava reakční směsi byla provedena na ledu za použití mikrozkušavek o objemu 200 $\mu$ l.

Tab. č. 1: Složení reakční směsi pro PCR

	pro 1 reakci (v $\mu$ l)
ddH <sub>2</sub> O	7,70
10x Pufr	1,25
dNTPs	1,00
primer Forward	0,75
primer Reverse	0,75
Taq polymeráza *	0,05
DNA	1,00
Celkem	11,50

\*) V průběhu studie jsem vystřídala tři polymerázy: Ex Taq (TaKaRA), Taq DNA polymeráza Unis (TopBio s.r.o.), Dream Taq (Fermentas); každá polymeráza měla svůj speciální pufr.

##### 2.2.5.2 PCR program

Samotná PCR byla provedena na termocykleru firmy Biometra. Po úvodním kroku 94 $^{\circ}$ C po dobu 2 min bylo standardně nastaveno 30 cyklů o těchto délkách a teplotách: 94 $^{\circ}$ C po dobu 30 s, nasedání primerů (annealing) bylo v rozmezí 50-61 $^{\circ}$ C v závislosti na délce a sekvenci primerů (Příloha. č. 2) po dobu 30 s, prodlužování

produktu (elongace) 72°C po dobu 0,5-2,5 min podle délky fragmentu PCR. Konečné dosyntetizování produktů probíhalo při 72°C 7 min. U některých párů primerů byl pro jejich optimalizaci použit program „step-up“. Rozdíl od běžného nastavení teplot je v tom, že prvních 15 cyklů byla nastavena nižší teplota annealingu o dva stupně pod vypočtenou teplotu nasedání primerů, a poté následovalo 15 cyklů při teplotě vyšší.

### **2.2.6 Gelová elektroforéza**

K vyhodnocení PCR produktu byla provedena elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Gel byl zhotoven s použitím 0,25 g agarózy (SEVERA) a 25 ml 1x TAE pufru, jehož složení je (rozpočítáno pro 50x TAE): 121 g TRIS; 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0, 421,45 ml H<sub>2</sub>O, 28,55 ml kyseliny octové. Po krátkém povaření je gel ochlazen, aby do něj mohlo být přidáno 2,5 µl ethidium bromidu o koncentraci přibližně 0,5 µg/µl. Gel je nalit do připravené formy s hřebínky a nechá se ztuhnout. Poté jsou do jamek gelu nanесeny 2 µl PCR fragmentu smíchané se 4 µl značící bravy (loading dye) a do jedné jamky pro kontrolu délky fragmentů 2 µl standardu molekulových vah (size marker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu 20 min. Následovala vizualizace vzorků pod UV světlem a zaznamenání výsledku pomocí fotografie.

### **2.2.7 Přečištění PCR produktu**

Po ověření úspěšnosti amplifikace daného fragmentu byl PCR produkt přečištěn. K přečištění byly používány 3 metody.

#### **2.2.7.1 Přečištění PCR produktu pomocí QIAquick PCR Purification Kit**

Nejprve se změřil objem PCR produktu a poté se přidal pufr PB v poměru 1:5 (PCR:PB) a vzorek zvortexoval. Směs byla přelita do dodaných sloupečků a centrifugována při maximálních otáčkách na stolní centrifuze 1 minutu. Po centrifugaci se vyleje proteklá tekutina ze spodní části kolonky. Kolonka se vrátí zpět pod sloupeček, přidá se 0,75 ml pufru PE a opět centrifuguje. Proteklá tekutina se vyleje a provede se centrifugace na sucho při maximálních otáčkách 1 minutu. Sloupeček se vloží do připravené eppendorfky a přidá se 50 µl pufru BE, který se nechá 5 minut nasáknout do kolonky, která se poté centrifuguje při maximálních otáčkách 1 minutu. Kontrola přečištění se provádí gelovou elektroforézou na 1 % agarózovém gelu.

### **2.2.7.2 Přečištění PCR produktu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit**

Po vyříznutí PCR fragmentu z gelu je vzorek zvážen a podle jeho váhy je vypočítán objem pufru PB, který se má přidat do reakce. Váha vzorku se násobí 300x. Směs je inkubována při teplotě 50°C 10 min, následně se směs vortexuje, přelije do dodaných sloupečků a centrifuguje při maximálních otáčkách 1 min. Po centrifugaci se vylije proteklá tekutina ze spodní části kolonky a kolonka se vrátí zpět pod sloupeček. Přidá se 0,75 ml pufru PE a opět centrifuguje. Proteklá tekutina se vylije a provedeme se centrifugace na sucho při maximálních otáčkách 1 min. Sloupeček se vloží do připravené eppendorfky a přidá se 50 µl pufru BE, který se nechá 5 min nasáknout do kolonky a pak při maximálních otáčkách 1 min centrifuguje. Kontrola přečištění se provádí gelovou elektroforézou na 1 % agarózovém gelu.

### **2.2.7.3 Přečištění PCR produktu pomocí Sephadexu**

Na jednu reakci potřebujeme 0,05 g Sephadex<sup>TM</sup> G-50 a 800 µl ddH<sub>2</sub>O. Vzniklá suspenze se ponechá hydratovat nejméně 45 min v chladničce. Mezitím z aerosolové špičky 1000 µl s filtrem vytvoříme kolonku – špička se odřízne žiletkou asi 5 mm pod filtrem a vzniklá kolonka se umístí do 1,5ml mikrozkušavky. Do kolonky se nanese 400 µl sephadexu a kapalina se vytlačí pomocí pipetovacího dudlíku do mikrozkušavky. Protlačenou kapalinu z mikrozkušavky se odstraní a předešlý krok se zopakuje. Po nanesení dalších 400 µl se sloupeček centrifuguje 2 min při 1000 g a přemístí se do nové mikrozkušavky. Důležité je zajistit stejné natočení špiček zkumavek v centrifuze jako při předešlé centrifugaci tak, aby „svah“ vzniklého sloupečku stlačeného sephadexu klesal směrem do středu centrifugy. Na šikmou plochu sephadexu se nanese vzorek a centrifuguje se 2 min při 1000 g. Přečištěná reakce v mikrozkušavce se vysuší ve vakuové centrifuze (Concentrator 5310 od firmy Eppendorf) při pokojové teplotě cca 30 min.

### **2.2.8 Analýza sekvencí**

Sekvence DNA byly získány na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystéme v laboratoři genomiky, ÚMBR, Biologické centrum AV ČR. Analýza je založena na Sangerově metodě (Sanger, 1977).

### 2.2.8.1 Zpracování získaných sekvencí

Ke zpracování sekvencí byl využit softwarový balíček programů **Lasergene 8.0** – DNASTAR. Konkrétně program **SeqMan**, s jehož pomocí byla vytvořena z komplementárních sekvencí jedna konsenzuální. Z těchto vzniklých sekvencí byl vytvořen alignment v programu **MEGA 4.1** (Tamura et al. 2007) za přispění programu **ClustalW**, jenž je součástí programu MEGA. Alignment byl následně použit pro fylogenetickou studii.

### 2.2.8.2 Fylogenetické vyhodnocení

Pro zhotovení dendrogramu byl vybrán úsek genu dlouhý kolem 2 kb a to od exonu 6 po začátek exonu 9, který byl vhodný pro amplifikaci sekvence všech 55 kmenů (Příloha č. 1).

Studie byla provedena s pomocí softwarového balíčku **PHYLIP** verze **3.0.1** (Felsenstein, 1989; Felsenstein, 1996). Součástí balíčku je několik desítek programů zajišťujících konstrukci a vyhodnocení fylogenetických stromů na základě dat nejrůznějšího typu. Z nich byla zvolena znaková metoda **Maximum Likelihood**, která vyhledává nejvěrohodnější dendrogram. Tato metoda je z hlediska spolehlivosti považována za jeden z nejpřesnějších postupů při tvorbě fylogenetických stromů. Statistická podpora stromu byla testována pomocí metody bootstrap.

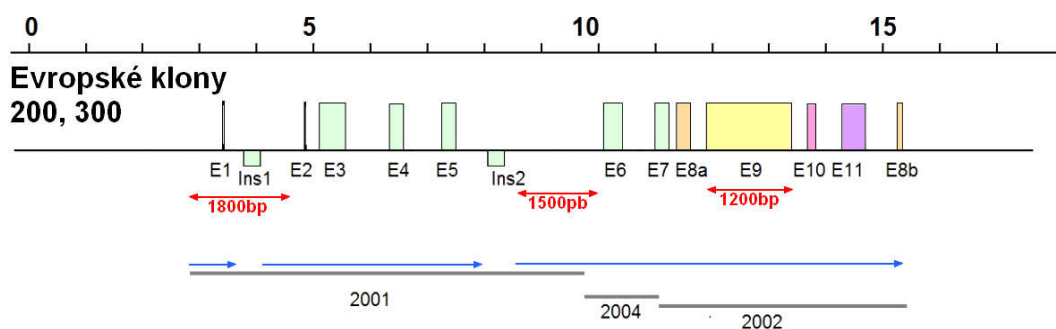
Alignment vytvořený programem MEGA se musel pro další zpracování programem PHYLIP převést v programu **ForCon** z formátu souboru \*.meg na \*.phy. Program PHYLIP byl nastaven následovně: model GTR+I+G, 10 random starting tree, Best of NNI and SPR, bootstrap 1000.

### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1 Mapování genomických klonů 2001, 2002 a 2004

Hlavním cílem práce bylo přesné mapování genomických klonů, nazvaných 2001, 2002 a 2004, které byly odvozeny z genu *sericin 2* a získány z genomové knihovny *B. mori*, vytvořené z DNA hybridů mezi Evropskými kmeny 200 a 300. Restrikční mapy těchto klonů byly popsány v práci Michaille et al. (1990a).

DNA klonů 2001, 2002 a 2004 byla získána od Dr. Annie Garell (Universite Claude Bernard, Lyon, Francie). Na základě publikované sekvence genu *Ser2* (Kludkiewicz et al. 2009) jsme navrhli celou řadu PCR primerů (Příloha. č. 2) a provedli jsme sekvenování. Podařilo se nám získat úplnou sekvenci těchto klonů, až na dva úseky (v klonu 2001) obsahující repetitivní DNA (Obr. č. 4). Srovnáním získané sekvence alely C se sekvencí *Ser2* alely D popsanou Kludkiewiczovou jsme zjistili významné rozdíly v délce prvního intronu, pátého intronu, exonu 9 a největší rozdíl byl zjištěn v pořadí exonů na 3' konci genu (Obr. č. 4 a 5).



**Obr. č. 4:** Orientační mapa alely C hybridního kmene 200 a 300 (Michaille et al. 1990a) obsahuje celkem 12 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 9, 10, 11, 8b), které se vzájemně liší svou velikostí. Ty jsou na mapě značeny písmenem E a jejich číslem. Pod mapou jsou vyznačeny délky genomických klonů 2001, 2002 a 2004. Modré šipky nad klony označují úseky, které se nám podařilo osekvenovat. Až na dva úseky obsahující repetitivní DNA v klonu 2001 (značené Ins1, Ins2) se podařilo získat úplnou sekvenci těchto klonů. Červeně jsou značeny významné rozdíly v délce intronů 1, 5 a exonu 9 alely C oproti alele D.

Byly nalezeny rozdíly v délkách jednotlivých částí alel. Polyvoltinní hybrid Daizo p50 má oproti cDNA evropského kmene delší intron 1 o 200 nukleotidů a kratší intron 5 asi o 1000 nt. Naopak exon 9a má Daizo delší a to o 800 nt (Obr. č. 5).

Výrazným rozdílem alely C oproti alele D je uspořádání exonů, kdy za exonem 10 alely D následuje část zduplikovaného úseku exonu 9 a exonu 10.

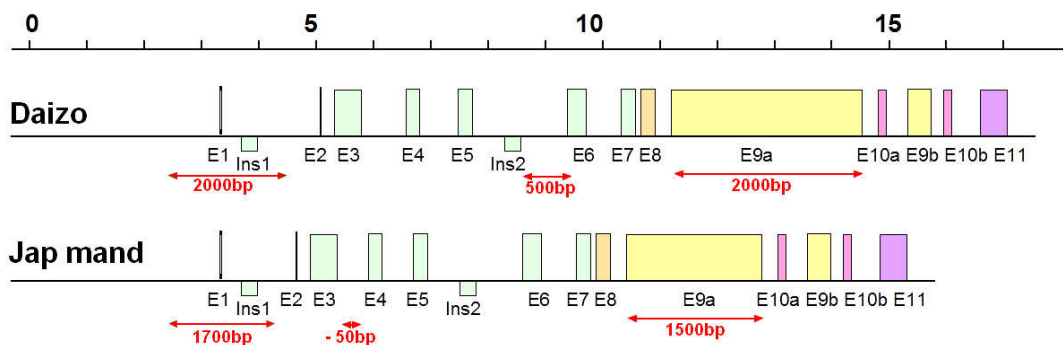
U alely C jsme na 3' konci zjistili duplikaci exonu 8. Podle restrikční mapy publikované Michaille et al (1990a) se za exonem 8 nachází i další exony 9, 10 a 11. Duplikace, která se nachází v alele C, se zdá být ancestrální, neboli možnou výchozí formou genu *Ser2*. Jedna z možných hypotéz vzniku duplikace v alele C je, že došlo ke zdvojení úseku genu *Ser2* u kterého pak druhotně proběhla ztráta exonů mezi exony 11a a 8b (Obr. č. 4).

### 3.2 Struktura genu *Ser2* u *B. mandarina*

Zajímal nás polymorfismus u genu *Ser2* a zejména to, zda se u *B. mandarina* bude nacházet podobné ancestrální uspořádání duplikovaných koncových exonů 11a a 8b jako u alely C hybrida evropského kmene 200 a 300. Izolovali jsme proto genomovou DNA z *B. mandarina* z Japonska (konkrétně z oblasti Sapporo) a pomocí sady primerů (Příloha č. 2) jsme sekvenovali téměř celý gen *Ser2*. Srovnáním získané sekvence se sekvencemi *Ser2* z kmene Daizo (Kludkiewicz et al. 2009) a alely C (Michaille et al. 1990a) jsme zjistili významné odchylky ve stejných oblastech jako u předchozích dvou alel – a sice v délce prvního intronu, pátého intronu a exonu 9 a nově i u třetího intronu (Obr. č. 5).

*B. mandarina* má podstatně kratší gen *Ser2* než kmen Daizo p50. Nejvýraznější je rozdíl v délce exonu 9, který je u *B. mandarina* kratší asi o 500 nt než u alely D kmene Daizo p50. Následuje intron 1, který je kratší o 300 nt, intron 3 kratší o 50 nt, intron 5 je stejně dlouhý. Ale ve srovnání s alelou C je intron 1 u *B. mandarina* kratší o 100 nt, intron 3 je kratší o 50 nt a intron 5 kratší asi o 1000 nt. Naopak exon 9a má *B. mandarina* delší a to o 300 nt než má alela C hybrida evropského kmene 200 a 300.

Pořadí exonu na 3' konci genu bylo u *B. mandarina* stejné jako u alely D, což dokládají výsledné obrázky č. 4, 5, 6 a 7. Znamená to, že zástupce japonského *B. mandarina* nemá ancestrální uspořádání duplikace na 3' konci genu.

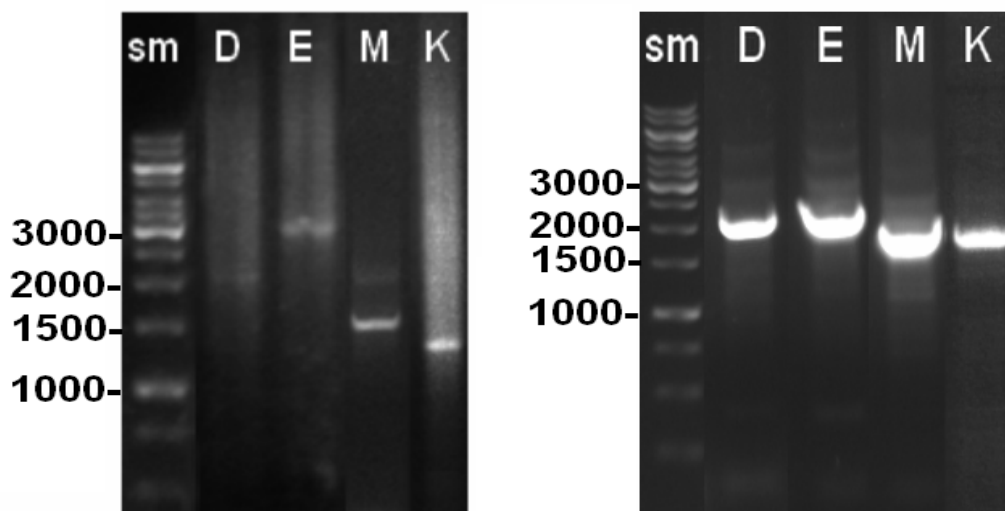


**Obr. č 5:** Srovnání alely D (podle Kludkiewicz et al. 2009) genu *Ser2* japonského kmene *B. mandarina*. Alela D – Daiza p50 obsahuje celkem 13 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 10a, 9b, 10b, 11), které se vzájemně liší svou velikostí v rozmezí 28-2574 bp (Kludkiewicz et al. 2009). Ty jsou na mapě značeny písmenem E + jejich číslo. Mezi exonem E1 - E2 a E5 - E6 se nachází dva úseky transpozónů, obsahující repetitivní DNA a jsou označeny Ins1, Ins2. Pro přehlednost jsou exony 8 a 9 znázorněny žlutými a exony 10 a 11 růžovými obdélníky. Jak je patrné z obrázku, *B. mandarina* má podstatně kratší gen *Ser2* než kmen Daizo p50, ale stejné uspořádání všech exonů.

Mezi sekvencemi genů *Ser2* z kmene Daizo a námi osekvenovaného japonského *B. mandarina* jsou patrné rozdíly v délce prvního intronu, pátého intronu a exonu 9. Rozdíly v délce alely D kmene Daizo oproti alele D japonského *B. mandarina* jsou značeny červenými šipkami. Pořadí exonu na 3' konci genu bylo u *B. mandarina* stejné jako u kmene Daizo.

### 3.3 Struktura genu *Ser2* u evropského kmene 301 a čínského kmene Chahan

Při sledování polymorfismu u genu *Ser2* a v pátrání po v současnosti žijícím kmene bource s ancestrálním uspořádání duplikovaných koncových exonů v genu *Ser2* (jako u alely C s exony 11a-8b) jsme se rozhodli podrobně mapovat gen *Ser2* u zástupce kmene *B. mori* „European 301“ a zástupce starého čínského kmene *B. mori* „Chahan“. Opět jsme sekvenovali téměř celé geny *Ser2* a získané sekvence porovnali se sekvencemi *Ser2* genů z kmene Daizo p50 (Kludkiewicz et al. 2009) a alely C hybridu evropského kmene 200 a 300 (Michaille et al. 1990a). Zjistili jsme, že oba kmeny jsou svým uspořádáním exon-intronové struktury stejní, jako alela D. Jediné rozdíly jsou opět v délce prvního a pátého intronu a exonu 9. Evropský kmen 301 má nejdelší exon 9 ze všech zkoumaných vzorků, kolem 3200 nt (Obr. č. 6).



**Obr. č 6:** Výsledné fotografie PCR fragmentů. Vlevo jsou rozdílné délky exonu 9 a vpravo intronu 1 u jednotlivých kmenů. (M – japonský *B. mandarina* (Sapporo), E – evropský kmen *B. mori* (Europas 301), D – japonsko-čínský kmen *B. mori* (Daizo p50), K – genomický klon, 2002 z evropského *B. mori* kmenů 200 a 300)

### 3.4 Srovnání 3' konců genu *Ser2* u jiných kmenů bource se zaměřením na evropské kmene

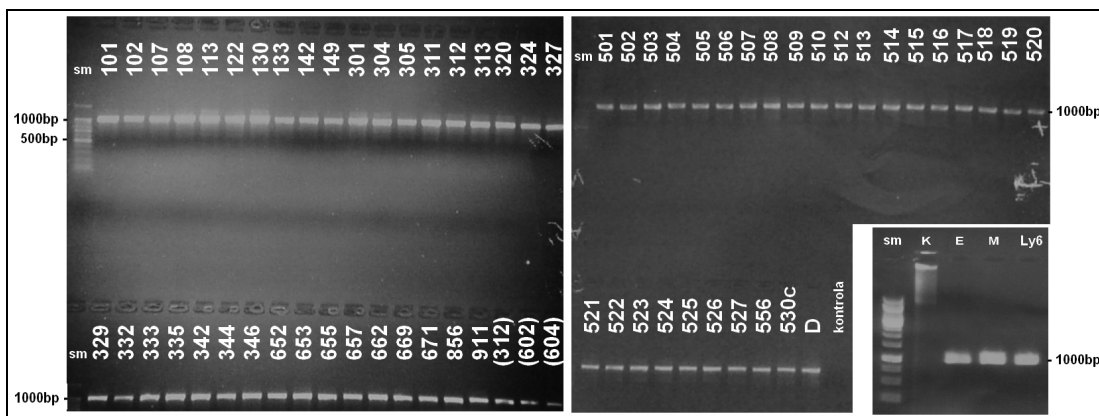
Zajímalo nás, zda se u některého z dalších kmenů bource evropského původu vyskytuje „ancestrální“ uspořádání exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 9a, 10a, 11a, 8b, 9b?, 10b?, 11b?) zjištěné u alely C. Exony 9b?, 10b?, 11b? jsou naznačeny v práci (Michaille et al. 1990a), ale námi nebyly potvrzeny.

Původní hybrid mezi evropskými kmeny *B. mori* 200 a 300 dnes již v důsledku ukončení výzkumu na pracovišti University Claude Bernarda v Lyonu bohužel neexistuje. Analyzovali jsme proto všechny dostupné evropské kmene (celkem jsme získali 30 evropských kmenů ze sbírky dr. Tamury (URL č. 4) (Obr. č 7).

Primery byly navrženy tak, že v případě výskytu exonů 8b a 11a typických pro „ancestrální typ“ by se amplifikoval fragment přibližně dvojnásobné délky než je tomu v případě alely D (Obr. č 7).

Z celkového počtu 70 (30 evropských, 16 čínských, 11 japonských, 7 tropických, 5 hybridů, 1 japonská *B. mandarina*) (Příloha č. 1) analyzovaných kmenů nebyl nalezen žádný jedinec podobného uspořádání exonů jako u alely C hybridu evropského kmene 200 a 300.





**Obr. č 7:** Přehled výsledků kontroly 3' konce u vybraných 70 kmenů bourců. Všechny vzorky s čísly 100 a výše jsou japonské kmeny, 300 a výše čínské, 500 a výše jsou evropské kmeny a 600 a výše pochází z tropických oblastí. Ostatní jsou hybridy. Ve všech případech byl amplifikován jeden stejně dlouhý fragment, kromě alely C, která je na obrázku označena písmenem K (genomický klon 2002).

### 3.5 Fylogenetická analýza

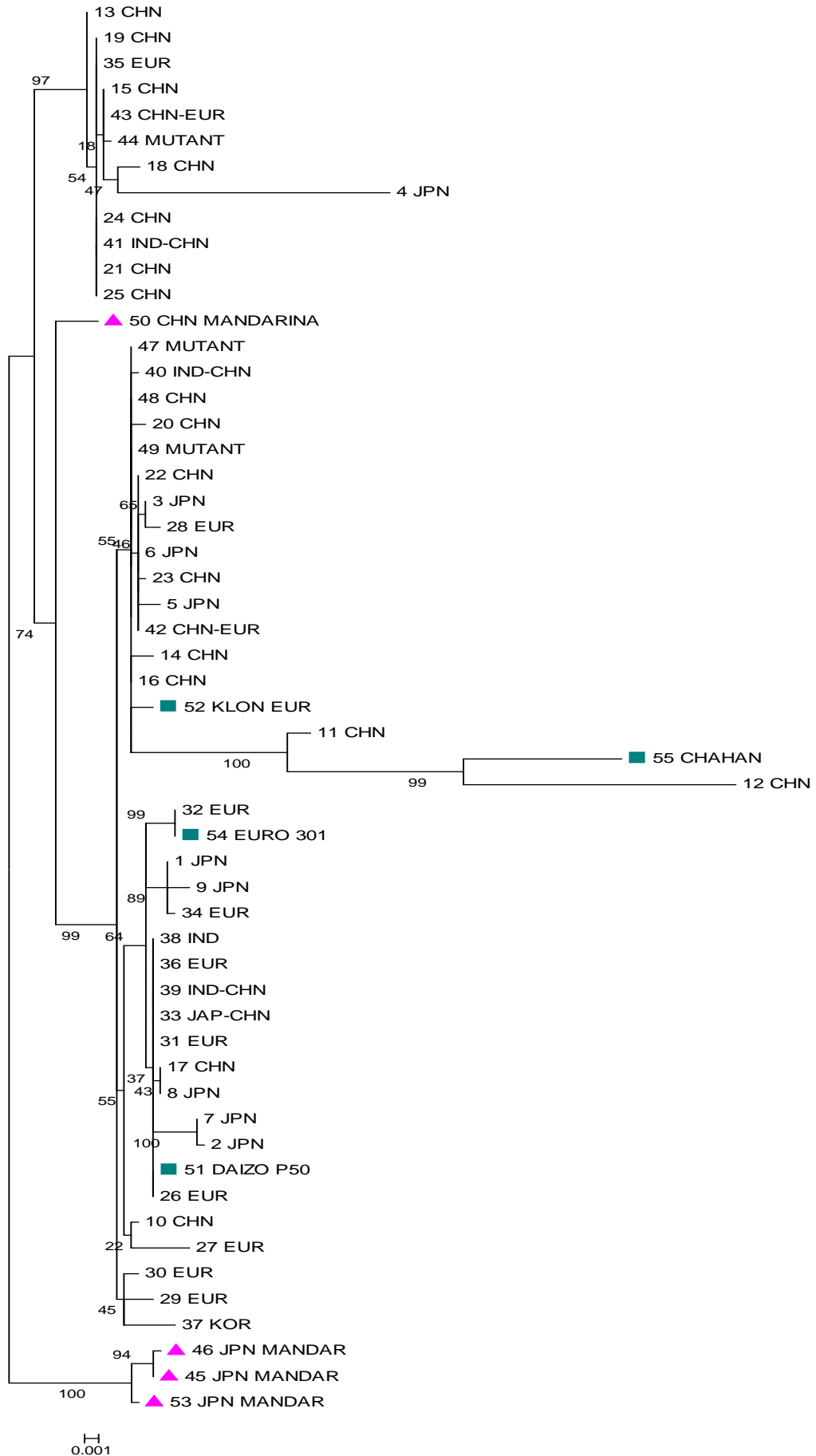
Zajímalo nás, jestli jsme schopni najít mezi dostupnými kmeny bource alelu blízkou alele C a zda se tato alela bude významně lišit od ostatních, což by odpovídalo naší hypotéze o tom, že představuje jakousi původní ancestrální formu genu *Ser2*. Provedli jsme tedy fylogenetickou studii, pro kterou byl vybrán unikátní úsek genu *Ser2* o velikosti kolem 2 kb (od exonu 6 po začátek exonu 9), který byl vhodný pro amplifikaci (Příloha č. 1).

Pro amplifikaci byl opět použit soubor DNA od Dr. Tamury (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japonsko). Z finančních důvodů byl zkoumaný počet kmenů snížen z 70 jedinců na 55 kmenů z různých geografických oblastí, spolu s našimi pěti výchozími vzorky. Získané sekvence byly použity pro sestavení alignmentu programem MEGA (Příloha. č. 3). Dendrogram byl sestaven za použití metody maximum likelihood, modelu GTR++G, 10 random starting tree, Best of NNI and SPR. Podpora hodnoty bootstrap byla 1000. Hodnoty bootstrapu jsou zobrazeny v procentech a jako outgroup byl zvolen japonský kmen *B. mandarina* z oblasti Sapporo.

Z dendrogramu na Obrázku 8 je zřejmé, že jedinci *B. mandarina* z Japonska vytvořili vlastní větev podpořenou 100% bootstrapem, a nebyl do ní zahrnut ani čínský *B. mandarina*. Naproti tomu sekvence *Ser2* z čínského *B. mandarina* se zařadila mezi kmeny *B. mori*. To poukazuje na odlišnost genu *Ser2* u japonského *B. mandarina* od ostatních studovaných kmenů, a také na to, že domestikovaný *B. mori* má evolučně blíže k čínskému *B. mandarina*.

Dendrogram dále poukazuje na rychlé evoluční změny v genu *Ser2* u čínských kmenů Chahan, 11chn a 12chn, jejichž oddělení je též vysoce podpořeno 100% bootstrapem. Sekvence alely C (sekvence 52) se zařadila mezi jiné kmeny *B. mori* a nezdá se tedy být oddělenou „ancestrální“ formou.

**Obr. č 8** (*následující strana*): Dendrogram znázorňující historii genu *Ser2*. Byl sestaven za použití metody maximum likelihood, modelu GTR+I+G, 10 random starting tree, Best of NNI and SPR, podpora hodnoty bootstrap byla 1000. Hodnoty bootstrapu jsou zobrazeny v uzlech. Jako outgroup byl použit japonský kmen *B. mandarina* z oblasti Sapporo. Fialové značky znázorňují divoké druhy. Zelené označují čtyři výchozí vzorky.



## 4. DISKUSE

### 4.1 Rozdíly v délkách intronů a exonu 9 mezi zkoumanými alelami

V předkládané diplomové práci jsem se nejprve zabývala sekvenováním 3 alel genu *Ser2* z *B. mori* a jedné alely *B. mandarina*, každá o velikosti asi 10 kb. Hlavní podíl na rozdílech ve velikosti intronů mají transpozony. V genu *Ser2* se nachází celkem 5 kopií transpozonu typu *Bm1*, jež se vzájemně značně liší svou velikostí a velikost jednotlivých kopií u nich kolísá i mezi námi zkoumanými alelami (v rozmezí okolo 50 nt). Jedna z alel, alela L, kterou mapoval Michaille et al. (1990), obsahovala dokonce transpozon o velikosti 4,4 kb. Transpozony jsou zodpovědné za značné rozdíly mezi jednotlivými kmeny *B. mori*. Transpozabilní elementy tvoří přibližně 35% geonomu (Futanashi et al. 2008).

Značné délkové rozdíly v rámci genu *Ser2* byly zjištěny rovněž v exonu 9, jenž je tvořen opakovanou sekvencí o délce 45 nukleotidů. Již Michaille et al. (1990a), již tuto sekvenci u genu *Ser2* objevili, předpokládali, že hraje významnou roli při vzniku délkového polymorfismu u tohoto genu v důsledku nerovnoměrnému crossing-overu. U jiného proteinu z hedvábí s opakovanou sekvencí fibroinu bylo popsáno nejméně 19 alel s rozdílnou délkou (Gage a Manning 1980).

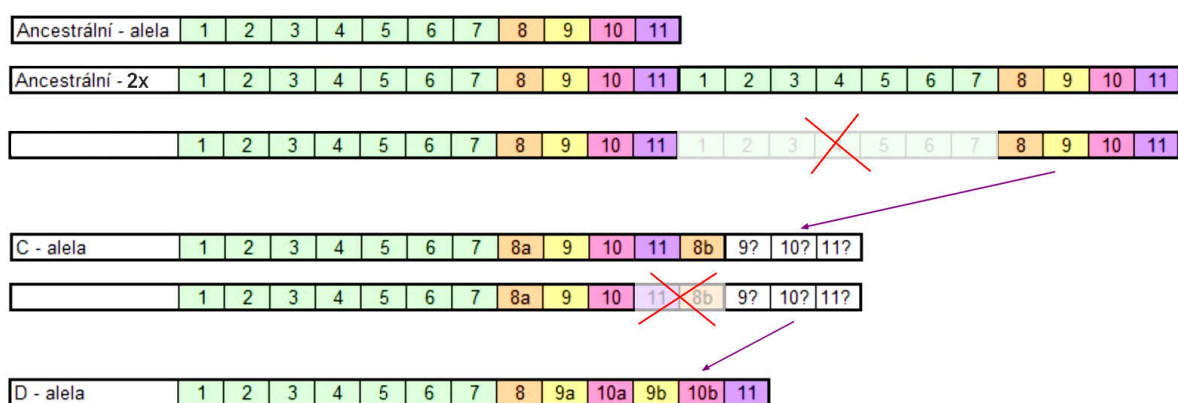
### 4.2 Rozdíly v uspořádání exonů na 3' konci genu

Alela C pocházející z genomových klonů evropského hybridu 200 a 300 (Michaille et al. 1990) se ukázala jako nejzajímavější, neboť obsahovala jiný typ uspořádání exonů, než byl popsán Kludkiewiczovou a ostatními (2009). Jedná se o alelu, jež by mohla představovat „ancestrální typ“ uspořádání exonů obsahující duplikaci exonů 8, 9, 10 a 11, neboť u kmene Daizo a posléze i u dalších kmenů byla zjištěna pouze duplikace exonu 9 a 10 (obr. 4). Je možné, že evropský kmen 200/300 *B. mori* byl odvozen od nějaké staré linie bource. Je málo pravděpodobné, že duplikace exonů u alely C mohla vzniknout inzercí exonů 11a a 8b do správné pozice vzhledem k exonům 10a a 9b. Málo pravděpodobná je i možnost, že se jedná o artefakt klonování a že k duplikaci došlo na úrovni genomového klonu, neboť opět by k inzerci muselo dojít do správné pozice. Michaille et al. (1990a) rovněž prováděli genomové Southern bloty, jež ověřily strukturu klonů. Nemůžeme však vyloučit jinou možnost, a sice že duplikace v alele C je důsledkem nezávislé složitější přestavby.

Michaille et al. (1990a) zaznamenali velké rozdíly mezi alelami na 3' konci genu a předpokládali, že se v této oblasti nachází jakýsi rekombinační „hotspot“. Při

analýze 3' konců genů u celé řady kmenů bourců jsme však srovnatelné rozdíly nezaznamenali a domníváme se, že se jednalo o specifickou vlastnost tohoto evropského kmene.

Jedna z možných hypotéz vývoje uspořádání exonů *Ser2* je, že došlo nejprve ke zdvojení genu *Ser2* a v průběhu evoluce tohoto genu došlo ke změnám v duplikované části, např. delecí rozsáhlého úseku od exonu 1b po exon 8b. Tato změna by dala vznik alele C, jelikož na základě restriční mapy Michaille et al. (1990a) předpokládáme, že za exonem 8b jsou další duplikované exony (Obr. č. 8). Následnou delecí exonu 11a a 8b v alele C mohla vzniknout alela D a všechny ostatní alely, které jsme zkoumali.



Obr. č 8: Hypotéza vzniku alely C a alely D

#### 4.4. **Fylogenetická analýza genu *Ser2***

Pomocí fylogenetické analýzy jsme se pokusili blíže objasnit historii genu *Ser2*. Zajímalo nás, zda je alela C hodně odlišná od jiných alel genu *Ser2* a zda jsme schopni najít mezi dostupnými kmeny bource jinou alelu blízkou alele C. Ke studii byl vybrán unikátní úsek genu *Ser2* o velikosti kolem 2 kb (a to od exonu 6 po začátek exonu 9), který byl vhodný pro amplifikaci vybraných 55 kmenů bource z různých geografických oblastí. Dendrogram byl vytvořen s pomocí metody maximum likelihood.

Z dendrogramu (Obr. č. 8) je patrné, že čínský *B. mandarina* (stejně jako alela C) se začleňuje mezi kmeny *B. mori*, kdežto japonský *B. mandarina* tvoří vlastní skupinu. To odpovídá předpokladům, že *B. mori* byl domestikován z čínského *B. mandarina* (Arunkumar 2006, Li 2010). Všeobecně se předpokládá, že *B. mori* byl domestikován až dlouho poté, co se japonský *B. mandarina* vlivem klimatických podmínek zřejmě během poslední doby ledové oddělil od čínské *B. mandarina* (Minato, 1966; Maekawa et al. 1988). Je málo pravděpodobné, že by se

mezi kmeny *B. mori* zachoval kmen nesoucí formu *Ser2*, jež by předcházela oddělení japonské formy *B. mandarina* od společné větve *B. mori*—čínský *B. mandarina*.

Kulturní kmeny *B. mori* nejsou v dendrogramu rozmístěny podle geografických oblastí výskytu – to může být způsobeno jednak důsledkem umělé selekce při vzniku kulturních kmenů, nebo křížením různých kmenů v posledních 50 letech, a také nedostatkem znaků (což plyne i z nízkých bootstrapů). Pro podrobnou analýzu by bylo potřeba většího počtu genů, nejlépe kódující proteiny související s metabolismem buňky nebo jinou základní „housekeepingovou“ funkcí. Avšak pro naši orientační informaci o vztahu alely C k jiným alelám je dostačující. Nezdá se, že by alela C mohla být ancestrální alelou. Naše výsledky podporují teorii, že duplikace u alely C není ancestrální formou, ale spíše důsledkem nezávislé složitější sekundární přestavby genu *Ser2*.

## 5. ZÁVĚR

Sledovali jsme polymorfismus genu *Ser2* u řady kmenů bource morušového.

Sekvenovali jsme (až na malé úseky opakované sekvence) 3 různé alely genu *Ser2* z *B. mori* a jednu alelu u *B. mandarina*, každou o velikosti okolo 10 kb.

Mezi sekvenovanými alelami byly zjištěny značné rozdíly v délkách intronů a exonu 9. Alela D má delší intron 1 o 200 nukleotidů a kratší intron 5 asi o 1000 nt oproti alele C. Naopak exon 9a má Daizo delší a to o 800 nt.

Alela C pocházející z dříve popsanych genomových klonů dnes již zřejmě vyhynulého evropského hybrida kmenů 200 a 300 se ukázala jako nejzajímavější a mohla teoreticky představovat „ancestrální typ“ uspořádání exonů.

Hledali jsme domnělý ancestrální typ uspořádání exonů u dalších 70 dostupných kmenů bource, avšak výsledek byl negativní.

Zkoumali jsme příbuznost alely C s jinými alelami dostupných kmenů bource a pomocí fylogenetické analýzy jsme zjistili, že patří mezi jiné linie bource morušového, což nepotvrzuje naši původní hypotézu o ancestrálním uspořádání původu této alely. Na základě našich výsledků se zdá, že duplikace nalezená u alely C není ancestrální formou, ale spíše je důsledkem nezávislé složitější sekundární přestavby genu *Ser2*.

Fylogenetická analýza úseku genu *Ser2* dále prokázala, že jedinci *B. mandarina* z Japonska vytvořili vlastní větev podpořenou velmi vysokým bootstrapem, do které nebyl zahrnut čínský *B. mandarina*. To poukazuje na odlišnost genu *Ser2* u japonské *B. mandarina* od *Ser2* z ostatních kmenů a to, že domestikovaný *B. mori* má evolučně blíže k čínské *B. mandarina*. Dendrogram dále poukazuje na rychlé evoluční změny v genu *Ser2* u čínských kmenů Chahan, 11chn a 12chn (též vysoce podpořeno 100% bootstrapem).

Zjištěný polymorfismus v genu *Ser2* je možno použít pro rozlišování kmenů bource.

Výsledky práce budou použity do širší studie, obsahující analýzu 6 jaderných genů, zaměřené na fylogenetické vztahy kmenů *B. mori* a *B. mandarina*.

## 6. SEZNAM LITERATURY

Akai H., Nagashima T., Aoyagi S. (1993) Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta drury* (*Lepidoptera: Saturniidae*) *Int. J. Insect Morphol.* 22: 497-506.

Arunkumar K. P., Metta M., Nagaraju J. (2006) Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkworm, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 419-427.

Astaurov B. L., Golysheva M. D., Rovinskaya I. S. (1959) Chromosome complex of Ussuri geographical race of *Bombyx mandarina* M. with special reference to the problem of the origin of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Cytology* 1: 327-332.

Banno Y., Nakamura T., Nagashima E., Fujii H., Doira H. (2004) M chromosome of the wild silkworm, *Bombyx mandarina* (n=27), corresponds to two chromosomes in the domestication silkworm, *Bombyx mori* (n=28). *Genome* 47: 96-101.

Filpula D. R., Lee S. M., Link R. P., Strausberg S. L., Strausberg R. L. (1990) Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Prog.* 6: 171-177.

Futanashi et al. (2008) Genome-wide screening and characterization of transposable elements and their distribution analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1046-1057.

Garel A., Deleage G., Prudhomme J. C. (1997) Structure and organization of *Bombyx mori* Sericin 1 gene and of the Sericin 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 469-477.

Hwang J. S., Lee J. S., Goo T. W., Yun E. Y., Sohn, H. R., Kim H. R., Kwon O. Y. (1999) Molecular genetic relationships between *Bombycidae* and *Saturniidae* based on the mitochondria DNA encoding of large and small rRNA. *Genet. Anal.* 15: 223-228.

Hyde N. (1984) The queen of textiles. *National Geographic* 165: 3-49.

Hyršl P. (2003) Dražší než zlato, *ABC* 13: 16-18.

Chang G., Kim H. J., D. Kaplan D., Vunjak-Novakovic G., Kandel A. (2007) *Eur. Spine J.* 16: 1848-1857.



Chikushi H. (1972) Genes and genetic stocks of the silkworm. Keigaku Publications, Tokyo. pp. 1-6.

Inoue S., Tanaka K., Tanaka H., Ohtomo K., Kanda T., Imamura M., Quan G. X., Kojima K., Yamashita T., Nakajima T., Taira H., Tamura T., Mizuno S. (2004) Assembly of the silk fibroin elementary unit in endoplasmic reticulum and a role of L-chain for protection of alpha1,2-mannose residues in N-linked oligosaccharide chains of fibrohexamerin/P25. Eur. J. Biochem. 271: 356-366.

Jiang Q. L. (1982) Origin and Speciation of Silkworm. Jiangsu Scientific and Technological Press.

Kawaguchi E. (1928) Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. I. Gametogenese von *Bombyx mori* L. und *B. mandarina* M. und ihrer Bastard. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 7: 519-552.

Kawaguchi E. (1934) Chromosome behaviour in tetraploid female of the silkworm. J. Seric. Sci. Jpn. 5: 73-79.

Kislingová I. (2006) Genetické aspekty chovu bource morušového (*Bombyx mori* L.). Bakalářská práce, PřF MU, Brno, 59 str.

Kludkiewicz B., Takasu Y., Fedic R., Tamura T., Sehnal F. and Zurovec M. (2009) Structure and expression of the silk adhesive protein *Ser2*. Insect Biochem. Mol. Biol. 39: 938-946.

Kodrík, D. (2000). Fyziologie hmyzu (učební texty). Entomologický ústav AVČR a BF, JCU v Českých Budějovicích, 220 str.

Li D., Guo Y., Sbal H., Tellier T., Wang J., Xiang Z., Xia Q. (2010) Genetic diversity, molecular phylogeny and selection evidence of the silkworm mitochondria implicated by complete resequencing of 41 genomes. BMC Evol. Biol. 10: 81.

Maekawa H., Takada N., Mikitani K., Ogura T., Miyajima N., Fujiwara H., Kobayashi M., Ninaki O. (1988) Nucleolus organizers in the wild silkworm *Bombyx mandarina* and the domesticated silkworm *B. mori*. Chromosoma (Historical Archive) 96: 263-269.

Manning R. F., Gage L. P. (1980) Internal structure of the silk fibroin gene of *Bombyx mori*. II. Remarkable polymorphism of the organization of crystalline and amorphous coding sequences. J. Biol. Chem. 255:9451-7.

Miao X. X., Xu S. J., Li M. H., Li M. W., Juany J. H., Dai F. Y., Marino S. W., Mills D. R., Zheng P. Y., Mita K. et al. (2005) Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 16303-16308.

Michaille J. J., Garel A. and Prudhomme J. C. (1989) The expression of five model silk gland specific genes is territorially regulated v during the larval development of *Bombyx mori*. *Insect. Biochem.* 19: 19-27.

Michaille J. J., Garel A., Prudhomme J. C. (1990a) Cloning and characterization of the highly polymorphic *Ser2* gene of *Bombyx mori*. *Gene* 86: 177-184.

Michaille J. J., Garel A., Prudhomme J. C. (1990b) Expression of *Ser1* and *Ser2* genes in the middle silk gland of *Bombyx mori* during the fifth instar. *Sericologia* 30: 49e60.

Minato M. (1966) The last viaduct of Japan Islands. *Earth Sci.* 85/86: 2-11 (in Japanese with English Summary).

Murakami A., Imai H.T. (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (*Bombycidae*, *Lepidoptera*). *Chromosoma* 47: 167-178.

Nakamura T., Banno Y., Nakada T., Nho S. K., Xü M. K., Ueda K., Kawarabata T., Kawaguchi Y. and Koga K. (1999) Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in a chromosome number and the occurrence of the a retroposon-like insertion in the arylphorin gene. *Genome* 42: 1117-1120.

Okamoto H., Ishikawa E., Suzuki Y. (1982) Structural analysis of sericin genes. Homologies with fibroin genes in the 50 flanking nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* 257: 15192-15199.

Padamwar M. N., Pawar A. P., Daithankar A. V., Mahadik K. R. (2005) Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *J. Cosmet. Dermatol.* 4: 250-257.

Sarovart S., Sudatis B., Meesilpa P., Grady B. P., Magaraphan R. (2003) The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 5: 193-198.

Sehna F. (2008) Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomol. Res.* 38: S1-S8.

Sehna F. and Akai H. (1990) Insect silk glands: Their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 19: 79-132.

Tahala K., Inoue S., Mizuno S. (1999) Hydrofobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 269-276.

Takasu Y., Yamada H., Tamura T., Sezutsu H., Mita K., Tsubouchi K. (2007) Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37:1234-40.

Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K. (2002) Isolation of free main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Bioch.* 66: 2715-2718.

Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Komoto N., Thomas J. L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme J.C., Couple P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18: 81-84.

Tomita M., Munetsuna H., Sato T., Adachi T., Hino R., Hayashi M., Shimizu K., Nakamura N., Tamura T., Yoshizato K. (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* 21: 52-56.

Xia Q., Zhou Z., Lu C., Xiang Z. (1998) Molecular phylogenetic study on the racial differentiation of *Bombyx mori* by random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Entomol. Sin.* 41: 32-40.

Yoshitake N. (1967) Investigation of Japanese silkworm origin. *Jpn. Silkworm Mag.* 37: 83-87.

Yoshitake N. (1968) Phylogenetic aspects on the origin of Japanese race of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 37: 83-87.

Yukuhiro K., Sezutsu H., Itoh M., Shimizu K., Banno Y. (2002) Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the wild mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol.* 19:1385-1389.

Zhaorigetu S., Yanaka N., Sasaki M., Watanabe H., Kato N. (2003) Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J. Photochem. Photobiol. B* 71: 11-7.

### **Internetové zdroje:**

URL č. 1: <http://www.chinaculture.org>

URL č. 2: <http://www.china.lu/en/discover-asia/traditional-arts-crafts/silk.htm>

URL č. 3: [http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20080107/TVN\\_Prednaska\\_9.pdf](http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20080107/TVN_Prednaska_9.pdf)

URL č. 4: <http://www.nises.affrc.go.jp/nisesDB/bombygen/tablemaster-eng.html#tables>

URL č. 5: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/summary/sci;325/5944/1058-a>

## 7. PŘÍLOHY

Příloha. č. 1: Přehled vybraných kmenu

Poř. č.	Kód	Kmen	Oblast	Voltinism	Moltinism
1	102	Skalo	Jpn	Uni	4
2	107	Chusuotsu	Jpn	Uni	4
3	122	Ryukyu multi-pupal cocoon(Kiaya)	Jpn	Uni	4
4	130	Wako	Jpn	Uni	4
5	133	Chusu	Jpn	Bi	4
6	142	Onishiki	Jpn	Bi	4
7	149	Yamato nishiki	Jpn	Bi	4
8	101	Akajuku	Jpn	Uni	4
9	113	Kokin	Jpn	Uni	4
10	301	Amoi moricaud	Chn	Uni	4
11	312	Kansen	Chn	Uni	4
12	313	Golden yellow	Chn	Uni	4
13	324	Chinese white cocoon	Chn	Uni	4
14	333	Y10	Chn	Uni	4
15	344	Shoko	Chn	Bi	4
16	346	209AB	Chn	Bi	4
17	606	Ringetsu	Chn	Multi	4
18	652	Choyo	Chn	Uni	3
19	662	Golden yellow cocoon of Shisen	Chn	Uni	3
20	669	Pentamolting black	Chn	Uni	5
21	305	C spherical cocoon	Chn	Uni	4
22	311	Kankoshaken	Chn	Uni	4
23	327	Shuko	Chn	Uni	4
24	332	Uryu	Chn	Uni	4
25	335	Daianko	Chn	Bi	4
26	504	Bagdad	Eur	Uni	4
27	507	Blanc des C'evennes	Eur	Uni	4
28	515	No.500	Eur	Uni	4
29	520	St.Julien	Eur	Uni	4
30	522	Yellow cocoon of Turkey	Eur	Uni	4
31	556	European No.16	Eur	Uni	4
32	653	European No.7 trimolter	Eur	Bi	3
34	526	y39	Eur	Uni	4
35	512	Black moth	Eur	Uni	4
36		LY6	Eur		
37	655	Trimolter of Korai	Korean	Uni	3
38	605	Pure Mysore	Ind	Multi	4
33		Daizo p50	Jpn-Chn	Uni	4
39	601	Annam	Ind-Chn	Multi	4
40	602	Cambodia(Fixed race)	Ind-Chn	Bi	4
41	604	Mysore	Ind-Chn	Multi	4
42	671	N.S	Chn-Eur	Uni	6
43	658	Sanko	Chn-Eur	Uni	3
44	856	Sawa J	Mutant		

45		Tsukuba - Japan mandarina	Jpn		
46		Tsukuba - Japan mandarina	Jpn		
47	919	w-2,ch,ms,nfad	Mutant		
48	667	Chogosan No.1	Chn	Uni	5
49	912	pe re,ch,Sph,Src-2	Mutant		
50		Chinese mandarina	Chn		
51		Daizo p50 kontrolní	Jpn-Chn		
52		Klon - hybrid 300 x 200	Eur		
53		Japan mandarina - Sapporo	Jpn		
54	530c	Chavancy301	Eur		
55	304	Chahan	Chn	Uni	4

Příloha. č. 2: Přehled primerů

Kód	Oblast genu	Primer	Sequence (5' → 3')	F/R	°C
1	Int1-Int2	BMBashaF	GGTCGAAAATGATACTAGAGC	F	57
		BM2exR	AGACAGCCAACGAGGAGGG	R	59
L		BMBashaF	GGTCGAAAATGATACTAGAGC	F	57
		Basha2R	CGCCCCTGATAATCAGTGGGGCAC	R	75
I		Ser1	ACGAGTCATCATGAAGATCC	R	55
		BMSer2	GCTCGTCTTTCAGATCTTCG	R	57
2	Int2-Ex3	Ty3F	GTGGTAGGACGTGTTTTGAGC	F	61
		BMSer2	GCTCGTCTTTCAGATCTTCG	R	57
J		Ty3F	GTGGTAGGACGTGTTTTGAGC	F	61
		Ex4Rev	GTCTTTCTCATATTCGCCTTC	R	57
S		Ex2Frw	GCGTGGCTGTGGTCAACG	F	57
		Ex4Rev	GTCTTTCTCATATTCGCCTTC	R	57
3	Ex3-Ex4	Spec1g2f	TGTTGGAGACAAATTAGAAG	F	51
		BMR Scan1b	AGAACTTGTCGTGGGTCC	F	53
4	Ex4-Ex5	BMF Scan45F	CGAAAAATACGGTGAAGAGG	F	55
		Exon5R	CAGTTTCGACTCTTCCTTG	R	53
4/5A		Ex5Frw	GAACAACGGCGGATCCTCC	F	59
		Basha4R	TTATTATGCTCTGAGGG	R	45
TA		Ex4Frw	AGCGACGGCATCTCATAACAGC	F	63
		Basha4R	TTATTATGCTCTGAGGG	R	45
T		Ex4Frw	AGCGACGGCATCTCATAACAGC	F	63
		Ex5Rev	CATATTTCTTTTCCTTTCCAG	R	55
5A	Ex5-Ex6	NewInF	GATAATTCAAATCGTATTCCG	F	55
		Basha4R	TTATTATGCTCTGAGGG	R	45
UA		NewInF	GATAATTCAAATCGTATTCCG	F	55
		Ex6Rev	CCTATAGGTCTGAAGATTCAGC	R	59
5B	Ex5-Ex6	Basha4F	GATATCCTCTCAAACAACCC	F	53
		Spec2gur	TCGCTGCCAGTTTCTCATCTT	R	63
6	Ex6-Ex8	BMF Scan3	GAAAGGAGAACTGTTGTAGG	F	55
		Phantom	CTGCCCTTACTTTGATTCACTC	R	61
V		BMF Scan3	GAAAGGAGAACTGTTGTAGG	F	55
		Ex9AR	GCTGGTCTTTATGGGTAGTGC	R	61
VB	Ex7-Ex9a	BMF Scan5	GGTTGAAAAGAATTCTGCCAGAG	F	63
		Ex9AR	GCTGGTCTTTATGGGTAGTGC	R	61
9N	Ex9a-Ex10a	Basha5B	CAGCAAAAACATAGACAAGCC	F	57
	Ex9a-Ex10b	End9R	ATTTCCGGCTAGATTCCGATTTGT	R	61
9A	Ex9a-Ex10a	Basha5B	CAGCAAAAACATAGACAAGCC	F	57
	Ex9a-Ex10b	Ex9R	CGGGAGTCATTTCGATCCAGAC	R	63
9B	Ex9a-Ex10a	Ex9BF	ACTACAAATCCGAATCTAGCC	F	57
	Ex9a-Ex10b	Ex9R	CGGGAGTCATTTCGATCCAGAC	R	63
Z		Ex9BF	ACTACAAATCCGAATCTAGCC	F	57
		Ser2RT	GTGATAGCCAATGATACACG	R	55
9C	Ex10b-Ex11	Ex3F	CGAGCACGTTCTACAAAAGCC	F	61
	Ex10a-Ex11	Ser2RT	GTGATAGCCAATGATACACG	R	55
10		Ex3F	CGAGCACGTTCTACAAAAGCC	F	61
		Ex10Rev	GTAATTCTTAGATTGCGAGC	R	53
W		Ex11F	GATGATAGCTCCGAGGAATG	F	57
		MandaR	GGTTAGTTTGCCTGAATGCC	R	59
11=>8	Ex11=>Ex8	Ex11F	GATGATAGCTCCGAGGAATG	F	57
		Phantom	CTGCCCTTACTTTGATTCACTC	R	61

F/R – směr primeru (forward, reverse); °C – teplota nasedání





















29_EUR	ATGTGGCTCTAGG
5_JPN	ATGTGGCTCTAGG
3_JPN	ATGTGGCTCTAGG
6_JPN	ATGTGGCTCTAGG
7_JPN	ATGTGGCTCTAGG
10_CHN	ATGTGGCTCTAGG
11_CHN	ATGTGGCTCTAGG
14_CHN	ATGTGGCTCTAGG
27_EUR	ATGTGGCTCTAGA
28_EUR	ATGTGGCTCTAGG
30_EUR	ATGTGGCTCTAGG
51_DALZO_F50	ATGTGGCTCTAGG
40_IND-CHN	ATGTGGCTCTAGG
17_CHN	ATGTGGCTCTAGG
18_CHN	ATGTGGCTCTAGG
32_EUR	ATGTGGCTCTAGG
37_KOR	ATGTGGCTCTAGG
43_CHN-EUR	ATGTGGCTCTAGG
20_CHN	ATGTGGCTCTAGG
42_CHN-EUR	ATGTGGCTCTAGG
45_JPN_MANDARINA	ATGTGGCTCTAGG
46_JPN_MANDARINA	ATGTGGCTCTAGG
8_JPN	ATGTGGCTCTAGG
9_JPN	ATGTGGCTCTAGG
21_CHN	ATGTGGCTCTAGG
22_CHN	ATGTGGCTCTAGG
23_CHN	ATGTGGCTCTAGG
24_CHN	ATGTGGCTCTAGG
25_CHN	ATGTGGCTCTAGG
33_JAP	ATGTGGCTCTAGG
55_CHAHAN	ATGTGGCTCTAGG
54_EURO_301	ATGTGGCTCTAGG
53_JPN_MANDARINA	ATGTGGCTCTAGG
52_KLON_EUR	ATGTGGCTCTAGG
36_EUR	ATGTGGCTCTAGG
47_MUTANT	ATGTGGCTCTAGG
34_EUR	ATGTGGCTCTAGG
12_CHN	ATGTGGCTCTAGG
39_IND-CHN	ATGTGGCTCTAGG
38_IND	ATGTGGCTCTAGG
41_IND-CHN	ATGTGGCTCTAGG
16_CHN	ATGTGGCTCTAGG
35_EUR	ATGTGGCTCTAGG
19_CHN	ATGTGGCTCTAGG
2_JPN	ATGTGGCTCTAGG
48_CHN	ATGTGGCTCTAGG
49_MUTANT	ATGTGGCTCTAGG
4_JPN	ATGTGGCTCTAGG
15_CHN	ATGTGGCTCTAGG
31_EUR	ATGTGGCTCTAGG
50_CHN_MANDARINA	ATGTGGCTCTAGG
26_EUR	ATGTGGCTCTAGG
44_MUTANT	ATGTGGCTCTAGG
13_CHN	ATGTGGCTCTAGG
1_JPN	ATGTGGCTCTAGG