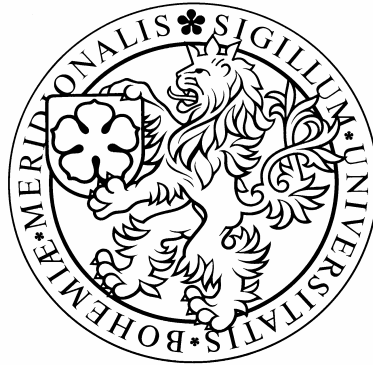


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra medicínské biologie



Bc. Barbora Sedláčková

## **Vliv sericinů na kvalitu hedvábného vlákna**

Magisterská diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. František Sehnal, CSc.

České Budějovice, 2009

Sedláčková, B. (2009): Vliv sericinů na kvalitu hedvábného vlákna [The effect of sericines on quality of silk fibre], Mgr. Thesis in Czech – 67 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The silk produced by caterpillars is a composite polymer of several proteins. H-fibroin, L-fibroin and P25 glycoprotein form the silk filament, the inner sericines join the filaments and the surface sericines glue the fibers together when a cocoon is spun. Composition of silk filaments seems to remain identical during the development, as indicated by sustained expression of the L-fibroin, P25 and H-fibroin genes. However, the change in fiber function occurs concurrently with a transition of the expression profile of the sericine genes. The study demonstrates that silk fiber properties are changed throughout larval life of *Galleria mellonella*.

Finanční podpora:

Grant ME 907 programu Kontakt „Integrovaný výzkum hmyzího hedvábí umožněný mezinárodní spoluprací“. Magisterská práce byla vypracována v Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR a v laboratořích Department of Biology na University of California v Riverside s použitím přístrojů těchto pracovišť.

Prohlašuji, v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem předloženou magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2009

.....  
Barbora Sedláčková

Moje poděkování patří Prof. RNDr. Františku Sehnalovi, CSc. za odborné vedení této práce a pracovníkům jeho laboratoře. Dále bych chtěla poděkovat Prof. Cheryl Y. Hayashi a Matthew A. Collinovi, oba Department of Biology, University of California, Riverside za milé přijetí a umožnění práce v jejich laboratořích, Ing. Oxaně Habuštové PhD. za poskytnutí prostor na přípravu vzorků, pracovníkům laboratoře elektronové mikroskopie pod vedením Ing. Jany Nebesářové, CSc., v neposlední řadě děkuji také Bc. Davidu Markovi za velkou pomoc při statistickém hodnocení výsledků.

Oceňuji možnost práce v Entomologickém ústavu Biologického centra Akademie věd ČR a v laboratořích Department of Biology na University of California v Riverside.

# Obsah

1 Úvod.....	6
2 Literární přehled – základní informace .....	7
2.1 Hedvábí .....	7
2.1.1 Syntéza a sekrece hedvábí u housenek .....	7
2.1.2 Struktura hedvábného vlákna .....	7
2.1.3 Hedvábnictví – produkce a využití hedvábí člověkem .....	10
2.1.4 Fyzikální vlastnosti hedvábí .....	11
3 Materiál a metodika .....	12
3.1 Modelové organismy .....	12
3.1.1 Chov <i>Galleria mellonella</i> .....	12
3.1.2 Stáří larev a výběr larev <i>Galleria mellonella</i> .....	12
3.1.3 Chov <i>Bombyx mori</i> .....	14
3.1.4 Stáří a výběr larev <i>Bombyx mori</i> .....	14
3.1.5 Juvenoidy.....	15
3.2 Měření mechanických vlastností hedvábí.....	15
3.2.1 Metodika odběru a uchycení vlákna .....	15
3.2.2 Měření průměru vláken.....	16
3.2.3 Mechanické vlastnosti vláken.....	18
3.2.4 Tensile testing – namáhání v tahu .....	19
3.3 Statistika.....	21
3.3.1 Analýza variance .....	21
3.3.2 Kruskal-Wallisův test .....	22
3.3.3 T-test a Mann-Whitney U test.....	23
3.4 Elektronová mikroskopie .....	23
3.4.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	23
3.4.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) .....	25
4 Výsledky.....	26
4.1 Statistické vyhodnocení .....	26
4.1.1 Fyzikální vlastnosti vláken <i>Galleria mellonella</i> .....	28
4.1.2 Fyzikální vlastnosti vláken <i>Bombyx mori</i> .....	43
4.2 Elektronová mikroskopie .....	48
4.2.1 TEM.....	48
4.2.2 SEM.....	48

5 Diskuse .....	51
5.1 Měření fyzikálních vlastností hedvábí.....	51
5.1.1 Smysl měření.....	51
5.1.2 Měření hedvábných vláken housenek .....	52
5.2 Analýza výsledků měření.....	53
5.2.1 Průměr vlákna .....	53
5.2.2 Maximální napětí.....	53
5.2.3 Relativní deformace.....	54
5.2.4 Houževnatost .....	54
5.2.5 Tuhost.....	54
5.3 Pravděpodobné příčiny vývojových změn vlastností vlákna .....	55
6 Závěry.....	57
7 Literatura a zdroje .....	58
7.1.1 Literatura .....	58
7.1.2 Internetové zdroje .....	61
8 Přílohy	

# 1 Úvod

Hmyz vytváří celou řadu produktů, které mohou sloužit k užítku člověka. Mezi nejdůležitější patří hedvábí, med, vosky, laky a jedy. Člověk je na hmyzu také nepřímo závislý jako na opylovačích, v některých částech světa je hmyz také důležitou složkou lidské potravy. Hmyz je důležitým modelovým objektem základního i aplikovaného výzkumu (Kodrík, 2004).

Hedvábí je popisováno jako polymer proteinů, který je spřádán do vláken. Tuto schopnost má řada zástupců terestrických členovců, např. pavouci, roztoči, snovatky a také larvy několika řádů hmyzu s proměnou dokonalou např. motýlů, chrostíků, včel, pilatek, pakomárů aj. (Craig, 2003). Schopnost produkovat hedvábí se vyvinula u několika hmyzích rodů (Sehnal et Akai, 1990; Craig, 1997). Hedvábí je produkt u hmyzu relativně rozšířený, produkován ve žlázách různého původu, ale nejčastěji se s ním setkáváme u larev chrostíků a motýlů. Nejznámějším zástupcem, který produkuje komerčně využitelné hedvábí je bourec morušový (*Bombyx mori*) (Kodrík, 2004).

Do Evropy se hedvábí dostalo z Číny, kde bylo hedvábnictví založeno. Hedvábná stezka byla starověká trasa, která začínala v Číně a pokračovala přes centrální Asii až do Egypta a Evropy. Obchod po hedvábné stezce byl důležitým faktorem při rozvoji velkých starověkých civilizací v Číně, Mezopotámii, Persii, Indii a Itálii a pomohl položit základy moderního světa (Hyde, 1984). Využití pavoučích vláken není novinkou pro tradiční kultury, polynéští rybáři používali vlákna pavučin jako rybářský vlasec a domorodci na Nové Guiney si dávají pavučiny na hlavu, aby se chránili před slunečními paprsky (Vesmír.info, 2008). S objevením umělých vláken silonu, nylonu atd. začátkem 40. let 20. století klesl o hedvábné vlákno zájem, ale produkce hedvábí má několika tisíciletou tradici a v zemích, které patří k jeho tradičním producentům (Čína, Japonsko, Korea) je i přes existenci umělých vláken zcela nezastupitelné.

Jak se ale časem ukázalo, hedvábí má unikátní vlastnosti a získalo si proto znovu oblibu. Bílkoviny přírodního hedvábí se uplatňují v různých oblastech medicíny (chirurgické nitě, náhrady pojiv, zmírnění imunitní odpovědi, potlačení infekcí) a kosmetiky (Sehnal, 2008). Využití vychází ze znalostí jednotlivých komponent hedvábí. Osa vlákna je tvořena třemi bílkovinami, jejichž složení se během vývoje nemění, zatímco lepivý povrch je ze sericinů, jejichž složení se mění (Fedič et al., 2002).

Cílem práce je zjistit, jak tyto změny ovlivní fyzikální vlastnosti vlákna, potažmo zjistit, které sericiny jsou pro pevnost, pružnost a roztažnost vlákna nejlepší.

## **2 Literární přehled - základní informace k problematice**

### **2.1 Hedvábí**

#### **2.1.1 Syntéza a sekrece hedvábí u housenek**

Larvy většiny Lepidopter sekretují vláknité proteiny, které jsou souhrnně označovány jako hedvábí. U některých druhů obsahují esenciální aminokyseliny a intenzita produkce hedvábí je závislá na jejich přítomnosti v potravě (Jindra et Sehnal, 1989). Hedvábí je u larev motýlů produkováno ve snovacích žlázách. Tubulární snovací žlázy (obr. 2.1) jsou přeměněné labiální žlázy, jejichž původní funkcí byla produkce slin a jsou dobře přizpůsobeny své nové funkci. Hedvábí je využíváno na budování chodbiček nebo zámotků, které larvám slouží jako úkryt, a na tvorbu kokonů, které chrání vyvíjející se kuklu (Fedič et al., 2002). Časový průběh produkce hedvábí během larválního vývoje a jeho množství jsou u různých druhů velmi odlišné (Sehnal et Akai, 1990).

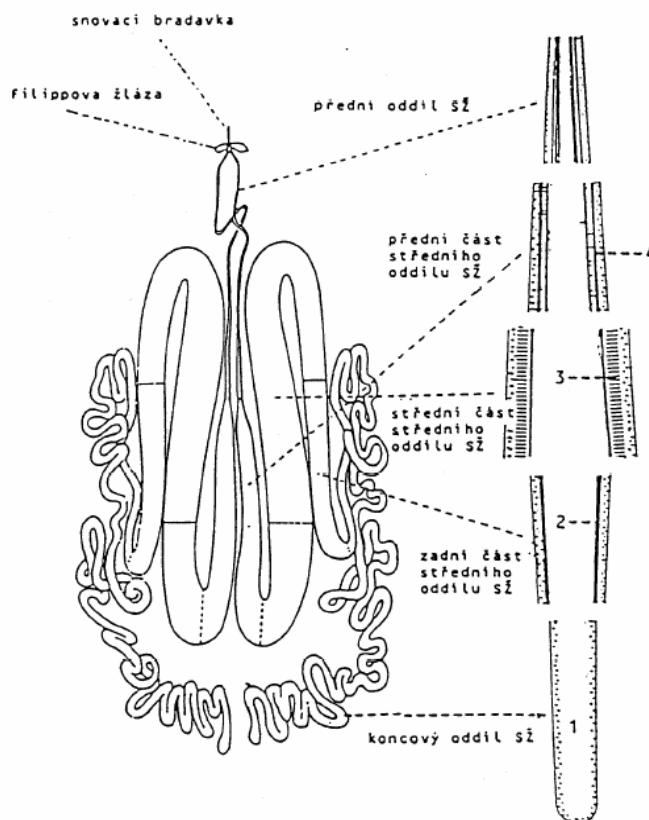
Snovací žlázy jsou morfologicky i funkčně rozděleny na zadní (posterior – PSG), střední (middle – MSG) a přední (anterior – ASG) oddíl. Na rozdíl od zadního a středního oddílu nevytváří přední oddíl žádné strukturální bílkoviny hedvábí, ale je důležitý pro přeměnu hustého roztoku bílkovin v pevné vlákno. Tento proces není zcela objasněn, důležitá je resorpce vody a změna iontových poměrů. Přední oddíly pravé a levé snovací žlázy se spojují a ústí ven snovací bradavkou. Ta funguje jako lis, který housenka uzavírá nebo otevírá. Dotykem bradavky se hedvábí přichytí a při oddálení hlavy od podložky vzniká vlákno. Při předení kokonu je tvorba vlákna kontinuální a nepřerušované vlákno je u některých druhů více než kilometr dlouhé.

Činnost snovacích žláz je řízena hormonálně. Uplatňují se zde juvenilní hormony, ekdysteroidy i neurohormony. Po aplikaci juvenilního hormonu či juvenoidu dochází k primární inhibici snovacích žláz, ale aplikovaný hormon prodlouží larvální instar, a tedy i žír larev, snovací žlázy jsou déle udržovány v tzv. akumulární fázi, kdy hromadí více živin a po odeznění vlivu hormonu produkují větší larvy se zvětšenými snovacími žlázami více hedvábí. Těchto poznatků se využívá v komerční produkci hedvábí, kdy jsou larvy vhodného stáří ve velkochovech ošetřeny juvenoidy, které zvyšují produkci hedvábí asi o 10 % (Kodřík, 2004).

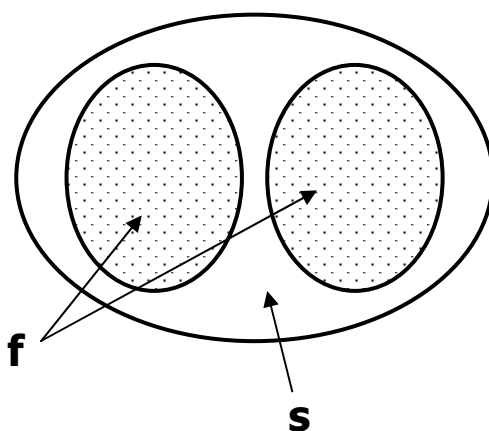
#### **2.1.2 Struktura hedvábného vlákna**

Hedvábí produkované housenkami je polymer složený z proteinů pocházejících z dvojice snovacích žláz (Fedič et al., 2002). Těžký řetězec fibroinu (H-fibroin; heavy chain fibroin) se spojuje s lehkým řetězcem (L-fibroin; light chain fibroin) a P25 glykoproteinem a tvoří hedvábný filament. Tyto tři proteiny jsou produkovány a sestavovány v zadním oddíle snovacích žláz a ve formě gelu se hromadí ve středním oddíle, kde jsou obaleny vrstvou sericinového gelu. Fibroinové sloupce (budoucí filamenty) a nad nimi uložené sericinové vrstvy jsou skladovány v lumen žlázy několik dní až týdnů jako separované a vysoce koncentrované gely. Během předení jsou proteiny

z PSG přeměňovány na pevný a pružný filament, ve kterém jsou H-fibroin, L-fibroin a P25 zastoupeny v poměru 6:6:1 (Inoue et al., 2000; 2004). Pár filamentů (z pravé a levé žlázy) je ihned po vypředění spojen v jedno vlákno pomocí „vnitřních“ sericinů (obr. 2.2 a 2.3). Povrchové sericiny lepí vlákna dohromady během předění kokonu (Michaille et al., 1986).

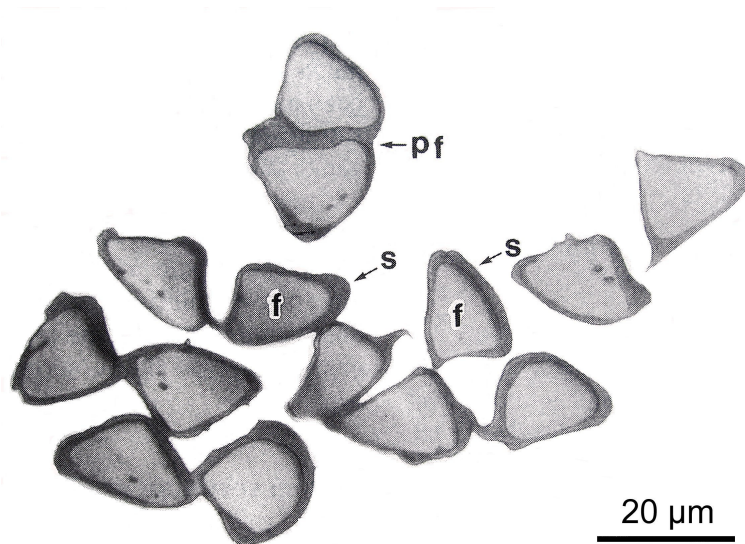


Obr. 2.1: Snovací žlázy Lepidopter (podle Akai, 1965)



Obr. 2.2: Příčný řez hedvábným vláknem  
**f** – fibroinové filamenty; **s** – sericinová vrstva





Obr. 2.3: Příčný řez hedvábným vláknem kokonu *Bombyx mori* (Akai, 2000)

**pf** – pár filament; **f** – fibroinové filamenty; **s** – sericinová vrstva

#### Středová část hedvábného vlákna (fibroiny, P25)

Shimura et al. (1976), Gamo et al. (1977) a další objevili, že osa hedvábí, tj. dva filameny, jsou sekretem zadního oddílu snovacích žláz (PSG) *Bombyx mori* a obsahují dvě hlavní složky, které jsou od sebe oddělitelné rozštěpením disulfidických můstků. Později byla objevena třetí složka nazvaná P25. PSG sekretuje velké množství vysokomolekulárního (200 – 500 kDa) H-fibroinu, nízkomolekulárního L-fibroinu a chaperoninu P25, který se objevuje ve dvou formách (27 a 31 kDa), které se liší obsahem cukrů (Tanaka et al., 1999). L-fibroin je připojen ke karboxylovému konci H-fibroinu pomocí disulfidického můstku, který je zásadní pro sekreci obou komponent (Takei et al., 1987). Fibroin má charakteristickou strukturu i aminokyselinové složení, které zajišťuje jeho obrovskou pevnost a pružnost (Žurovec et Sehnal, 2002).

#### Sericiny

Další složkou hedvábí jsou bílkoviny sericiny, syntetizované ve středním oddíle žláz. Fungují jako tmel, postupně se nabalují na fibroin, který postupuje ze zadního do středního oddílu žláz, zpevňují ho a později se také podílí na stmelování fibroinových filamentů z levé a pravé snovací žlázy (Kodrík, 2004). Vysoký obsah serinu (16 – 42 %) a velký podíl dalších hydrofobních aminokyselin (Komatsu, 1975; Gamo et al., 1977) činí povrchové sericiny rozpustné v horké alkalické vodě (Fedič et al., 2002).

Studie prováděné na *Bombyx mori* ukazují, že distální, centrální a proximální části MSG produkují sericiny o molekulové hmotnosti 150 kDa, 400 kDa a 250 kDa (Takasu et al., 2002). Z hedvábí bylo získáno nejméně šest (Gamo et al., 1977) ale až patnáct (Sprague, 1975) typů sericinů, některé jsou zřejmě ze stejných peptidů lišících se stupněm glykosylace. Většina těchto

sericinů nebyla přiřazena ke specifickým genům. Protože každá MSG část produkuje rozdílnou směs sericinů, liší se jejich vrstvy kolem vláken. Zastoupení sericinů v sekretovaném hedvábí dosahuje 20 – 30 % váhy kokonu u komerčního producenta hedvábí bource morušového (Michaille et al., 1986).

#### Nestrukturální komponenty hedvábí

Kromě fibroinu se v zadním oddíle žláz syntetizuje několik bílkovin o malé molekulové hmotnosti, jejichž funkce není zcela jasná, zdá se, že hrají roli při přeměně tekutého fibroinu na pevné vlákno. Některé z těchto bílkovin vykazují aktivitu inhibitoru proteáz a pravděpodobně tak chrání hedvábí proti mikrobiálnímu rozkladu (Nirmala et al., 2001).

### **2.1.3 Hedvábnictví – produkce a využití hedvábí člověkem**

Archeologické nálezy svědčí o tom, že kokony byly sbírány již v době kamenné, ale naši předci pravděpodobně využívali kukly jako potravu, ale ne kokony jako zdroj hedvábí. Zpracování kokonů pro textilní výrobu bylo objeveno kolem roku 2700 př.n.l. v Číně, kdy podle legendy spadl kokon bource do čaje princezny Hsi Ling Shi, která tak mohla pozorovat jak se z plovoucího kokonu uvolňuje vlákno (Park et al., 2002). Splétáním několika vláken pak vznikla hedvábná nit, resp. tkanina. Číňané přísně střežili umění hedvábnictví stovky let a v případě vyrazení postupu zpracování kokonů by následoval trest smrti. Během let se toto třpytivé vlákno stalo měřítkem hodnoty a mělo cenu zlata. Stále více lidí znalo tajemství technologie, a tak se při úpadku císařství na začátku čtvrtého století vajíčka bource dostala do Korey a později i do Japonska (Hyde, 1984). K obchodování s Evropou sloužila, jak už bylo řečeno, Hedvábná stezka.

Komerční hedvábí je získáváno převážně z domestikovaného bource morušového (*Bombyx mori*), ale částečně i z jiných druhů motýlů (Peigler, 1993). Výroba hedvábí sestává ze čtyř částí: pěstování morušovníku, chov bourců morušových, namotávání hedvábných nitek ze zámotku na cívky a tkaní hedvábných látek. Při přípravě komerčního surového hedvábí se využívá rozpustnosti sericinů. Kokony se povaří ve vodě, povrchové sericiny se rozpustí a 4 – 7 uvolněných vláken se sericiny na jejich povrchu slepí v nit, která se používá na výrobu hedvábných tkanin. Surové hedvábí se skládá převážně z fibroinu. Z jednoho kokonu bource morušového lze získat vlákno o délce 300 – 1200 m. Člověkem je hedvábí využíváno především v oděvnictví, ale má použití i v průmyslu, medicíně, farmacii a kosmetice.

#### Využití fibroinu

Hedvábné vlákno má výborné mechanické vlastnosti, které z něj před vynalezením nylonu udělalo mj. materiál pro výrobu padáků (Sponner, 2007). Použití přírodních hedvábných vláken jako šití v chirurgii ukázalo, že jsou velmi dobře snášena imunitním systémem. Fibroin byl proto také vybrán jako látka pro růst buněk a tkání. Materiály založené na fibroinu a zpracované do

filmů, vláken, membrán a hydrogelů podporují proliferaci a diferenciaci různých typů buněk. Jsou považovány za ideální materiál pro regeneraci tkání a práci s kmenovými buňkami (Wang et al., 2006).

#### Využití sericinů

Sericiny představují objemný odpad při přípravě textilních vláken. Odhaduje se, že světové zpracování kokonů poskytuje asi 50 000 tun sericinů ročně (Zhang, 2002). Používání sericinových extraktů pro kosmetické účely má dlouholetou tradici založenou na základě praktických zkušeností. Dnes víme, že sericiny zvlhčují (Padamwar et al., 2005), absorbují UV záření, mají antioxidační účinky a některé mají též antimikrobiální vlastnosti (Sarovat et al., 2003; Zhaorigetu et al., 2003) pro které jsou přidávány do pleťových krémů a produktů péče o vlasy. Tvrdí se, že sericiny předcházejí vzniku vrásek a dalším příznakům stárnutí pleti (Padamwar et Pawar, 2004).

#### **2.1.4 Fyzikální vlastnosti hedvábí**

Vlastnosti hedvábí, které jsou důležité pro textilní průmysl (např. pevnost a pružnost), byly měřeny u různých druhů, ale příspěvek sericinů těmto vlastnostem nebylo adekvátně stanoveno. Měření byla většinou prováděna na hedvábných vláknech získaných uvolněním z kokonu v horké alkalické vodě. Jednotlivá vlákna jsou uvolňována, když je rozpuštěna vnější sericinová vrstva, zatímco vnitřní vrstva přetrvává a drží fibroinové filamenty pohromadě (Sehnal et Žurovec, 2004).

Více k měřeným veličinám v kapitole Materiál a metodika.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Modelové organismy

Jako modelové organismy byly použity larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) a bource morušového (*Bombyx mori*).

#### 3.1.1 Chov *Galleria mellonella*

Larvy zavíječe voskového se chovají na uměle připravované půdě. Výhodou zavíječe voskového je jeho kontinuální chov ve standardních laboratorních podmínkách, larvy se chovají při 30 °C a trvalé tmě. Půdu připravíme tak, že sypké složky (tabulka 3.1) dáme do misky a zahřejeme asi na 80 °C. Obdobně rozežřejeme vosk a odděleně med s glycerinem. Suchou směs zalejeme voskem a promícháme, potom přidáme med s glycerinem a opět důkladně promícháme. Hotovou potravu uchováváme v chladu při 15 °C.

Tabulka 3.1: Složení půdy pro zavíječe voskového

Složka	Hmotnost v g	Složka	Hmotnost v g
Kukuřičný šrot	660	Sušené kvasnice	165
Pšeničný šrot	330	Včelí vosk	525
Pšeničná mouka	330	Med	330
Sušené mléko	330	Glycerin	330

#### 3.1.2 Stáří a výběr larev *Galleria mellonella*

Čerstvě svlečené housenky posledního (VII.) instaru se poznají podle velikosti hlavové schránky a zbarvení. Čerstvě svlečené housenky jsou bílé, ale během čtyř hodin ztmavnou v důsledku melanizace exokutikuly. Nad každou epidermální buňkou je sloupec nepoddajné exokutikuly, mezi sloupce se ukládá světlá a poddajná endokutikula. Při pohledu pod mikroskopem se exokutikula jeví jako tmavé terčíky na světlém pozadí. Po svlečení jsou terčíky u sebe a proto jsou housenky tmavě zbarvené. Když housenky rostou, zvětšují se ukládáním endokutikuly mezery mezi terčíky a housenky se při zběžném pohledu jeví jako šedé. Pátý den posledního instaru přestávají housenky přijímat potravu a hledají místo k předení kokonu (wandering stage). Na začátku předení je nazýváme pohyblivé prepupy (6,5. den posledního instaru). Ty se po dokončení kokonu mění na takzvané nepohyblivé prepupy (farátní kukly), které se osmý den svlékají do kulek.

Pro naše pokusy byly housenky roztríděny do skupin podle věku. Aby byl zajištěn dostatek vzorků pro statistické vyhodnocení, byla každá skupina složena z jedné nebo více podskupin. V první sadě bylo hodnoceno 187 vzorků rozdělených do 6 skupin. Pokus byl opakován nezávisle na první sadě. Celkem 90 vzorků druhé sady bylo rozděleno do 4 skupin, některá měření nebyla

opakována (tabulka 3.2). Vlákna první sady byla odebírána v červenci a měřena v prosinci 2007, vzorky druhé sady byly odebrány v říjnu a měřeny v listopadu 2008.

#### První sada vzorků *Galleria mellonella* (2007)

- G1a** Skupina G1a zahrnuje čerstvě svlečené housenky do posledního instaru (VII/1), pracovníčně označené jako GB, hmotnost larev v této skupině byla  $145 \pm 30$  mg.
- G2a** Do skupiny G2a patří housenky posledního instaru 36 hodin po svlečení (VII/2) označené původně jako GC, hmotnost larev v této skupině byla  $169 \pm 25$  mg.
- G5a** Ve skupině G5a se jedná o housenky 5. den posledního instaru (VII/5), hmotnost larev byla  $280 \pm 25$  mg v podskupině GF a  $245 \pm 31$  mg v GH.
- G7a** Do skupiny G7a patřily housenky 7. dne posledního instaru (VII/7), předoucí středně silné kokony, hmotnost larev v této skupině byla  $372 \pm 27$  mg. Hedvábí odebrané housenkám bylo označeno jako GA.
- G5a-J** Ve skupině G5a-J byly housenky kontaminované juvenoidem ZR 515 (1% roztok v acetonu, topicky aplikovány 2  $\mu$ l na jedince) během jednoho dne po svlečení do posledního instaru a znovu za 24 hodin dávkou 1  $\mu$ l na jedince. Hedvábí označené GJ bylo odebráno 5. den posledního instaru (VII/5). Housenky v té době ještě nebyly svlečené a jejich hmotnost byla  $270 \pm 41$  mg.
- G6a-J** Ve skupině G6a-J byly housenky ošetřené juvenoidem stejně jako skupina G5a-J, ale hedvábí označené GL bylo odebráno až 6. den posledního instaru (VII/6). Housenky nebyly svlečené a jejich průměrná hmotnost byla  $268 \pm 21$  mg.

#### Druhá sada vzorků *Galleria mellonella* (2008)

- G1b** Skupina G1b zahrnuje čerstvě svlečené housenky do posledního instaru (VII/1), označené jako E, hmotnost larev v této skupině byla  $199 \pm 31$  mg. Housenky jsou stejného stáří jako ve skupině G1a první sady.
- G5b** Do skupiny G5b patří housenky 5. den posledního instaru (VII/5), hmotnost larev byla  $261 \pm 11$  mg. Odebrané hedvábí je označováno jako F a odpovídá skupině G5a.
- G7b** Do skupiny G7b jsou zařazeny housenky předoucí středně silné kokony (VII/7), hmotnost larev v této skupině byla  $220 \pm 16$  mg. Hedvábí odebrané housenkám je označováno jako K. Srovnatelné se skupinou G7a.
- G5b-J** Ve skupině G5b-J jsou housenky 5. den posledního instaru s aplikovaným juvenoidem (1% ZR 515) ve dvou dávkách 24 hodin po sobě: 2  $\mu$ l a druhá 1  $\mu$ l na jedince. Housenky nebyly do odběru svlečené, za další 3 dny se však polovina svlékla do nadpočetného larválního instaru a druhá polovina vypředla kokony. Hmotnost larev v době odběru hedvábí byla  $382 \pm 51$  mg; odebrané hedvábí je označováno jako M. Odpovídá dřívější skupině G5a-J.

Tabulka 3.2: Přehled doby odběru vláken jednotlivých skupin *Galleria mellonella*

Skupina	G1a; G1b		G2a		*	G6a-J		G7a; G7b	
Odběr	█		█		█	█		█	
Hodiny		36							172
Dny	1	2	3	4	5	6	7		8

\* G5a; G5a-J;G5b; G5b-J

### 3.1.3 Chov *Bombyx mori*

Larvy bource morušového jsou monofágní a živí se jen listím moruše bílé (*Morus alba L.*) nebo černé (*Morus nigra L.*). Kromě čerstvého morušového listí je možné bource morušové chovat na umělé potravě. Její základ tvoří prášek ze sušeného morušového listí a agar, doplněný o vitaminy a minerály. Vyrábí ji např. Nippon Nosan Co., Ltd., Yokohama, Japan. Pouze larvální stádia rapidně rostou a konzumují listy moruše, ostatní vývojová stadia potravu nepřijímají. Normální teploty pro chov bourců jsou mezi 20 – 28°C. Velkochov bource morušového má i své nevýhody, hlavně snadné šíření nemocí.

### 3.1.4 Stáří a výběr larev *Bombyx mori*

Životní cyklus bource trvá 6 – 8 týdnů v závislosti na rase a podmínkách chovu. Existuje pět larválních instarů, mezi kterými se housenky svlékají. Larvy, které se vylíhnou, jsou drobné, černé či tmavě hnědě zbarvené, pokryté jemnými štětinkami, které do 24 hodin opadají. Ihned po vylíhnutí hledají potravu. Toto období trvá 3 dny a čtvrtý den se začínají svlékat. Období druhého instaru trvá 2 dny, třetí instar trvá 3 až 4 dny, čtvrtý 4 až 5 dní a váha housenky vzroste až 380krát. Období pátého instaru trvá 6 až 8 dní, váha larev vzroste 10 000krát od doby co se vylíhly. Housenky dorůstají délky 6 cm, po ukončení žíru krátce migrují (hledají vhodné místo k uchycení kokonu) a pak se začínají zapřádat. Zapřádání trvá 2 až 3 dny a za další 2 až 3 dny dojde k přeměně na kuklu uvnitř kokonu (Kislingová, 2006).

Pro naše pokusy jsem housenky opět rozdělila do skupin podle stáří. Na rozdíl od zavíječe voskového začínají housenky bource morušového příst hedvábí až po ukončení žíru. Ani uměle se mi nepodařilo odebrat vzorky hedvábí od žeroucích housenek. Po ukončení žíru byly odběry možné, avšak vzorky odebrané 7. den, tj. těsně po ukončení žíru (podskupiny BS a BT) nebyly měřeny, protože odebraná vlákna byla nekvalitní, s nerovnoměrnými kapičkami sericinu na povrchu (zjištěno použitím polarizačního mikroskopu). Měřeno bylo pouze 48 vzorků rozdělených do dvou skupin.

### Vzorky *Bombyx mori* (2008)

- BW** První skupina BW (wandering) zahrnuje housenky asi 8. den posledního instaru po ukončení žíru. Hedvábí je označeno stejně jako skupina BW, hmotnost larev byla  $1615 \pm 53$  mg.
- BK** Do skupiny BK patří housenky předoucí slabé kokony (asi 1 den předení), označené také BK, hmotnost larev v této skupině byla  $896 \pm 69$  mg.

### **3.1.5 Juvenoidy**

Bioanalogy juvenilního hormonu, které mají i úplně odlišnou strukturu a chemické složení, ale stejné účinky jako juvenilní hormony nazýváme juvenoidy. Některé juvenoidy (methopren, hydropren, phenoxy carb, pyriproxyphen) jsou prodávány komerčně a využívají se především k hubení a kontrole populací hmyzích škůdců, někdy však ke zcela specifickým účelům (zvýšení produkce hedvábí u bource morušového). Mechanismus kontroly hmyzích populací juvenoidy spočívá v tom, že juvenoidy zasahují do vyvážených a přesně řízených hormonálních poměrů v těle. Způsobují tak poruchy svlékání, vznik přechodných forem neschopných života nebo nadpočetných instarů, zasahují do reprodukce. Výhody juvenoidů spočívají v tom, že tyto látky jsou specifické nejen pro hmyz, ale i pro určitý druh nebo jeho stadium a rychle se v přírodě rozkládají (Kodrík, 2004).

Použitý juvenoid methopren, též nazývaný altosid nebo ZR 515, byl rozpuštěn v acetonu a 1% roztok aplikován na povrch těla v odstupu 24 hodin. První dávka byla 2  $\mu$ l a druhá 1  $\mu$ l roztoku na jedince.

## **3.2 Měření mechanických vlastností hedvábí**

Odebírání hedvábných vláken a jejich další měření jsem prováděla podle metodiky popsané v práci Blackledge et al. (2005). Vlákna byla odebírána v Biologickém centru AV ČR, vlastní měření probíhala během stáží v laboratoři Prof. Cheryl Hayashi na University of California, Riverside.

### **3.2.1 Metodika odběru a uchycení vlákna**

Pro odběr a uchycení vlákna jsou používány papírové držáky černé barvy o velikosti 75 x 25 mm se dvěma otvory (23 x 10 mm), přes které je vlákno nataženo. Vlákno je na držák fixováno pomocí kyanoakrylátového (vteřinového) lepidla, které musí asi hodinu schnout.

### Příprava pro tensile testing (tahové testování)

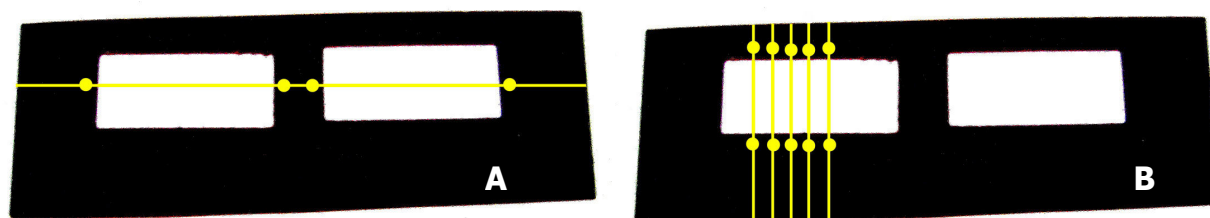
Hlava vybrané housenky je zlehka přiložena na horní okraj papírového držáku, do té doby než se hedvábné vlákno lepivým povrchem k držáku přichytí. Některé housenky se přichytí okamžitě, jindy je úspěšný druhý odběr provedený za několik minut. Po uchycení vlákna je housenka lehce tažena směrem dolů podél nakloněného držáku rychlostí asi 75 mm (délka držáčku) za 3 sekundy. Uprostřed je vlákno rotováno dorso-ventrálním otočením předoucí larvy. Na dolním konci držáku je hlavička housenky opět jemně přitlačena, aby se vlákno přichytilo i na druhém konci. Vlákno je fixováno pomocí kyanoakrylátového lepidla. Na držák je vždy připevněno jedno vlákno (obr. 3.1).

### Příprava pro transmisní elektronový mikroskop

Vlákna jsou namotávána přes kratší stranu držáku, co nejbližší vedle sebe, namotaná jako na cívku, na obou koncích držáčku jsou vlákna opět přilepena pomocí vteřinového lepidla.

### Příprava pro skenovací elektronový mikroskop

Vlákna jsou natahována přes kratší stranu držáku (jako pro transmisní mikroskop), cca pět vláken na jeden otvor (obr. 3.1). Vlákno není rotováno, ale jinak postup odpovídá přípravě vláken pro tensile testing.



Obr. 3.1: Způsob upevnění hedvábného vlákna na papírový držák

**A** - pro tensile testing; **B** - pro skenovací elektronový mikroskop

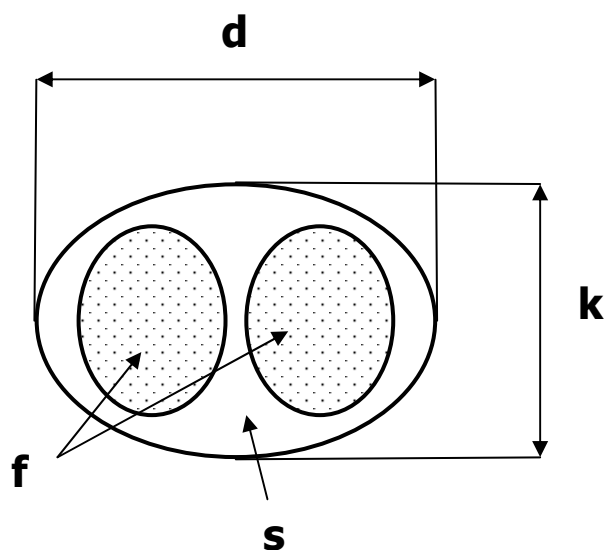
### **3.2.2 Měření průměru vláken**

Vlákna jsou nejprve pozorována pomocí polarizačního mikroskopu (Leica DMLB, McBain instruments) při zvětšení 1000krát. Vlákno je oválné (obr. 3.2) a proto je pro zjištění plochy průřezu vlákna nutné měřit délku dlouhé i krátké osy oválu. Vedle vlákna (dva fibroinové filamenty a sericinový obal) jsem měřila i filamenty, které jsou na průřezu také oválné (obr. 3.2). Při pohledu na dlouhou osu vlákna je vidět krátká osa obou filamentů a při pohledu na krátkou osu vlákna je vidět dlouhá osa jednoho z filamentů. Místa, kde je možno vlákno pozorovat kolmo na dlouhou nebo krátkou osu jsou pečlivě vybrána a zachycena digitálním fotoaparátem (Canon



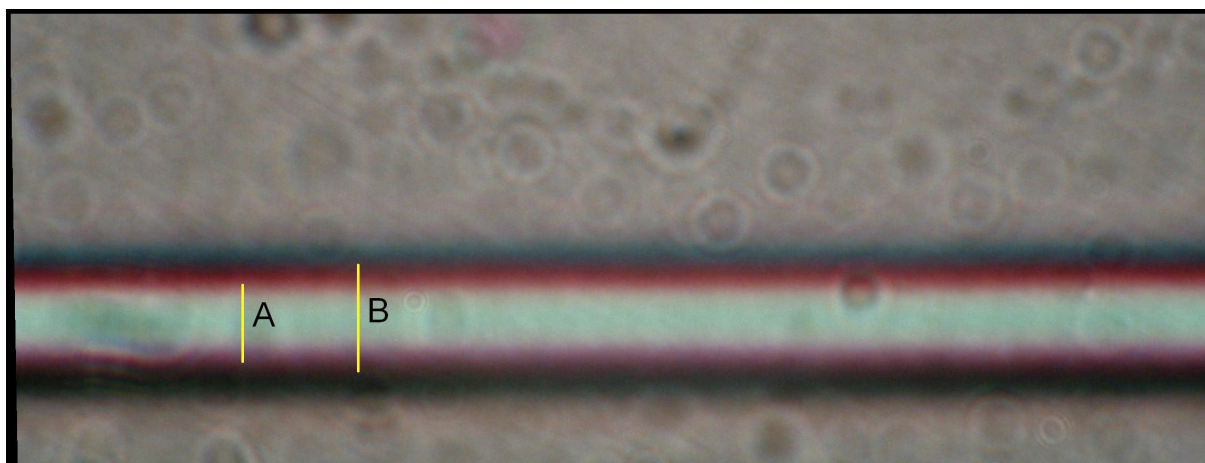
PowerShot S40). Díky přetočení housenky při odběru vlákna je možné najít pohledy na obě osy. Každá osa je měřena na různých částech vlákna nejméně třikrát.

Fotografie jsou pořizovány s rozlišením 180 dpi (pixelů na palec) a délky os vlákna i filamentů jsou následně měřeny pomocí programu ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997 – 2008). Při měření jsou pomocí úseček označena místa měření os filamentů i celého vlákna (obr. 3.3 a 3.4). Měří se vždy na třech místech každého preparátu. Z naměřené délky úseček v pixelech se pomocí přepočítávacího faktoru (93,588) vypočtou délky os filamentů a vlákna v  $\mu\text{m}$ . Výsledky měření jsou převedeny na plochu průřezů filamentů a vlákna.



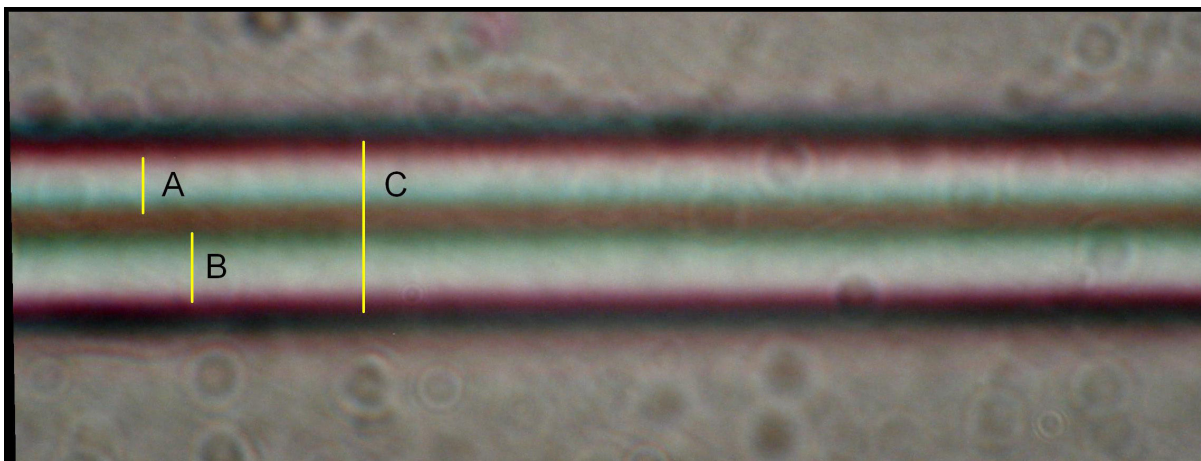
Obr. 3.2: Vzájemné postavení fibroinových filament v hedvábném vlákne

**d** – dlouhá osa vlákna; **k** – krátká osa vlákna; **f** – fibroinové filamenty; **s** – sericinová vrstva



Obr. 3.3: Pohled na krátkou osu vlákna (vzorek GA 5.5)

**A** - úsečka měřící delší osu fibroinového filamentu; **B** – úsečka měřící krátkou osu vlákna (tj. filament a sericinový obal vlákna)



Obr. 3.4: Pohled na dlouhou osu vlákna (vzorek GA 1.5)

**A, B** - úsečky měřící krátkou osu filamentů; **C** – úsečka měřící dlouhou osu vlákna (tj. filamenty a sericinový obal)

### 3.2.3 Mechanické vlastnosti vláken

Mechanické vlastnosti vláken se projevují jako odezva na mechanické namáhání vnějšími silami. Podle působení vnějších sil lze hovořit o namáhání v tahu, tlaku, ohybu a kroucení (Militký, 2008). V našem případě byla vlákna laboratorně testována v tahu. Během mechanického namáhání dochází ke změně tvaru – deformaci, která je závislá na velikosti zatížení, rychlosti a době trvání namáhání. Při zkoušení mechanických vlastností jde většinou o zjištění meze pevnosti. Vlákno je zatěžováno až do destrukce, tj. přetrhu vzorku (Militký, 2008). Výsledkem měření je řada charakteristik, které jsou popsány v následujících odstavcích. Naměřené hodnoty jsou vztahovány na plochu průřezu vlákna, počítanou z počátečního průměru (v případě eliptického průřezu z délky os). Při stanovení tzv. „engineering“ hodnot, se považuje průřez za neměnný během měření, zatímco při měření „true“ hodnot se bere v úvahu zmenšení průřezu při protažení vlákna. Protože průřez (ve skutečnosti rozměry os) nelze během měření kontinuálně sledovat, počítají se změny na základě změn délky vlákna. Předpokládá se, že objem vlákna se nemění, tj. při protažení se zákonitým způsobem zmenší jeho průřez. V této práci uvádím „true“ hodnoty měřených fyzikálních veličin.

#### Mechanické napětí (stress) $\sigma$ [MPa]

Napětí je absolutní síla  $F$  [N] přepočítaná na plochu průřezu vlákna  $S$  [m<sup>2</sup>] (v angličtině se používá  $A$ ; area). Přepočet absolutní síly na napětí se provádí proto, aby bylo možné porovnávat vlákna s různými průměry (Blackledge, 2005) a rozdílné materiály. Napětí do přetrhu vzorku je nazýváno pevností v tahu (Militký, 2008). Maximální mechanické napětí (ultimate stress) odpovídá mezi pevnosti.

$$\sigma = F / S \text{ [MPa]}$$

### Relativní deformace (strain) $\epsilon$ [mm/mm]

Při natahování se vlákno prodlužuje, čili deformuje. Relativní deformace je deformace materiálu zapříčiněná působením napětí. Má-li být deformace různých materiálů srovnávána je jí nutno přepočítat na relativní jednotky. Relativní deformaci do přetruhu zveze tažnost, vyjadřuje se v % počáteční délky (Militký, 2008).

$$\epsilon_{tr} = \log_e (l-l_0) \text{ [mm/mm]}$$

tr – „true“; e - „engineering“; l - délka po natažení;  $l_0$  - počáteční délka (podle Blackledge, 2005)

### Houževnatost (toughness) [MJ $\times$ m<sup>-3</sup>] nebo [MPa]

Houževnatost vyjadřuje odolnost materiálu vůči lomu a zpravidla je charakterizována velikostí mechanické práce, nutné k lomu (Vlach, 2003). Udává spotřebu energie potřebnou k přetržení vlákna. Spočítá se jako plocha pod deformační křivkou (stress-strain curve) (Blackledge, 2005). Jednoduše řečeno, tahová houževnatost je dána velikostí plochy pod tahovým diagramem (Vlach, 2003).

### Youngův modul pružnosti (Young's modulus) E [GPa] a tuhost (stiffness)

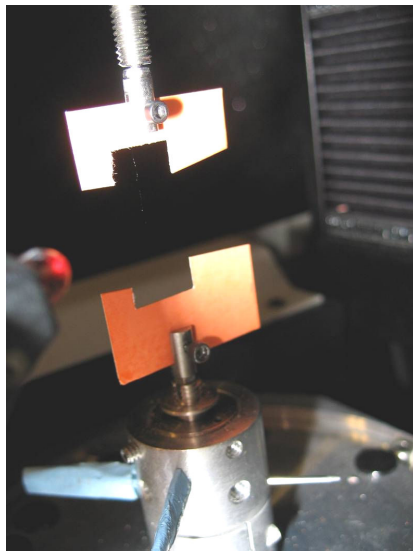
Tuhost je fyzikální veličina, která je charakteristická pro každé stlačitelné těleso a vyjadřuje míru odolnosti vůči deformaci způsobené vnější silou. Tuhost zkoumaného materiálu bez ohledu na měřené těleso, se vyjadřuje jako Youngův modul (E), který udává pružnost materiálu při namáhání v tahu. Vypočítá se ze sklonu regrese křivky vyjadřující změny poměru napětí-deformace a to v oblasti lineárního průběhu křivky (úsek mezi body O a P křivky na obr. 3.6). Konec lineárního průběhu vztahu napětí-deformace je bodem, ve kterém se mění mechanické chování vlákna z elastického na viskózní.

$$E = \sigma / \epsilon \text{ [Pa]}$$

#### **3.2.4 Tensile testing – namáhání v tahu**

Pro testování mechanických vlastností vláken byl používán Nano Bionix® Universal Testing System (MTS Systems Corp., Oak Ridge, TN, USA), přístroj je softwarově kompatibilní s MS Windows XP. Nano Bionix je schopný získat data z velmi tenkých vláken s rozlišením zatěžování od 50 nN a prodloužení od 35 nm. Jedná se o přístroj s konstantním přírůstkem deformace, tyto přístroje vyvozují napětí ve vzorku posuvem hlavice, která se pohybuje konstantní rychlostí, ale přerušovaně. Přerušování, při konstantním měření délky a napětí, umožňuje přesně zjistit tuhost a pružnost vlákna (Blackledge, 2005). Vstupními údaji jsou zejména upínací délka, rychlost zatěžování a průměr vlákna (Militký, 2008).

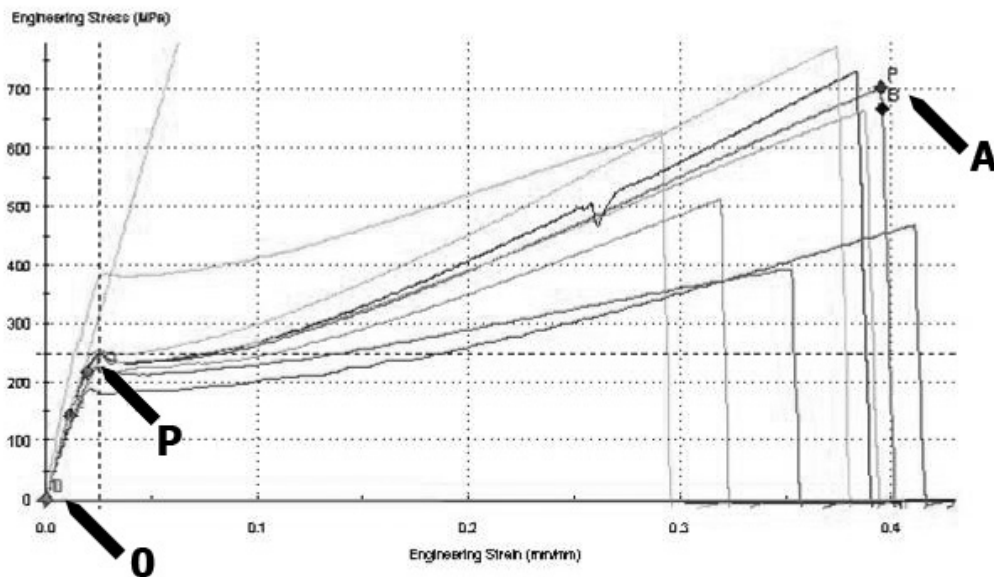
Papírový držák je upevněn mezi dvě hlavice tak, aby vlákno v jeho otvoru bylo napnuté, ale nevystavené napětí. Boční strany držáku se před začátkem měření odstříhnou, takže jsou hlavice přístroje spojeny jen měřeným vláknem (obr. 3.5). Po spuštění přístroje se hlavice od sebe oddalují. Vlákna jsou natahována rychlostí 1 % deformace za sekundu dokud se nepřetrhnou. Tato rychlost deformace je zvolena proto, aby se zachovala maximální porovnatelnost výsledků, protože stejná rychlost byla použita už u předchozích měření (Blackledge, 2005). Prvotní data jsou transformována do hodnot napětí a relativní deformace, aby bylo možné srovnání vzorků hedvábí s různým průměrem vlákna. Jak již bylo uvedeno měření síly na plochu příčného průřezu vlákna (napětí) dovoluje porovnání relativního zatížení vláken s různým průměrem. Upínací délka ( $l_0$ ) vlákna pro naše měření odpovídá velikosti otvoru v držáku, tj. 23 mm.



Obr. 3.5: Upevnění vlákna mezi hlavice přístroje Nano Bionix

### Deformace elastická a plastická

Přerušované působení napětí a kontinuální měření délky vlákna umožňuje odlišit elastické (vratné) a plastické (nevratné) deformace. Vratné deformace lze očekávat pouze v oblasti malých sil a deformací, jejich vztah je popisován Hookeovým zákonem a vyjádřen Youngovým modulem pružnosti. Plastické (nevratné) deformace se začínají projevovat za mezí pružnosti (obr. 3.6). Pro plastickou deformaci platí, že rychlost deformace je úměrná působícímu napětí (Militký, 2008).



Obr. 3.6: Deformační křivka

**O** – počátek; **P** - mez pružnosti; **A** - bod destrukce, mez pevnosti

**O - P** - oblast elastických deformací; **P - A** - oblast plastických deformací

### 3.3 Statistika

Ke statickému zpracování hodnot získaných z empirických měření byl použit program SPSS verze 15.0 společnosti SPSS Inc.

#### 3.3.1 Výběr metodiky

Počet prvků ( $N$ ) je ve většině srovnávaných skupin první sady zavrječe poměrně vyrovnaný. Výjimku tvoří larvy 1. dne posledního instaru (skupina G1a), u kterých se odběr hedvábí podařil jen u menšího počtu jedinců. Počet prvků ve skupinách druhé sady je také vyrovnaný, což platí i u dvou samostatně hodnocených skupin bource (tabulka 4.1, 4.2).

Vzhledem k povaze shromážděných dat byla pro statistické hodnocení použita analýza rozptylů (ANOVA), resp. obecný lineární model (GLM). V případě GLM je možné uvažovat vliv více než jednoho faktoru, tj. mimo stáří i aplikaci juvenoidu. Všechny testy byly prováděny na 95% intervalu spolehlivost, tzn. s maximální pravděpodobností chyby 5 %. Před samotným testováním hypotéz bylo třeba ověřit splnění požadovaných podmínek, tj. nezávislost dat, jejich normální rozložení a podobné rozptyly dat uvnitř vytvořených skupin. Vzájemná nezávislost dat vyplývá už z povahy jejich sběru. Normální rozdělení bylo ověřeno grafickou metodou z histogramu a provedením Kolmogorov–Smirnovova testu. Homogenita rozptylů byla zjišťována pomocí Levenova testu. Ve většině případů byly tyto podmínky splněny. V případě nesplnění všech podmínek bylo možné spoléhat se na robustnost ANOVA, resp. GLM, vůči nesplnění požadavků

normality a homogenity rozptylů, která je při podobné velikosti skupin poměrně značná. Jako potvrzení byl přesto v takovýchto situacích proveden ještě neparametrický Kruskal-Wallisův test, který některé uvedené podmínky nevyžaduje. Pro zachování přehlednosti výsledků jsou u všech veličin uváděny pouze výsledky GLM. Testování pomocí analýzy rozptylů bylo využito u *Galleria mellonella* (dvě nezávislé série pokusů v letech 2007 a 2008). Data pro *Bombyx mori* (rok 2008) jsou rozdělena pouze do dvou skupin a proto zde bylo možné použít hodnocení pomocí jednoduššího t-testu, resp. Mann-Whitney U testu.

### 3.3.2 Analýza variance

Pro porovnání několika souborů dat, v konkrétním případě mechanických vlastností vláken produkovaných housenkami různého stáří, popřípadě ještě s aplikací juvenoidu byla použita analýza variance (angl. Analysis of Variance, ANOVA). Obecně spočívá základní funkce analýzy rozptylu v posouzení hlavních a interakčních efektů kategoriálních nezávislých proměnných na závisle proměnnou kvantitativního typu. Nezávisle proměnné nazýváme faktory. Nejjednodušším případem je analýza rozptylu jednoduchého třídění, kdy analyzujeme efekt jednoho faktoru na závisle proměnnou (Hendl, 2004). To znamená, že jsou pokusné objekty klasifikované (zařazené do skupin) podle jednoho faktoru, proto se tato analýza nazývá one-way ANOVA (Lepš, 1996). V našem případě je ale klasifikačním faktorem stáří housenek a ošetření juvenoidem, proto jsme použili metodu vícefaktorového třídění – obecný lineární model (GLM, General Linear Model).

Princip analýzy variance spočívá v porovnání variability uvnitř skupin s variabilitou mezi skupinami (Lepš, 1996). Základní statistikou v analýze rozptylu je F-testovací statistika rozdílnosti skupinových průměrů, pomocí níž se testuje hypotéza, zda průměry ve skupinách určených kombinacemi faktorů se od sebe liší více než na základě působení náhodného kolísání. Testovací F-statistika musí zohlednit rozdílnosti ve výběrových průměrech a zároveň přirozenou variabilitu závisle proměnné.

Aby analýza rozptylu byla validní, musí být splněny následující předpoklady:

1. Všechna měření musí být vzájemně nezávislá uvnitř skupin i mezi skupinami.
2. Měření v každé skupině jsou normálně rozdělená s průměrem  $\mu_i$ .
3. Ve všech skupinách mají měření stejný rozptyl kolem průměru.

Obecně lze říci, že největší vliv na validitu F-testu má předpoklad o statistické nezávislosti všech měření. Vůči poruchám ostatních předpokladů je analýza rozptylu poměrně robustní (Hendl, 2004). Síla testu roste s velikostí výběru, s rozdíly mezi skupinami a klesá s variabilitou materiálu uvnitř skupin a s počtem skupin (Lepš, 1996).

### **3.3.3 Kruskal-Wallisův test**

Data můžeme testovat také pomocí neparametrického testu založeného na pořadí. Jedná se o podobný test jako je F-test a použijeme ho jestliže nemůžeme vycházet z předpokladu, že měření jsou normálně rozdělená. Nulová hypotéza předpokládá, že měření ve skupinách mají stejné mediány (Hendl, 2004). Při tomto testu nejprve přiřadíme každému pozorování jeho pořadí mezi všemi pozorováními bez ohledu na zařazení do skupiny, potom spočteme statistiku (Lepš, 1996).

### **3.3.4 T-test a Mann-Whitney U test**

T-test je parametrický test, který používáme pro porovnání svou průměrů, a proto vyžaduje normální rozložení dat. Mann-Whitneyův test je neparametrickou obdobou t-testu. Tento test porovnává každé měření z první skupiny s každým měřením ze druhé skupiny a lze jej použít při narušení normality dat.

## **3.4 Elektronová mikroskopie**

Elektronová mikroskopie je metoda umožňující studium mikrostruktury zkoumaných objektů. Mikrostruktura je studována ve vakuu pomocí elektronového svazku, který vzniká emisí elektronů z katody jež jsou dále urychlovány k anodě. Svazek je fokusován vhodně upraveným elektrickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem, aby bylo dosaženo požadovaného zvětšení. Elektronový svazek vytváří obraz interakcemi s pozorovaným preparátem. Podle fyzikální tvorby obrazu dělíme elektronovou mikroskopii na dva základní druhy, transmisní elektronovou mikroskopii a skenovací elektronovou mikroskopii (Bílý, 2007).

### **3.4.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)**

Transmisní elektronový mikroskop umožňuje pozorování preparátů do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení a s velkou rozlišovací schopností (Nebesářová, 2001). Elektrony pronikají pozorovaným preparátem a interakcemi s ním jsou odchylovány od původního směru, jímž se pohyboval hlavní svazek. Většina odchýlených elektronů je pomocí clony ze svazku vyloučeno. Obraz je tvořen dopadem převážně neodchýlených elektronů na zobrazovací systém. Zobrazovacím systémem může být stínítko z luminiscenčního materiálu, na kterém se vytvoří kruhový obraz (Bílý, 2007).

Pro naše pozorování byl používán TEM JEOL JEM-1010 (JEOL Ltd., Japan) v laboratoři EM, PaÚ AV ČR v Českých Budějovicích.

## Příprava preparátů pro TEM

Vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii nesmí obsahovat vodu, protože v mikroskopu jsou vystaveny vysokému vakuu a z mokrých preparátů by se voda bouřlivě uvolňovala. To by vedlo jednak jejich degradaci a za druhé i ztěžovalo práci urychleným elektronům, které by se srážkami s molekulami vody brzdily. Proto je nutné biologický materiál, který obsahuje vysoké procento vody, před pozorováním v mikroskopu upravit tak, aby žádnou vodu neobsahoval. Druhou podmínkou, která vyplývá z nízké penetrační schopnosti elektronů, je, že tloušťka preparátu nesmí překročit 100 nm. Silnějšími preparáty elektrony neprojdou a pokud ano, je obraz zatížený značnou chromatickou vadou a nelze jej zaostřit. Příprava vzorků se skládá ze šesti základních fází.

Prvním krokem přípravy preparátů pro TEM je v naprosté většině případů **fixace**. Jejím cílem je zachovat buněčnou ultrastrukturu s minimem změn oproti nativnímu stavu, zabránit degradačním procesům a stabilizovat vzorek do dalších kroků přípravy. K fixaci biologických objektů se používají chemické nebo fyzikální metody, nejčastěji změna teploty nebo záření. Při chemické fixaci se nejčastěji používá oxid osmičelý ( $\text{OsO}_4$ ).

Po fixaci a promytí preparátu následuje jeho zalití do vhodné pryskyřice. Většina zalévacích médií rutině používaných pro přípravu vzorků pro TEM není mísitelná s vodou, a proto je nutné po fixaci nahradit volnou vodu ve vzorku kapalinou, která je mísitelná jak s vodou, tak se zalévacím médiem. K tomuto účelu slouží **dehydratace**, kdy vzorek je postupně umísťován do roztoků s rostoucím podílem dehydračního činidla, až je jím všechna voda v systému nahrazena. Nejčastěji se jako dehydratační činidla používají etanol a aceton.

Účelem **zalévání** je dát zpracovávanému vzorku takové vlastnosti, aby ho bylo možné nakrájet na ultratenké řezy. Na pryskyřice, které se pro zalévání používají, je kladeno velké množství požadavků.

Preparáty pro TEM by měly mít optimálně tloušťku 60 – 70 nm. Dalším krokem přípravy je tedy **krájení** zalitých preparátů na řezy této tloušťky, které jsou označovány jako ultratenké. Obecně platí, že čím tenčí jsou ultratenké řezy, tím lepší je rozlišení struktur v obraze, ale slabší kontrast. K pohodlné manipulaci s ultratenkými řezy slouží **sít'ky**. Vyrábějí se z mědi, niklu, zlata a dalších materiálů elektrogalvanickým leptáním, jejich průměr se v současnosti ustálil na 3 mm.

Biologický materiál zalitý do pryskyřice je z hlediska interakcí se svazkem elektronů značně homogenní a proto mají ultratenké řezy v TEM minimální kontrast. Z tohoto důvodu je nutné biologický materiál kontrastovat, tj. diferencially nasýtit látkami, které s elektrony reagují. Způsobem, který se pro **kontrastování** používá nejvíce, je selektivní adsorpce těžkých kovů na buněčné organely. Protože těžké kovy více rozptylují primární elektrony, zvyšují tak kontrast struktur, na které se adsorbovaly. K prvnímu kontrastování vlastně dochází při fixaci  $\text{OsO}_4$ . V ostatních případech se řezy kontrastují buď před zalitím, tzv. v bloku, nebo po nakrájení na ultratenké řezy přímo na sít'kách (Nebesářová, 2001).



### 3.4.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronový mikroskop (dále SEM) je přístroj určený k pozorování povrchů nejrůznějších objektů. Je ho možné do jisté míry považovat za analogii světelného mikroskopu v dopadajícím světle, na rozdíl od něho je výsledný obraz tvořen pomocí sekundárního signálu – odražených nebo sekundárních elektronů (Nebesářová, 2001). Elektrony dopadají na pozorovaný preparát a interakcí s hmotou vyraží ze vzorku elektrony. Ty jsou pomocí vhodného potenciálu přitahovány na detektory, které vytváří signál upravený pro zpracování v zobrazovacím systému. Zobrazovacím systémem může být obrazovka, na které se vytváří příslušný obraz vzniklý rastrováním elektronového paprsku po snímané ploše. Výsledným obrazem je snímek, který zachycuje povrchovou strukturu preparátu (Bílý, 2007).

Pro naše pozorování byl používán SEM JEOL JSM-6300 nebo JEOL JSM-7401F (JEOL Ltd., Japan) v laboratoři EM, PaÚ AV ČR v Českých Budějovicích.

#### Příprava preparátů pro SEM

Stejně jako v případě TEM ani v SEM většinou nelze biologické materiály prohlížet bez jejich úpravy. Preparát vhodný pro prohlížení v mikroskopu musí totiž splňovat následující kritéria: na jeho povrchu by se neměly vyskytovat cizorodé částice např. prach, měl by být stabilní ve vakuu, stabilitu by měl vykazovat i při ozáření elektronovým paprskem, měl by produkovat dostatečné množství požadovaného signálu např. sekundárních elektronů, při expozici primárními elektrony by nemělo docházet k jeho nabíjení.

Některé biologické objekty tyto předpoklady bez problémů splňují, jako např. různé mineralizované struktury, zuby, kosti apod. Ve většině případů však biologické vzorky obsahují vodu, která z nich musí být před prohlížením odstraněna, což znamená jejich úpravu. Výběr metody závisí na typu preparátu a informacích, které o něm chceme získat. Živočišné tkáně a orgány, rostlinné tkáně představují preparáty, které jsou dosti choulostivé a vyžadují jemné zacházení. Jejich příprava začíná kvalitní fixací. Po každém kroku musí být tyto vzorky centrifugovány, což je nebezpečný zdroj tvarových změn. Východiskem může být jejich přilepení na vhodnou podložku, např. krycí sklíčko, nebo zachycení na filtr, se kterým se pak dále pracuje. Přípravě preparátů pro SEM musí být věnována náležitá pozornost, neboť často bývá zdrojem artefaktů (Nebesářová, 2001).

## 4 Výsledky

### 4.1 Přehled výsledků fyzikálních měření

Tabulka 4.1 ukazuje průměrné hodnoty měřených fyzikálních veličin v hodnocených skupinách *Galleria mellonella*, které jsou podstatné pro interpretaci výsledků inferenční statistiky a srovnání vláken různých typů (dle stáří housenek, popř. s aplikací juvenoidu nebo bez ní). Označení skupin u *G. mellonella* je vyjádřením stáří ve dnech posledního instaru (označení hedvábí velkými písmeny je arbitrární). Označení skupin *B. mori* vychází z vývojových fází housenek, kterým bylo hedvábí odebíráno – BW: housenky po ukončení žíru „wandering“ a BK: předoucí slabé kokony.

Jednotlivé měřené parametry jsou podrobně popsány a vyhodnoceny v následujících odstavcích. Pro lepší orientaci znázorňuji výsledky graficky pomocí krabicového grafu (box plot) a bodového průměrového grafu. Box plot popisuje variabilitu dat uvnitř skupin, tučně je zvýrazněn medián skupiny, obdélník vymezuje kvartilové rozpětí, úsečky ukazují odlehlá pozorování (do vzdálenosti 3/2 kvartilového rozpětí, dále bodově). Bodový graf zobrazuje průměrné hodnoty pro danou veličinu s kategoriemi dle stáří ve dnech posledního instaru. Barevně a tvarem znaku je odlišena aplikace juvenoidu.

Výsledky jednotlivých měření jsou uvedeny v příloze (tabulka 8.1, 8.2 a 8.3).

Tabulka 4.1: Fyzikální vlastnosti vláken *Galleria mellonella*

Skupina (ozn. hedvábí)	N	Hmotnost [mg]	Průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]	Max. napětí [MPa]	Relat. deformace [mm/mm]	Houževnatost [MPa]	Tuhost [GPa]
První sada, odběr a měření 2007							
<b>G1a (GB)</b>	11	145 $\pm$ 30	2,03 $\pm$ 0,31	375,94 $\pm$ 141,95	0,19 $\pm$ 0,04	50,32 $\pm$ 21,71	9,71 $\pm$ 2,93
<b>G2a (GC)</b>	27	169 $\pm$ 25	2,31 $\pm$ 0,29	500,80 $\pm$ 162,02	0,22 $\pm$ 0,05	74,49 $\pm$ 32,95	11,75 $\pm$ 2,86
<b>G5a (GF, GH)</b>	44	280 $\pm$ 25; 245 $\pm$ 31	2,81 $\pm$ 0,51	525,33 $\pm$ 194,42	0,28 $\pm$ 0,07	97,42 $\pm$ 42,72	11,18 $\pm$ 2,53
<b>G7a (GA)</b>	40	372 $\pm$ 27	3,58 $\pm$ 0,40	555,82 $\pm$ 197,81	0,30 $\pm$ 0,06	97,17 $\pm$ 35,97	9,67 $\pm$ 2,48
<b>G5a-J (GJ)</b>	27	270 $\pm$ 41	2,39 $\pm$ 0,34	688,11 $\pm$ 246,18	0,27 $\pm$ 0,08	121,54 $\pm$ 54,96	14,50 $\pm$ 3,00
<b>G6a-J (GL)</b>	38	268 $\pm$ 21	2,90 $\pm$ 0,64	556,54 $\pm$ 199,48	0,23 $\pm$ 0,05	88,42 $\pm$ 30,04	12,05 $\pm$ 2,69
Druhá sada, odběr a měření 2008							
<b>G1b (E)</b>	24	199 $\pm$ 31	2,43 $\pm$ 0,42	816,49 $\pm$ 258,85	0,22 $\pm$ 0,04	117,51 $\pm$ 46,06	14,46 $\pm$ 3,39
<b>G5b (F)</b>	23	261 $\pm$ 11	2,69 $\pm$ 0,44	770,84 $\pm$ 300,15	0,25 $\pm$ 0,07	120,95 $\pm$ 52,34	15,14 $\pm$ 4,58
<b>G7b (K)</b>	21	220 $\pm$ 16	3,55 $\pm$ 0,21	984,12 $\pm$ 234,40	0,24 $\pm$ 0,05	136,85 $\pm$ 40,44	13,42 $\pm$ 3,51
<b>G5b-J (M)</b>	22	382 $\pm$ 51	2,70 $\pm$ 0,12	710,04 $\pm$ 288,58	0,23 $\pm$ 0,07	108,41 $\pm$ 60,04	15,23 $\pm$ 3,45

 Tabulka 4.2: Fyzikální vlastnosti vláken *Bombyx mori*

Skupina (ozn. hedvábí)	N	Hmotnost [mg]	Průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]	Max. napětí [MPa]	Relat. deformace [mm/mm]	Houževnatost [MPa]	Tuhost [GPa]
Odběr a měření 2008							
<b>BW (BW)</b>	22	1615 $\pm$ 53	6,30 $\pm$ 0,40	998,87 $\pm$ 239,24	0,21 $\pm$ 0,05	151,60 $\pm$ 44,15	29,91 $\pm$ 5,88
<b>BK (BK)</b>	26	896 $\pm$ 69	5,49 $\pm$ 0,30	1092,70 $\pm$ 217,62	0,20 $\pm$ 0,04	169,49 $\pm$ 54,16	35,91 $\pm$ 3,23

#### 4.1.1 Fyzikální vlastnosti vláken *Galleria mellonella*

##### Průměr vlákna

Z naměřených hodnot jsem pro potřeby této práce využila jen výsledky měření vlákna, tj. obou filamentů s jejich sericinovým obalem. Rozpětí mezi minimální a maximální hodnotou průměru vlákna je uvnitř skupin i mezi skupinami značné. Hodnoty průměru vlákna, které postupně rostou se stářím larev, naznačují pozitivní korelaci mezi těmito veličinami (tabulka 4.3). GLM potvrdil vliv stáří a aplikace juvenoidu na průměr vlákna (tabulka 4.4). V první sadě (2007) tento závěr platí plně, v sadě z roku 2008 byl zcela potlačen vliv aplikace juvenoidu (průměrový graf 4.4). Ve druhém případě neexistují statisticky významné rozdíly mezi stejně starými housenkami s aplikací a bez aplikace juvenoidu. Tento fakt můžeme pravděpodobně přičíst vyššímu titru endogenního juvenilního hormonu (JH), ke kterému může dojít např. působením chladového šoku. Nelze ani vyloučit kontaminaci všech skupin housenek juvenoidem. Při detailnějším pohledu na první sadu je z dílčí Eta-statistiky zjevná větší role stáří než juvenoidu.

Z průměrového grafu 4.3 (sada 2007) je patrné, že hodnota průměru vlákna je při aplikaci juvenoidu bližší hodnotě druhého dne, než hodnotě u stejně starých housenek (pátý den) bez juvenoidu. Otestováním této hypotézy byl jev na 95% intervalu spolehlivosti také potvrzen.

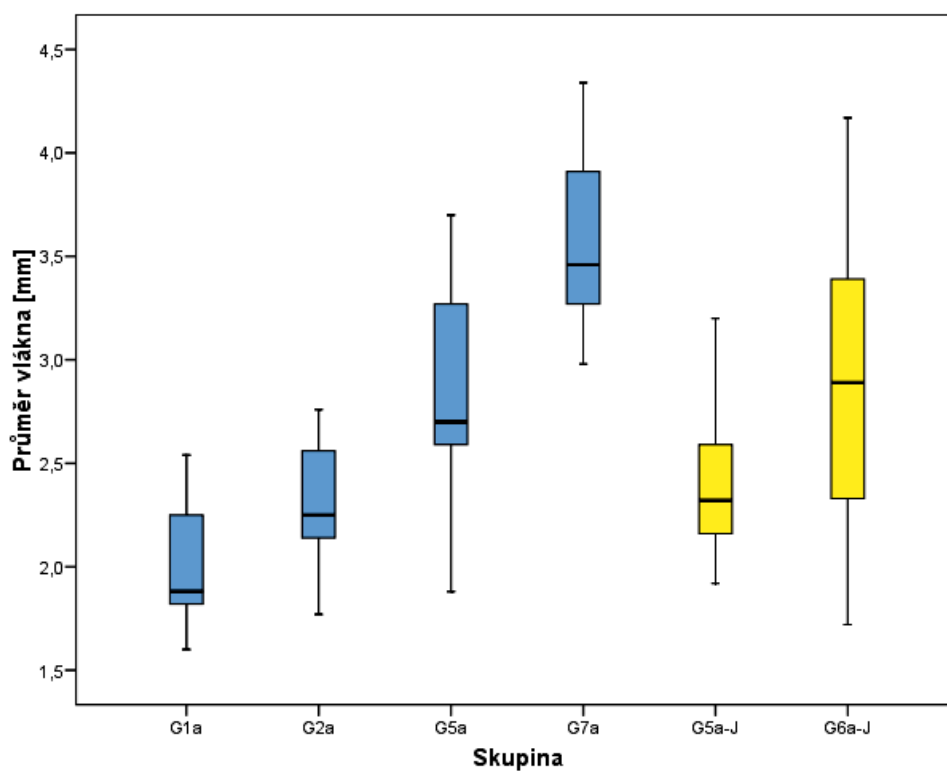
Tabulka 4.3: Základní charakteristiky – průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
První sada, odběr a měření 2007						
G1a	11	1,600	2,540	2,032	0,314	0,099
G2a	27	1,770	2,760	2,312	0,287	0,082
G5a	44	1,880	3,700	2,810	0,511	0,262
G7a	40	2,980	4,340	3,578	0,395	0,156
G5a-J	27	1,920	3,200	2,391	0,343	0,118
G6a-J	38	1,720	4,170	2,898	0,635	0,403
Druhá sada, odběr a měření 2008						
G1b	24	1,730	3,060	2,433	0,416	0,173
G5b	23	1,860	3,460	2,689	0,443	0,197
G7b	21	3,190	3,820	3,549	0,213	0,045
G5b-J	22	2,540	2,960	2,698	0,122	0,015

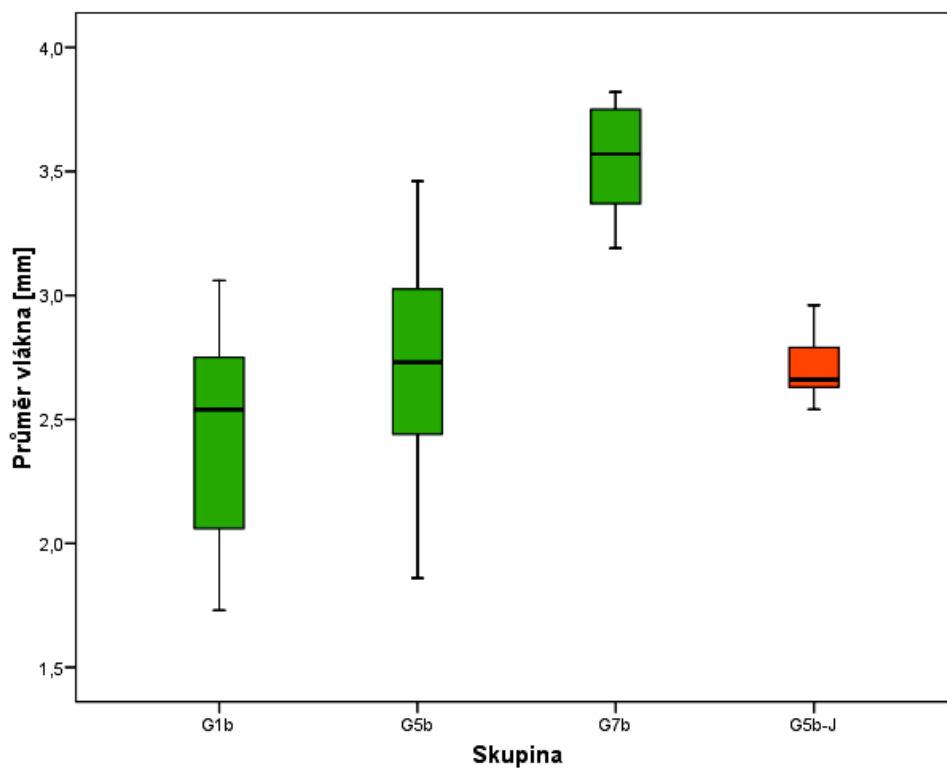
Tabulka 4.4: Test vlivu faktorů (GLM) – průměr vlákna

Faktor	St. volnosti	F-statistika	Sig.	Dílčí Eta-statistika
První sada, odběr a měření 2007				
Skupina	5	39,501	0,000	0,522
Stáří	4	47,489	0,000	0,512
Juvenoid	1	13,873	0,000	0,071
Druhá sada, odběr a měření 2008				
Skupina	3	46,546	0,000	0,619
Stáří	2	67,757	0,000	0,612
Juvenoid	1	0,008	0,928	0,000

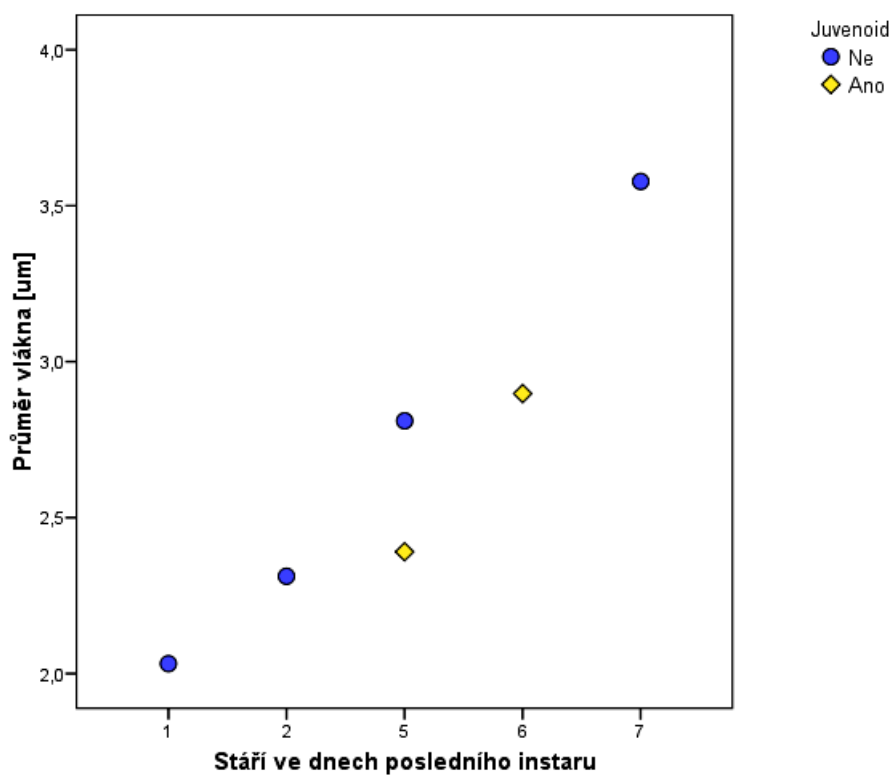
Graf 4.1: Box plot – průměr vlákna (2007)



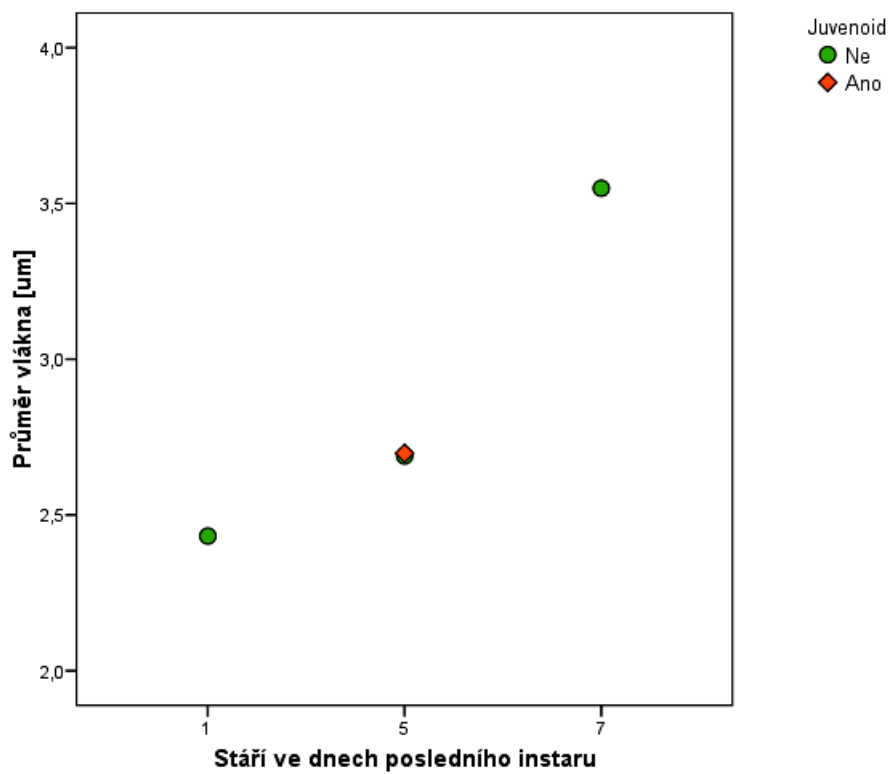
Graf 4.2: Box plot – průměr vlákna (2008)



Graf 4.3: Bodový průměrový graf – průměr vlákna (2007)



Graf 4.4: Bodový průměrový graf – průměr vlákna (2008)



## Maximální napětí

Zatímco poměr rozpětí mezi minimální a maximální hodnotou průměru vlákna odpovídal zhruba dvounásobku, u maximálního napětí je variabilita hodnot uvnitř skupin až čtyřnásobná. U poslední skupiny z druhé sady (2008) se rovněž vyskytují velmi vysoké odlehle hodnoty (tabulka 4.5). Z testu je patrná slabší závislost max. napětí na stáří housenky, než tomu bylo u průměru vlákna, přesto je i zde v obou sadách statisticky významná. V sadě odebrané v roce 2008 opět nemá na rozdíly v max. napětí vliv aplikace juvenoidu (tabulka 4.6), podobně jako v případě průměru vlákna.

Podíváme-li se na průkaznější první sadu, je v průměrovém grafu (graf 4.7) opět patrný rostoucí trend, avšak aplikace juvenoidu zde má interakční efekt (s rostoucím stářím max. napětí při aplikaci juvenoidu klesá), u stejně starých housenek je pak průměrná hodnota max. napětí značně vyšší.

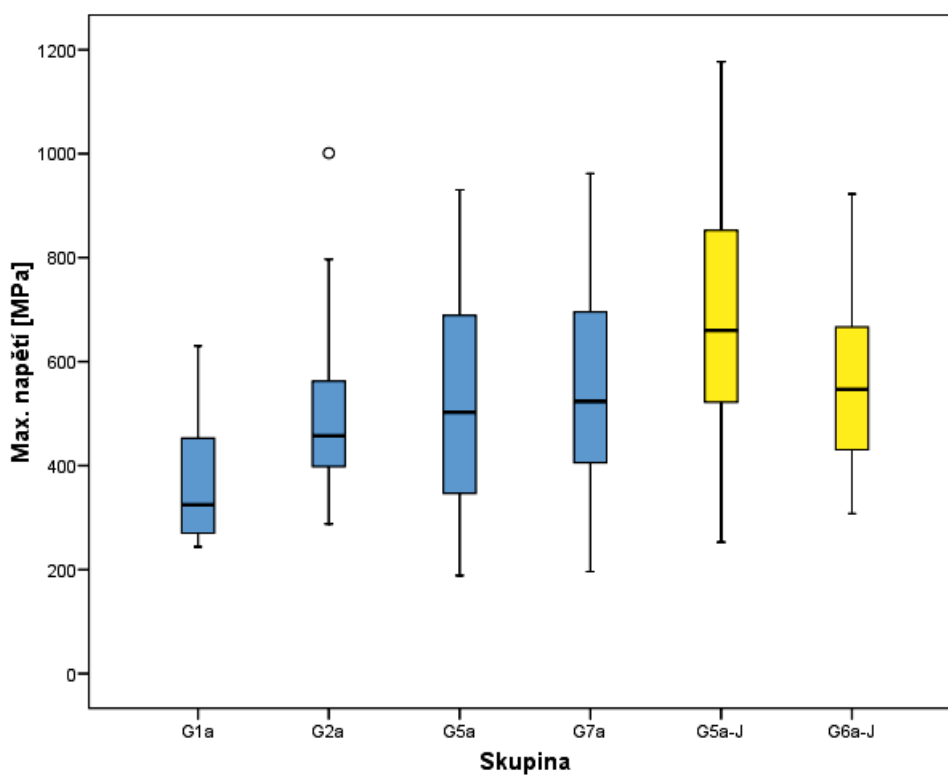
Tabulka 4.5: Základní charakteristiky – max. napětí [MPa]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
První sada, odběr a měření 2007						
G1a	11	243,805	630,398	375,940	141,949	20149,400
G2a	27	287,880	1001,109	500,795	162,021	26250,790
G5a	44	188,714	930,548	525,333	194,417	37798,120
G7a	40	196,007	961,499	555,861	197,812	39129,650
G5a-J	27	252,681	1176,628	688,109	246,175	60601,890
G6a-J	38	307,699	922,225	556,543	151,326	22899,660
Druhá sada, odběr a měření 2008						
G1b	24	440,185	1492,742	816,489	258,849	67002,857
G5b	23	359,478	1234,181	770,842	300,145	90086,840
G7b	21	590,844	1340,178	984,115	234,396	54941,649
G5b-J	22	343,965	1295,562	710,043	288,582	83279,533

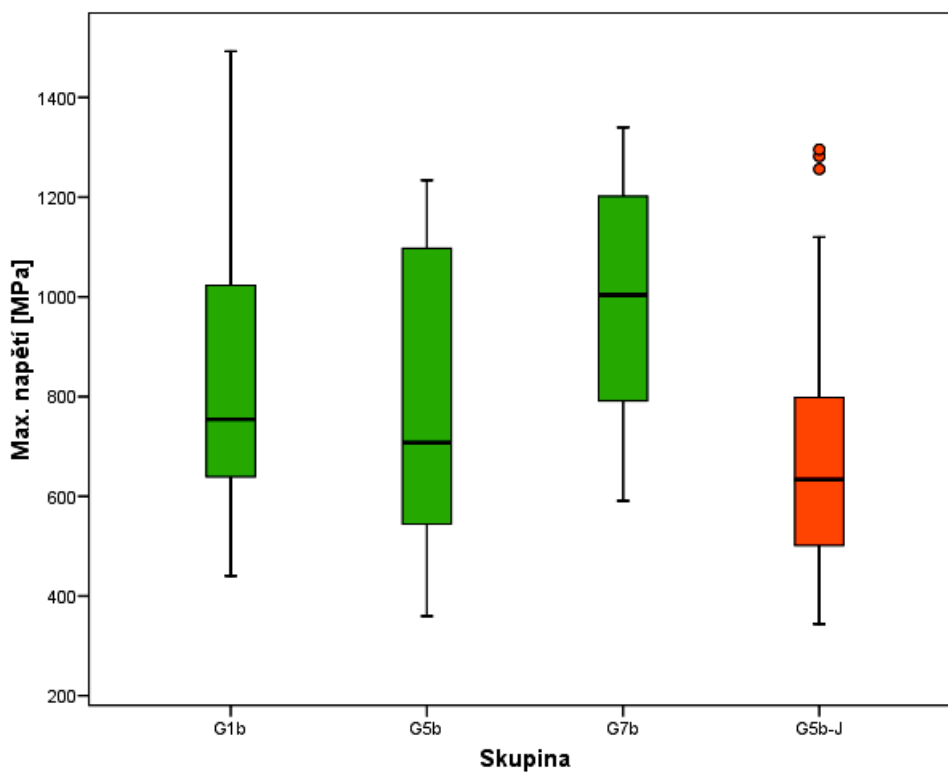
Tabulka 4.6: Test vlivu faktorů (GLM) – max. napětí

Faktor	St. volnosti	F-statistika	Sig.	Dílčí Eta statistika
První sada, odběr a měření 2007				
Skupina	5	5,288	0,000	0,127
Stáří	4	3,942	0,004	0,080
Juvenoid	1	12,425	0,001	0,064
Druhá sada, odběr a měření 2008				
Skupina	3	3,992	0,010	0,122
Stáří	2	3,701	0,029	0,079
Juvenoid	1	0,561	0,456	0,006

Graf 4.5: Box plot – max. napětí (2007)

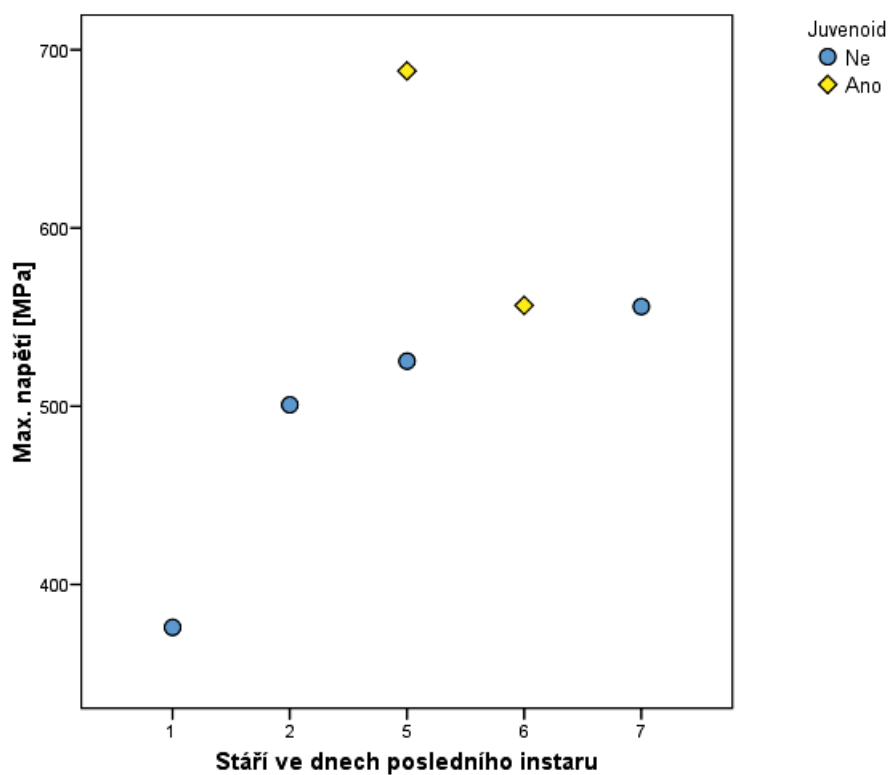


Graf 4.6: Box plot – max. napětí (2008)

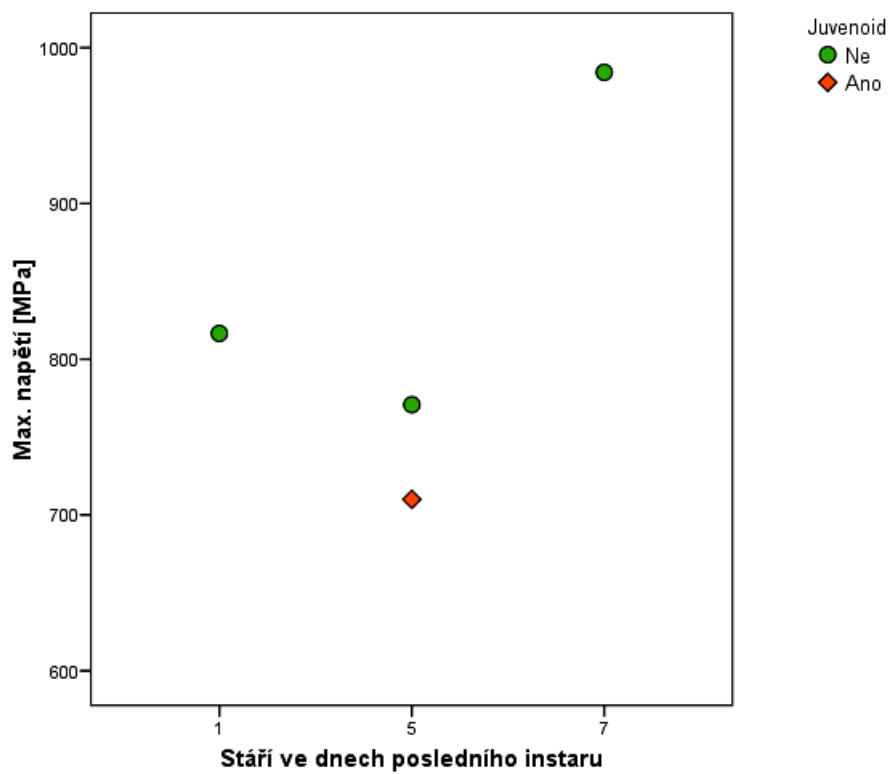




Graf 4.7: Bodový průměrový graf – max. napětí (2007)



Graf 4.8: Bodový průměrový graf – max. napětí (2008)



## Relativní deformace

Naměřené hodnoty relativní deformace jsou uvnitř skupin i mezi skupinami velmi vyrovnané (tabulka 4.7). Testování vlivu faktorů (tabulka 4.8) potvrdilo závislost relativní deformace na stáří housenky pouze u první sady odběrů. Statisticky významná role aplikace juvenoidu nebyla potvrzena ani v jednom případě. Přesto je při pohledu na bodový graf odběrů první sady (graf 4.11) viditelný interakční efekt, který mění směr pravidelnosti mezi stářím a relat. deformací po aplikaci juvenoidu. Ve všech případech došlo po aplikaci juvenoidu ke snížení hodnot relat. deformace oproti kategoriím, kde juvenoid přítomný nebyl. Platí jednostranná hypotéza, že hodnota relativní deformace (2007) je při aplikaci juvenoidu bližší hodnotě skupiny stejně starých housenek (pátý den) bez juvenoidu, než hodnotě u housenek druhého dne.

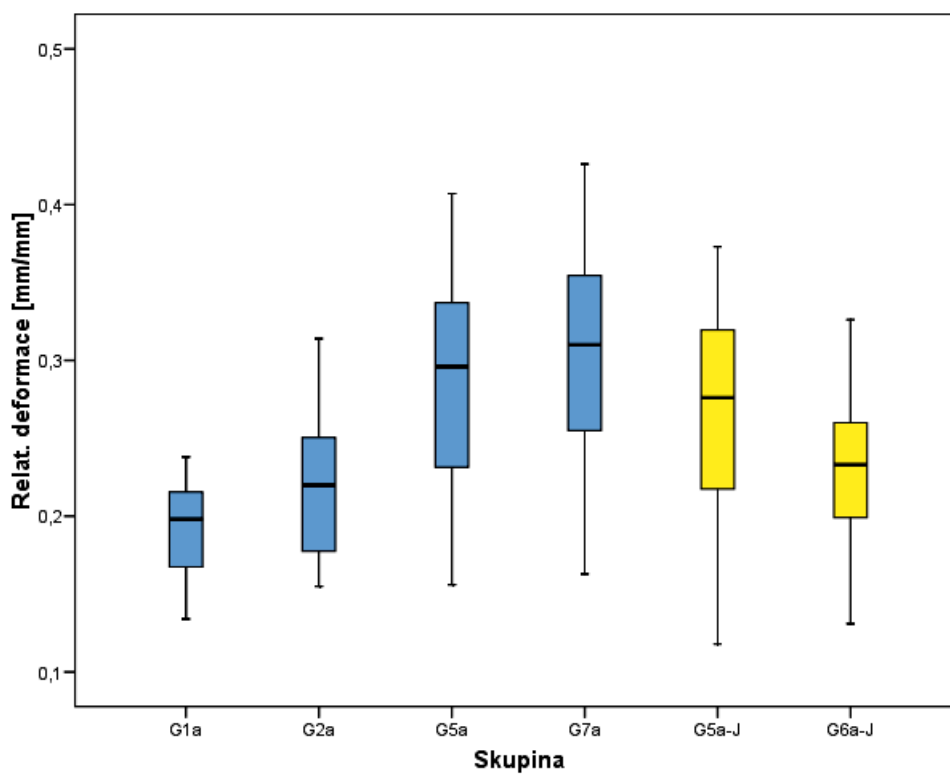
Tabulka 4.7: Základní charakteristiky – relat. deformace [mm/mm]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
První sada, odběr a měření 2007						
G1a	11	0,134	0,238	0,190	0,035	0,001
G2a	27	0,155	0,314	0,216	0,046	0,002
G5a	44	0,156	0,407	0,284	0,072	0,005
G7a	40	0,163	0,426	0,304	0,062	0,004
G5a-J	27	0,118	0,373	0,265	0,076	0,006
G6a-J	38	0,131	0,326	0,231	0,048	0,002
Druhá sada, odběr a měření 2008						
G1b	24	0,152	0,293	0,221	0,044	0,002
G5b	23	0,077	0,333	0,245	0,070	0,005
G7b	21	0,163	0,312	0,241	0,047	0,002
G5b-J	22	0,096	0,354	0,228	0,068	0,005

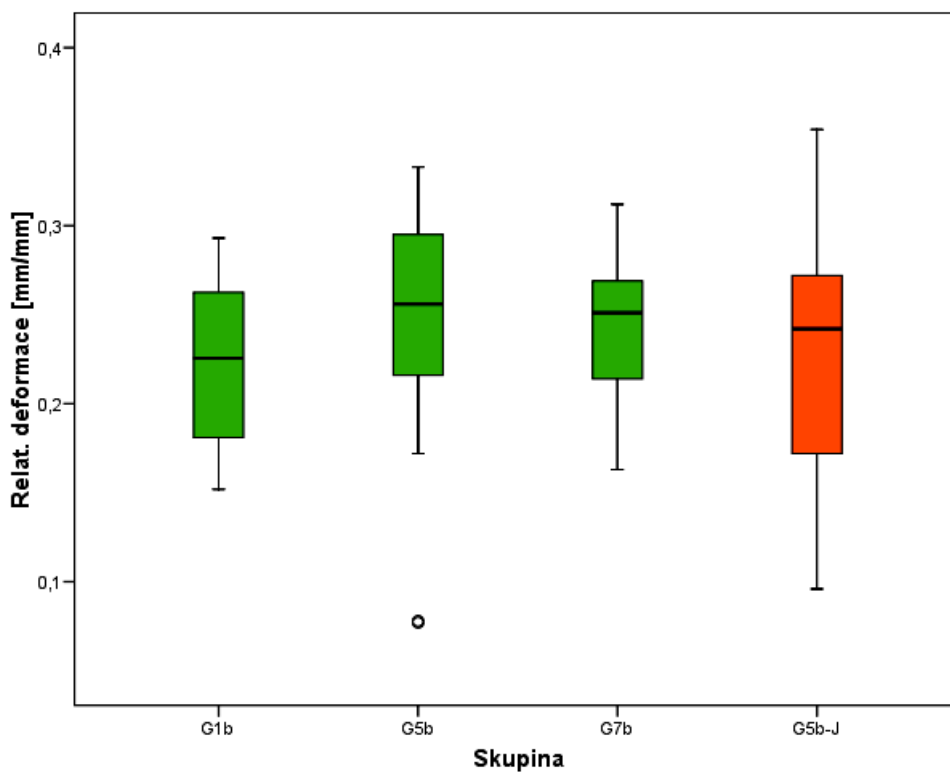
Tabulka 4.8: Test vlivu faktorů (GLM) – relat. deformace

Faktor	St. volnosti	F-statistika	Sig.	Dílčí Eta statistika
První sada, odběr a měření 2007				
Skupina	5	12,873	0,000	0,262
Stáří	4	14,738	0,000	0,246
Juvenoid	1	1,711	0,192	0,009
Druhá sada, odběr a měření 2008				
Skupina	3	0,879	0,455	0,030
Stáří	2	1,184	0,311	0,027
Juvenoid	1	1,020	0,315	0,012

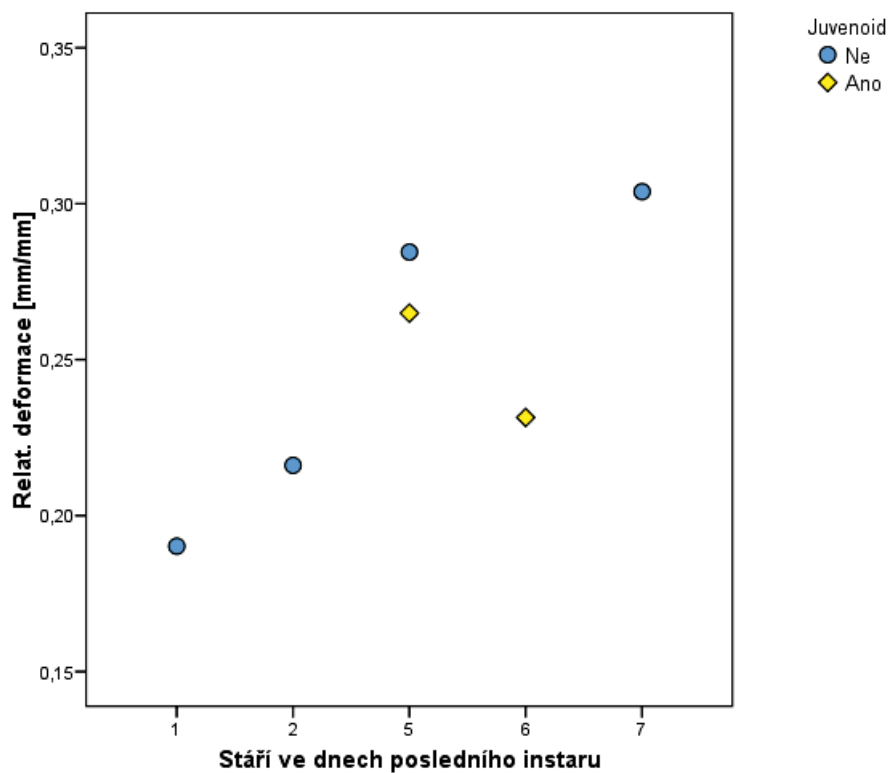
Graf 4.9: Box plot – relat. deformace (2007)



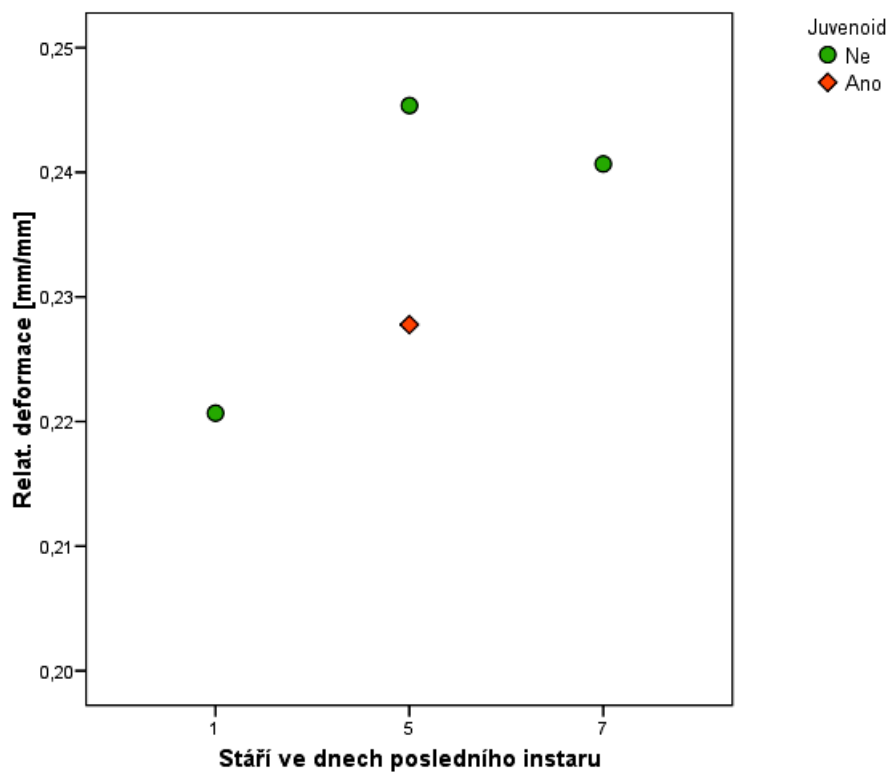
Graf 4.10: Box plot – relat. deformace (2008)



Graf 4.11: Bodový průměrový graf – relat. deformace (2007)



Graf 4.12: Bodový průměrový graf – relat. deformace (2008)



## Houževnatost

Výrazným znakem hodnot této vlastnosti je rozkolísanost. U obou sad měření byly velké rozdíly mezi minimální a maximální hodnotou houževnatosti podle skupin (tabulka 4.9). Značná variabilita hodnot celkově snižuje reálnou vypovídací schopnost testů (tabulka 4.10), což se promítlo i v nízkých hodnotách dílčí Eta-statistiky. Trend průměrných hodnot je v obou sadách rostoucí se stářím housenky, v první sadě silněji s výjimkou hodnoty poslední skupiny. Statisticky významné rozdíly v houževnatosti vlákna dle stáří housenky byly testem prokázány pouze u první sady.

Vliv aplikace juvenoidu se podařilo na zvolené hladině testu prokázat pouze u první sady. Z grafického znázornění je patrné rozporuplné chování vzorků z obou sad. V první sadě je hodnota houževnatosti u housenek pátého dne s juvenoidem výrazně vyšší než u jejich ekvivalentu bez juvenoidu, ve druhé sadě je to naopak.

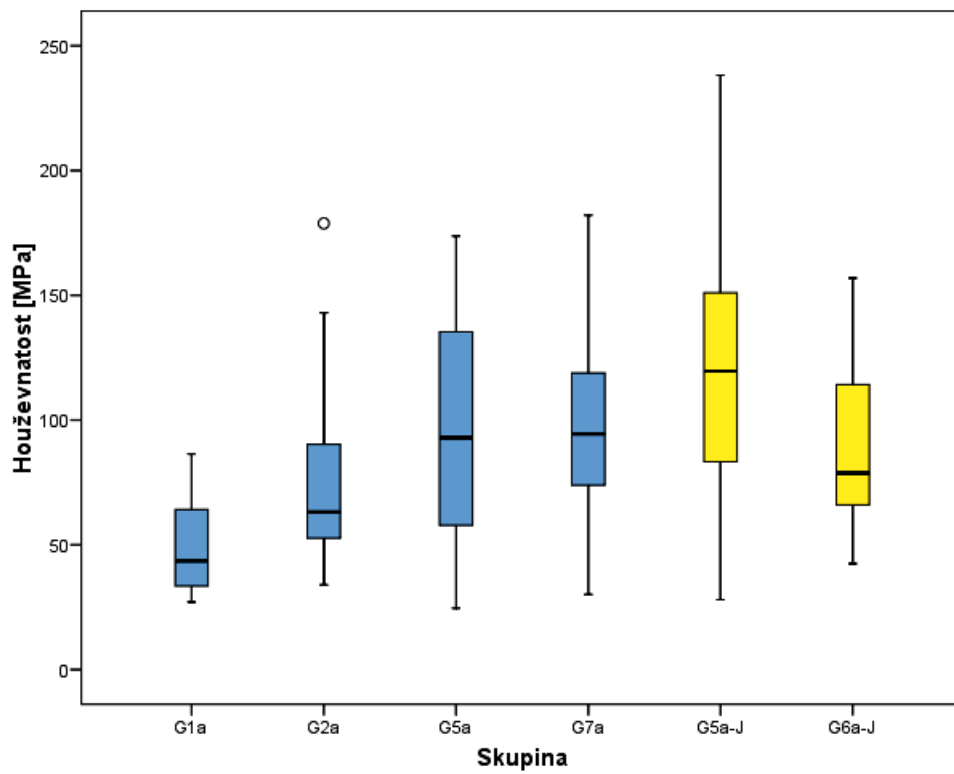
Tabulka 4.9: Základní charakteristiky – houževnatost [MPa]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
První sada, odběr a měření 2007						
G1a	11	27,140	86,419	50,315	21,708	471,250
G2a	27	33,990	178,821	74,491	32,953	1085,919
G5a	44	24,652	173,764	97,418	42,724	1825,310
G7a	40	30,114	182,132	97,166	35,970	1293,853
G5a-J	27	28,028	238,215	121,542	55,960	3131,526
G6a-J	38	42,508	156,865	88,424	30,039	902,344
Druhá sada, odběr a měření 2008						
G1b	24	56,438	211,573	117,513	46,064	2121,929
G5b	23	27,102	193,017	120,946	52,338	2739,315
G7b	21	70,096	207,623	136,851	40,443	1635,612
G5b-J	22	30,964	270,960	108,407	60,042	3605,061

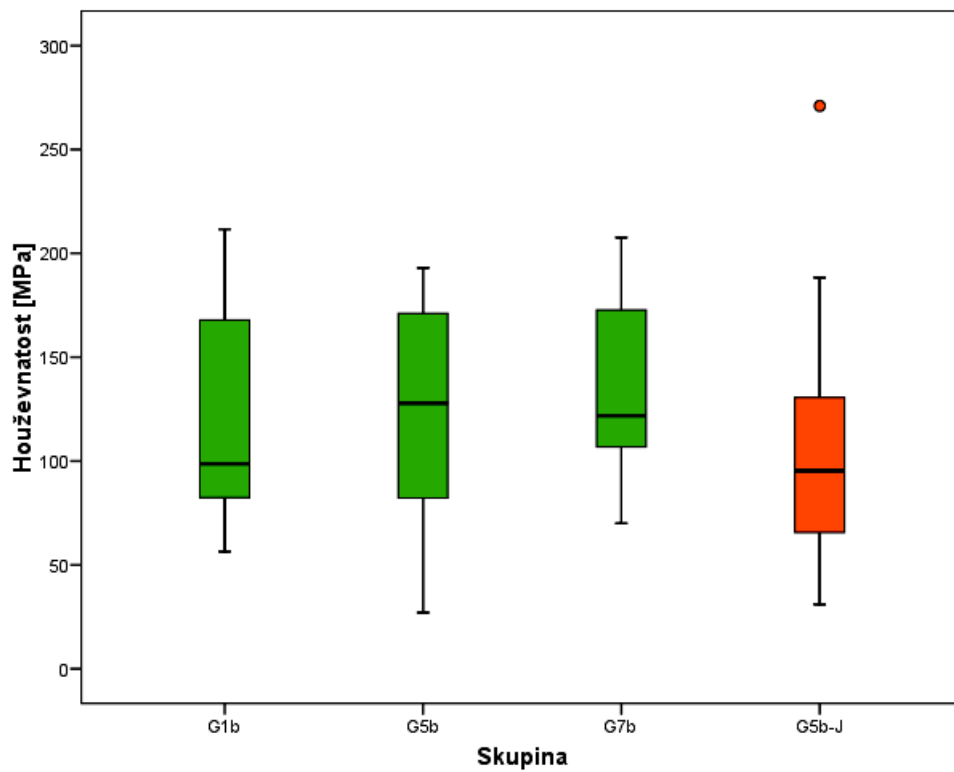
Tabulka 4.10: Test vlivu faktorů (GLM) – houževnatost

Faktor	St. volnosti	F-statistika	Sig.	Dílčí Eta statistika
První sada, odběr a měření 2007				
Skupina	5	7,017	0,000	0,162
Stáří	4	7,379	0,000	0,140
Juvenoid	1	6,369	0,012	0,034
Druhá sada, odběr a měření 2008				
Skupina	3	1,193	0,317	0,040
Stáří	2	0,922	0,402	0,021
Juvenoid	1	0,699	0,405	0,008

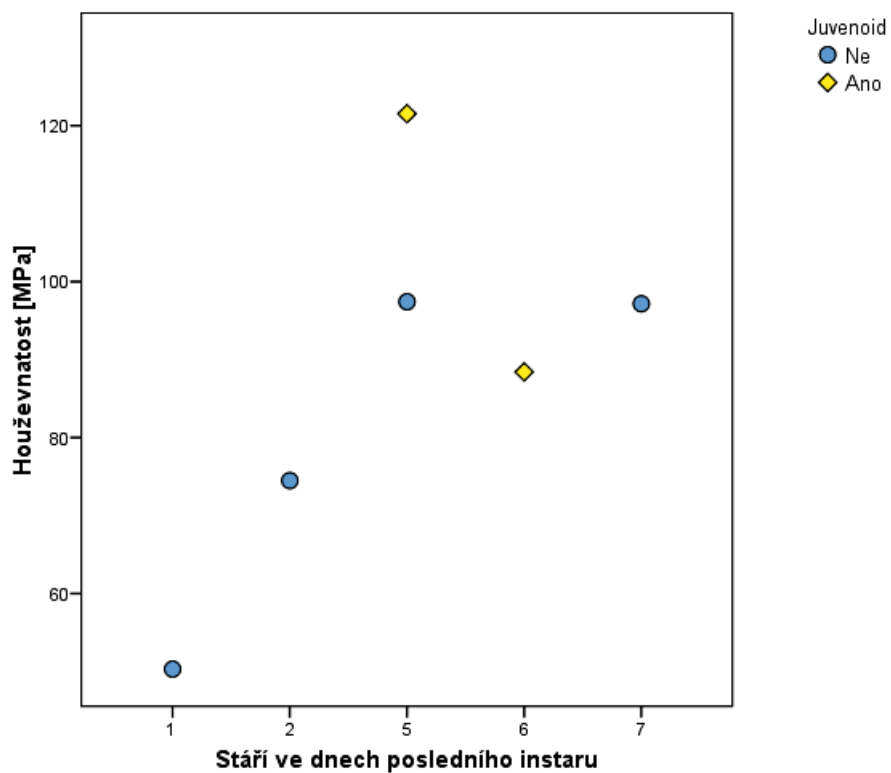
Graf 4.13: Box plot – houževnatost (2007)



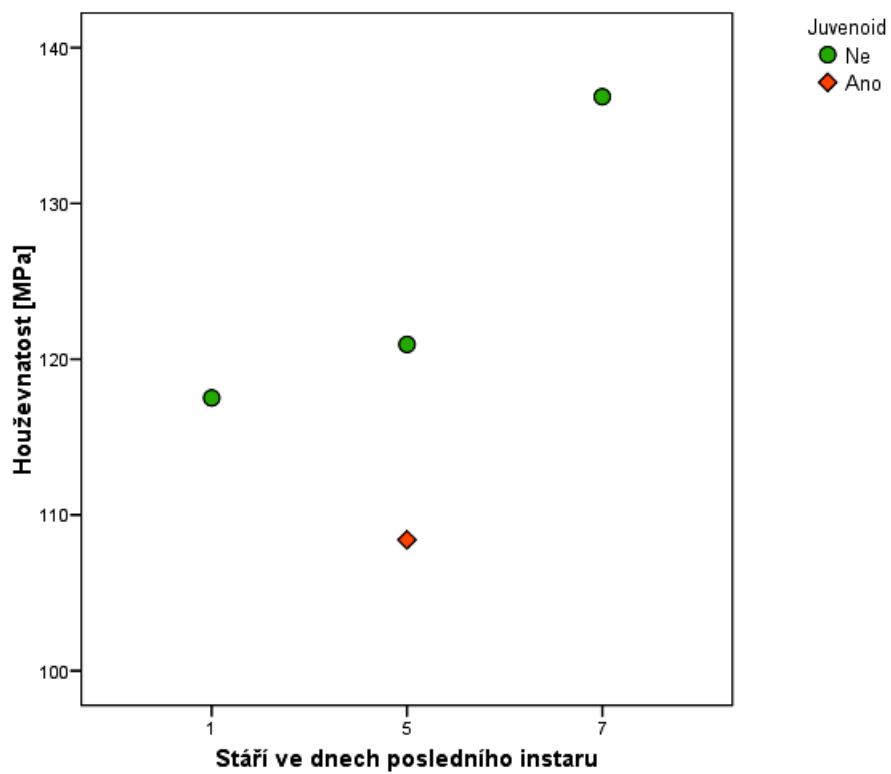
Graf 4.14: Box plot – houževnatost (2008)



Graf 4.15: Bodový průměrový – houževnatost (2007)



Graf 4.16: Bodový průměrový graf – houževnatost (2008)



### Youngův modul (tuhost)

Rozptyly hodnot Youngova modulu uvnitř skupin jsou dosti podobné (tabulka 4.11). Z testování faktorů pomocí GLM (tabulka 4.12) vyšlo u obou sad jako významné stáří housenky. Vliv juvenoidu se podařilo potvrdit pouze v první sadě, kde jeho aplikace výrazně zvýšila hodnoty Youngova modulu.

Sledujeme-li průměrné hodnoty Youngova modulu při zohlednění stáří, roste jejich velikost z nízkých hodnot v prvním dni, maxima je dosaženo ve druhém, resp. pátém dni, pak se směr závislosti obrací, velikost Youngova modulu u starších housenek opět klesá.

Tabulka 4.11: Základní charakteristiky – Youngův modul [GPa]

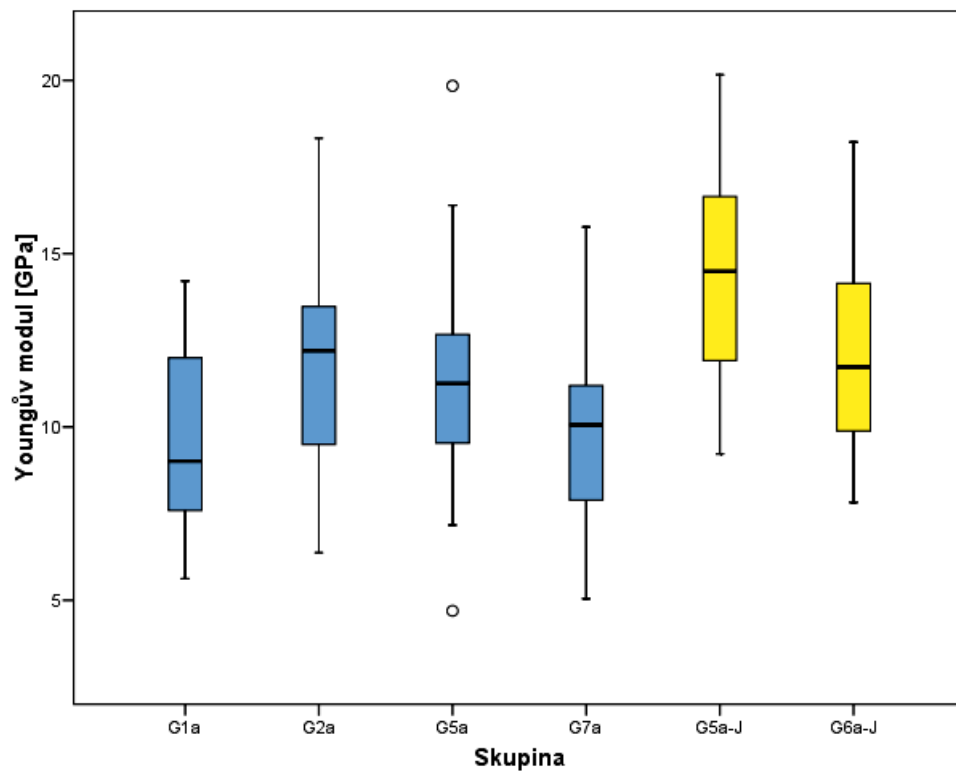
Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
První sada, odběr a měření 2007						
G1a	11	5,625	14,208	9,713	2,930	8,587
G2a	27	6,371	18,331	11,753	2,860	8,182
G5a	44	4,695	19,843	11,176	2,527	6,388
G7a	40	5,044	15,769	9,666	2,478	6,139
G5a-J	27	9,220	20,163	14,504	2,995	8,968
G6a-J	38	7,822	18,221	12,054	2,687	7,221
Druhá sada, odběr a měření 2008						
G1b	24	7,732	22,480	14,462	3,385	11,457
G5b	23	9,219	31,134	15,140	4,576	20,938
G7b	21	8,904	20,149	13,416	3,513	12,342
G5b-J	22	6,773	20,267	15,233	3,454	11,932

Tabulka 4.12: Test vlivu faktorů (GLM) – Youngův modul

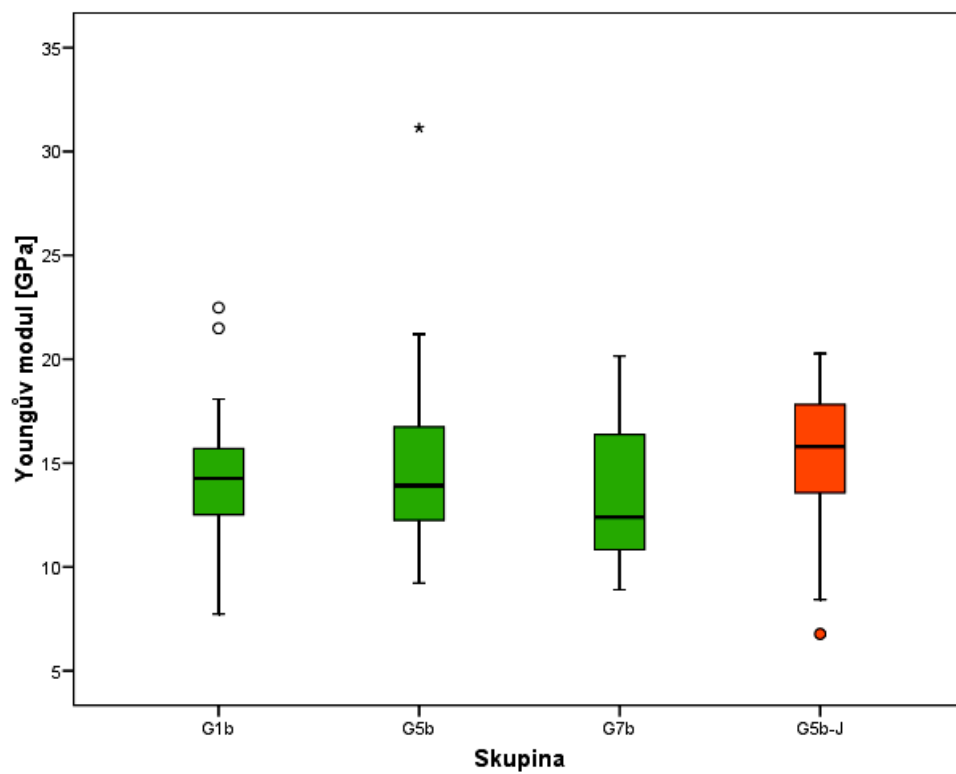
Faktor	St. volnosti	F-statistika	Sig.	Dílčí Eta statistika
První sada, odběr a měření 2007				
Skupina	5	11,895	0,000	0,247
Stáří	4	6,486	0,000	0,125
Juvenoid	1	25,549	0,000	0,124
Druhá sada, odběr a měření 2008				
Skupina	3	3,992	0,010	0,122
Stáří	2	3,701	0,029	0,079
Juvenoid	1	0,561	0,456	0,006



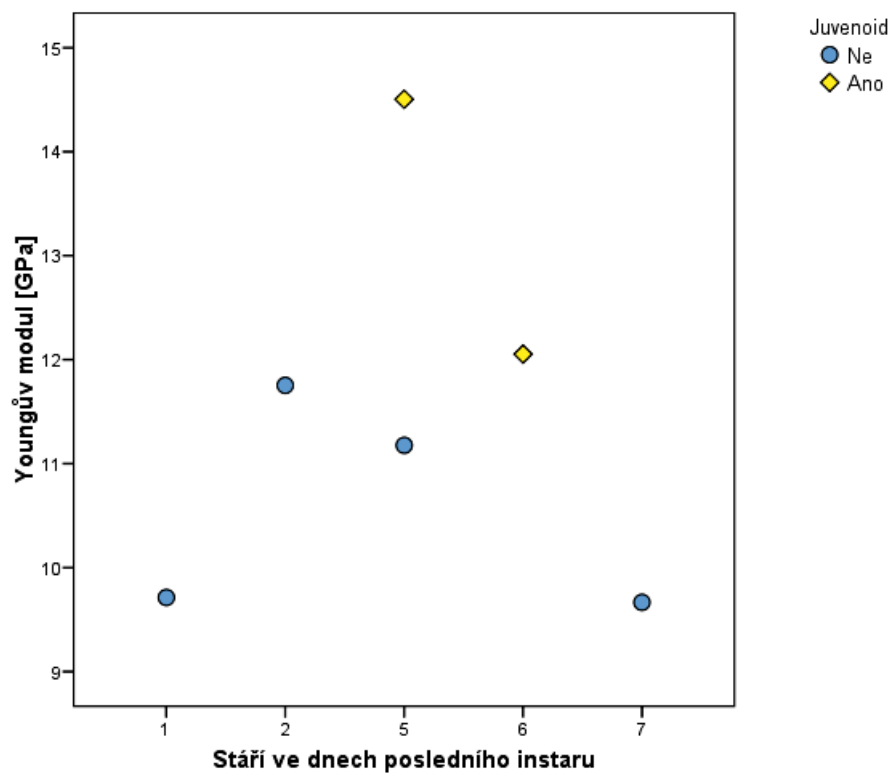
Graf 4.17: Box plot – Youngŭv modul (2007)



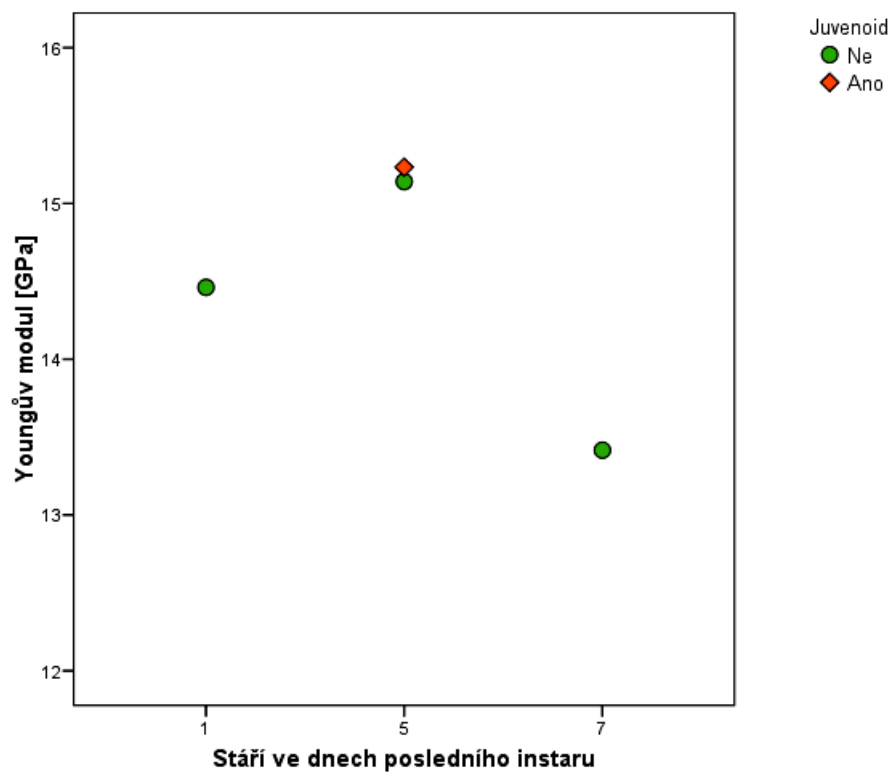
Graf 4.18: Box plot – Youngŭv modul (2008)



Graf 4.19: Bodový průměrový graf – Youngův modul (2007)



Graf 4.20: Bodový průměrový graf – Youngův modul (2008)



### 4.1.2 Fyzikální vlastnosti vláken *Bombyx mori*

#### Průměr vlákna

Hodnoty průměru vlákna nemají ve skupinách bource normální rozdělení. Nerovnoměrné rozdělení hodnot okolo mediánu je patrné i z box plotu (graf 4.21). Pro testování hypotézy o významnosti rozdílů mezi skupinami byl proto použit neparametrický Mann-Whitney U test (tabulka 4.14). Mann-Whitney U test potvrdil statisticky významné rozdíly mezi skupinami. S přihlédnutím k průměrům lze tedy konstatovat, že s rostoucím stářím (skupina BK) klesá průměr vlákna.

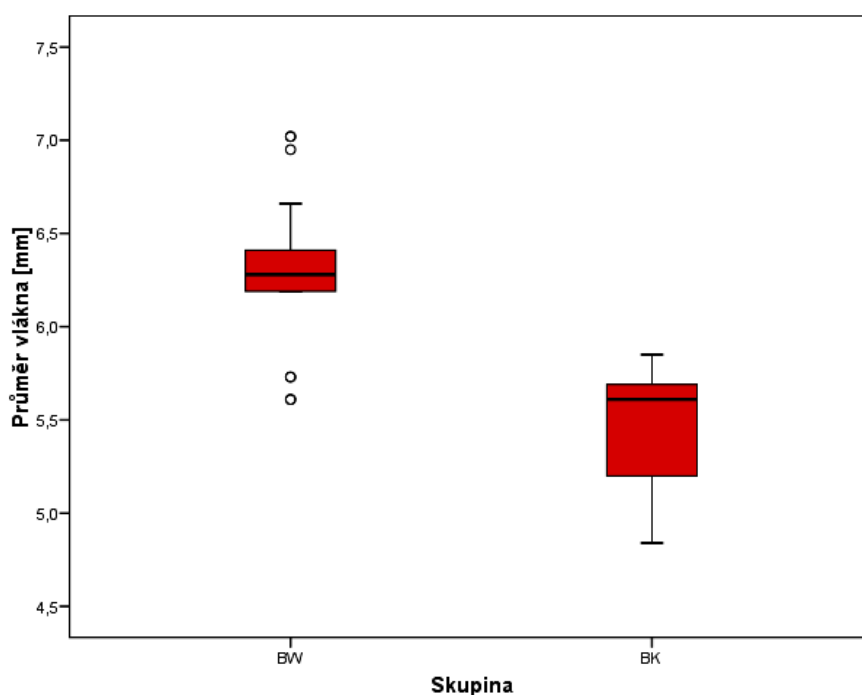
Tabulka 4.13: Základní charakteristiky – průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
<b>BW</b>	22	5,610	7,020	6,300	0,404	0,163
<b>BK</b>	26	4,840	5,850	5,487	0,301	0,091
<b>Celkem</b>	48	4,840	7,020	5,860	0,537	0,289

Tabulka 4.14: Mann-Whitney U – průměr vlákna

Skupina	N	Střední pořadí	Součet pořadí	Testová statistika	
<b>BW</b>	22	35,773	787	<b>Mann-Whitney U</b>	38
<b>BK</b>	26	14,962	389	<b>Sig.</b>	0,000
<b>Celkem</b>	48				

Graf 4.21: Box plot – průměr vlákna



## Maximální napětí

V případě max. napětí jsou hodnoty ve skupinách rozděleny normálně, proto můžeme použít t-test. Minimální i maximální hodnoty jsou v obou skupinách podobné, totéž platí i pro průměr (tabulka 4.15). T-test nepotvrdil dostatečné rozdíly mezi skupinami, resp. statisticky významný vliv stáří bource na hodnoty max. napětí jeho vláken (tabulka 4.16).

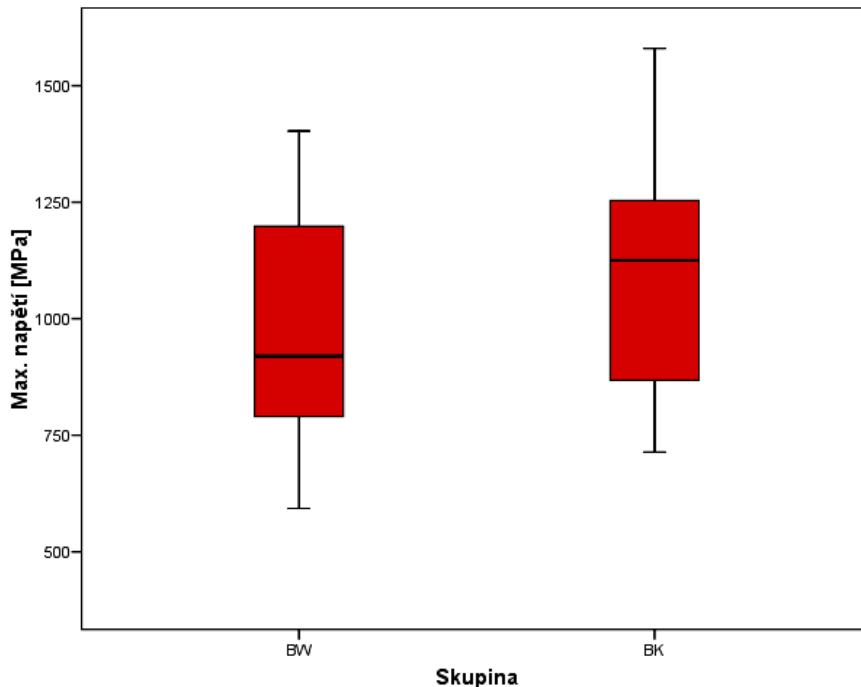
Tabulka 4.15: Základní charakteristiky – max. napětí [MPa]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
<b>BW</b>	22	593,258	1402,347	998,868	239,242	57236,925
<b>BK</b>	26	713,645	1580,057	1092,695	217,623	47359,725
<b>Celkem</b>	48	593,258	1580,057	1049,691	230,212	52997,406

Tabulka 4.16: T-test dvou nezávislých výběrů – max. napětí

Levenův test homogenity rozptylů		T-test pro stejné rozptyly				
F statistika	Sig.	t statistika	Stupně volnosti	Sig. (T-test)	95% int. spolehlivosti	
					Horní	Dolní
0,908	0,346	-1,422	46	0,162	-226,627	38,972

Graf 4.22: Box plot – max. napětí



## Relativní deformace

V obou skupinách jsou krajní hodnoty relativní deformace obdobné, ovšem skupina BW nemá hodnoty v normálním rozdělení, proto je třeba použít neparametrický Mann-Whitney U test. Stejně jako u předchozí veličiny, tak ani zde nebyly prokázány dostatečně velké rozdíly mezi skupinami, na jejichž základě by se dal uznat vliv stáří na uvedenou vlastnost vlákna (tabulka 4.18). V obou skupinách jsou vyrovnané průměrné hodnoty relativní deformace (tabulka 4.17).

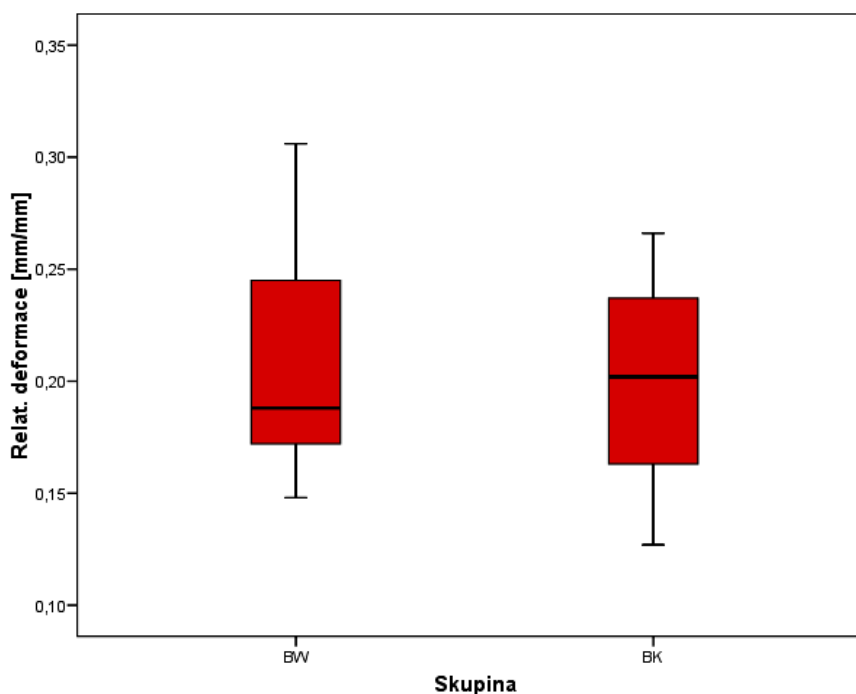
Tabulka 4.17: Základní charakteristiky – relat. deformace [mm/mm]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
<b>BW</b>	22	0,148	0,306	0,207	0,045	0,002
<b>BK</b>	26	0,127	0,266	0,198	0,044	0,002
<b>Celkem</b>	48	0,127	0,306	0,202	0,044	0,002

Tabulka 4.18: Mann-Whitney U – relat.deformace

Skupina	N	Střední pořadí	Součet pořadí	Testová statistika	
<b>BW</b>	22	25,705	565	<b>Mann-Whitney U</b>	259,5
<b>BK</b>	26	23,481	611	<b>Sig.</b>	0,583
<b>Celkem</b>	48				

Graf 4.23: Box plot – relat. deformace



## Houževnatost

Situace u dat houževnatosti je obdobná jako u předchozích vlastností. Byl splněn požadavek normality, proto byl použit t-test (tabulka 4.20), avšak jeho výsledek nepotvrdil statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

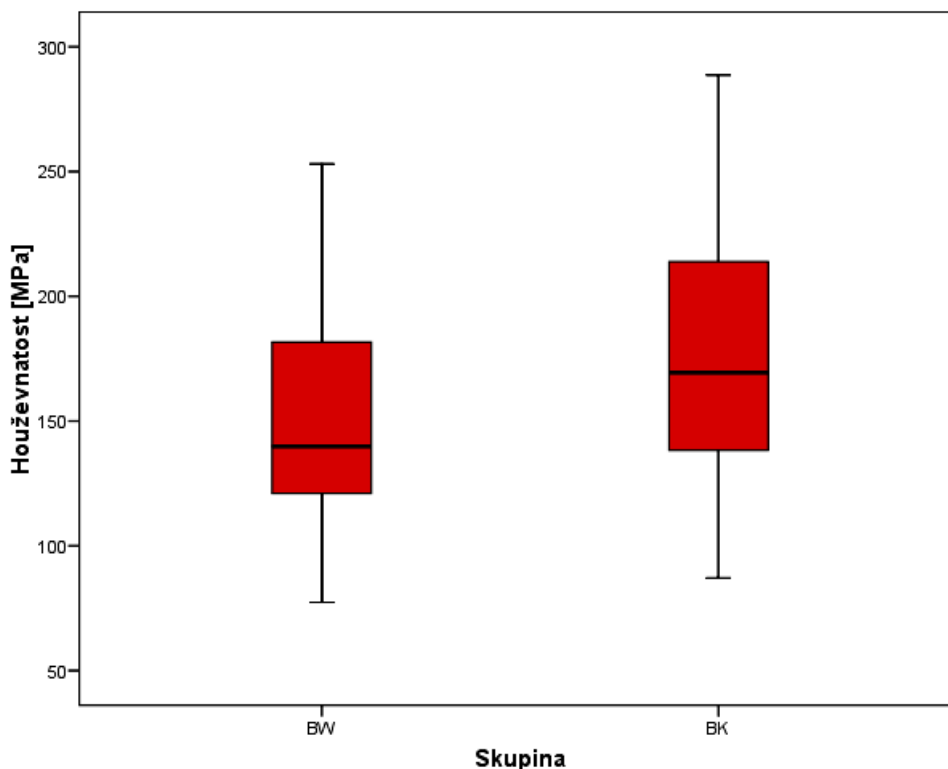
Tabulka 4.19: Základní charakteristiky - houževnatost [MPa]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
<b>BW</b>	22	77,374	252,958	151,596	44,152	1949,408
<b>BK</b>	26	87,106	288,674	169,485	54,156	2932,849
<b>Celkem</b>	48	77,374	288,674	161,286	50,122	2512,173

Tabulka 4.20: T-test dvou nezávislých výběrů - houževnatost

Levenův test homogenity rozptylů		T-test pro stejné rozptyly				
F statistika	Sig.	t statistika	Stupně volnosti	Sig. (T-test)	95% int. spolehlivosti	
					Horní	Dolní
0,792	0,378	-1,239	46	0,222	-46,950	11,172

Graf 4.24: Box plot - houževnatost



### Youngův modul (tuhost)

Dostatečně velké rozdíly mezi skupinami v průměrných hodnotách Youngova modulu byly potvrzeny t-testem (tabulka 4.22). Proto lze zobecnit závislost, že s rostoucím stářím housenky, resp. s přechodem od předení „lešení“ pro uchycení kokonu k předení vlastního kokonu, rostou i hodnoty Youngova modulu. Růstový trend s věkem byl pozorován i u dalších vlastností mimo průměru vlákna, ovšem s nedostatečnou intenzitou pro zobecnění těchto pravidelností.

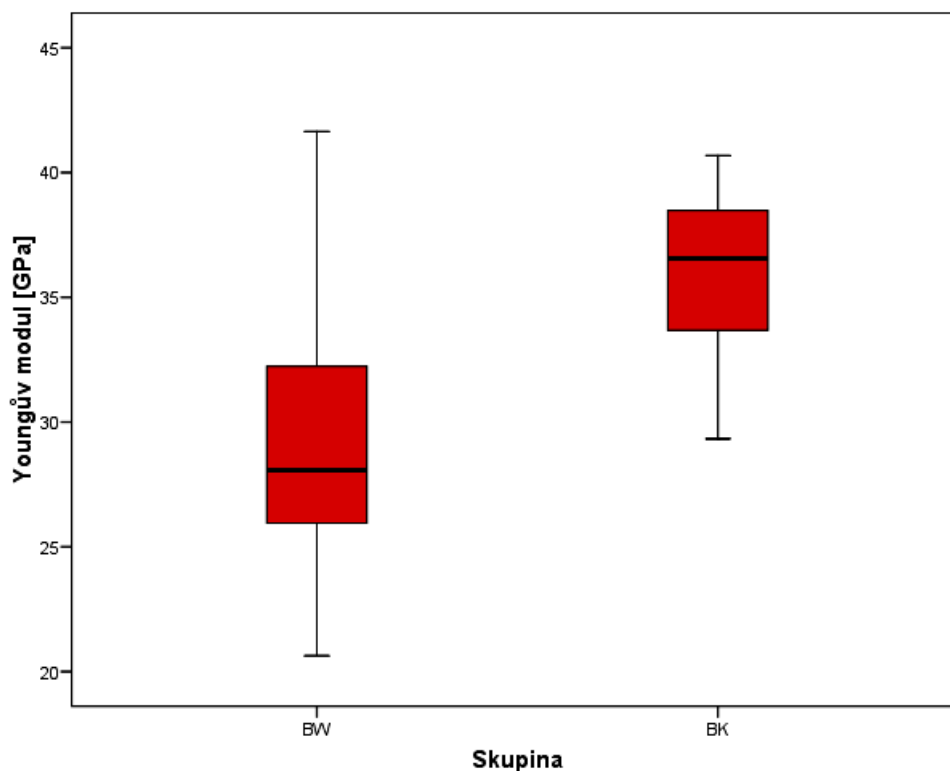
Tabulka 4.21: Základní charakteristiky - Youngův modul [GPa]

Skupina	N	Minimum	Maximum	Průměr	Sm. odchylka	Rozptyl
<b>BW</b>	22	20,629	41,637	29,911	5,847	34,185
<b>BK</b>	26	29,334	40,680	35,906	3,233	10,455
<b>Celkem</b>	48	20,629	41,637	33,158	5,472	29,946

Tabulka 4.22: T-test dvou nezávislých výběrů - Youngův modul

Levenův test homogenity rozptylů		T-test pro nesejné rozptyly				
F statistika	Sig.	t statistika	Stupně volnosti	Sig. (T-test)	95% int. spolehlivosti	
					Horní	Dolní
6,963	0,011	-4,286	46	0,000	-8,845	-3,144

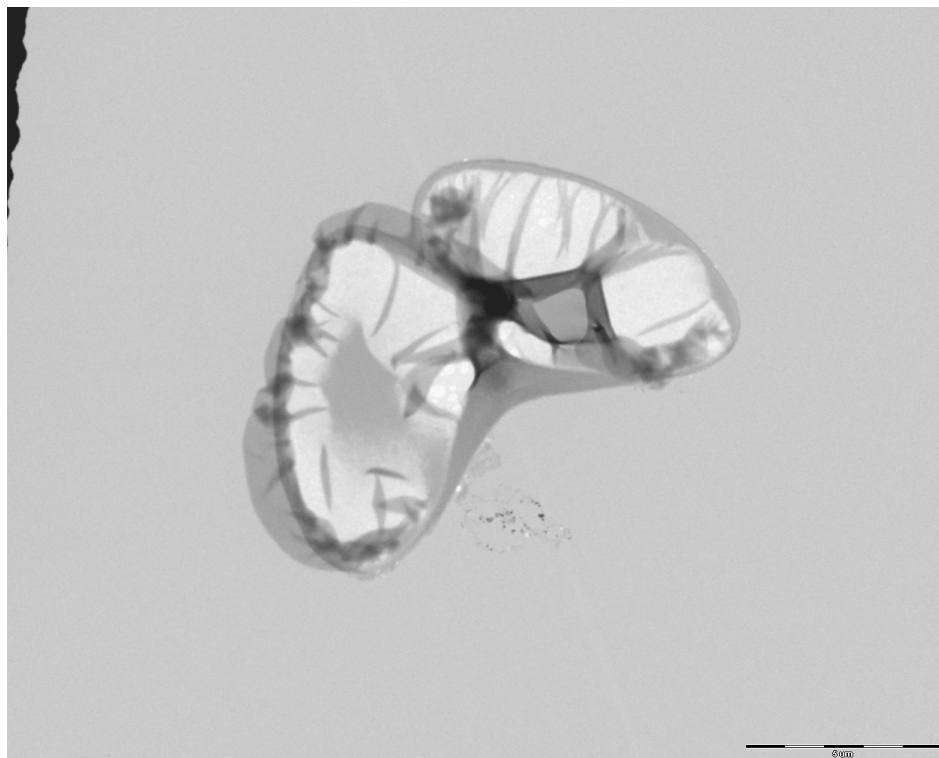
Graf 4.25: Box plot - Youngův modul



## 4.2 Elektronová mikroskopie

### 4.2.1 TEM

Bohužel se pro TEM nepodařilo připravit kvalitní preparáty. Zřejmě během odvodňování preparátů došlo k deformacím, které se na řezech vlákna projevily jako „zkrabacení“. Na fotografii 4.1 jsou nicméně vidět dva fibroinové filameny (bílé ovály) a jejich sericinový obal (zobrazený šedě).



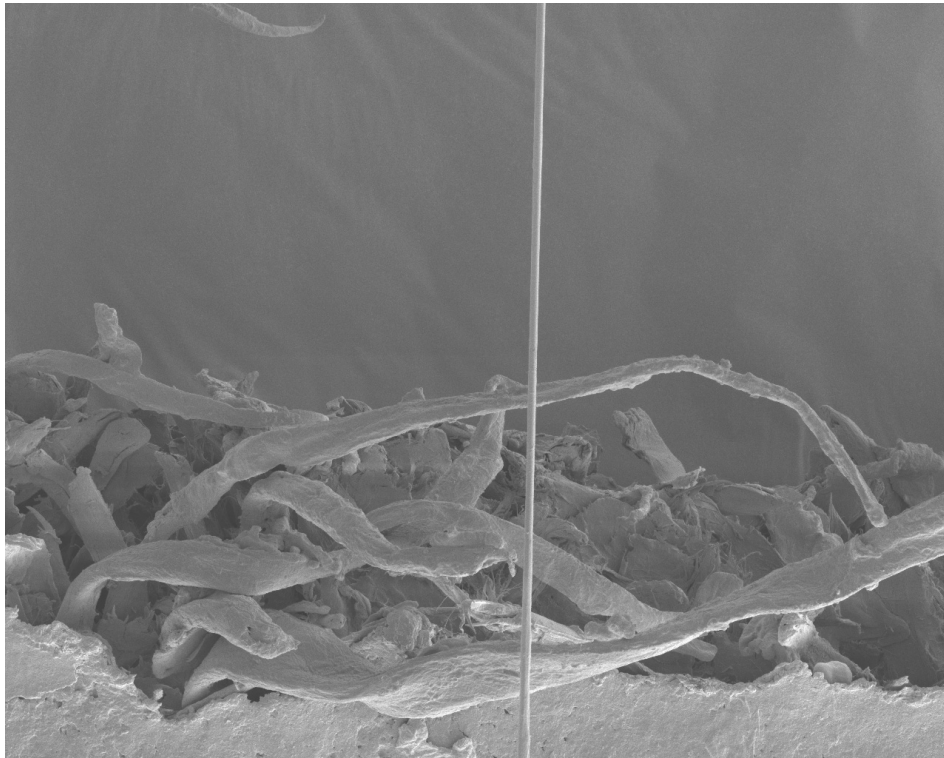
Obr. 4.1: TEM – Příčný řez hedvábným vláknem *Galleria mellonella*

### 4.2.2 SEM

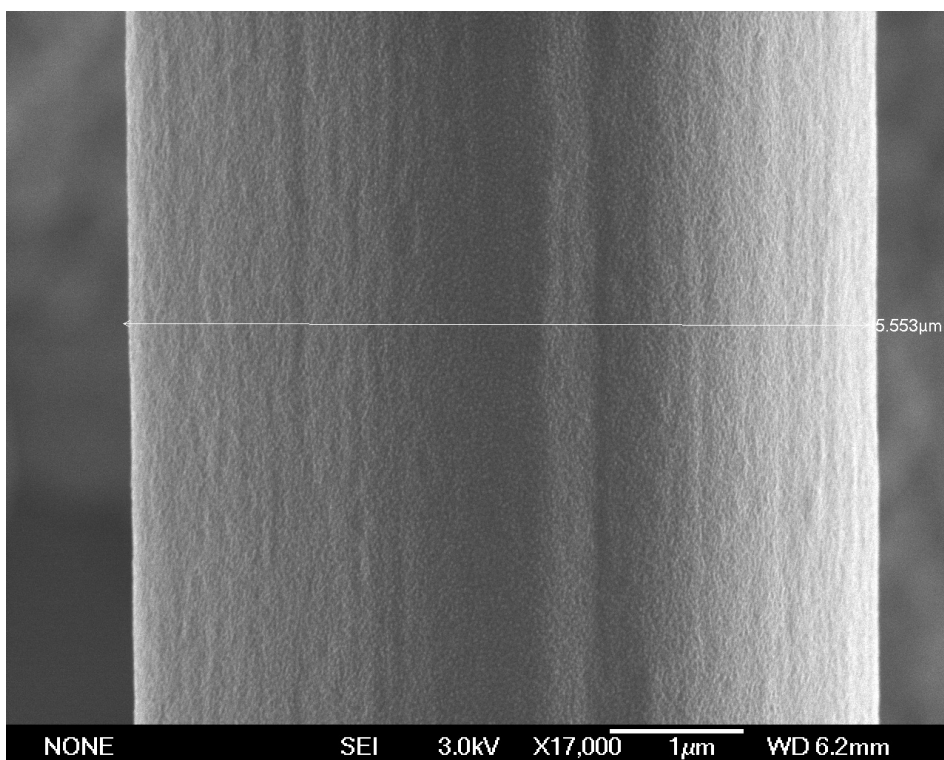
Skenovací elektronová mikroskopie zobrazila při malém zvětšení hedvábné vlákno jako hladkou „nit“. Obrázek 4.2 ukazuje vlákno zavíječe voskového, včetně ukotvení vlákna k papírové podložce. Nepravidelné provazce v dolní části obrázku jsou vlákna celulózy uvnitř povrchově hlazené podložky.

Při velkých zvětšeních (17 000krát) je vidět jemná povrchová struktura vlákna (vrstva sericinů) a jsou jasně patrné obrysy filamentů pod sericinovou vrstvou. Na obrázku 4.3 je vlákno housenek zavíječe voskového 7. dne posledního larválního instaru, při pohledu na jeho dlouhou průřezovou osu (kapitola 3.2.2). Její délka byla 5,553  $\mu\text{m}$ , zatímco délka krátké osy naměřená poněkud nepřesně (měla by se měřit jen kontura jednoho filamentu, do malé míry byl ale měřen i druhý) činila 3,050  $\mu\text{m}$  (obr. 4.4). Průměr vlákna vypočtený z těchto hodnot je 4,302  $\mu\text{m}$ , což odpovídá maximální hodnotě 4,340  $\mu\text{m}$  zjištěné měřením v polarizačním mikroskopu (tabulka 4.3).

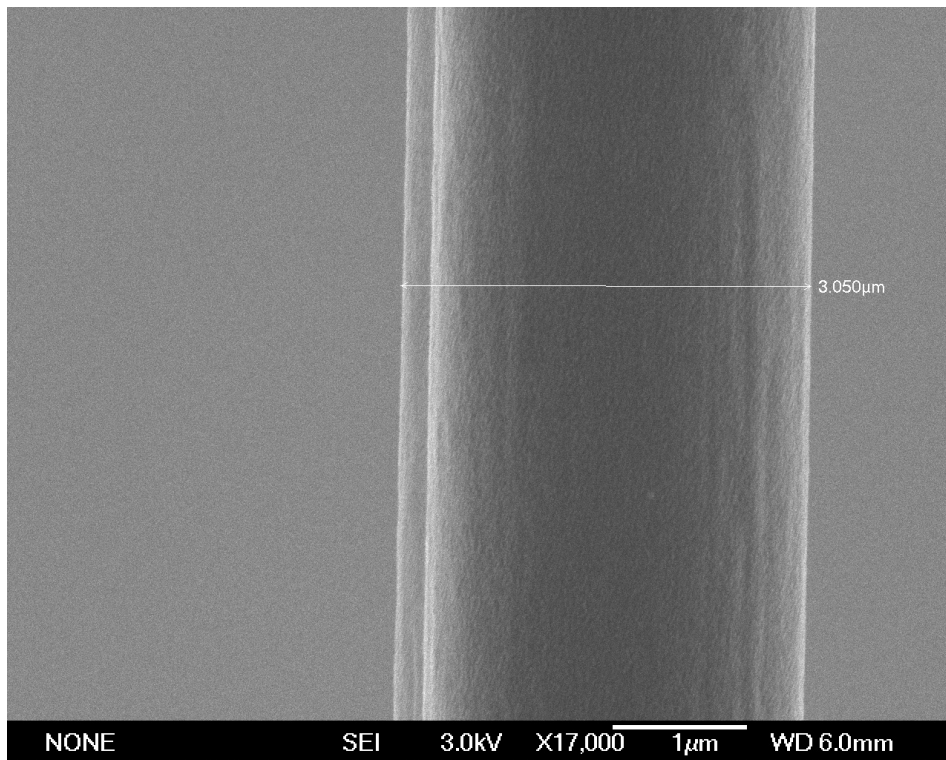




Obr. 4.2: SEM – Hedvábné vlákno *Galleria mellonella*



Obr. 4.3: SEM – Hedvábné vlákno *Galleria mellonella*, pohled na dlouhou průřezovou osu



Obr. 4.4: SEM – Hedvábné vlákno *Galleria mellonella*, pohled na krátkou průřezovou osu

## 5 Diskuse

### 5.1 Měření fyzikálních vlastností hedvábí

#### 5.1.1 Smysl měření

Znalost fyzikálních vlastností různých typů vláken je důležitá pro jejich praktické využití v různých odvětvích průmyslu či medicíny. Každé odvětví si žádá jiné vlastnosti, tak jako pavouci produkují v závislosti na potřebě použití různé typy hedvábí, které mají velmi odlišné složení i vlastnosti (tabulka 5.1).

Tab. 5.1: Vlastnosti různých vláken (Sponner, 2007 podle Hinman et al., 2000)

Materiál	Mechanické napětí (Pa)	Pružnost (%)	Energie k přetržení (J/kg)
Major ampullate silk*	** až $4 \times 10^9$	35	$1 \times 10^5$
Flagelliform silk*	$1 \times 10^9$	>200	$1 \times 10^5$
Minor ampullate silk*	$1 \times 10^9$	5	$3 \times 10^4$
Kevlar	$4 \times 10^9$	5	$3 \times 10^4$
Guma	$1 \times 10^6$	600	$8 \times 10^4$
Šluchy	$4 \times 10^9$	5	$5 \times 10^3$
Nylon, typ 6	$7 \times 10^7$	200	$6 \times 10^4$

\* názvy bílkovin hedvábí pavouků se odvozují od typů snovacích žláz: "major" a "minor" ampullate silk jsou hlavní a vedlejší proteiny z ampulárních ("hroznovitých") žláz; flagelliform silk je bílkovina produkovaná "nitkovitými" žlázami

\*\* publikovány byly hodnoty mezi  $1,5$  a  $4 \times 10^9$

Prakticky významné je měření hedvábných vláken, která jsou komerčně využívána, tj. vlákna z kokonů asi patnácti druhů motýlů (Peigler, 1993). Hlavním cílem výzkumu je objasnění vztahu mezi chemickým složením vlákna a jeho fyzikálními vlastnostmi. Význam tohoto výzkumu roste se snahami připravit rekombinantní hedvábí bez nutnosti nákladných chovů housenek. Největšího úspěchu v tomto směru dosáhla společnost Nexia (USA a Kanada), které se podařilo připravit transgenní kozy, produkující pod kaseinovým promotorem bílkovinu blízkou hedvábí pavouků (Lazaris et al., 2002). Bílkovina se poměrně snadno získá z mléka ve formě hustého roztoku a za vhodných podmínek se dosáhne její polymerizace do pevného vlákna nazvaného biosteel. Umělá hedvábná vlákna byla získána i jinými způsoby a lze očekávat postupný vývoj komerčních vláken. Objasnění faktorů určujících fyzikální vlastnosti vláken je pro komerční využití velmi důležité.

### 5.1.2 Měření hedvábných vláken housenek

Fyzikální vlastnosti hedvábných vláken bource morušového a několika dalších druhů byly mnohokrát měřeny pro potřeby textilního průmyslu. Používají se vlákna rozvolněná z kokonů po krátké lázni v horké, mírně alkalické vodě. Vlákna se z kokonu uvolní v důsledku rozpuštění povrchových sericinových vrstev. Tento proces není přesně kontrolován a také nevíme, jak se vlastnosti mění v důsledku lázně. Naměřené vlastnosti se běžně přisuzují těžkému fibroinu, který společně s lehkým řetězcem a glykoproteinem P25 vytváří filamenty (Fedič et al., 2002). Možný vliv sericinové vrstvy se ignoruje. Tento postup vedl k významným objevům, např. objasnění struktury některých bílkovin, za což dostal L. Pauling Nobelovu cenu. Postup je také dostatečný pro srovnání komerčních vzorků kokonů, nepostačuje však plně pro vysvětlení funkčních změn hedvábí během vývoje. U některých druhů, jakým je např. zavíječ voskový, jsou tyto změny nápadné. Housenky zavíječe předou kromě krátkého období kolem každého svlékání téměř nepřetržitě. Každá si vytváří hedvábnou trubičku, kterou během růstu rozšiřuje a prodlužuje (přebytečné hedvábí konzumuje). Housenky žijí v úlech a v trubičce unikají pozornosti včel, které je jinak usmrtí. Protože se housenky v trubičkách otáčejí, musí být hedvábí dostatečně pružné. Tím se zřejmě liší od hedvábí kokonů, které housenky předou na konci svého vývoje před kuklením. Kokon je pevný a hedvábí, které ho vytváří, se pravděpodobně svými fyzikálními vlastnostmi liší od hedvábí chodbiček. Potvrzení či vyvrácení tohoto předpokladu bylo cílem této magisterské práce.

Abych mohla uvedeného cíle dosáhnout, musela jsem nejprve najít metodiku odběru vláken použitelnou pro housenky různého stáří. Metodika nuceného odběru je popsána v části 3.2.1, zde se však chci zmínit o úskalích, která je nutno brát v úvahu při hodnocení výsledků. Předání je vynucené a nevíme, nakolik závisí tloušťka vlákna a možná i relativní zastoupení sericinového obalu na způsobu odběru (zejména rychlost pohybu housenky) a momentálním fyziologickým stavu housenky. Variabilitě lze čelit jen zpracováním velkých souborů vzorků a kvalitním statistickým zpracováním výsledků. To klade velké nároky na čas i standardizaci celého postupu. Na základě analýzy mnoha měření (viz přílohy) jsem došla k závěru, že tato metodika je správná a výsledky jsou spolehlivé.

Vlastní měření fyzikálních vlastností jsem prováděla podle metodiky (kapitola 3.2) uvedené v práci Blackledge et al. (2005), která se týká hedvábí pavouků. Protože vlákna housenek jsou na průřezu elipsoidní, měřila jsem krátkou i dlouhou osu elipsy. Dosud publikovaná měření tuto skutečnost ignorovala, mj. proto, že autoři používali normální světelný mikroskop, ve kterém nelze filamenty rozpoznat. Autoři měřili náhodně vybraná místa vlákna, tj. náhodně dlouhé i krátké poloosy elipsy a spočítali průměr. Metodika uvedená v této práci je bezesporu přesnější. Abych získala vlákna pro pozorování dlouhé i krátké osy elipsy, doplnila jsem metodiku odběru o jednu dorso-ventrální otočku předoucí larvy. Takto odebrané vlákno upevněné na podložce je na svých koncích obráceno k pozorovateli svou dlouhou osou a v jeho střední části

lze najít místa pro pozorování a měření krátké osy. Rotace housenky při odběru vlákna může však teoreticky způsobit přivření lisu snovací bradavky a tím změnu tloušťky vlákna i relativního zastoupení fibroinových filamentů a sericinové vrstvy. Toto nebezpečí je nutno mít na paměti, prokázat se mně ho však nepodařilo.

Odebraná vlákna byla skladována různě dlouhou dobu, od několika týdnů do několika měsíců. Předpokládá se, že během skladování nedochází ke změnám fyzikálních vlastností vláken, ale s určitostí se to neví. Proto by bylo vhodné měřit vlákna v co nejkratším čase po vypředení, což ale není vždy možné vzhledem k drahé, a tím pádem obtížně dostupné měřicí technice.

## **5.2 Analýza výsledků měření**

### **5.2.1 Průměr vlákna**

Průměr vlákna byl stanoven jako součet hodnot dlouhé a krátké osy elipsy, jakou vlákno na průřezu je. Poměr dlouhé a krátké osy poněkud kolísá, protože v některých případech jsou filameny těsně přiložené jeden ke druhému, jindy se ale stýkají jen malou plochou. Celkově však považují hodnoty průměru vlákna za spolehlivé. Průměr vlákna se u zavíječe voskového zvětšuje v korelaci s růstem housenek (zvyšování tělesné hmotnosti) až do předení kokonu a dosahuje u plně vzrostlých larev (G5a, G5b) hodnot asi 2,7 – 2,8  $\mu\text{m}$ . Předení kokonu je spojeno se zvětšením průměru na hodnoty přesahující 3,5  $\mu\text{m}$  (G7a, G7b). U larev ošetřených juvenoidem a tedy nepředoucích kokony dosáhly hodnoty průměru vlákna nejvýše 2,9  $\mu\text{m}$  (G5a-J, G6a-J, G5b-J). Přechod od předení trubičky na předení kokonu je tedy pro zvětšení tloušťky vlákna u housenek zavíječe voskového rozhodující. Housenky bource morušového před vytvářením kokonu nepředou. Jsou schopny vynuceného předení teprve ve stadiu „wandering“, tj. po ukončení žíru. Hedvábí produkované v této době zřejmě odpovídá typu, který je normálně předen až když larva vyprázdní střevo (hlavní faktor odpovědný za velký pokles hmotnosti mezi skupinami BW a BK). Zdá se, že tento typ má poněkud větší průměr než vlákno předené až během tvorby kokonu. Větší průměr předběžně připisujeme silnější sericinové vrstvě. Lepivý sericin 3 je součástí vlákna jen na začátku předení kokonu (Takasu et al., 2007).

### **5.2.2 Maximální napětí**

Maximální napětí, čili mez pevnosti vlákna v tahu, kolísá u zavíječe voskového bez zjevné korelace se stářím nebo vývojovým programem housenek (metamorfóza bez juvenoidu, larvální vývoj po ošetření juvenoidem). Značné rozdíly jsou zejména mezi vlákny odebranými v roce 2007 a 2008. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je různá kvalita potravy a zejména režimu krmení. Předení závisí na dostatečném přísunu bílkovin v potravě a může se při jejich nedostatku zcela zastavit (Jindra et Sehnal, 1989). Pokud jsou housenky ponechány několik dní bez výměny potravy, částečně hladoví. Rovněž konzumují méně potravy po jejím dlouhodobém skladování a ztrátě vody. Tyto faktory asi nebyly dostatečně rigidně kontrolovány.

Nejvyšší hodnoty pevnosti vlákna naměřené u zavíječe jsou podobné jako hodnoty zjištěné u bource morušového. To je v souladu s výsledky dřívějších měření (Fedič et al., 2003).

### 5.2.3 Relativní deformace

Relativní deformace vyjadřuje, nakolik se může vlákno protáhnout. Fedič et al. (2003) pomocí málo přesného postupu měření zjistili o něco vyšší hodnoty protažení u zavíječe voskového než u bource morušového. Naše přesná měření tento závěr potvrdila, i když hodnoty zjištěné u zavíječe dost kolísají. Překvapením jsou vysoké hodnoty u larev předoucích kokony (zejména G7a) a nižší hodnoty u larev ošetřených juvenoidem. Vlákna používaná k předení larválních chodeb jsou zřejmě pružnější (kapitola 5.2.5), ale celkově méně roztažná než vlákna kokonů.

### 5.2.4 Houževnatost

Odolnost vlákna vůči přetržení neboli jeho houževnatost vzrůstá u zavíječe voskového se stářím housenek, nedosahuje ale hodnot zjištěných u bource morušového. U zavíječe byly zjištěny velké rozdíly mezi vzorky odebranými v roce 2007 a nebo o rok později. Příčina je neznámá. V obou létech houževnatost vzrůstala se stářím. Vliv juvenoidu nebyl jednoznačný a v tomto ohledu nelze učinit žádný jednoznačný závěr.

### 5.2.5 Tuhost

Tuhost je mírou odolnosti vůči deformaci (protažení) a při přepočtu na Youngův modul pružnosti vyjadřuje pružnost vlákna při namáhání v tahu. Hodnoty Youngova modulu byly u zavíječe voskového podstatně nižší v roce 2007 než v roce 2008. V obou sériích však byl nalezen pokles mezi hedvábím předeným při ukončení žíru a hedvábím kokonů (G5a versus G7a a G5b versus G7b). Ošetření juvenoidem zvýšilo hodnoty modulu v obou pokusných sériích, tento rozdíl však byl statisticky průkazný jen v první sérii. Oproti očekávání byl modul pružnosti u bource morušového více než dvojnásobně vyšší než hodnoty zjištěné u zavíječe voskového. Na začátku předení (skupina BW) je vlákno méně pružné, než v průběhu předení kokonu (skupina BK). Tento rozdíl je v souladu se změnou funkce vlákna. První vlákna slouží jako úchyty pro kokon a pro tento účel není velká pružnost zapotřebí. Během předení kokonu housenka přímé vlákno bodově uchycuje a pohybem svého těla ho pak protahuje a zakřivuje, takže postupně vzniká ovoidní kokon. Protahování vlákna zřejmě vyžaduje pružnost, která se v této fázi předení zvyšuje.

### 5.3 Pravděpodobné příčiny vývojových změn vlastností vlákna

Zjištěné vývojové změny ve vlastnostech vlákna jsou relativně malé, objasnění jejich příčin však není jednoduché. Většinu hmoty vlákna tvoří filamenty, kterým jsou běžně připisovány fyzikální vlastnosti celého vlákna. Všechny dostupné údaje svědčí o tom, že se složení filamentů z H-fibroinu, L-fibroinu a glykoproteinu P25 během vývoje nemění. Nelze vyloučit vývojové změny ve způsobu polymerizace, tj. konverze gelovitého roztoku uvedených bílkovin v pevné vlákno, pro tuto možnost však neexistují žádné doklady. Pravděpodobnější příčinou jsou dobře doložené změny ve složení a množství sericinů, které filamenty spojují do jediného vlákna. Množství sericinů není zanedbatelné, u bource morušového tvoří 20 – 30 % celkových bílkovin kokonu (Suzuki, 1977).

Sericiny jsou sekretovány středním oddílem snovacích žláz a obalují sloupec H-fibroinu, L-fibroinu a P25, který sem postupuje ze zadního oddílu žláz. U bource morušového bylo dokázáno, že střední oddíl (middle silk gland, MSG) sestává nejméně ze tří funkčních jednotek, které se liší typem produkovaných sericinů. Gen Ser1 je exprimován v mediální a distální část MSG, které se však liší sestřihem transkriptu (Couple et al., 1987; Takasu et al., 2007). Produkt o velikosti 150 kDa pochází z distální části a je proto uložen těsně kolem filamentů, zatímco produkt o velikosti 400 kDa z mediální části je nad ním (Takasu et al., 2002). V proximální části MSG se exprimují geny Ser2 a Ser3 – jejich exprese má odlišný časový průběh, nejvýznamnější je produkt Ser2 o velikosti 250 kDa. Z genu Ser1 vznikají sestřihem čtyři různě velké mRNA, jejichž relativní zastoupení se mění během vývoje (Michaille et al., 1986). Gen Ser2 je zdrojem dvou typů mRNA, jejichž poměr se rovněž mění během vývoje (Michaille et al., 1990). K různorodosti sericinů přispívá krom sestřihu transkriptu i glykosylace. Na úrovni bílkovin rozpoznal Gamo et al. (1977) šest a Sprague (1975) dokonce patnáct různých sericinů.

U zavíječe voskového identifikoval Žurovec et al. (1992) sericinové geny MG1 a MG2. Detekce RNA (Northern blot) odhalila, že existuje několik transkriptů MG1 a dva transkripty MG2 jejichž podíl se mění během vývoje. Předposlední larvální instar a začátek posledního instaru se vyznačují převahou transkriptů MG1 o velikosti 1.9 kb, malým počtem 4.2 kb a stopami 3.2 kb. V průběhu posledního instaru se 4.2 kb mRNA akumulují, zejména u larev, které přestaly přijímat potravu a množství 1.9 kb mRNA se sníží. Ve fázi „wandering“ dosahuje počet 4,2 kb mRNA maxima a dočasně se objevují nové transkripty MG1 o velikosti 5.0, 7.2 a 10.0 kb. Gen MG2 tvoří převládající 3.4 kb velký produkt, který se hromadí u žeroucích larev a minoritní 5.2 kb, který je nejzřetelnější u „wanderig“ larev. Většina transkriptů vymizí během předení kokonu, jenom 4.2 kb produkt genu MG1 je detekovatelný v zanikajících snovacích žlázách nepohyblivých prepup (Yang et al., 1995).

Vývojové změny exprese sericinových genů a sestřihu jejich produktů jsou u bource morušového řízeny hormonálně (Tripoulas et Samols, 1986; Hamada et al., 1987). Podrobně bylo

hormonální řízení studováno u zavíječe voskového. Prokázalo se, že vývojové změny profilu sericinových mRNA závisejí na ekdysteroidech a jsou podmíněny nízkým titrem JH (Kodrík et Sehnal, 1996). Po aplikaci juvenoidu na larvy posledního instaru nedojde v případě MG1 k akumulaci mRNA o velikosti 4.1 kb a neobjeví se nové mRNA o velikosti 5.0, 7.2 a 10.0 kb. V případě MG2 nedojde ke snižování 3.4 kb a zvyšování 5,2 kb. Patern mRNA zůstává na úrovni žeroucích larev. Velmi překvapivé bylo zjištění, že aplikace juvenoidu až po ukončení žíru, kdy již došlo ke změně profilu mRNA, během dvou dnů obnoví larvální typ sestřihu a ustaví se profil mRNA, který odpovídá žeroucím larvám (Yang et al., 1996).

**Popsané změny profilu sericinů během vývoje a po aplikaci juvenoidů silně naznačují, že jsou příčinou vývojových změn fyzikálních vlastností hedvábného vlákna.**



## 6 Závěry

1. Předložená práce je první svého druhu a proto není možné přímé srovnání s jinými publikacemi.
2. Byla vypracována metodika odběru nativních vláken od housenek a modifikována metodika měření fyzikálních vlastností vláken, která byla původně vytvořena pro hedvábí pavouků.
3. U zavíječe voskového a zčásti i u bource morušového byly v některých vlastnostech zjištěny sice malé, ale statisticky významné vývojové rozdíly.
4. Některé parametry lze ovlivnit aplikací juvenoidu, který potlačí metamorfózu a vyvolá pokračování larválního vývoje.
5. Vývojové změny fyzikálních vlastností jsou pravděpodobně způsobeny změnami ve složení a případně i množství sericinů.
6. Hedvábí bource morušového je o něco pevnější a podstatně houževnatější a pružnější než hedvábí zavíječe voskového.

## 7 Literatura a zdroje

### 7.1 Literatura

- Akai, H. (1965). Studies on the ultrastructure of the silk gland in the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Sericult. Exp. Sta. **19**: 375-484.
- Akai, H. (2000). Cocoon filament characters and post cocoon technology. *Int. J. Silkmoth & Silk*. **5**: 71-84.
- Bílý, T. (2007). Fyzikální principy transmisní a skenovací elektronové mikroskopie. Bakalářská práce, PF JU, České Budějovice, 79 str.
- Blackledge, T. A., Swindeman, J. E. et Hayashi, C. Y. (2005). Quasistatic and continuous dynamic characterization of the mechanical properties of silk from the cobweb of the black widow spider *Latrodectus hesperus*. *The Journal of Experimental Biology*. **208**: 1937-1949.
- Couple, P., Michaille, J. J., Couple, M. L. et Prudhomme, J. C. (1987). Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland. *Dev. Biol.* **124**: 431-440.
- Craig, C. L. (1997). Evolution of arthropod silks. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 231-261.
- Craig, C. L. (2003). Silk production. *Encyclopedia of Insects*. 1038-1040.
- Fedič, R., Žurovec, M. et Sehnal, F. (2002). The Silk of Lepidoptera. *J. Insect Biotech. Sericol.* **71**: 1-15.
- Fedič, R., Žurovec, M. et Sehnal, F. (2003). Correlation between fibroin amino acid sequence and physical silk properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 35255-35264.
- Gamo, T. (1987). Component of Silk Proteins and Their Gene Loci in the Silkworm. *JARQ Japan Agricultural Research Quarterly*. **21(1)**: 53-58.
- Gamo, T., Inokuchi, T. et Laufer, H. (1977). Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **7**: 285-295.
- Hamada, Y., Yamashita, O. et Suzuki, Y. (1987). Haemolymph control of sericin gene expression studied by organ transplation. *Cell Differentiation*. **20**: 65-76.
- Hendl, J. (2004). Přehled statistických metod zpracování dat. Portál, Praha, 584 str.
- Hyde, N. (1984). The queen of textiles. *National Geographic*. **165**: 3-49.
- Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K. et Mizuno, S. (2000). Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mas elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with 6:6:1 molar ratio. *Journal of Bioloical Chemistry*. **275**: 40517-40528.

- 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. et Mizuno, S. (2004). Assembly of the silk fibroin elementary unit in endoplasmatic reticulum and a role of L-chain for protection of  $\alpha$ 1,2-mannose residues in N-linked oligosaccharide chains of fibrohexamerin / P25. *European Journal of Biochemistry*. **271**: 356-366.
- Jindra, M. et Sehnal, F. (1989). Larval growth, food consumption, and utilization of dietary protein and energy in *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* **35**: 719-724.
- Kislingová, I. (2006). Genetické aspekty chovu bource morušového (*Bombyx mori* L.). Bakalářská práce, PřF MU, Brno, 59 str.
- Kodrík, D. (2004). Fyziologie hmyzu (učební texty). Entomologický ústav Akademie věd České republiky a Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 220 str.
- Kodrík, D. et Sehnal, F. (1994). Juvenile hormone counteracts the action of ecdysterone on silk glands of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **23**: 39-56.
- Komatsu, K. (1975). Studies on dissolution behaviors and structural characteristics of silk sericin. *Bull. Seric. Exp. Str.* **26**: 135-256.
- Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J. F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W. et Karatzas, C. N. (2002). Spider silk fiber spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*. **295**: 472-476.
- Lepš, J. (1996). Biostatistika. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 166 str.
- Michaille, J. J., Couble, P., Prudhomme, J. C. et Garel, A. (1986). A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. *Biochemie*. **68**: 1165-1173.
- Michaille, J. J., Garel, A. et Prudhomme, J. C. (1990). Expression of Ser1 and Ser2 genes in the middle silk gland of *Bombyx mori* during the fifth instar. *Sericologia*. **30**: 49-60.
- Nirmala, X., Mita, K., Vanisree, V., Žurovec, M. et Sehnal, F. (2001). Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **10**: 437-445.
- Padamwar, M. N. et Pawar, A. P. (2004). Sericin and its applications: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **63**: 323-329.
- Padamwar, M. N., Pawar, A. P., Daithankar, A. V. et Mahadik, K. R. (2005). Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *J. Cosmet. Dermatol.* **4**: 250-257.
- Park, K. J., Jin, H. H. et Hyun, C. K. (2002). Antigenicity of peptides produced from silk fibroin. *Process Biochemistry*. **38**: 411-418.

- Peigler, R. S. (1993). Wild silks of the world. *American Entomologist*. **39**: 151-161.
- Sarovat, S., Sudatis, B., Meesilpa, P., Grady, B. P. et Magaraphan, R. (2003). The use of sericine as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Review of Advanced Material Science*. **5**: 193-198.
- Sehna, F. et Akai, H. (1990). Insects 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.
- Sehna, F. et Žurovec, M. (2004). Constitution of silk fiber core in Lepidoptera. *Biomacromolecules*. **5**: 666-674.
- Sehna, F. (2008). Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomological Research*. **38**: S1-S8.
- Shimura, K., Kikuchi, A., Ohtomo, K., Katagata, Y. et Hyodo, A. (1976). Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Biochem.* **80**: 693-702.
- Sponner, A. (2007). Spider silk as a resource for future biotechnologies. *Entomological Research*. **37**: 238-250.
- Sprague, K. (1975). The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*. **14**: 925-931.
- Suzuki, Y. (1977). Differentiation of silk gland. A model system for the study of differential gene action. In: Beermann W (ed) *Results and Problems in Cell Differentiation*, pp. 1-44. Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg.
- Takasu, Y., Yamada H. et Tsubouchi, K. (2002). Isolation of tree main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **66**: 2715-2818.
- Takasu, Y., Yamada, H., Tamura, T., Sezutsu, H., Mita, K. et Tsubouchi, K. (2007). Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Bioch. Mol. Biol.* **37**: 1234-240.
- Takei, F., Kikuchi, Y., Kikuchi, A., Mizuno, S. et Shimura, K. (1987). Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from posterior silk gland cells. *Journal of Cell Biology*. **105**: 175-180.
- Tanaka, K., Inoue, S. et Mizuno, S. (1999). Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **29**: 269-276.

- Tripoulas, N. A. et Samols, D. (1986). Developmental and hormonal regulation of sericin RNA in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental Biology*. **116**: 328-336.
- Wang, Y., Kim, H. J., Vunjak – Novakovic, G. et Kaplan, D. L. (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*. **27**: 6064-6082.
- Yang, C., Krishnan, M., Žurovec, M., Sehnal, F. et Scheller, K. (1995). Correlation between ecdysteroid titre and silk gene expression in the last instar larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Eur. J. Entomol.* **92**: 229-234.
- Yang, C., Sehnal, F. et Scheller, K. (1996). Juvenile hormone restores larval pattern of sericotropin gene transcripts. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **32**: 353-362.
- Zhang, Y. Q. (2002). Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances*. **20**: 91-100.
- Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H. et 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **71**: 11-17.
- Žurovec, M., Sehnal, F., Scheller, K. et Kumaran, A. K. (1992). Silk gland specific cDNAs from *Galleria mellonella* L.. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**: 55-67.
- Žurovec, M. et Sehnal, F. (2002). Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*. *J. Biol. Chem.* **277**: 22639-22647.

## 7.2 Internetové zdroje

- Militký, J. (2008). Technická univerzita v Liberci, katedra textilních materiálů. Zkoušení textilií pro bakaláře 1. díl. [http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20080228/ZKB\\_1\\_dil.pdf](http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20080228/ZKB_1_dil.pdf). Staženo 20. 3. 2009.
- Nebesářová, J. (2001). Biologické centrum AV ČR, Parazitologický ústav, Laboratoř elektronové mikroskopie. Elektronová mikroskopie pro biology. <http://www.paru.cas.cz/lem/book>. Staženo 17. 3. 2009.
- Vesmír.info. Japonci již vědí, jak využít vlastností pavučin. <http://www.vesmir.info/genetika/japonci-jiz-vedi-jak-vyuzit-vlastnosti-pavucin.htm>. Staženo 8. 10. 2008.
- Vlach, B. (2003). Vysoké učení technické v Brně, fakulta strojního inženýrství, Ústav materiálových věd a inženýrství. Nauka o materiálu. Zkouška rázem v ohybu. <http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/nomd/zkouska%20razem%20v%20ohybu.do> c. Staženo 22. 3. 2009.

## 8 Přílohy

Tabulka 8.1: Přehled výsledků měření *Galleria mellonella* (2007)

Označení vzorku	Skupina	Průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]	Max. napětí [MPa]	Relat. deformace [mm/mm]	Houževnatost [MPa]	Tuhost [GPa]
GB1.1.1	G1a	2,54	592,097	0,232	84,416	10,613
GB1.1.2	G1a	2,54	243,805	0,198	32,444	5,625
GB1.2.1	G1a	1,81	266,385	0,169	34,508	9,164
GB1.2.2	G1a	1,81	537,982	0,201	74,089	13,373
GB1.4.1	G1a	1,88	324,521	0,238	54,272	7,636
GB1.4.2	G1a	1,88	305,329	0,210	44,638	7,087
GB1.5.1	G1a	1,60	367,611	0,134	43,573	13,847
GB3.1.1	G1a	1,96	630,398	0,221	86,419	14,208
GB3.5.1	G1a	1,83	254,073	0,166	30,047	7,550
GB4.1.1	G1a	2,25	273,962	0,139	27,140	9,013
GB4.1.2	G1a	2,25	339,178	0,184	41,920	8,722
GC1.1.1	G2a	2,25	556,480	0,190	70,777	13,997
GC1.1.2	G2a	2,25	1 001,109	0,264	178,821	16,124
GC1.2.1	G2a	2,71	436,434	0,225	59,177	8,928
GC1.2.2	G2a	2,71	778,583	0,245	107,779	13,147
GC1.3.2	G2a	2,76	797,033	0,290	142,967	13,798
GC1.5.2	G2a	2,13	583,694	0,229	90,534	12,841
GC2.1.2	G2a	2,18	550,494	0,256	90,047	11,487
GC2.2.1	G2a	2,59	327,166	0,180	47,132	10,475
GC2.2.2	G2a	2,59	350,572	0,197	47,745	8,920
GC2.3.1	G2a	2,45	523,695	0,314	94,556	9,060
GC2.3.2	G2a	2,45	405,336	0,233	67,290	10,093
GC2.4.1	G2a	2,53	669,373	0,282	116,669	12,933
GC3.1.1	G2a	2,15	287,880	0,166	33,990	6,371
GC3.1.2	G2a	2,15	332,482	0,189	41,576	8,077
GC3.2.1	G2a	1,88	359,584	0,161	47,039	12,231
GC3.3.1	G2a	1,83	514,565	0,160	55,833	13,852
GC4.1.1	G2a	2,50	391,217	0,220	60,545	9,542
GC4.2.2	G2a	2,40	378,592	0,159	44,415	11,513
GC4.5.1	G2a	1,77	467,647	0,155	59,072	18,331
GC5.2.2	G2a	2,59	457,318	0,262	68,509	7,414
GC5.3.1	G2a	2,56	568,281	0,268	87,615	9,446
GC5.3.2	G2a	2,56	506,781	0,232	67,228	10,103
GC5.4.1	G2a	1,95	582,155	0,229	97,932	15,436
GC5.4.2	G2a	1,95	451,359	0,193	60,630	12,832
GC5.5.1	G2a	2,21	409,468	0,175	49,519	12,202
GC5.5.2	G2a	2,21	427,053	0,202	60,693	12,664
GC5.1.1	G2a	2,12	407,124	0,159	63,156	15,522
GF3.1.1	G5a	2,74	451,970	0,300	83,867	11,121
GF1.3.2	G5a	2,74	564,742	0,276	90,044	12,725
GF1.4.1	G5a	2,59	694,445	0,392	145,575	11,251
GF1.4.2	G5a	2,59	685,196	0,340	131,442	13,616
GF1.5.1	G5a	2,61	392,684	0,292	78,659	11,257
GF1.5.2	G5a	2,61	524,846	0,365	116,301	10,328
GH2.1.1	G5a	3,00	537,990	0,327	103,392	10,780
GH2.1.2	G5a	3,00	601,763	0,390	137,511	10,087
GH2.2.1	G5a	2,87	766,102	0,316	156,173	16,397
GH2.2.2	G5a	2,87	355,781	0,189	48,933	12,651
GH2.3.2	G5a	2,41	692,989	0,334	139,070	13,102
GH2.5.1	G5a	2,82	337,352	0,174	49,902	13,038
GF2.4.2	G5a	1,88	327,011	0,156	37,575	8,175
GF2.5.1	G5a	1,95	315,944	0,208	46,266	8,847

GF5.2.2	G5a	1,95	391,779	0,240	60,818	7,167
GF2.2.1	G5a	2,12	188,714	0,183	24,652	4,695
GF2.2.2	G5a	2,12	271,777	0,190	41,046	9,101
GF3.1.1	G5a	3,64	930,548	0,333	160,964	12,527
GF3.1.2	G5a	3,64	888,011	0,326	159,571	13,591
GF3.2.2	G5a	3,70	815,701	0,328	154,456	12,275
GF3.3.1	G5a	2,61	761,710	0,256	133,691	19,843
GF3.4.1	G5a	3,40	610,910	0,277	101,489	12,690
GF3.4.2	G5a	3,40	634,941	0,345	115,863	11,230
GF3.5.1	G5a	3,44	491,901	0,302	97,833	11,428
GF3.5.2	G5a	3,44	420,117	0,247	80,155	12,577
GH1.3.1	G5a	3,44	916,184	0,353	173,764	12,337
GH1.3.2	G5a	3,44	702,549	0,406	159,885	9,313
GH1.4.1	G5a	3,14	611,521	0,317	122,127	11,395
GH1.4.2	G5a	3,14	818,002	0,329	151,285	13,343
GH1.5.1	G5a	3,60	717,744	0,356	127,896	8,765
GH1.5.2	G5a	3,60	495,434	0,265	89,078	10,270
GH1.2.1	G5a	3,01	329,361	0,236	58,947	12,714
GH3.2.1	G5a	2,63	286,695	0,169	35,582	8,214
GH3.2.2	G5a	2,63	441,021	0,271	78,256	10,307
GH3.3.1	G5a	2,59	577,305	0,407	136,957	10,505
GH3.3.2	G5a	2,59	410,652	0,351	95,790	9,593
GH3.4.1	G5a	2,67	445,134	0,315	87,126	9,141
GH3.4.2	G5a	2,67	509,885	0,227	73,516	11,318
GH3.5.1	G5a	2,26	537,893	0,364	129,933	11,610
GH4.1.1	G5a	2,70	318,576	0,207	47,237	9,559
GH4.1.2	G5a	2,70	287,344	0,253	56,723	7,469
GH4.3.2	G5a	2,33	279,450	0,171	40,483	9,508
GH4.4.1	G5a	2,19	443,340	0,263	79,606	12,016
GH4.4.2	G5a	2,19	331,620	0,171	46,966	13,876
GA1.1.1	G7a	3,48	350,484	0,264	78,931	5,103
GA1.2.1	G7a	4,34	961,499	0,356	157,031	10,046
GA1.3.1	G7a	3,94	515,417	0,224	74,107	10,070
GA1.3.2	G7a	3,94	532,137	0,348	94,493	7,960
GA1.4.1	G7a	4,34	504,534	0,426	109,633	7,050
GA1.4.2	G7a	4,34	598,568	0,353	110,226	11,066
GA1.5.1	G7a	3,27	276,175	0,163	39,585	13,366
GA1.5.2	G7a	3,27	422,703	0,333	81,665	10,179
GA2.1.1	G7a	2,98	694,033	0,293	118,758	15,769
GA2.1.2	G7a	2,98	196,007	0,246	30,114	5,044
GA2.4.1	G7a	3,33	375,489	0,376	79,411	6,006
GA2.4.2	G7a	3,33	747,679	0,292	115,353	13,298
GA3.3.2	G7a	3,13	687,296	0,295	109,988	9,558
GA3.4.1	G7a	3,72	793,175	0,290	117,880	11,865
GA3.5.2	G7a	3,96	431,123	0,327	86,690	8,188
GA4.1.1	G7a	3,94	756,492	0,365	130,616	8,227
GA4.2.1	G7a	3,72	912,527	0,338	157,891	11,151
GA4.2.2	G7a	3,72	420,497	0,185	51,213	10,928
GA4.3.1	G7a	3,46	286,674	0,219	43,065	6,447
GA4.3.2	G7a	3,46	546,148	0,330	94,385	6,144
GA4.5.1	G7a	3,22	500,217	0,218	71,619	11,595
GA4.5.2	G7a	3,22	317,002	0,307	68,389	7,826
GA5.1.1	G7a	3,90	438,756	0,308	86,882	10,436
GA5.1.2	G7a	3,90	365,024	0,349	77,936	9,373
GA5.2.1	G7a	4,18	464,329	0,303	73,633	6,740
GA5.2.2	G7a	4,18	696,841	0,329	119,967	9,062
GA5.3.1	G7a	3,29	727,285	0,307	133,509	11,816
GA5.3.2	G7a	3,29	558,060	0,194	77,606	10,579
GA5.4.1	G7a	3,67	729,978	0,295	109,983	10,982
GA5.4.2	G7a	3,67	390,305	0,357	77,057	6,400

GA5.5.1	G7a	3,16	634,914	0,326	118,959	9,273
GA5.5.2	G7a	3,16	958,925	0,362	173,010	10,520
GA6.1.1	G7a	3,91	553,567	0,376	113,030	8,912
GA6.1.2	G7a	3,91	434,269	0,244	62,479	10,861
GA6.2.1	G7a	3,28	669,682	0,358	127,312	8,994
GA6.2.2	G7a	3,28	949,758	0,375	182,132	12,712
GA6.4.1	G7a	3,45	591,010	0,368	128,136	11,235
GA6.4.2	G7a	3,45	510,263	0,312	97,759	12,445
GA6.5.1	G7a	3,17	369,517	0,201	51,758	12,380
GA6.5.2	G7a	3,17	366,095	0,243	54,440	7,016
GJ1.2.1	G5a-J	3,20	692,510	0,316	123,265	11,675
GJ1.2.2	G5a-J	3,20	568,291	0,306	112,064	12,634
GJ1.4.1	G5a-J	2,60	1 176,628	0,358	238,215	18,651
GJ1.4.2	G5a-J	2,60	981,479	0,373	206,230	18,220
GJ1.5.1	G5a-J	2,59	650,219	0,366	153,549	13,199
GJ1.5.2	G5a-J	2,59	363,375	0,213	63,932	13,693
GJ2.2.1	G5a-J	2,32	821,598	0,267	139,208	16,321
GJ2.2.2	G5a-J	2,32	329,229	0,118	30,388	14,492
GJ2.4.2	G5a-J	1,95	477,570	0,137	53,326	18,974
GJ2.5.1	G5a-J	2,08	413,027	0,222	71,729	13,999
GJ3.1.1	G5a-J	2,80	991,948	0,360	191,190	14,648
GJ3.1.2	G5a-J	2,80	953,647	0,313	185,373	17,223
GJ3.3.1	G5a-J	2,52	553,074	0,241	87,648	12,205
GJ3.3.2	G5a-J	2,52	765,701	0,323	148,450	12,164
GJ3.5.1	G5a-J	2,31	640,815	0,184	85,800	16,624
GJ3.5.2	G5a-J	2,31	1 096,588	0,312	215,413	16,676
GJ4.2.1	G5a-J	2,43	723,197	0,292	119,584	10,834
GJ4.2.2	G5a-J	2,43	1 029,117	0,340	178,432	11,246
GJ4.3.2	G5a-J	2,32	421,158	0,276	80,744	9,220
GJ4.4.1	G5a-J	1,92	502,104	0,294	103,996	11,304
GJ4.4.2	G5a-J	1,92	252,681	0,141	28,028	10,869
GJ4.5.1	G5a-J	2,22	660,144	0,228	98,922	16,610
GJ4.5.2	G5a-J	2,22	542,284	0,329	122,442	11,529
GJ5.1.2	G5a-J	1,95	883,165	0,233	140,820	20,163
GJ5.2.1	G5a-J	2,10	758,530	0,274	140,283	14,895
GJ5.2.2	G5a-J	2,10	783,387	0,200	105,002	18,526
GJ5.5.1	G5a-J	2,23	547,482	0,137	57,595	15,024
GL1.1.1	G6a-J	2,18	495,959	0,204	78,771	14,911
GL1.1.2	G6a-J	2,18	679,315	0,247	123,195	16,011
GL1.2.1	G6a-J	2,66	595,611	0,210	88,962	15,367
GL1.2.2	G6a-J	2,66	591,084	0,186	81,562	17,105
GL1.3.1	G6a-J	3,16	430,722	0,203	68,249	13,843
GL1.3.2	G6a-J	3,16	430,623	0,247	69,445	7,822
GL1.4.1	G6a-J	2,28	376,420	0,147	42,508	14,144
GL1.4.2	G6a-J	2,28	664,193	0,255	122,098	15,847
GL1.5.1	G6a-J	2,77	437,781	0,199	59,230	12,031
GL1.5.2	G6a-J	2,77	587,262	0,245	92,098	12,565
GL2.2.1	G6a-J	3,03	515,363	0,272	86,797	8,918
GL2.2.2	G6a-J	3,03	578,206	0,219	75,519	10,320
GL2.3.1	G6a-J	2,76	687,809	0,224	106,172	13,381
GL2.3.2	G6a-J	2,76	697,252	0,300	137,078	13,587
GL2.4.1	G6a-J	3,44	646,795	0,298	110,703	9,948
GL2.4.2	G6a-J	3,44	482,622	0,254	78,660	9,495
GL3.1.1	G6a-J	2,33	394,133	0,213	68,149	12,120
GL3.1.2	G6a-J	2,33	369,338	0,198	51,660	10,005
GL3.2.1	G6a-J	2,27	922,225	0,247	156,865	18,221
GL3.2.2	G6a-J	2,27	666,746	0,253	120,833	15,065
GL3.3.1	G6a-J	3,39	664,277	0,240	95,579	10,542
GL3.3.2	G6a-J	3,39	711,516	0,240	107,452	10,933
GL4.1.1	G6a-J	3,18	341,666	0,207	57,083	9,021



GL4.1.2	G6a-J	3,18	397,766	0,212	62,531	8,786
GL4.2.1	G6a-J	4,17	508,845	0,199	70,824	11,000
GL4.2.2	G6a-J	4,17	850,930	0,293	150,480	11,669
GL4.3.1	G6a-J	3,94	626,276	0,326	118,069	9,391
GL4.3.2	G6a-J	3,94	782,811	0,308	127,842	9,889
GL4.4.1	G6a-J	3,01	457,116	0,176	58,871	11,795
GL4.4.2	G6a-J	3,01	689,627	0,310	125,444	10,890
GL5.3.1	G6a-J	2,74	360,261	0,260	68,164	8,313
GL5.3.2	G6a-J	2,74	460,796	0,260	76,473	9,495
GL5.4.1	G6a-J	3,58	384,305	0,280	77,345	9,276
GL5.5.2	G6a-J	3,14	448,402	0,199	66,022	12,186
GL5.1.1	G6a-J	3,45	307,699	0,173	47,326	11,045
GL6.2.1	G6a-J	1,72	653,983	0,135	63,437	15,544
GL6.3.2	G6a-J	1,79	514,405	0,131	54,364	14,831
GL6.4.2	G6a-J	1,81	738,511	0,226	114,253	12,726

Tabulka 8.2: Přehled výsledků měření *Galleria mellonella* (2008)

Označení vzorku	Skupina	Průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]	Max. napětí [MPa]	Relat. deformace [mm/mm]	Houževnatost [MPa]	Tuhost [GPa]
E1.2.1	G1b	2,57	752,922	0,254	164,399	18,080
E1.2.2	G1b	2,57	1188,897	0,244	175,762	17,539
E1.3.1	G1b	2,06	560,387	0,152	63,719	14,808
E1.3.2	G1b	2,06	717,156	0,182	86,054	17,523
E1.5.1	G1b	2,49	1030,967	0,271	173,593	15,530
E1.5.2	G1b	2,49	1114,256	0,293	184,832	13,573
E2.1.1	G1b	1,75	440,185	0,224	72,633	9,585
E2.1.2	G1b	1,75	639,221	0,180	80,209	13,493
E2.4.1	G1b	1,73	506,375	0,157	56,438	11,932
E2.4.2	G1b	1,73	767,398	0,231	119,522	14,008
E2.5.2	G1b	2,02	740,861	0,194	101,361	14,293
E3.1.1	G1b	2,74	638,627	0,270	93,808	7,732
E3.1.2	G1b	2,74	568,235	0,207	70,021	11,060
E3.2.2	G1b	2,50	755,988	0,197	87,771	12,950
E3.4.2	G1b	2,25	649,216	0,176	84,528	14,237
E4.1.1	G1b	3,06	1015,177	0,270	154,805	12,756
E4.1.2	G1b	3,06	672,641	0,227	95,966	10,700
E4.2.1	G1b	2,54	1492,742	0,275	211,573	15,804
E4.2.2	G1b	2,54	1040,815	0,262	171,337	14,861
E4.3.1	G1b	2,76	616,872	0,159	76,97	22,480
E4.3.2	G1b	2,76	1233,527	0,263	175,118	15,585
E4.5.1	G1b	2,82	847,054	0,155	87,607	21,489
E4.5.2	G1b	2,82	842,553	0,215	115,026	14,812
E5.1.1	G1b	2,57	763,660	0,238	117,267	12,249
F1.4.2	G5b	2,77	454,248	0,211	68,285	12,022
F2.1.2	G5b	2,86	442,987	0,295	92,645	11,499
F2.2.1	G5b	3,03	891,937	0,333	175,967	11,605
F2.2.2	G5b	3,03	687,073	0,289	127,882	12,555
F2.5.1	G5b	2,69	396,137	0,196	57,338	11,271
F2.5.2	G5b	2,69	726,794	0,316	128,997	12,467
F3.1.1	G5b	3,02	1169,457	0,310	193,017	15,160
F3.1.2	G5b	3,02	791,849	0,228	113,397	17,405
F3.4.2	G5b	2,42	385,243	0,078	27,102	17,124
F3.5.1	G5b	3,09	1098,363	0,290	177,330	15,808
F3.5.2	G5b	3,09	1206,245	0,295	184,603	14,461

F4.2.1	G5b	2,46	1096,897	0,249	161,768	19,649
F4.2.2	G5b	2,46	1206,385	0,256	172,643	18,740
F4.3.1	G5b	2,73	595,503	0,184	72,970	13,814
F4.3.2	G5b	2,73	559,657	0,077	39,099	31,134
F4.5.1	G5b	3,46	359,478	0,172	47,260	11,625
F4.5.2	G5b	3,46	661,337	0,307	113,621	9,219
F5.1.1	G5b	1,86	529,154	0,232	91,372	12,715
F5.1.2	G5b	1,86	807,650	0,307	158,383	13,917
F5.2.1	G5b	2,12	1234,181	0,237	182,370	21,200
F5.2.2	G5b	2,12	1141,854	0,269	169,559	16,346
F5.3.1	G5b	2,44	579,501	0,221	92,385	14,945
F5.3.2	G5b	2,44	707,434	0,291	133,767	13,548
K1.1.2	G7b	3,64	769,768	0,251	99,971	9,061
K1.2.1	G7b	3,31	843,349	0,287	135,402	9,401
K1.4.1	G7b	3,39	1208,169	0,265	161,357	12,397
K1.4.2	G7b	3,39	1122,638	0,268	162,147	11,488
K1.5.1	G7b	3,37	1013,113	0,308	172,732	9,355
K1.5.2	G7b	3,37	655,756	0,214	88,297	8,904
K2.2.1	G7b	3,75	1202,013	0,284	181,521	15,329
K2.2.2	G7b	3,75	698,295	0,182	92,296	18,374
K2.4.1	G7b	3,72	1295,806	0,168	116,730	17,432
K2.4.2	G7b	3,72	1340,178	0,268	199,322	16,582
K3.2.1	G7b	3,59	590,844	0,163	70,096	14,702
K3.3.1	G7b	3,55	1151,051	0,218	154,931	16,158
K3.3.2	G7b	3,55	791,540	0,222	106,831	11,587
K3.4.1	G7b	3,19	1296,785	0,291	207,623	16,371
K3.5.1	G7b	3,78	1004,428	0,191	121,538	17,751
K3.5.2	G7b	3,78	926,767	0,163	110,657	20,149
K4.2.1	G7b	3,23	885,393	0,227	108,476	9,360
K4.2.2	G7b	3,23	855,158	0,268	121,854	10,831
K4.3.1	G7b	3,57	1210,373	0,269	182,528	13,318
K5.1.1	G7b	3,82	690,425	0,235	98,37	11,060
K5.1.2	G7b	3,82	1114,568	0,312	181,188	12,118
M1.1.1	G5b-J	2,63	808,954	0,292	188,103	20,147
M1.1.2	G5b-J	2,63	1295,562	0,354	270,960	18,643
M1.2.1	G5b-J	2,55	550,250	0,246	94,651	14,463
M1.2.2	G5b-J	2,55	486,230	0,172	64,264	18,435
M1.3.1	G5b-J	2,65	756,355	0,205	96,116	17,115
M1.3.2	G5b-J	2,65	795,859	0,275	130,188	13,885
M1.5.1	G5b-J	2,67	606,965	0,267	99,522	12,044
M1.5.1	G5b-J	2,67	469,607	0,223	72,582	12,247
M2.1.2	G5b-J	2,71	531,388	0,240	70,497	8,429
M2.2.1	G5b-J	2,54	1281,933	0,264	172,530	15,936
M2.3.1	G5b-J	2,79	798,131	0,244	130,646	15,670
M2.3.2	G5b-J	2,79	419,844	0,096	30,964	16,494
M3.1.1	G5b-J	2,96	501,354	0,136	49,541	13,569
M4.1.1	G5b-J	2,84	1256,259	0,272	174,361	17,815
M4.1.2	G5b-J	2,84	1120,073	0,301	188,327	16,525
M4.2.1	G5b-J	2,71	694,701	0,187	84,696	15,912
M4.3.1	G5b-J	2,63	378,025	0,112	33,399	15,105
M4.3.2	G5b-J	2,63	343,965	0,235	49,146	6,773
M4.4.1	G5b-J	2,88	619,294	0,263	107,320	14,797
M4.4.2	G5b-J	2,88	647,635	0,314	128,298	12,096
M4.5.1	G5b-J	2,58	706,898	0,167	83,218	20,267
M4.5.2	G5b-J	2,58	551,671	0,146	65,619	18,757

Tabulka 8.3: Přehled výsledků měření *Bombyx mori* (2008)

Označení vzorku	Skupina	Průměr vlákna [ $\mu\text{m}$ ]	Max. napětí [MPa]	Relat. deformace [mm/mm]	Houževnatost [MPa]	Tuhost [GPa]
BW1.3.1	BW	7,02	31,698	0,188	134,895	675,035
BW1.3.2	BW	7,02	28,967	0,171	123,591	925,558
BW2.3.1	BW	6,20	32,232	0,173	121,032	909,247
BW2.3.2	BW	6,20	27,656	0,177	110,585	840,067
BW3.3.1	BW	6,38	31,938	0,270	233,870	1327,693
BW3.3.2	BW	6,38	29,967	0,306	252,958	1282,524
BW3.4.1	BW	6,95	28,211	0,245	168,424	1044,818
BW3.5.1	BW	6,28	27,923	0,262	195,211	1116,528
BW3.5.2	BW	6,28	27,508	0,217	133,553	865,871
BW4.1.1	BW	6,41	27,356	0,269	195,348	761,988
BW4.1.2	BW	6,41	25,953	0,255	181,685	1112,930
BW4.2.2	BW	6,28	38,395	0,163	143,302	1154,137
BW4.3.1	BW	6,21	20,703	0,218	131,321	878,260
BW4.3.2	BW	6,21	24,347	0,176	100,691	762,159
BW4.5.1	BW	5,61	25,257	0,244	140,067	786,309
BW4.5.2	BW	5,61	27,615	0,188	111,703	789,969
BW5.1.1	BW	6,19	37,054	0,174	169,927	1402,347
BW5.1.2	BW	6,19	41,637	0,172	167,222	1373,774
BW5.3.1	BW	5,73	20,629	0,171	77,374	593,258
BW5.3.2	BW	5,73	25,632	0,160	107,382	913,361
BW5.5.1	BW	6,66	39,860	0,148	139,737	1260,809
BW5.5.2	BW	6,66	37,513	0,207	195,234	1198,446
BK1.2.1	BK	4,84	40,680	0,202	173,147	821,830
BK1.2.2	BK	4,84	29,855	0,202	142,320	917,663
BK1.4.1	BK	5,52	37,612	0,230	202,318	1209,419
BK1.4.2	BK	5,52	40,265	0,202	182,278	1253,606
BK2.1.1	BK	5,82	38,032	0,237	213,834	1272,312
BK2.1.2	BK	5,82	32,988	0,129	87,106	865,503
BK2.2.1	BK	5,63	37,982	0,127	90,564	867,870
BK2.2.2	BK	5,63	35,811	0,141	96,263	857,197
BK2.3.1	BK	5,69	31,993	0,256	225,459	1291,895
BK2.3.2	BK	5,69	37,139	0,237	224,858	1407,619
BK3.1.1	BK	5,74	39,514	0,260	288,674	1580,057
BK3.1.2	BK	5,74	36,813	0,246	239,422	1371,070
BK3.2.2	BK	5,61	35,649	0,211	171,041	1104,994
BK3.3.1	BK	5,85	36,690	0,185	157,307	1125,843
BK3.3.2	BK	5,85	38,598	0,171	151,738	1160,211
BK4.1.1	BK	5,61	38,479	0,184	141,232	713,645
BK4.3.1	BK	5,17	35,667	0,207	183,143	1124,147
BK4.3.2	BK	5,17	34,698	0,163	138,241	1129,816
BK4.4.1	BK	5,13	35,084	0,129	90,158	840,808
BK4.4.2	BK	5,13	36,418	0,155	121,818	918,284
BK4.5.1	BK	5,20	38,870	0,188	167,793	1184,446
BK4.5.2	BK	5,20	39,404	0,176	158,661	1068,910
BK5.1.1	BK	5,50	30,611	0,256	228,032	1124,579
BK5.1.2	BK	5,50	33,678	0,266	244,012	1292,833
BK5.2.1	BK	5,63	29,334	0,154	97,471	777,010
BK5.2.2	BK	5,63	31,684	0,237	189,709	1128,506