

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Mohou samci bource morušového produkovat vitellogenin?

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. František Sehnal, CSc.

Konzultant bakalářské práce: MSc. Valeriya Zabelina, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Markéta Vrchotová

České Budějovice, 2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta VRCHOTOVÁ**
Osobní číslo: **Z12363**
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Mohou samci bource morušového produkovat vitelogenin?**
Zadávající katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vajíčka hmyzu povětšinou obsahují poměrně velké množství žloutku, který se vytváří jako previtelogenin v tukovém tělese a v menší míře ve folikulárních buňkách ovárií. Gen pro vitelogenin se exprimuje jen u samic, v případě bource morušového v kukle. U tohoto druhu však bylo zjištěno, že ovária implantovaná do housenek vytvářejí během kuklového vývoje vajíčka, která lze u partenogenních kmenů bource přimět k normálnímu vývoji. Cílem práce je zjistit, zda v tomto případě implantát indukuje expresi vitelogeninového genu i u samců, či zda je ve vajíčkách ze samců vitelogenin nahrazen nějakou jinou bílkovinou.

Etapy práce

1. hov bource morušového, v ideálním případě nepartenogenního i partenogenního kmene. Určení stupně vývoje a pohlaví u housenek v posledním larválním instaru.
2. Extirpace a implantace ovárií u larev, získání vajíček u čerstvě vylíhlých imág.
3. Extrakce bílkovin z homogenátu vajíček a jejich dělení pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu (SDS PAGE).
4. Částečné vyčištění bílkovin a izolace dominantní frakce (zřejmě produkt vitellogeninu).
5. Připravit vyčištěné bílkoviny pro hmotnostní analýzu, popsání jejího principu.
6. Analýza výsledků - zodpovězení položené otázky.

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 30

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Singh, Nitin Kumar et al. Vitellogenin from the Silkworm, *Bombyx mori*: An Effective Anti-Bacterial Agent. PLOS ONE, 2013, vol. 8, no. 9, article number e73005.

Qian, Cen et al. Identification and expression analysis of vitellogenin from silk-producing insect, *Actias selene* Hubner. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 2011, vol. 10, no. 6, s. 999-1010.

Ying, Lin et al. Vitellogenin and vitellogenin receptor gene of the silkworm *Bombyx mori*. ACTA ZOOLOGICA SINICA, 2005, vol. 51, no. 1, s. 117-125.

Yano, K et al. Vitellogenin gene of the silkworm, *Bombyx-Mori* - structure and sex-dependent expression. FEBS LETTERS, 1994, vol. 356, no. 2-3, s. 207-211.

Sato, Y, Yamashita, O. Synthesis and secretion of egg-specific protein from follicle cells of the silkworm, *Bombyx-Mori*. INSECT BIOCHEMISTRY, 1991, vol. 21, no. 2, s. 233-238.

Yamashita, O, Irie, K, Ohtsuki, Y. Ovarian development and embryogenesis in vitellogenin-deficient eggs from male hosts of silkworms. INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY PROCEEDINGS, 1980, vol. 16, s. 105.

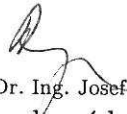
Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. František Sehnal, CSc.
Katedra fyziologie živočichů

Datum zadání bakalářské práce: 30. ledna 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2015


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUĎEJOVICÍCH
ZEMĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 3. března 2014

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích

.....
Markéta Vrchotová

Abstrakt:

Vajíčka bource morušového (*Bombyx mori*) získaná z vaječníků implantovaných do samčích hostitelů mohou po vyvolání umělé partenogeneze dokončit embryonální i postembryonální vývoj, přestože obsahují jen málo vitellogeninu. Ve své bakalářské práci jsem zjišťovala, jak se liší spektrum bílkovin u vajíček získaných ze standardních samic a z vaječníků implantovaných do samců a zda se liší spektrum bílkovin mezi několika partenoklony. Spektrum vaječných bílkovin jsem porovnávala pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí. Byl potvrzen rozdíl ve složení vaječných bílkovin u standardních vajíček a vajíček získaných z vaječníků implantovaných samcům. Bylo prokázáno, že ve vajíčkách vyvíjejících se v samčích hostitelích se vyskytovala pouze vysokomolekulární frakce (180 kDa), tedy těžká podjednotka vitellogeninu, zatímco ve vajíčkách samic byly patrné dvě podjednotky (180 a 42 kDa). Zároveň byla prokázána interakce transplantovaných gonád s prostředím příjemce. Všechny porovnávané partenoklony obsahovaly stejný pattern hlavních bílkovin vaječného žloutku, ale lišily se v některých vysokomolekulárních bílkovinných frakcích.

Klíčová slova: partenogeneze; partenoklon; vitellogenin; bourec morušový; elektroforéza bílkovin

Summary:

The eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, obtained from the ovaries implanted into male hosts are able to complete embryonic and post-embryonic development in spite of the very low amount of vitellogenin. Using polyacrylamide gel electrophoresis, I searched for differences between the protein spectra of eggs from standard females and the eggs from ovaries implanted into the males. I also examined the variability of protein spectra in the eggs of several parthenoclones. I confirmed great differences in the egg protein spectra between the eggs from females and those from the ovaries implanted into males. Both heavy (180 kDa) and light (42 kDa) subunits of vitellogenin were present in the eggs from females but only the heavy subunit of vitellogenin was found in the eggs developed in ovaries implanted into male hosts. Interesting interactions between transplanted gonads and the host milieu were observed. All compared parthenoclones contained similar patterns of the main yolk proteins but differed slightly in some high-molecular weight protein fractions.

Key words: parthenogenesis; parthenoclone; vitellogenin; silkworm; protein electrophoresis

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled.....	7
2.1. Identifikace vitellogeninu.....	7
2.1.1. Samičí pohlavní systém.....	7
2.1.2. Vývoj ovariol.....	8
2.1.3. Vývoj vajíčka.....	8
2.1.4. Vitellogeneze.....	8
2.1.5. Vitellogenin.....	9
2.1.6. Tukové těleso.....	9
2.2. Diapauza.....	9
2.3. Partenogeneze bource morušového.....	10
2.4. Využití partenogeneze pro studium vitellogeneze.....	11
3. Cíle práce.....	12
4. Metodika práce.....	13
4.1. Chov bource morušového.....	13
4.1.1. Příprava umělého krmení.....	14
4.1.2. Použité linie bource morušového.....	14
4.2. Transplantace vaječníků.....	15
4.3. Elektroforéza bílkovin.....	16
4.3.1. Extrakce bílkovin.....	16
4.3.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí (SDS – PAGE).....	17
5. Výsledky.....	22
5.1. Transplantace vaječníků.....	22
5.2. SDS-PAGE.....	23
6. Diskuze.....	25
7. Závěry.....	29
8. Literatura.....	30

1. Úvod

I drobní zástupci živočišné říše z třídy hmyzu mají pro člověka obrovský význam. Jsou významnou složkou ekosystémů a člověk je cíleně využívá v biologickém boji proti různým škůdcům, jako modelové organismy v genetice a v dalších oborech výzkumu a též jako zdroj řady produktů – medu, vosku, propolisu a v neposlední řadě i hedvábí. Ve své práci jsem se zaměřila na bource morušového (*Bombyx mori*) z čeledi *Bombycidae* z řádu *Lepidoptera*, který je dlouhá tisíciletí chován kvůli produkci hedvábí. Po objevu nylonu a jiných umělých vláken ve čtyřicátých letech minulého století se význam hedvábí snížil, přesto je však v řadě zemí hedvábnictví důležitým hospodářským odvětvím. Díky moderním metodám molekulární genetiky se také objevují zcela nové možnosti využití bource morušového, které jsou lákavé i pro nejnepělejší země (Japonsko, USA, Německo).

Abychom získali kvalitní hedvábí nebo jiné žádané produkty, je nutné v populaci bource udržet vhodný genotyp a zajistit jeho úspěšný přenos do dalších generací. Klonování genotypu bylo u bource umožněno objevením uměle vyvolané partenogeneze, při které vznikají linie samic se shodným genotypem. Udržení linií po několik let ve stejném stavu pomocí partenoklonů také usnadňuje umělé zásahy do genomu, zejména transgenezi, při které jsou do genomu vnášeny buď upravené geny, nebo geny z jiných organismů (Zabelina et al. 2015). Tak lze získat hedvábí s novými vlastnostmi nebo využít bource jako „bioreaktoru“ pro produkci vzácných bílkovin potřebných v biomedicinském výzkumu a perspektivně i v lékařství. Náhradou genů hedvábí za geny kódující vzácné proteiny můžeme dosáhnout jejich masové produkce a ekonomické dostupnosti. V hedvábnictví jsou zase využitelné geny, které způsobují, že hedvábí v UV světle fluoreskuje nebo je pevnější a pružnější. Ať už je cíl transgeneze jakýkoliv, podstatné je udržení žádoucího genotypu. S výhodou lze využít partenogenezi, jejímž výzkumem jsem se zabývala.

Ve své bakalářské práci jsem zkoumala vývoj vajíček ve vaječnicích přenesených ze samicích do samčích housenek. Vajíčka se v samcích plně vyvinou a jejich následný embryonální a postembryonální vývoj je umožněn umělou partenogenezí. Zjišťovala jsem, nakolik se liší bílkoviny uložené do vajíček během jejich tvorby v samicích a samcích. Měla jsem možnost využít několik partenoklonů a ověřit, jestli se jejich vaječné bílkoviny neliší od bílkovin ve vajíčcích standardních (nikoliv partenogenních) bourců.

2. Literární přehled

2.1. Identifikace vitellogeninu

Od 40. let minulého století bylo postupně zjištěno, že vývoj hmyzích vajíček závisí na dostatku bílkovin produkovaných v tukovém tělese a ukládaných do vajíček jako žloutek. První studie byly provedeny na plošticích a sarančích, u kterých se vajíčka vyvíjejí až ve stádiu imága, a jejichž vývoj závisí na juvenilním hormonu. U mnohých zástupců hmyzu s proměnou dokonalou, včetně řádu *Lepidoptera*, se vajíčka vyvíjejí už během kuklového vývoje. Příkladem publikace zaměřené na tvorbu a ukládání žloutku u bource morušového je práce autorů H. Doira a Y. Kawaguchi publikovaná v roce 1971. Srovnáním koncentrace bílkovin v hemolymfě normálních samic, samic s odstraněnými vaječníky a samců s transplantovanými vaječníky a následně srovnáním koncentrace bílkovin ve vajíčcích normálních samic a samců s transplantovanými vaječníky dospěli ke správnému závěru, že specifické samičí bílkoviny (larval female protein a pupal female protein) jsou sekretovány jinou tkání, než samotnými vaječníky, a popsali přenos těchto bílkovin z hemolymfy do žloutku v době zrání vajíček.

Problematice vývoje vajíček ve vaječnicích implantovaných do samců byla věnována značná pozornost zejména francouzskými, japonskými a ruskými badateli. Michel Lamy publikoval v sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století několik prací, např. Lama et al. 1975, Lama 1975, případně další. Zjistil, že vitellogenin se vyskytuje i v hemolymfě samců, ale v daleko menším množství, takže ho implantované vaječníky nejsou schopny z hemolymfy získat a zabudovat do žloutku. Dále poznamenal, že syntéza ekdysteroidů je kvantitativně a kvalitativně stejná u samců s implantovanými vaječníky i u normálních samic, proto jsou vajíčka získaná ze samců schopna prodělat normální embryonální vývoj.

2.1.1. Samičí pohlavní systém

Vaječníky dospělých samic bource morušového obsahují stovky ovariálních folikulů, které jsou uloženy v osmi trubicovitých ovariolách. Nové folikuly pravidelně vznikají blízko vrcholu ovariol a zralá vajíčka jsou uvolňována na druhém konci do oviduktu. Každý folikul obsahuje jeden oocyt a sedm podpůrných buněk (trofocytů), které obklopuje epitel tvořený vrstvou folikulárních buněk. Trofocyty jsou sesterskými buňkami oocyty, se kterým jsou spojeny cytoplazmatickými můstky. Trofocyty vytvářejí pro vznikající vajíčko cytoplazmu, buněčné organely a maternální determinanty, zatímco oocyty spočívají v profázi prvního meiotického dělení. Oocyty shromažďují a upravují prekurzory žloutku importované z hemolymfy prostřednictvím

folikulárních buněk. Další složky vaječného žloutku a pevný obal, chorion, vznikají činností folikulárních buněk. Během ovulace jsou zbytky trofocytů a folikulárních buněk odloučeny a zralé vajíčko pokračuje do oviduktu.

2.1.2. Vývoj ovariol

U larev se vaječníky nacházejí v osmém tělním článku těsně pod epidermis po obou stranách hřbetní cévy. Brzy po vylíhnutí larev jsou vaječníky od varlat k nerozeznání, což se mění během třetího instaru, kdy vaječníky získávají trojboký a varlata ledvinovitý tvar. Od třetího instaru jsou ve vaječnicích patrné ovariooly, které se prodlužují spolu s rostoucí larvou, až nakonec druhý den stádia kukly proniknou skrz stěnu vaječníku do tělní dutiny. Každá ovariola se skládá z terminálního filamentu, germária, vitellária a calyxu, který ústí do společného oviduktu.

2.1.3. Vývoj vajíčka

V germáriu procházejí oogonia třemi mitotickými děleními za vzniku osmi sesterských cystocytů vzájemně propojených kruhovými kanálky, kterými jsou do oocytu dopravovány organely, cytoplasma a některé maternální determinanty. Oocyt vzniká z jednoho cystocytu, ze zbylých sedmi vznikají trofocyty. Tento oktet je obalen vrstvou folikulárních buněk, oocyt leží na proximálním konci a podpůrné buňky na konci distálním. Následuje růst buněk, ukládání žloutku a tvorba chorionu. Po jeho dokončení degenerují trofocyty i folikulární buňky a hotové oválné vajíčko sestupuje do oviduktu. Tam dochází k oplodnění – spermie se do vajíčka dostane nepatrným kanálkem (tzv. mikropyle) v chorionu.

Jedna samice naklade přibližně 500 vajíček (záleží na rase bource morušového). Kladení probíhá ve večerních hodinách a přibližně 80 % vajec je položeno během čtyř hodin. Jednotlivá vajíčka jsou přibližně 1,2 mm dlouhá a 0,8 mm široká (Tazima, 1978).

2.1.4. Vitellogeneze

Vitellogeneze zahrnuje období rychlého růstu oocytů, během něhož jsou přijímány a ukládány jednotlivé složky žloutku (Pan et al. 1969, Hagedorn a Kunkel 1979), který tvoří zásobu energie pro budoucí embryo. Žloutek motýlů je tvořen bílkovinnými vezikuly, tukovými kapénkami a glykogenem. Tvorba žloutku trvá několik dní a oocyt během této doby zvětší svůj objem až stokrát. Významnou složkou bílkovinných vezikulů je vitellogenin, dále specifická bílkovina vajíček (ESP; egg-specific protein) a skupina 30 kDa bílkovin (Zhu et al. 1986). ESP je trimer o molekulové hmotnosti

225 kDa složený ze dvou těžkých (72 kDa) a jedné lehké podjednotky (64 kDa). Jeho syntéza probíhá ve folikulárních buňkách (Irie a Yamashita 1983).

Import bílkovin z hemolymfy do vyvíjejícího se vajíčka probíhá endocytózou za účasti membránové bílkoviny klathrinu ve folikulárních buňkách.

2.1.5. Vitellogenin

Vitellogenin je obecné označení specifických bílkovin, které jsou většinou syntetizovány extraovariálně v tukovém tělese (Pan et al. 1969, Izumi a Tomino 1983) a které jsou přijímány oocyty a ukládány jako hlavní složka vaječného žloutku, nazývaná vitellin. Ve velkém množství se vitellogeniny vyskytují pouze u samic (Pan et al. 1969, Zhu et al. 1986), ale pečlivé výzkumy odhalily malé množství i u samců. Izumi a Tomino (1980) vitellogenin bource morušového definovali jako glykolipoprotein o sedimentačním koeficientu 13,5 S a molekulové hmotnosti 440 kDa, který se skládá ze dvou těžkých (180 kDa) a dvou lehkých řetězců (42 kDa). Dále prokázali, že molekula obsahuje 3 % manózy, která se kovalentně váže pouze na těžší podjednotku, a 7,3 % tuků (z toho je 75 % fosfolipidů – fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin; k ostatním patří triacylglycerol, diacylglycerol a cholesterol).

2.1.6. Tukové těleso

Během vitellogeneze procházejí buňky tukového tělesa určitými změnami. Vedle jejich zásobní funkce spočívající v ukládání tuků a glykogenu jsou zdrojem řady bílkovin hemolymfy. Tukové těleso syntetizuje a vylučuje do hemolymfy také vitellogenin (Pan et al. 1969) a mikrovitellogenin (Cole et al. 1987). Obě tyto bílkoviny jsou kvantitativně specifické pro samice a jsou vývojově regulované. Tukové těleso dále syntetizuje lipophorin, který je složkou hemolymfy u samců i samic ve všech stádiích larválního vývoje i metamorfózy (Chino et al. 1981).

Tuky jsou ve vajíčkách ukládány v podobě bílkovinných vezikulů a tukových kapének. Tyto dvě složky do folikulů dodává vitellogenin a lipophorin. Vitellogenin je výhradně prekurzorem žloutku a v hemolymfě nemá jinou zdokumentovanou funkci. Je endocytován oocytem a přeměněn na bílkovinné tělísko žloutku bez pozorovatelné ztráty fosfolipidů či jiných částí.

2.2. Diapauza

Počet generací bource morušového za rok je určován hlavně dědičnými faktory. Z vajíček neprodávajících diapauzu se larvy líhnou při 25 °C přibližně za deset dní po

naklazení, zatímco embrya diapauzních vajíček zastavují svůj vývoj po dvou až třech dnech po naklazení a jsou schopna pokračovat ve vývoji, pouze pokud jsou vystavena po několik měsíců nízkým teplotám kolem 5 °C. Mezi kmeny, jejichž vajíčka neprodělávají diapauzu v každé generaci, existují bi- i polyvoltinní typy. Komerčně nejpoužívanější jsou bivoltinní typy. Počet generací za rok u nich může být ovlivněn měnícími se podmínkami prostředí (např. teplota a osvětlení) během časného vývoje rodičovské generace. Watanabe (1924, dle Tazima 1978) experimentálně potvrdil, že vývoj při 15 °C dává vzniknout vajíčkům bez diapauzy a inkubace při 25 °C dává vzniknout diapauzním vajíčkům. Samice bourců inkubované při 20 °C nakladly směs vajíček s diapauzou a bez diapauzy. Diapauzu ovlivňuje i teplota během zárodečného a časného larválního vývoje rodičů. Účinek teploty u ranějších larválních stádií je stejný jako účinek během embryonálního vývoje, avšak účinek teploty u pozdějších larválních stádií je opačný (vyšší teplota dává vzniknout vajíčkům bez diapauzy). Vliv na produkci diapauzních vajíček bivoltinních typů má také osvětlení. Nejméně 15 h světla každý den je nezbytných pro produkci dospělců, kteří budou klást 100% diapauzní vajíčka (Kogure 1933).

2.3. Partenogeneze bource morušového

Partenogeneze je způsob rozmnožování, při kterém se z neoplozených vajíček vyvíjí normální embryo. U bource morušového je spontánní partenogeneze velmi vzácná (Nagaraju et al. 2001), byly ovšem vyvinuty metody uměle vyvolané partenogeneze prostřednictvím tepelné aktivace (Astaurov 1940, dle Grenier et al. 2004).

Ameiotická partenogeneze – působením řízeného tepelného šoku (46 °C, 18 min) na neoplozená vajíčka se přeruší dělicí vřeténko v metafázi I a zabrání se redukčnímu dělení, čímž vzniká diploidní samičí pronukleus (Astaurov 1940, dle Klymenka 2001). Protože u samic bource morušového nedochází ke crossing-overu (Klimenko 1982 a 1990, dle Nagaraju et al. 2001), je pronukleus identický s mateřským genotypem. Stabilní klony je možné tímto způsobem udržovat po mnoho let bez viditelných změn.

Meiotická partenogeneze – šok mrazem (-11 °C) způsobí splnutí (nebo zabrání rozdělení) dvou geneticky identických haploidních samičích pronukleů vzniklých meiózou. Některé obsahují pohlavní chromozom Z, jiné chromozom W. Po splnutí dvou sesterských prvojader vznikne zygota s konstitucí ZZ nebo WW. Malá část samičích jedinců o genotypu ZZ přežívá, jsou homozygotní ve všech alelách, jejich plodnost je poměrně nízká. „Supersamice“ o genotypu WW nevznikají, neboť je tento genotyp letální - standardní genotyp samic je ZW (Terskaya a Strunnikov 1974, dle Nagaraju et al 2001).

Úspěšnost umělé partenogeneze je závislá na několika faktorech. Jedním z nich jsou vnější podmínky během chovu bource morušového. Zvláště v době oogeneze mohou značně ovlivnit vlastnosti oocyty a tím i schopnost vajíček prodělat partenogenetický vývoj. K dalším patří stáří vajíček či metoda aktivace partenogeneze, přesněji druh aktivátoru a způsob použití. V případě meiotické partenogeneze je limitujícím faktorem zabraňujícím vylíhnutí larev také haploidní počet chromozómů ve vajíčku. Larva se může vylíhnout jen z vajíčka, které je minimálně diploidní. Při kryoaktivaci ($-11\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) nízká teplota podporuje obnovu diploidního stavu po prvním meiotickém dělení haploidního samičího pronukleu (Vereyskaya a Terskaya 1986, dle Klymenka 2001), zatímco tepelný šok ($46\text{ }^{\circ}\text{C}$, 18 min) potlačuje první meiotické dělení, takže do druhého meiotického dělení vstupuje diploidní samičí pronukleus (Klymenko 2001). Schopnost dokončit partenogenetický vývoj mohou negativně ovlivnit i změny vaječné cytoplasmy způsobené aktivátorem.

2.4. Využití partenogeneze pro studium vitellogenese

Yamashita a Irie (1980) dokázali, že vitellogenin není nezbytný pro vývoj vajíček ani embrya. Vajíčka implantovaná samcům neobsahovala vitellogenin, ale po aktivaci umělé partenogeneze byla schopná normálního vývoje. Popsali také rozdíl mezi vajíčky získanými ze samic a vajíčky z vaječníků implantovaných samcům. Vajíčka ze samců byla méně početná a lehčí. Obsah aminokyselin, RNA a tuků byl přibližně stejný, ale vajíčka získaná ze samců obsahovala více glykogenu a zhruba o 20 % méně bílkovin než kontrolní vajíčka samic.

Zabelina a Klymenko (2008) předpokládali, že potenciál pro partenogenezi objevený u vajíček samců je založen na genetické determinaci partenogeneze vaječníků dárčovských klonů. Také zjistili, že po transplantaci vajíček z monovoltinných linií s vysokou schopností prodělat termální partenogenezi do monovoltinných samců z kmene s nulovou schopností prodělat partenogenezi jsou získána vajíčka nediapauzní a vylíhnutí jedinci jsou všichni samičího pohlaví, jak je u termální partenogeneze obvyklé. Doroshenko a Klymenko (2010) potvrdili, že existuje možnost klonování genotypů kmenů s nulovou schopností termální partenogeneze pomocí transplantace vaječníků do partenoklonů.

3. Cíle práce

Ověřit složení žloutku u vajíček samic a u vajíček získaných z vaječníků implantovaných do samců.

Srovnat složení žloutku u vajíček samic několika linií bource morušového.

Etapy práce

1. Chov bource morušového, v ideálním případě nepartenogenetického i partenogenetického kmene. Určení pohlaví a stupně vývoje gonád u housenek v posledním larválním instaru.
2. Extirpace a implantace vaječníků u larev, získání vajíček z čerstvě vylíhlých imág.
3. Extrakce bílkovin z homogenátu vajíček a jejich dělení pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu (SDS PAGE).
4. Srovnání elektroforegramů, na základě literatury rozlišit vitellogeniny z tukového tělesa od jiných bílkovin.

Dle časových možností případně možný navazující výzkum

5. Částečné vyčištění bílkovin a zhotovení „Western blotů“.
6. Vybrané bílkoviny připravit pro hmotnostní analýzu nebo sekvenování aminokyselin N-konce (popis principu těchto metod).
7. Identifikace bílkovin srovnáním s dostupnými databázemi – průkazné zodpovězení otázky, které geny tyto bílkoviny kódují (genom bource byl sekvenován, dostupné jsou též soubory cDNA z řady orgánů a vývojových období).

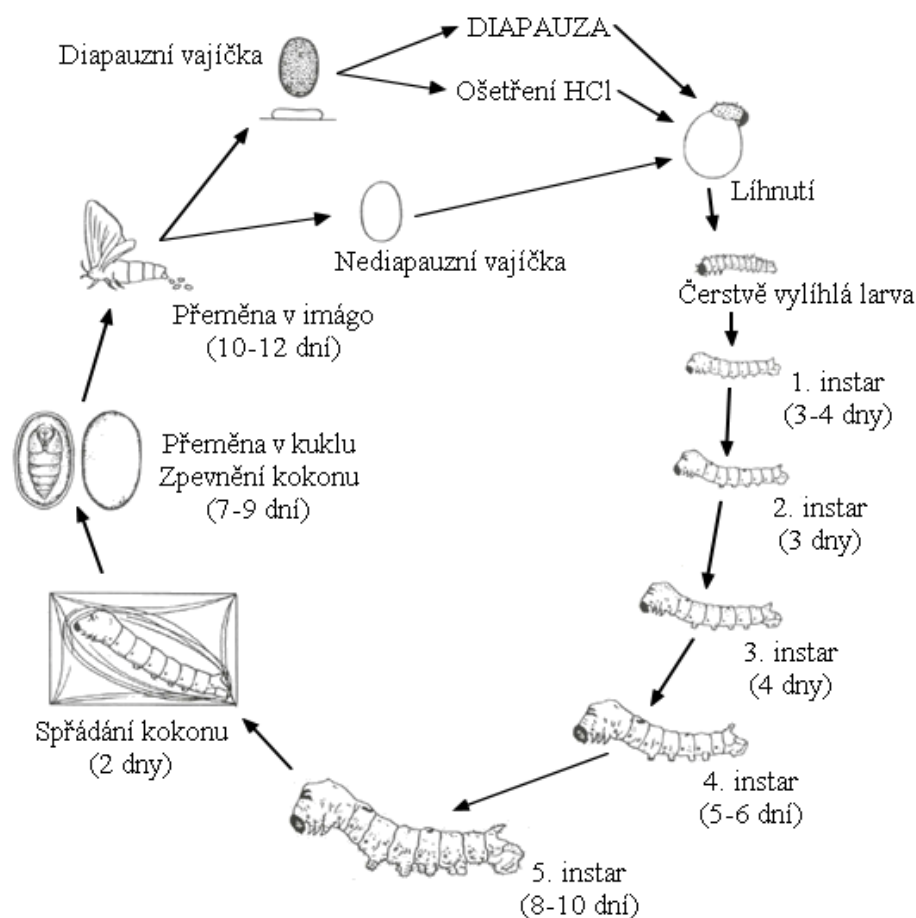
4. Metodika práce

4.1. Chov bource morušového

Bourec morušový snadno podléhá infekcím, proto byla vajíčka v počáteční fázi embryonálního vývoje ošetřena parami formaldehydu po dobu 5 minut (do Petriho misky s vajíčky byl položen filtrační papír nasycený 40% formaldehydem). Poté byla vajíčka inkubována v Petriho miskách při teplotě 25 °C a relativní vzdušné vlhkosti přibližně 90 %. Vzdušná vlhkost byla udržována pomocí nádoby s vlhčenou buničinou umístěnou v inkubátoru a během prvního a druhého instaru také vlhčeným filtračním papírem umístěným v každé Petriho misce.

Po vylíhnutí byly housenky krmeny umělou potravou, později i čerstvými listy morušovníku (*Morus sp.*). Teplota byla udržována na 27 °C. Pravidelně byl odstraňován trus housenek i zbytky krmení a byla udržována čistota misek. Od třetího instaru byly housenky přemísťovány do větších plastových nádob. S housenkami bylo manipulováno nejprve štětečkem, později pinzetou (Tazima, 1978).

Zobecněný životní cyklus bource morušového jsem dle Tazimy (1978) shrnula do následujícího diagramu (Obr. 1).



Obr. 1: Životní cyklus bource morušového

4.1.1. Příprava umělého krmení

1 díl práškového krmení (dodavatel Agricultural Research Council - Research Unit for Apiculture and Sericulture, Padova, Itálie) byl zalit 3 díly vroucí vody. Směs byla pečlivě promíchána a povařena ve vodní lázni po dobu 20 minut. Po vychladnutí byla uchovávána v lednici při teplotě 4-5 °C.

4.1.2. Použité linie bource morušového

P29 – diploidní partenoklon s vysokou životaschopností, několika genetickými markery a vysokou schopností aktivace vývoje pomocí termální partenogeneze; monovoltinní (Astaurov 1973).

P14 – partenoklon vzniklý křížením kmene P29 s bivoltinním kmenem PVN (Itálie, Padova) s téměř stoprocentně účinným partenogenetickým rozmnožováním (Klimenko et al. 2013).

P178 – diploidní partenoklon jedinečný svou schopností prodělat spontánní partenogenezi; monovoltinní.

Soviet 5 (S5) – velmi nízká schopnost termální partenogeneze; marker pohlaví – pigmentovaná vajíčka dávají vzniknout samicím, vajíčka bez pigmentu dávají vzniknout samcům (Strunnikov 1971).

K23 – identický s S5, ale pochází z italské kolekce (S5 – Kharkiv, Ukrajina).

4.2. Transplantace vaječníků

Postup transplantace vaječníků byl popsán dřívějšími badateli, já jsem použila protokol Spiridonové et al. (1987). K transplantaci byly používány housenky ve čtvrtém instaru, které byly před zákrokem narkotizovány ponořením na 20 minut do vlažné vody. Nejprve byly extirpovány vaječnky dárců. Z narkotizované housenky byla vystřižena dorzální část pátého abdominálního segmentu, která byla upevněna pomocí entomologických špendlíků v misce vylité parafinem a zalita fyziologickým roztokem. Vaječník byl opatrně vyjmut a uložen na 5-20 min v chladném fyziologickém roztoku.

Narkotizovaní příjemci obou pohlaví byli jednotlivě nastřiženi dorzálně mezi pátým a šestým abdominálním segmentem a do vzniklého otvoru byl mezi gonády vsunut jeden vaječník tak, aby nedošlo k poškození vlastních gonád. Rána byla osušena buničinou a ošetřena ethanolem.

Po transplantaci vaječníků byly housenky umístěny v čisté plastové nádobě při pokojové teplotě. Krmeny byly stejným způsobem jako dosud. V pátém instaru byl do nádoby vložen zmačkaný papír kvůli zlepšení prostoru pro tvorbu kokonů.

4.3. Elektroforéza bílkovin

4.3.1. Extrakce bílkovin

Po vylíhnutí imág jsem z vaječníků ponechaných *in situ* nebo implantovaných extirpovala zralá vajíčka (tj. s pevným obalem zvaným chorion). V případě samců jsem odstříhla zadeček v místě připojení hrudi a vajíčka jsem vytlačila na tkaninu. Tkaninu s vajíčky jsem napnula na skleněnou nálevku a opatrným tlakem špičkou ukazováčku za současného splachování tenkým proudem vody jsem vajíčka protlačila do sběrné kádinky. Několikrát jsem vajíčka propláchla vodou a po jejich usazení ke dnu kádinky jsem slila přebytečnou vodu a nechala jsem vajíčka osušit na vzduchu na kousku filtračního papíru. Po osušení jsem vajíčka vložila do mikrozkuavek a uchovávala je při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Při odebrání implantátu u samic jsem pracovala pod binolupou. Nastříhla jsem podélně zadeček na ventrální straně a přichytila jsem kutikulu entomologickými špendlíky do misky vylité parafinem. Implantát, který tvořil nepřichycený shluk uprostřed těla, jsem přenesla na filtrační papír a nechala jsem ho na vzduchu oschnout. Vlastní vajíčka samic jsem odstříhla v místě připojení ovariol ke kutikule a přenesla jsem je na filtrační papír. Po oschnutí jsem implantát a vlastní vajíčka vložila do mikrozkuavek a uchovávala je při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10 vajíček z každé mikrozkuavky (Tab. 1) jsem pomocí teflonového tloučku roztřela v čisté mikrozkuavce se 100 μl extrakčního pufru (10 mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS). Poté jsem mikrozkuavky zahřála v termostatu na $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 min a následně jsem je centrifugovala při 14 000 otáčkách 2x 20 min za teploty $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant jsem mikropipetou převedla do čistých mikrozkuavek, které jsem uchovávala při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jako kontrolu jsem použila normální nakladená vajíčka, která jsem homogenizovala a uchovávala stejným způsobem.

Tab. 1: Přehled vzorků extrahovaných bílkovin

Označení	Dárce	Příjemce	Pohlaví příjemce	Vajíčka
C1	P29	K23	samec	P29
C3	P14	K23	samec	P14
C4*	–	–	–	P14
C7*	–	–	–	S5 (F)
C8*	–	–	–	S5 (M)
C11	P178	P29	samice	P29
C12	P178	P29	samice	P178
C13*	–	–	–	P178
C14	S5	P14	samice	P14
C15	S5	P14	samice	S5
C16	S5	P29	samice	P29
C17	S5	P29	samice	S5

* kontrola; F – female; M - male

4.3.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí (SDS – PAGE)

Princip: Téměř všechny analytické elektroforézy bílkovin v polyakrylamidovém gelu jsou prováděny za takových podmínek, které zajistí disociaci bílkovin na jejich jednotlivé podjednotky, a tak zabrání jejich shlukování. Před nanesením vzorků na gel musí být bílkoviny denaturovány. Běžně se používá iontová povrchově aktivní látka, dodecylsírán sodný (SDS), za přítomnosti redukujícího činidla (např. 2-merkptoethanol nebo dithiotreitol) společně se zahřátím. Denaturované polypeptidy na sebe naváží SDS a získají tak záporný náboj. Protože je množství navázaného SDS téměř vždy úměrné molekulové hmotnosti polypeptidu a nezávislé na jeho primární struktuře, pohybuje se komplex SDS-polypeptid v gelu stejnou rychlostí, kterou by se pohyboval samotný polypeptid. Užitím velikostního markeru je možné odhadnout velikost zkoumaného polypeptidu.

SDS-PAGE probíhá v diskontinuálním systému pufrů, tzn. pufr pro přípravu gelu se liší svým pH a iontovou silou od pufru v nádrži. Komplex SDS-polypeptid se po připojení zdroje napětí pohybuje v elektrickém poli skrz polyakrylamidový gel k anodě. Po migraci skrz zaostřovací gel o vysoké pórovitosti vytvoří komplexy tenkou vrst-

vičku na začátku rozdělovacího gelu. Schopnost diskontinuálního systému pufrů soustředit všechny komplexy ve vzorku do velmi malého objemu značně zvyšuje rozlišení SDS-polyakrylamidových gelů.

Diskontinuální systém pufrů, který je široce používán, byl původně vytvořen Ornsteinem (1964) a Davisem (1964). Vzorek a zaostřovací gel obsahují Tris-Cl (pH 6,8), pufr sloužící jako elektrolyt obsahuje Tris-glycin (pH 8,3) a rozdělovací gel obsahuje Tris-Cl (pH 8,8). Všechny složky systému obsahují 0,1% SDS (Laemmli 1970). Chloridové ionty vzorku putují v elektrickém poli zaostřovacího gelu nejrychleji, zatímco neutrální molekuly glycinu nejpomaleji. Mezi nimi se nacházejí polypeptidy ze vzorku, které jsou ukládány na rozhraní zaostřovacího a rozdělovacího gelu. Vyšší pH rozdělovacího gelu podporuje ionizaci glycinu a výsledné glycinové ionty migrují skrz nakupené polypeptidy a cestují dál těsně za chloridovými ionty. Uvolněné komplexy SDS-polypeptid se pohybují skrz rozdělovací gel o jednotném napětí i pH a jsou oddělovány podle velikosti.

Polyakrylamidové gely jsou složeny z řetězců polymerizovaného akrylamidu, které jsou zesíťovány dvojfunkčním činidlem N,N'-methylene-bis-acrylamidem. Efektivnost sítě SDS-polyakrylamidových gelů závisí na koncentraci akrylamidu použitého při výrobě gelu a na intenzitě zesíťování. Polymerizace akrylamidu bez síťovacího činidla tvoří vazké roztoky, které nemají praktické využití. Zesíťování bisakrylamidem přidává gelu tuhost a pevnost v tahu a vytváří póry, skrz něž musí komplexy SDS-polypeptid projít. Velikost pórů klesá se zvětšujícím se poměrem bisakrylamid : akrylamid a dosahuje minima, když je poměr přibližně 1:20. Mnoho polyakrylamidových gelů je odléváno o molárním poměru bisakrylamid : akrylamid 1:29, který se ukázal být schopným rozdělit polypeptidy lišící se svou velikostí jen o 3 % (Sambrook a Russell 2001).

Reaktanty:

- 30% acrylamide mix (30% Acr/Bis)
- 10% dodecylsírán sodný (SDS)
- Tris base, HCl, glycin
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) – zrychluje polymerizaci katalyzováním tvorby volných radikálů z peroxodisíranu amonného (APS); nízké pH polymerizaci potlačuje
- 10% peroxodisíran amonný (APS) – poskytuje volné radikály potřebné k polymerizaci
- Destilovaná H₂O

Roztoky a pufr:

- Blue Protein Ladder CEB-P-0110-250 (Cental European Biosystems)
- Vzorkový pufr: 50 mM Tris-Cl (pH 6,8), 100 mM dithiotreitolu, 2% SDS, 0,1% bromfenolové modři, 10% glycerol
- Elektrodotový pufr: 25 mM Tris, 250 mM glycinu (pH 8,3), 0,1% SDS

Přístroje: forma na gel, zdroj elektrické energie.

Postup:

1. Příprava rozdělovacího gelu

- Sestavila jsem aparaturu na elektroforézu a formu na gel podle návodu.
- V čisté kádince jsem smíchala jednotlivé složky gelu (Tab. 2). Po přidání TEMED jsem okamžitě obsah kádinky promíchala pipetou a opatrně ho přenesla do formy.
- Formu jsem naplnila zhruba 3 mm pod hřebínek a gel jsem překryla vrstvou destilované vody, abych vytlačila případné vzduchové bubliny.
- Gel jsem nechala v klidu asi 30 min při pokojové teplotě.
- Po ztuhnutí gelu jsem opatrně vylila destilovanou vodu z povrchu a gel jsem osušila kouskem buničiny.

Tab. 2: 12% rozdělovací gel o výsledném objemu 15 ml

Složky gelu	Objem (ml)
H ₂ O	4,9
30% Acr/Bis	6,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8
10% SDS	0,15
10% APS	0,15
TEMED	0,01

2. Příprava zaostřovacího gelu

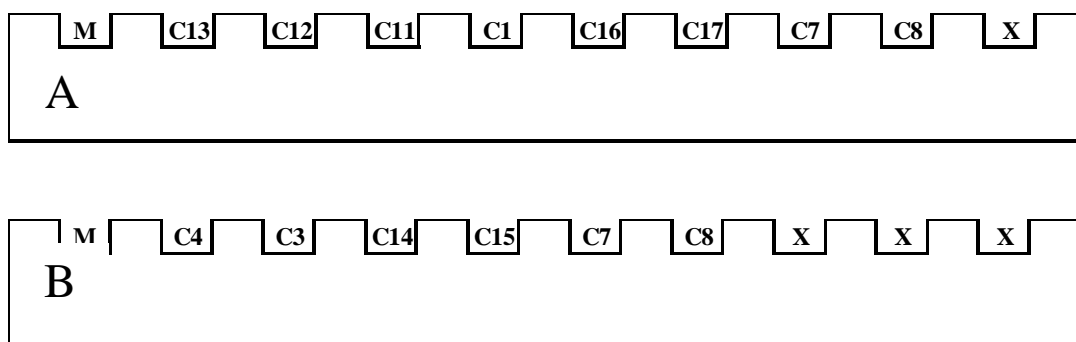
- V další čisté kádince jsem smíchala jednotlivé složky gelu (Tab. 3). Po přidání TEMED jsem okamžitě obsah kádinky promíchala pipetou a opatrně ho přenesla do formy nad rozdělovací gel.
- Do formy jsem opatrně zasunula čistý hřebínek a zaostřovacím gelem jsem vyplnila vzniklé mezery.
- Gel jsem nechala v klidu asi 30 min při pokojové teplotě.

Tab. 3: 5% zaostřovací gel o výsledném objemu 6 ml

Složky gelu	Objem (ml)
H ₂ O	4,1
30% Acr/Bis	1,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,75
10% SDS	0,06
10% APS	0,06
TEMED	0,006

3. Příprava vzorku

- Z připravených vzorků bílkovin uchovávaných při –20 °C jsem postupně odpipetovala po 30 µl roztoku do čistých mikrokumavek. Do každé mikrokumavky jsem přidala 30 µl vzorkového pufru a směs jsem vložila na 5 min do termostatu (98 °C).
- Opatrně jsem vytáhla hřebínek z gelu a jednotlivé jamky jsem vysušila proužkem buničiny.
- Vnitřní a vnější část nádrže jsem zalila elektrodovým pufrům.
- Do první jamky jsem nanasla 4 µl markeru, do ostatních jsem nanasla po 60 µl vzorku (Obr. 2). Prázdné jamky jsem vyplnila 60 µl vzorkového pufru.



Obr. 2: Rozvržení vzorků na gelu A a B
M – marker, X – prázdná jamka

4. Průběh elektroforézy

- Po nanesení vzorků a dolití elektrodového pufru jsem elektroforetický aparát připojila ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza probíhala 3 h při 80 V.

- Po odpojení od zdroje elektrického napětí jsem vyjmula gely z nádrže, odstranila jsem skla a vložila jsem gely do barvicích misek s destilovanou vodou.

5. Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue

- Připravila jsem si barvicí roztok rozpuštěním 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 100 ml roztoku metanolu a kyseliny octové (500 ml metanolu, 400 ml H₂O, 100 ml ledové kyseliny octové). Barvicí roztok jsem přefiltrovala přes filtrační papír.
- Polyakrylamidový gel v plastové misce jsem zalila barvicím roztokem do úplného ponoření a nechala jsem ho alespoň 4 h při pokojové teplotě na třepačce.
- Po obarvení jsem slila barvicí roztok a gel jsem přenesla do čisté misky s roztokem metanolu a kyseliny octové bez barviva. Při pokojové teplotě jsem ho nechala na třepačce přes noc.
- Gely jsem opláchla destilovanou vodou a uchovávala jsem je ponořené ve vodě v plastových miskách při 4 °C.

5. Výsledky

5.1. Transplantace vaječníků

Celkem jsem provedla 94 transplantací vaječníků do samců různých linií bource morušového a 101 transplantací vaječníků do samic. Úmrtnost operovaných bourců během dalšího vývoje byla velká. Nejvíce jedinců uhynulo před zakuklením na bakteriální nákazu, úhyn během metamorfózy byl ojedinělý. V šesti případech se implantát neuchytil a nebyl nalezen, u jedné z vylíhlých samic bez implantátu byla nedovyvinutá a zakrnělá vlastní vajíčka. Přehled získaných vzorků zralých vajíček lze vyčíst z následujících tabulek (Tab. 4, Tab. 5).

Tab. 4: Přehled provedených transplantací do samců.

Transplantace	Počet operací	Imága	Imága s implantátem
SAMCI příjemci:			
P29 → K23	48	1	1
P14 → K23	23	4	2
P29 → K23, S5	10	0	0
P29 → W1pnd	3	0	0
P29 → 55-4	1	0	0
P5D, P178 → S5	9	0	0
CELKEM	94	5	3

Tab. 5: Přehled provedených transplantací do samic.

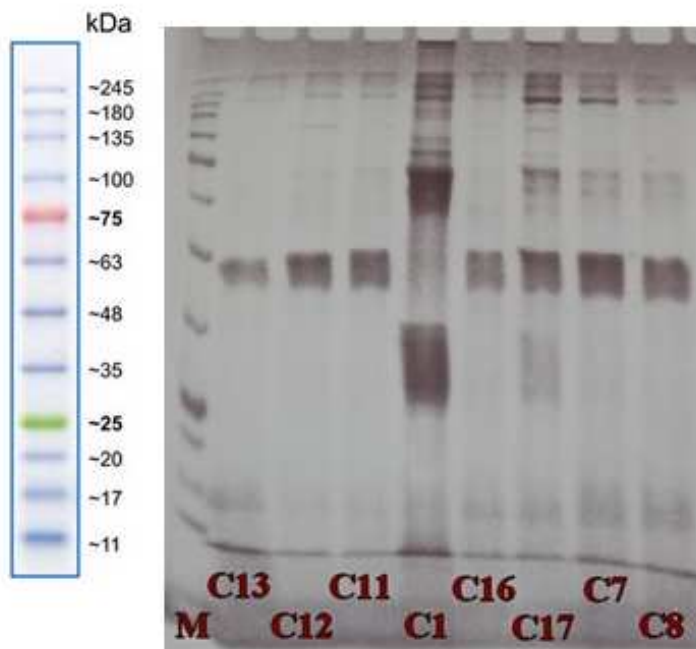
Transplantace	Počet operací	Imága	Imága s implantátem
SAMICE příjemci:			
K23, S5 → P29	15	3	3
55-4, S5, W1pnd → P29	9	1	1
P178 → P29	10	6	4
S5 → P14	6	4	3
S5 → P29	6	2	1
P29, P14 → K23	39	0	0
P29 → P14	8	0	0
P5D → P29	8	0	0
CELKEM	101	16	12

5.2.SDS-PAGE

Rozdíl mezi obsahem bílkovin ve vajíčkách z vaječníků *in situ* (vajíčka označovaná SF, standard females) a vajíčkách vyvíjejících se v samčích hostitelích (označovaná IM, implanted into males) byl na obarveném gelu jasně patrný (Obr. 3, Obr. 4). Jednotlivé frakce byly identifikovány na základě jejich velikosti a vzájemné polohy v souladu s publikacemi (Yamashita a Irie 1980, Telfer 2009). Ačkoliv byla frakce obsahující těžší podjednotku vitellogeninu (180 kDa) viditelná i ve vajíčkách IM (dráhy C1 a C3), frakce obsahující lehčí podjednotku vitellogeninu (42 kDa) v nich téměř chyběla. Nejzřetelnější byly ve vajíčkách IM frakce obsahující ESP (72 kDa a 64 kDa) a skupinu 30 kDa bílkovin, které u samic intenzitou zbarvení jednoznačně předčil vitellogenin.

Nezjistila jsem žádný významný rozdíl v obsahu a složení hlavních bílkovin žloutku mezi vajíčky SF a vajíčky IF (implanted into females) implantovaných do samic. U vzorků C13, C12 a C11 jsem pozorovala ovlivnění vajíček IF od dárkyně P178 prostředím příjemkyně implantátu z linie P29. Vzorek C12 obsahoval vajíčka IF od dárkyně P178 a měl by tedy obsahovat stejné frakce jako kontrolní vzorek C13 obsahující SF vajíčka P178. Vzorek C12 však obsahoval tři frakce, které se u kontroly nevyskytovaly, za to se objevily také u vzorku C11, který zastupoval vlastní vajíčka samice P29 vyvíjející se v přítomnosti implantátu P178.

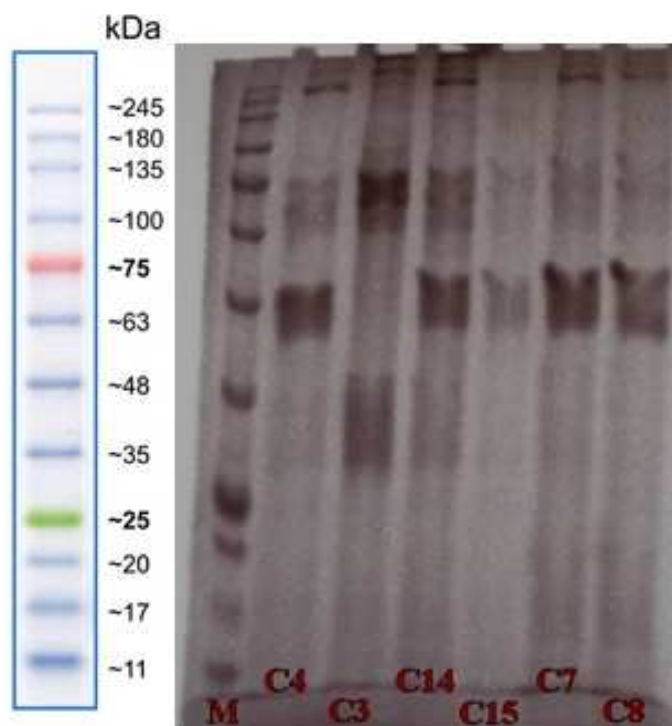
Vzorek C17 z vajíček IF z bourců P29 obsahoval slabě patrnou frakci srovnatelnou s frakcí skupiny 30 kDa bílkovin viditelnou u vajíček IM, ale ani kontrola, ani vlastní vajíčka vyvíjející se v přítomnosti implantátu S5 tuto frakci patrnou neměla.



Obr. 3: SDS-PAGE gel A

M – marker, C13 – SF P178 kontrola, C12 – IF P178 v P29, C11 – VR P29 (implantát P178), C1 – IM P29 v K23, C16 – VR P29 (implantát S5), C17 – IF S5 v P29, C7 – SF S5f kontrola, C8 – SF S5m kontrola

SF – standard female, IF – implanted into female, IM – implanted into male, VR- vajíčka recipienta, f, m – female, male (označení genetickým pohlavním markerem ve stádiu vajíčka)



Obr. 4: SDS-PAGE gel B

M – marker, C4 – SF P14 kotrola, C3 – IM P14 v K23, C14 – VR P14 (implantát S5), C15 – IF S5 v P14, C7 – SF S5f kotrola, C8 – SF S5m kotrola

SF – standard female, IF – implanted into female, IM – implanted into male, VR – vajíčka recipient, f, m – female, male (označení genetickým pohlavním markerem ve stádiu vajíčka)

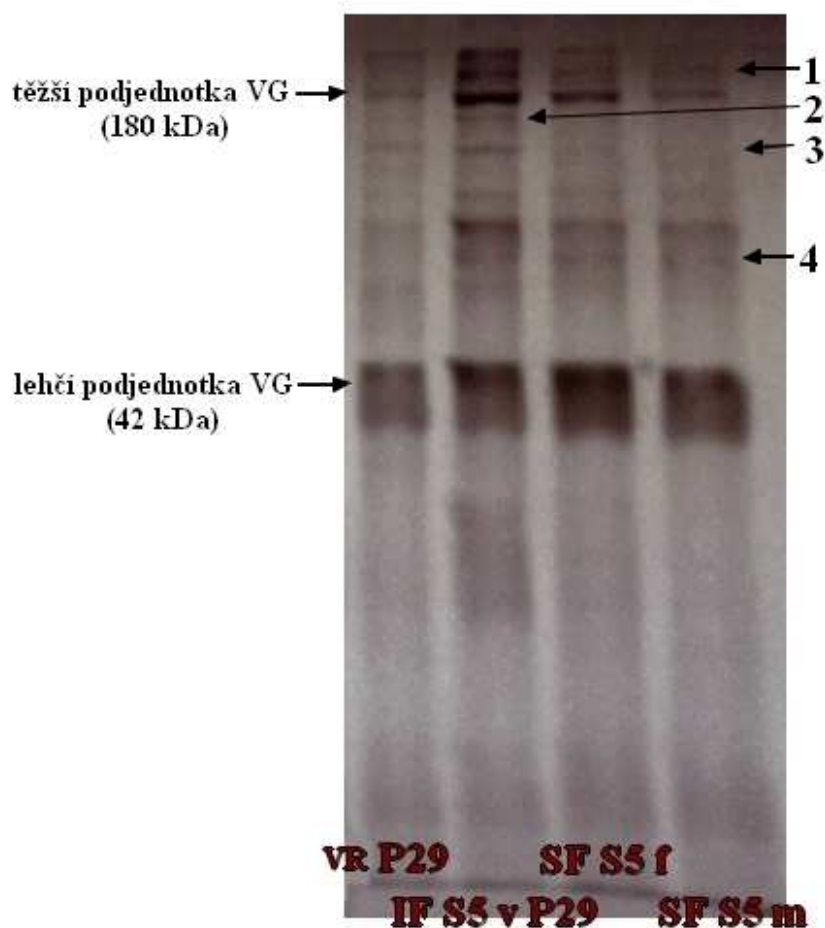
6. Diskuze

Průkopníkem ve studiu vitellogeneze a zvláště pak vývoje vajíček v samčích hostitelích byl Yamashita (1980, 1983, 1986), který dokázal, že vajíčka transplantovaná do samců (IM) se po vyjmutí z dospělce liší od vajíček standardních samic (SF) absencí vitellogeninu. Dále zjistil, že SF i IM vajíčka obsahují „egg specific protein“ (ESP), který vzniká ve folikulárních buňkách, a také skupinu 30 kDa bílkovin. Jejich množství je podle Yamashity (1986) v IM vajíčkách srovnatelné s množstvím v SF vajíčkách. Po vyvolání umělé partenogeneze Astaurovovou metodou (1940, dle Klymenka 2001) jsou IM vajíčka schopná normálního embryonálního i postembryonálního vývoje. Moje práce potvrzuje, že lehčí podjednotka vitellogeninu u IM vajíček chybí, ale na polyakrylamidovém gelu byla u IM vajíček viditelná frakce obsahující těžší podjednotku vitellogeninu. Její přítomnost by bylo nutné dále ověřit imunologickou reakcí. Již dříve bylo dokázáno, že se vitellogenin v malém množství vyskytuje i v hemolymfě samců (Lamy et al. 1975), ale není činností vaječníků zabudováván do vaječného žloutku. Domnívám se tedy, že samci jsou schopni tvorby pouze těžší podjednotky vitellogeninu, což omezuje jeho celkovou funkčnost. Obsah ESP a skupiny 30 kDa bílkovin u IM vajíček byl zřetelně vyšší než u SF vajíček, u IM vajíček tak zaujímají volné místo po chybějícím vitellogeninu.

Singh et al. (2003) studovali antibakteriální aktivitu vitellogeninu proti dvěma bakteriím a zjistili, že vitellogenin lze použít pro jejich detekci v napadeném organismu. Vajíčka IM neobsahující vitellogenin by tak měla být náchylnější k bakteriálním infekcím. Bylo by zajímavé tuto hypotézu otestovat porovnáním vitality vajíček standardních samic a vajíček implantovaných do samců a jejich náchylnost podléhat bakteriálním infekcím.

Rozdíl ve spektru bílkovin u dvou partenogenetických linií (P178 a P29) bource morušového jsem zmínila ve výsledcích. Rozdíl ve spektru bílkovin mezi pohlavně se rozmnožujícím kmenem S5 a partenoklonem P29 je patrný z Obr. 5. Všechny čtyři vzorky obsahovaly vajíčka zrající v samicích, takže lze podle hmotnostního markeru odhadnout frakce podjednotek vitellogeninu. Frakce 1 a 4 se vyskytují pouze u vajíček SF S5 a ne u vlastních vajíček P29 vyvíjejících se v přítomnosti implantátu, zatímco frakce 3 se nalézá pouze u vajíček recipienta P29. Pokud jsou ale implantovány vaječnický S5 do partenoklonu P29, spektrum bílkovin se rozšíří o frakci 3, která se do vajíček dostala z hemolymfy příjemce vaječnicku. Podobné výsledky obdržela i Zabelina (2009) při porovnávání spektra bílkovin hemolymfy a vajíček. Frakce 2 je jedinečná pro vajíčka S5 implantovaná do samice P29, standardní vajíčka ani jednoho kmene ji neobsahují. Je možné předpokládat, že mezi vaječnický dárce a prostředím příjemce dochází ke složitějším interakcím, díky nimž vznikají nestandardní bílkoviny. Další poznatky o ovlivňování složení bílkovin vaječného žloutku u im-

plantovaných vaječníků by mohlo přinést např. porovnání SF vajíček kmene K23 a linie P178 a vajíček P178 implantovaných do obou pohlaví K23. Toto porovnání jsem nemohla provést, protože žádná samice K23 s implantovanými vaječnými P29 při mém výzkumu nedosáhla dospělosti.



Obr. 5 : Porovnání standardních vajíček partenogenetického a nepartenogenetického kmene:

VG – vitellogenin; SF – standardní vajíčka; IF - implanted into female, VR – vajíčka recipienta, f, m – female, male (označení genetickým pohlavním markerem ve stádiu vajíčka)

Vzhledem k tomu, že na základě elektroforeogramu nelze bílkoviny jednoznačně identifikovat, navazující práce by měla být zaměřena na vyčištění jednotlivých bílkovin a jejich připravení k sekvenování či hmotnostní analýze. Srovnání výsledků s dostupnými databázemi by umožnilo identifikovat zásobní bílkoviny žlutku, popřípadě by objasnilo vznik nové frakce bílkovin u implantovaných vajíček.

Rozdíly v množství různých vaječných bílkovin v závislosti na pohlaví příjemce implantátu vaječníků naznačují, že jsou v závislosti na pohlaví různě aktivní promotory

příslušných genů. Laboratoře zabývající se transgenezí bource usilovně hledají účinné promotory stimulující transkripci v definovaných orgánech (např. v tukovém tělese) a definovaném čase (např. v první polovině vývoje kukly). Až budou geny bílkovin vajíček identifikovány, bude možné využít výsledky mé práce i tímto způsobem.

7. Závěry

S využitím monovoltinních linií bourců byla prokázána shoda ve složení hlavních zásobních bílkovin (tj. vitellogenin, egg specific protein, skupina 30 kDa bílkovin) žloutku u vajíček, která se vyvinula ve vaječnicích standardních nebo partenogenetických samic. Porovnávané partenogenetické linie (P178, P29, P14) se lišily v obsahu některých vysokomolekulárních bílkovinných frakcích.

Byl potvrzen vývoj vajíček ve vaječnicích transplantovaných z jedné larvy do druhé. Pokud byla příjemcem samičí larva, bylo spektrum vaječných bílkovin stejné, jako ve vajíčkách z ovarii *in situ* a navíc obsahovalo některé složky typické pro linii příjemce. V samčích příjemcích se spektrum hlavních vaječných bílkovin zřetelně lišilo od spektra ve vajíčkách vyvinuvších se ve standardních či partenogenetických samičích, ať již *in situ* nebo po implantaci do samičí larvy. Bylo prokázáno, že ve vajíčkách vyvíjejících se v samčích hostitelích se vyskytovala pouze vysokomolekulární frakce (180 kDa), tedy těžká podjednotka vitellogeninu, zatímco ve vajíčkách samic byly patrné obě podjednotky (180 a 42 kDa).

Získané výsledky splňují cíle práce a doplňují údaje získané pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu některými jinými autory. Tato metoda je velmi prospěšná, avšak neposkytuje jednoznačný důkaz identity bílkovin a příslušného genu. Proto jsem bílkoviny přenesla na nitrocelulózovou membránu, aby mohly být použity pro částečné sekvenování aminokyselin nebo hmotnostní analýzu. Tyto práce budou zadány jiným pracovištím a nejsou proto zahrnuty v předložené bakalářské práci.

8. Literatura

Davis B. J. (1964). Disc Electrophoresis - II Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121, 404-427. DOI 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x.

Doira H., Kawaguchi Y. (1972). Changes in Haemolymph and Egg Protein by the Castration and Implantation of the Ovary in *Bombyx mori*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*. 17(1), 119-127. ISSN 0023-6152.

Grenier AM., Rocha M. Da, Jalabert A., Royer C., Mauchamp B., Chavancy G. (2004). Artificial parthenogenesis and control of voltinism to manage transgenic populations in *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*. 50(8), 751-760. DOI 10.1016/j.jinsphys.2004.06.002.

Hagedorn H. H., Kunkel J. G. (1979). Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annual Review of Entomology*. 24, 475-505. DOI 10.1146/annurev.en.24.010179.002355.

Irie K., Yamashita O. (1983). Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochemistry*. 13(1), 71-80. DOI 10.1016/0020-1790(83)90066-5.

Izumi S., Tomino S. (1980). Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*. 10(2), 199-208. ISSN 0965-1748.

Izumi S., Tomino S. (1983). Vitellogenin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*: Separate mRNAs encode two subunits of vitellogenin. *Insect Biochemistry*. 13(1), 81-85. DOI 10.1016/0020-1790(83)90067-7.

Klymenko V. V. (2001). Parthenogenesis and Cloning in the Silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and Prospects. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. 70(3), 155-165. DOI 10.11416/jibs2001.70.155.

Klymenko V. V., Lysenko N. G., Liang H. (2013). Parthenocloning in genetics and breeding of the silkworm. *Animal Breeding and Genetics*. 47, 40-56.

Kogure M. (1933). The Influence Of Light And Temperature On Certain Characters Of The Silkworm, *Bombyx Mori*. *Journal of the Dept of Agriculture, Kyushu Imperial University*. 4(1), 1-93. ISSN 0368-1831.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680-685. DOI 10.1038/227680a0.

Lamy M. (1975). Vitellogenesis, Vitellogenin and Vitellin in the Males of Insects - a Review. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. 7(5), 311-321. DOI 10.1080/01688170.1984.10510107.

Lamy M., Julien-Laferriere N., Lavenseau L. (1975). Protein Vitellogenesis in Males Silkworm *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera*). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L Academie des Sciences Serie D*. 280(11), 1393-1395. ISSN 0567-655X.

Nagaraju J. G., Klimenko V., Couble P. (2001). The Silkworm, *Bombyx mori*: a model genetic system. In: Reeve E. C. R. (ed.). *Encyclopedia of genetics*. Chicago: Fitzroy Dearborn Publishers, s. 219-239. ISBN 1 884964 36 6.

Ornstein L. (1964). Disc Electrophoresis - I Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121, 321-349. DOI 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x.

Pan M. L., Bell W. J., Telfer W. H. (1969). Vitellogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body. *Science*. 165(3891), 393-394. DOI 10.1126/science.165.3891.393.

Sambrook J., Russell D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969577-4.

Singh N. K., Pakkianathan B. C., Kumar M., Prasad T., Kannan M., König S., Krishnan M. (2013). Vitellogenin from the Silkworm, *Bombyx mori*: An Effective Anti-Bacterial Agent. *Plos One*. 8(9), e73005. DOI 10.1371/journal.pone.0073005.

Tazima Y. (ed.) (1978). *The Silkworm: an important laboratory tool*. Tokyo: Kodansha Ltd.

Telfer W. H. (2009). Egg Formation in *Lepidoptera*. *Journal of Insect Science*. 9(50), 1-21. DOI 10.1673/031.009.5001.

Yamashita O., Irie K. (1980). Larval Hatching from Vitellogenin-deficient Eggs Developed in Male Hosts of the Silkworm. *Nature*. 283, 385-386. DOI 10.1038/283385a0.

Zabelina V. (2009). Parthenocloning of the Silkworm by Donor Ovary Cultivation in the Male Host. Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine. Disertační práce.

Zabelina V. Y., Klimenko V. V. (2008). Ovary transplantation in the silkworm *Bombyx mori* L.: Parthenocloning by eggs produced in male recipient. *Sericologia*. 48, 123-128.

Zabelina V., Klymenko V., Tamura T., Doroshenko K., Liang H., Sezutsu H., Sehnal F. (2015). Genome engineering and parthenocloning in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biosciences*, v tisku.

Zhu J., Indrasith L. S., Yamashita O. (1986). Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 882(3), 427-436. DOI 10.1016/0304-4165(86)90267-9.