

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Embryonální vývoj neoplozených vajíček bource morušového

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

MSc. Valeriya Zabelina, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Markéta Vrchotová

České Budějovice, 2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta VRCHOTOVÁ**
Osobní číslo: **Z15436**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Embryonální vývoj neoplozených vajíček bource morušového**
Zadávací katedra: **Katedra biologických disciplin**

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

U bource morušového byly vyšlechtěny partenoklony, u kterých specifické tepelné šoky indukují vývoj neoplozených vajíček. Protože v meióze oogonií motýlů není crossing-over, má potomstvo přesnou kopii mateřského genomu. Výhodou tohoto partenogenetického rozmnožování je udržení genotypu bez jakékoliv změny po mnoho generací, teoreticky do nekonečna. Je tak například možné udržet recesivní letální mutace. Větší význam mají partenoklony pro udržení transgenních bourců, do kterých byl uměle vnesen cizorodý gen, např. pro barevně fluoreskující bílkoviny, které se ukládají v hedvábí a propůjčují mu nové vlastnosti. Lze také získat bource pro produkci hedvábí pavouků nebo zcela jiných bílkovin (např. interferonu) pro využití v biomedicíně. Výhodou partenoklonů je stabilita transgenního genomu, ve srovnání se standartními liniemi bourců je však závažnou překážkou malá úspěšnost vlastní transgenéze. Zdá se, že příčinou je nerovnoměrný a asi zpomalený časný zárodečný vývoj. Nové geny totiž lze do gonocytů (budoucích oogonií) vnášet jen před vytvořením buněčného blastodermu. Předmětem práce je ověřit tato pozorování a pokusit se najít způsob, jak časný embryonální vývoj partenogenetických vajíček synchronizovat a urychlit. Práce bude soustředěna na (a) modifikaci metody aktivace neoplozených vajíček tepelným šokem a (b) vlivu kultivace ovarí a vývoje vajíček v samcích.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 30

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- ZABELINA V, UCHINO K, MOCHIDA Y, YONEMURA N, KLYMENKO V, SEZUTSU H, TAMURA T, SEHNAL F, 2015. JIP 81 28-35.
ZABELINA V, KLYMENKO V, TAMURA T, DOROSHENKO K, LIANG H, SEZUTSU H AND SEHNAL F, 2015. J. Biosci. 40 645-655.
ZABELINA V, KLYMENKO V, 2008. Sericologia 48, 2, 123-128.
ASTAUROV, B.L., 1940. Artificial parthenogenesis in the silkworm. USSR Acad. Sci., Moscow-Leningrad, 240 pp.
ASTAUROV, B.L., 1973. Genetika 9, 93-106.
DOROSHENKO, K.A., KLYMENKO, V.V., 2010. Sericologia 50, 187-197.
KLIMENKO V.V., 1982. Genetica 18, 64-72.
KLYMENKO, V.V., 2001. J. Insect Biotechnol. Sericol. 70, 155-165.
NAGY, L. M., RIDDIFORD, L. M., KIGUCHI, K., 1994. Dev. Biol. 165, 137-151.
STRUNNIKOV, V.A., 1987. Genetic methods of selection and sex regulation in the silkworm. Agropromizdat, Moscow.327 pp.
TAMURA T., KANDA T., TAKIYA S., OKANO K. & MAEKAWA H., 1990. Jap.J.Genet. 65, 401-410.
YAMASHITA O., IRIE K., 1980. Nature. 283, 385-386.


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

Katedra fyziologie živočichů

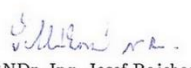
Konzultant diplomové práce: MSc. Valeriya Zabelina, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: 18. února 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., Dr.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvká 1868, 370 05 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 30. března 2016

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích

.....

Bc. Markéta Vrchotová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Františku Sehnalovi, CSc. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Děkuji také MSc. Valeriyi Zabelině, Ph.D. a Mgr. Haně Sehadové, Ph.D., které mi velmi pomohly s praktickým zvládnutím použitých metodik.

Abstrakt:

Transgenoze je nástroj, kterým lze dále vylepšovat vlastnosti hedvábí produkovaného bourcem morušovým nebo který umožní použít bource jako producenta rekombinantních proteinů využitelných v lékařství. Zabelina *et al.* (2015a) vytvořili transgenní partenogenetickou linii, jejíž výhodou bylo rychlé získání homozygotů ve vloženém transgenu se stabilní expresí v dalších generacích. Účinnost vlastní transgenoze však byla nižší než 2 %, zatímco u běžných nepartenogenetických linií se pohybuje v rozmezí 20 – 60 %. Náplní mé práce bylo hledání příčin tohoto rozdílu. Protože úspěch transgenoze závisí na injekci do vajíček před dokončením tvorby blastodermu, zdálo se, že nebyla použita vajíčka vhodného stupně vývoje. Transgenoze se u standardních linií provádí při teplotě 25 °C, zatímco vajíčka partenogenetických linií je třeba po aktivaci tepelným šokem inkubovat 3 dny v 15 °C. Překážkou pro transgenozu partenogenetických linií je rovněž embryonální diapauza. K jejímu potlačení při tvorbě transgenní partenogenetické linie VTG1 byla použita transplantace vaječníků partenogenetické linie do samčích housenek standardní linie. V práci byla porovnáována vajíčka standardní a partenogenetické linie vyvíjející se v 15 °C. Vliv teploty na vývoj byl pozorován u standardní linie K23 inkubované v teplotách 25 a 15 °C. Embryogeneze byla v 25 °C asi dvakrát rychlejší než v 15 °C. U implantátů ze samců a ze samic nebyl pozorován rozdíl v rychlosti vývoje. S ohledem na průběh rýhování je možno doporučit k injekci konstruktem DNA čas 24 h po aktivaci partenogeneze. Vývoj partenogenetické linie bez zásahu v porovnání s implantáty byl srovnatelný. Vývoj u standardní linie probíhal rychleji než při aktivaci embryogeneze tepelným šokem. Vlastní vajíčka samic K23 vyvíjející se v přítomnosti implantátu získala částečnou schopnost partenogeneze. Vývoj transgenní partenogenetické linie VTG1 byl pomalejší než vývoj partenogenetické linie PK1. Je zřejmé, že interpretace a využití rozdílů v rychlosti embryogeneze bource vyžaduje další výzkum.

Klíčová slova: *Bombyx mori*; embryogeneze; partenogeneze; transgenoze; transplantace ovaríí; embryonální diapauza.

Summary:

Transgenesis of silkworms has great potential for the development of silk with new properties as well as for the preparation of recombinant proteins for the use in biomedicine. Zabelina *et al.* (2015a) showed that transgenesis of parthenogenetic silkworms facilitates the selection and maintenance of transgenic homozygotes with stable transgene insertions. However, the efficiency of transgenesis was less than 2 % compared to 60 % in the standard, non-parthenogenetic silkworms. The purpose of the present research was to explore the cause of this difference. Since transgenesis is normally performed at 25 °C but in the parthenogenetic silkworms at 15 °C (3 days incubation at this temperature is part of the protocol for the induction of parthenogenetic development), we assumed that the eggs incubated at 15 °C might have been injected with the DNA construct at unsuitable time. The work was therefore focused on the rate of embryogenesis at 15 °C in the eggs treated in different ways. Intensive cleavage of the control eggs (strain K23) was observed at 12 h after oviposition at 25 °C and between 24 and 36 h at 15 °C. The transgenesis of parthenogenetic silkworms is also complicated by the embryonic diapause. In the current work, diapause was suppressed by implanting PK1 ovaries into the non-parthenogenetic male hosts K23. Parthenogenetic development was activated by the heat shock in the chorionated eggs dissected from the implants. No cleavage was detected at 12 h after the activation and nearly complete blastoderm was found at 48 h. In respect to the course of cleavage at 15 °C, transgene injection 24 h after the activating heat shock can be recommended. The eggs from endogenous ovaries of the K23 females, which also contained the implants of the PK1 ovaries, acquired partial capacity of parthenogenesis. Low rate of embryogenesis was also found in the transgenic clone VTG1. Current results suggest that more research is needed to understand and possibly explore differences in the rate of silkworms exposed to different treatments.

Key words: *Bombyx mori*; embryogenesis; partenogenesis; transgenesis; transplantation of ovaries; embryonic diapause.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	11
2.1. Embryonální vývoj bource morušového	11
2.1.1. Oplození.....	12
2.1.2. Raný vývoj.....	12
2.1.3. Růst embrya	14
2.2. Diapauza	15
2.3. Partenogeneze	16
2.4. Transgenoze	18
2.4.1. Nůžky na DNA – restrikční endonukleázy	18
2.4.2. Plazmidy	19
2.4.3. Transgenoze u bource morušového.....	20
2.4.4. Skupina <i>piggyBac</i>	21
2.4.5. Mechanismus transpozice	21
2.4.6. Příprava partenogenetické transgenní linie	23
3. Cíle práce	25
4. Metodika práce.....	26
4.1. Použité linie bource morušového	26
4.2. Transplantace vaječníků.....	26
4.3. Indukce partenogeneze.....	27
4.4. Vajíčka standardně se rozmnožující linie	28
4.5. Zpracování vajíček.....	28
4.6. Barvení zárodků	29
4.7. Příprava preparátů.....	30
4.8. Skenování vajíček na konfokálním mikroskopu	30
5. Výsledky	32
5.1. Výběr vhodné barvicí techniky	32
5.2. Vliv teploty na normální průběh embryogeneze	33
5.3. Vliv různých zákroků na rýhování v 15 °C.....	35
5.4. Dělení jader.....	37
6. Diskuze	38
7. Závěr	40
8. Literatura.....	41

1. Úvod

Bourec morušový (*Bombyx mori*) je jeden ze dvou domestikovaných hmyzích druhů. Pět tisíc let v lidské péči z něj udělalo tvora kompletně závislého na člověku. Kvalita jeho hedvábí nebyla ani v době syntetických materiálů překonána; hedvábí je stále důležité v tradičních textilních výrobcích i ve farmacii. V dnešní době je chována řada ras bource, které jsou přizpůsobeny různým klimatickým podmínkám a liší se kvalitou a množstvím produkovaného hedvábí. Pro snadnější udržení vhodných genotypů byly vyselektovány linie schopné téměř 100% partenogeneze (Astaurov 1973). Z neoplozených vajíček se po ošetření tepelným šokem vylíhnou samice s identickým genomem, které lze takto klonovat řadu let. Partenogenetický vývoj je možné u malého počtu vajíček aktivovat i nízkou teplotou, pak vznikají hlavně samci (Terskaya a Strunnikov 1974, dle Nagaraju *et al.* 2001).

S vývojem genového inženýrství byl vypracován způsob, jak do genomu bource morušového zabudovat geny z jiného druhu (Tamura *et al.* 1990, 2000). Tvorbou transgenních bourců lze dále vylepšovat kvality hedvábí či využít bource jako tzv. bioreaktory – místo hedvábí mohou produkovat jinou látku, např. interferon využitelný v biomedicíně (Zabelina *et al.* 2015b). Při transgenozí je nutné injikovat konstrukt DNA obsahující transgen do nediapauzního vajíčka před vytvořením membrán oddělujících jednotlivé buňky (Tamura *et al.* 2000), aby se injikovaná DNA mohla dostat do jader (včetně jader buněk zárodečné linie) a integrovat se do genomu. Přesné načasování injekce DNA je pro úspěšnost transgenoze velmi důležité.

Nejkvalitnější hedvábí produkují bourci, kteří mají 1 – 2 generace během sezony a za běžných okolností kladou diapauzní vajíčka, ve kterých se vývoj zastaví na časném stádiu embryogeneze. Pro transgenozí je nelze použít, je však možné získat nediapauzní vajíčka. V případě partenogeneticky udržovaných genotypů je nejvhodnější transplantace vaječníků partenogenetické linie do samců standardních linií (Zabelina a Klymenko 2008). Samci totiž neprodukují diapauzní hormon, který u samic diapauzu vajíček vyvolává. Implantaci jednoho či obou vaječníků je vhodné provést asi v polovině larválního vývoje dárce i příjemce, odstranění gonád hostitele není nutné (Spiridonova *et al.* 1987). Zralá nediapauzní vajíčka získaná z implantátu partenogenetické linie, nepotřebují oplození a jejich vývoj je možno aktivovat tepelným šokem.

Výše uvedený postup byl vypracován a realizován pracovníky Biologického centra AV ČR ve spolupráci s japonskými kolegy (Zabelina *et al.* 2015b). Byli vytvořeni partenogenetičtí transgenní bourci. Aktivací partenogeneze vysokou teplotou vznikly transgenní samice, nízkou teplotou transgenní samci a jejich křížení dalo vzniknout potomstvu homozygotnímu ve vloženém cizorodém genu. Úspěšnost transgenoze však byla mnohem nižší než při použití standardních vajíček kladených oplozenými samicemi. Možnou příčinou bylo špatné načasování injekce konstruktů DNA. Ve své diplomové práci jsem proto porovnávala rozdíly v raném embryonálním vývoji u standardně se rozmnožujících bourců, u partenogenetických vajíček aktivovaných tepelným šokem, u partenogenetických vajíček vyvíjejících se v samcích standardní linie a aktivovaných tepelným šokem a u transgenní partenogenetické linie bource morušového.

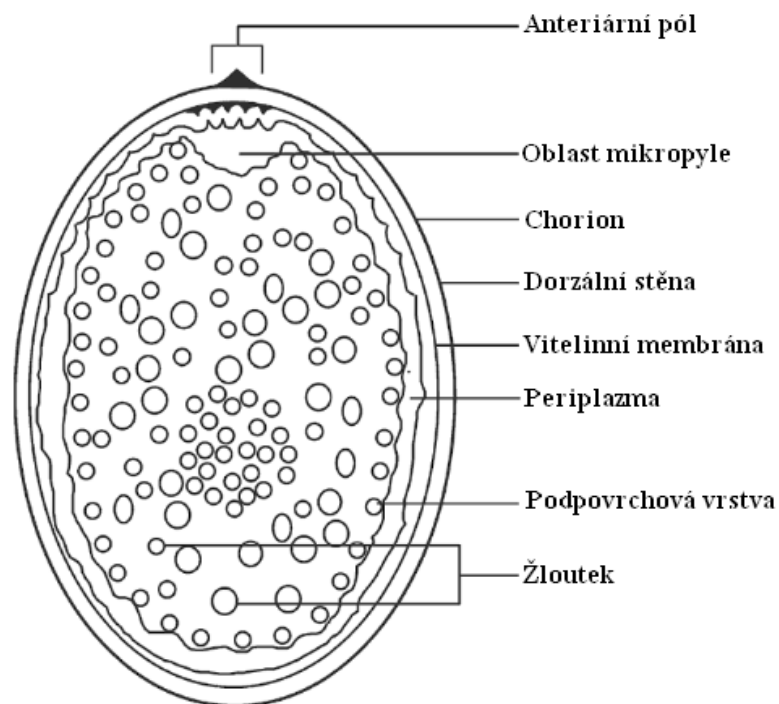
2. Literární přehled

2.1. Embryonální vývoj bource morušového

Vývoj vajíček probíhá ve vaječnících nacházejících se v pátém abdominálním článku pod epidermis. Každý vaječník se skládá ze čtyř ovariol, které jsou patrné již u larev třetího instaru. Druhý den stádia kukly protrhávají pouzdro vaječníku a pronikají do tělní dutiny. Terminálními filamenti jsou ukotveny k tělní stěně.

Jedna samice bource morušového je schopna naklást až 500 vajíček (záleží na linii). Kladení probíhá večer a 80 % vajíček je vykladeno v prvních čtyřech hodinách (Tazima 1978). Vajíčka jsou 1,2 mm dlouhá, 0,8 mm široká (Tazima 1978) a lze na nich podle tvaru rozlišit přední pól, který je mírně plošší než pól zadní, a ventrální stranu, která je oblejší než strana dorzální (Nagy *et al.* 1994).

Vajíčka hmyzu lze podle rozložení žloutku v cytoplazmě označit jako centrolecitální – žloutek se nachází uvnitř vajíčka a je obalený cytoplazmatickou membránou. Okrajová vrstva žloutku se nazývá periplazma. Celé vajíčko je chráněno dvěma vaječnými obaly: vitelinní membránou a chorionem (Obr. 1).



Obr. 1: Stavba hmyzího vajíčka (upraveno dle Nation 2015).

2.1.1. Oplození

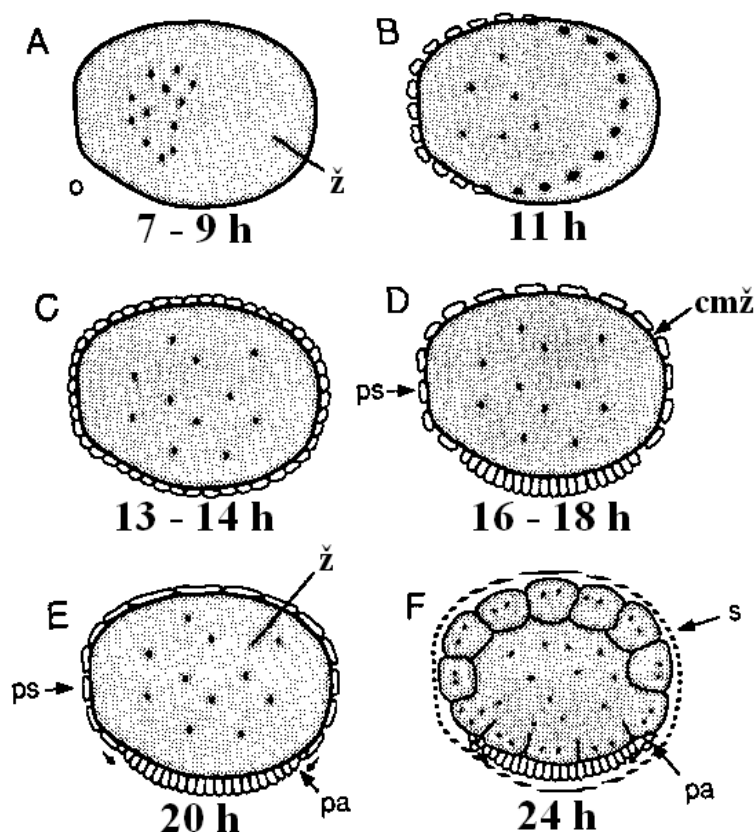
Jádro vajíčka se po opuštění vaječníku nachází v metafázi I prvního meiotického (redukčního) dělení. Pokračování v dělení způsobí spermie, která do vajíčka proniká v genitální komoře (burza copulatrix) a zůstává v přední (anteriorní) části vajíčka, dokud není dokončena meióza samičího prvojádra. Do genitální komory spermie putuje ze spermatheky, která samicím slouží k uchování spermií.

První meiotické dělení oocyty je dokončeno vznikem oocyty II. řádu a jedním pólocytem (pólovým tělískem). Druhé meiotické (ekvační) dělení začíná asi 60 min po vykladení (Tazima 1978). Výsledkem je samičí prvojádro migrující do středu vajíčka a 3 pólocyty, které jsou následně reabsorbovány.

Zatímco oocyt prochází meiózou, odděluje se bičík spermie od hlavičky. Hlavička se postupně zakulacuje a formuje samčí prvojádro. Jakmile je dokončeno meiotické dělení, samičí a samčí prvojádra se k sobě přiblíží, až nakonec splynou v zygotu. Čas od naklazení vajíček do splnutí prvojader byl několika badateli odhadnut na 120 – 140 min (Tazima 1978). Následné rýhování vajíčka probíhá zhruba v hodinových intervalech (Ohtsuki a Murakami 1968).

2.1.2. Raný vývoj

V prvních 7 – 9 h po vykladení (vajíčka uchovávaná v 25 °C) probíhá ve vajíčku intralecitální rýhování (Obr. 2A). Rýhování vajíčka je sled synchronizovaných mitotických dělení jádra zygoty a jeho dceřiných jader; intralecitální znamená, že probíhá uvnitř žloutku. Brzká dělení se zdají téměř synchronní, před formací blastodermu synchronizace ale zaniká (Tazima 1978).



Obr. 2: Vývoj vajíčka od 9 do 24 h po vykladení (upraveno dle Nagy *et al.* 1994). (o) oolemma = cytoplazmatická membrána vajíčka; (ž) žloutek; (ps) preserózní buňky; (cmž) cytoplazmatická membrána žloutku; (pa) budoucí amnion; (s) seróza.

Jednotlivé rýhující se energidy (energid – jádro s ostrůvkem cytoplasmy bez membrány) tvoří elipsovitý shluk v první třetině vajíčka u předního pólu. Vzdálenost mezi jednotlivými jádry je přibližně stejně velká a při každém dalším dělení se vzdálenost mezi jádry úměrně zmenšuje (Nagy *et al.* 1994). Jádra pokračují v dělení, přibližují se k periplazmě, až dosáhnou povrchu vajíčka, nejprve na předním pólu a anterolaterální stěně vajíčka (Obr. 2B). Tvorba buněčných membrán oddělujících jednotlivá jádra rovněž probíhá od předního pólu k zadnímu jako „mexická vlna“ až je nakonec vytvořen celistvý buněčný blastoderm (Obr. 2C), který je podle histologických studií Keina a Takesua (1982) kompletně oddělen od žloutku.

Na rozdíl od octomilky u bource nevzniká syncytiální blastoderm (Nagy *et al.* 1994), tedy útvar, ve kterém jsou jádra rozmístěna rovnoměrně při celém povrchu vajíčka, než se synchronně vytvoří buněčné membrány a vznikne buněčný blastoderm. U bource se také neobjevují zřetelné pólové buňky, ze kterých později vznikají buň-

ky zárodečné. U octomilky jsou uloženy v koncové části vajíčka odděleně od buněčného blastodermu.

Po dokončení blastodermu je celý povrch vajíčka pokryt uniformními buňkami, které se postupně začínají tvarově a funkčně rozlišovat (Obr. 2D). Ventrolaterální stěna je pokryta malými buňkami tvaru kvádra (primordiální zárodečný proužek) a většinu povrchu zaujímají buňky velké, kulaté a oddělené mezi sebou malými mezerami (preserózní buňky). Primární jádra žloutku nejsou dosud oddělena buněčnými membránami (Nagy *et al.* 1994). Funkcí vznikajících buněk, označovaných jako vitelofágy, je přenos živin obsažených v žloutku do vyvíjejícího se embrya.

U buněk hraničících s primordiálním zárodečným proužkem se vytvářejí cytoplazmatické výběžky směřující všemi směry (Nagy *et al.* 1994), zatímco ostatní buňky nevykazují žádné morfologické změny. Buňky představují budoucí amnion, membránu obklopující a chránící embryo.

Ostatní preserózní buňky se zplošťují, zvětšují svůj povrch a splývají s okolními buňkami za vzniku serózy, která obalí embryo a zbylý žloutkový vak (Obr. 2F). Tato membrána zabraňuje vysychání vajíčka v terestrickém prostředí (Jacobs *et al.* 2013). Po dokončení serózy budoucí zárodek prochází sérií stahů: celkový povrch budoucího zárodka se snižuje mezi 14 a 22 h od vykladení o 55 % (Nagy *et al.* 1994). Kontrakce jsou nesymetrické, redukce v šířce budoucího zárodka je více než dvakrát větší než redukce délky. Během tohoto procesu periferní jádra žloutku začínají tvořit buněčné membrány.

2.1.3. Růst embrya

Vchlípnutím buněk zárodečného proužku vznikají zárodečné listy: vnější ektoderm a vnitřní nerozlišený mezoderm (mezoderm + entoderm; Nation 2015); ze kterých při dalším vývoji vznikají různé orgány. Z ektodermu vzniká epidermis a její deriváty, oči (jednoduchá stemata a ocelli a oči složené), jiné smyslové orgány (mechanoreceptory, chemoreceptory, sluchové orgány), slinné žlázy, prothorakální žlázy, corpora allata, snovací žlázy, sekreční buňky oenocyty, přední střevo (foregut) a zadní střevo (hindgut), Malpighické trubice, vzdušnice, nervová soustava a zevní pohlavní orgány. Z mezodermu jsou formovány vnitřní pohlavní orgány, svaly, hřbetní céva,

tukové těleso, krevní buňky a perikardiální žláza. Z entodermu vzniká střední střevo (midgut).

Brzy po vytvoření zárodečných listů začíná tělní segmentace a asi 10 dní po vykladení je embryonální vývoj dokončen a líhne se housenka.

U bource, stejně jako u dalších druhů řádu *Lepidoptera*, probíhají během zárodečného vývoje zřetelné změny v poloze a orientaci embrya uvnitř vajíčka. Tyto pohyby jsou označovány jako blastokineze. Slouží pravděpodobně k efektivnějšímu využití zásobních látek ze zbylého žloutku a lepší ochraně embrya (Sharov 1966 dle Horna 1978).

2.2. Diapauza

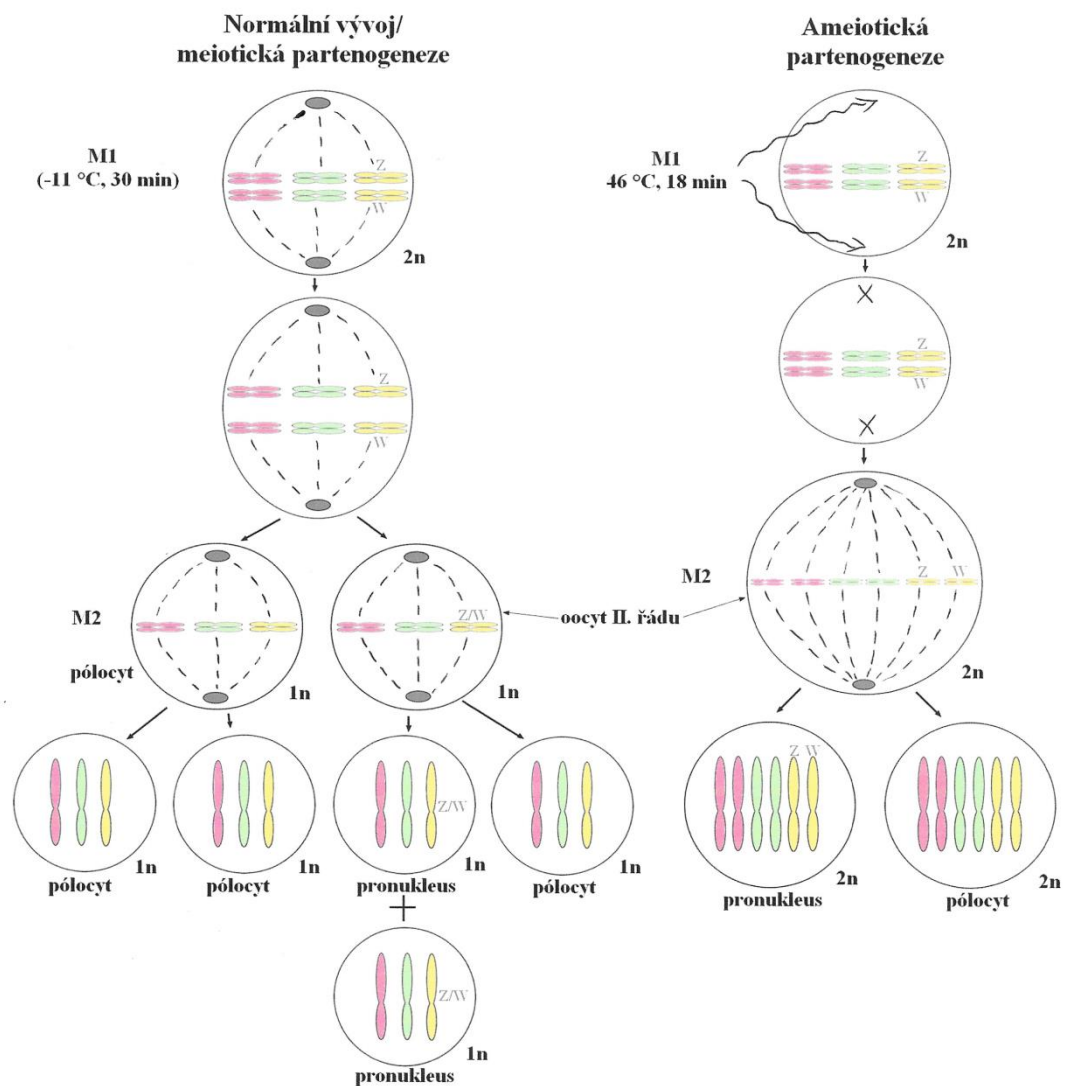
Počet generací bource morušového za rok závisí na dědičné determinaci embryonální diapauzy v reakci na environmentální faktory. Z vajíček neprodělávajících diapauzu se larvy líhnou při 25 °C přibližně za deset dní po naklazení, zatímco embrya diapauzních vajíček zastavují svůj vývoj dva až tři dny po naklazení a jsou schopna pokračovat ve vývoji, pouze pokud jsou vystavena po několik měsíců nízkým teplotám kolem 5 °C. Při vývoji v mírném klimatickém pásmu kladou monovoltinní kmeny bourců výlučně diapauzní vajíčka, zatímco bi- a polyvoltinní kladou diapauzní vajíčka jen za určitých podmínek. Komerčně nepoužívanější jsou bivoltinní typy. Počet generací za rok je u nich ovlivněn fotoperiodou a teplotou během embryonálního a časného larválního vývoje rodičovské generace. Nejméně 15 h světla každý den je nezbytných pro produkci dospělců, kteří budou klást 100% diapauzní vajíčka (Kogure 1933). Watanabe (1924 dle Tazimy 1978) experimentálně potvrdil, že při vývoji v 15 °C vznikají vajíčka bez diapauzy a inkubace při 25 °C dává vzniknout diapauzním vajíčkům. Samice bourců inkubované při 20 °C nakladly směs vajíček s diapauzou a bez diapauzy. Diapauzu ovlivňuje i teplota během zárodečného a časného larválního vývoje rodičů. Účinek teploty u ranějších larválních stádií je stejný jako účinek během embryonálního vývoje, avšak účinek teploty u pozdějších larválních stádií je opačný (vyšší teplota dává vzniknout vajíčkům bez diapauzy).

2.3. Partenogeneze

Grenier *et al.* (2004) navrhli použití partenogeneze, tj. vývin neoplozených vajíček, jako možnost klonování transgenních bourců. U bource morušového je spontánní partenogeneze velmi vzácná (Nagaraju *et al.* 2001), byly ovšem vyvinuty účinné metody vedoucí k meiotické a ameiotické partenogenezi pomocí působení různých teplot na neoplozená vajíčka. Astaurov (1940) zjistil, že vystavení neoplozených vajíček (vyjmutých z vaječníků dospělých samic) teplotě 46 °C po dobu 18 min a následné uložení vajíček v teplotě 15 °C na tři dny, bylo nejúčinnější pro vyvolání kompletního partenogenetického vývoje u několika linií bource morušového.

Mechanismus ameiotické a meiotické partenogeneze jsem shrnula do následujícího diagramu (Obr. 3). Stejně jako u jiných zástupců řádu *Lepidoptera* je oogeneze u bource zastavena v metafázi prvního meiotického (redukčního) dělení, kdy jsou jednotlivé homologní chromozomy spojeny synaptonemálním komplexem a tvoří tzv. bivalenty (Rasmussen 1976). V případě normálního vývoje (levá strana Obr. 3) probíhá standardní meióza po interakci spermie s vajíčkem. Po druhém meiotickém (ekvačním) dělení vzniknou tři haploidní pólocyty a jedno haploidní samičí prvojádru nesoucí pohlavní chromozom Z nebo W. Pro indukci meiotické partenogeneze je třeba působit na neoplozená vajíčka po dobu 30 min teplotou -11 °C, která způsobí splynutí (nebo zabránění rozdělení) dvou geneticky identických haploidních samičích prvojader vzniklých meiózou. Některé obsahují pohlavní chromozom Z, jiné chromozom W. Po splynutí dvou sesterských prvojader s identickým genomem vznikne zygota s konstitucí ZZ nebo WW. Malá část samčích jedinců o genotypu ZZ přežívá, jsou homozygotní ve všech alelách, ale jejich plodnost je nízká. „Supersamice“ o genotypu WW nevznikají, neboť je tento genotyp letální - standardní genotyp samic je ZW (Terskaya a Strunnikov 1974, dle Nagaraju *et al.* 2001).

Na pravé straně diagramu (Obr. 3) je znázorněna ameiotická partenogeneze vyvolaná působením teploty 46 °C po dobu 18 min. Dochází k přerušení dělicího vřeténka v metafázi I a zabránění následnému redukčnímu dělení, čímž vzniká diploidní samičí prvojádru (Astaurov 1940). Protože u samic bource morušového nedochází ke crossing-overu (Klimenko 1982 a 1990, dle Nagaraju *et al.* 2001), je prvojádru identické s mateřským genotypem. Stabilní klony je možné tímto způsobem udržovat po mnoho let bez viditelných změn.



Obr. 3: Schéma meiotické a ameiotické partenogeneze. (M1) metafáze I.

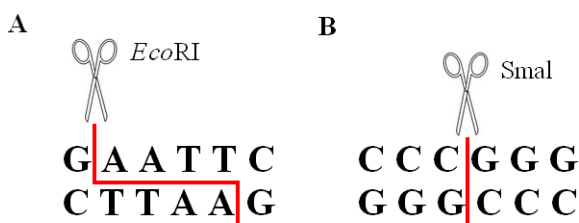
Křížením různých linií bource morušového a následnou selekcí samic s vysokým podílem potomstva schopného vyvolání umělé partenogeneze vytvořil Astaurov několik partenoklonů, u kterých tepelný šok vyvolá vývoj u 30 – 60 % neoplozených vajec (Zabelina *et al.* 2015b). Posléze zkonstruoval partenoklon s téměř 100% schopností partenogenetického vývoje po vystavení vajíček tepelnému šoku (Astaurov 1973). Tento klon označil jako P29. Byl udržován více než 40 let bez viditelných ztrát svého partenogenetického potenciálu ale i jiných fenotypových charakteristik.

2.4. Transgenoze

V roce 1973 dva biochemici, Herbert Boyer a Stanley N. Cohen, vyvinuli technologii rekombinantní DNA, když vložili gen drápatky vodní (*Xenopus laevis*) do bakterie *Escherichia coli*. Tento gen byl poté aktivní i v dalších generacích bakterie. Cohenův výzkum zahrnoval studium plazmidů, kruhových molekul DNA vyskytujících se u bakterií, kterým zajišťují důležité vlastnosti, např. rezistenci k antibiotikům či fixaci vzdušného N₂. Geny pro tyto funkce nejsou součástí bakteriálního chromozomu (nukleoidu). Boyer se zabýval restrikčními endonukleázami, vyskytujícími se taktéž u bakterií, kterým pomáhají v obraně proti vnášení cizorodé DNA do vlastního genomu. Restriktázy rozeznávají určité sekvence DNA a poté tuto DNA štěpí. Spojením těchto dvou nástrojů vznikl účinný způsob vložení cizorodé DNA do plazmidu a následný přenos takto sestrojeného plazmidu do cíleného organismu.

2.4.1. Nůžky na DNA – restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které štěpí dvoušroubovici DNA v místě, nebo blízko místa se specifickou rozpoznávací sekvencí nukleotidů = restrikční místo. Tyto enzymy se vyskytují u bakterií, kterým poskytují ochranu před napadením viry. Jsou zaměřeny na štěpení cizí DNA, zatímco vlastní genetická informace je chráněna např. metylací. Rozpoznávací sekvence nukleotidů je většinou dlouhá 4 až 8 bází a je palindromická (při čtení zprava doleva i zleva doprava obsahuje stejné báze). Existuje několik typů restriktáz, nejčastěji se v genovém inženýrství uplatňují restrikční endonukleázy II. typu, které štěpí dvoušroubovici DNA přímo v rozpoznávací sekvenci a tvoří tzv. lepivé konce (Obr. 4).



Obr. 4: Příklady restriktáz štěpící DNA přímo v rozpoznávací sekvenci. (A) Štěpením vznikají lepivé (kohezní) konce; (B) štěpením vznikají rovné (tupé) konce.

Uměle vytvořená restrikční endonukleáza může vzniknout fúzí přirozené či konstruované DNA vázající domény (DNA-binding domain, DBD) a nukleázy typu II

(Kim *et al.* 1996). DBD obsahuje nejméně jeden strukturální motiv, který rozeznává určitou sekvenci nukleotidů v jedno- či dvouřetězcové DNA.

U bource morušového již byly použity tři typy zkonstruovaných nukleáz. První typ vznikl fúzí dvou proteinů, z nichž každý obsahoval DNA vázající doménu označovanou jako zinkový prst (Zinc finger) a *FokI* nukleázu (Takasu *et al.* 2010). Větší efektivita byla zaznamenána v pracích Ma *et al.* (2012) a Sajwan *et al.* (2013) za použití nukleázy, která obsahovala DNA vázající doménu označovanou jako TAL efektor (= transcription activator-like). Poslední typ nukleázy byl sestrojen pomocí CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) a *cas* (CRISPR-associated system) genů (Wang *et al.* 2013). CRISPR/Cas systém slouží jako imunitní systém prokaryot a jeho upravením lze získat účinný nástroj na editaci genomu.

2.4.2. Plazmidy

Jak již bylo zmíněno výše, plazmidy jsou malé, kruhové, dvoušroubovicové molekuly DNA poskytující bakteriím zvýhodňující vlastnosti, např. rezistenci k některým antibiotikům. Jsou schopny své vlastní replikace nezávisle na replikaci hostitelské buňky a horizontálního přenosu genetické informace, jak mezi nepříbuznými jedinci jednoho druhu, tak mezi jedinci různých druhů.

Uměle zkonstruované plazmidy jsou využívány k přenosu cizorodého genu do jiného organismu v jedné a více kopiích. Každý takový plazmid musí obsahovat počátek replikace (origin of replication, ORI), mnohočetné klonovací místo (multiple cloning site), které obsahuje několik restričních míst, kam může být pomocí příslušné restriktázy zabudován požadovaný gen, a selekční marker, např. rezistenci k ampicilinu či fluoreskující protein.

Gen vnášený do plazmidu může být získán z genomu některého organismu nebo může být uměle vytvořen. Aby podle něj mohl transkripce a translace vznikat příslušný protein, musí obsahovat startovací nukleotid, který určuje začátek transkripce, terminator, značící konec transkripce a promotor, oblast DNA sloužící k navázání RNA polymerázy.

2.4.3. Transgenoze u bource morušového

Transgenoze zahrnuje přípravu plazmidu (konstrukt DNA), který obsahuje transpozon, studovaný gen a jeden nebo více markerů (pro selekci s pomocí antibiotik nebo detekci pomocí fluorescence). Konstrukt je injikován do embrya před vytvořením buněčného blastodermu společně s pomocným plazmidem poskytujícím transposázu, která umožňuje vystřížení a následné vložení transpozonu do genomu cílového organismu. První transgenní bourci byli získáni pomocí transpozonu *piggyBac* jako vektoru značeného zeleným fluorescenčním proteinem (Green Fluorescent Protein, GFP) a pomocného plazmidu s genem pro transposázu pod kontrolou promotoru genu pro aktin *BmA3* (Tamura *et al.* 2000) nebo promotoru genu pro teplotní protein *hsp70* vyskytující se u rodu *Drosophila* (Uhlířová *et al.* 2002). Transgenní bourci byli detekováni v další generaci. Expres GFP byla patrná ve tkáních housenek, kukel i dospělců, ale překvapivě ji nebylo možno potvrdit u embryí (Tamura *et al.* 2000).

Transpozon neboli transpozibilní element je sekvence repetitivní DNA, která je schopna se přemísťovat uvnitř genomu. Transpozony byly identifikovány u všech organismů, prokaryotických i eukaryotických, a zabírají velkou část genomu. Transpozice takového elementu může mít pozitivní či negativní dopad na genom, např. může způsobit inaktivaci genu, změnit intenzitu genové exprese nebo způsobit nepravdělné rekombinace.

Transpozony se rozdělují do dvou tříd. Třída I obsahuje RNA transpozony fungující prostřednictvím reverzní transkripce, které mohou být dále rozděleny do dvou skupin podle výskytu dlouhých terminálních repetit (Long Terminal Repeats, LTR) obklopujících hlavní část retrotranspozonu. Do třídy II řadíme DNA transpozony, které se v genomu pohybují mechanismem vystřížení a vložení na jiné místo v genomu. DNA transpozon je složen z genu pro transposázu, který je obklopen dvěma terminálními invertovanými repeticemi (Terminal Inverted Repeats, TIR). Tyto repetice transposáza rozpozná, vystřihne hlavní část DNA transpozonu a vloží ho na jiné místo v genomu. Po vložení je cílové místo v DNA duplikováno za vzniku duplikace cílového místa (Target Site Duplications, TSD), které je typické pro každý transpozon. DNA transpozony jsou dále děleny do skupin podle jejich sekvence, terminálních invertovaných repetit a/nebo duplikací cílového místa. Do podtřídy I patří skupiny Tc1/*mariner*, PIF/*Harbinger*, hAT, Mutator, Merlin, Transib, P, *piggyBac* a CACTA.

Transpozony *Helitron* a *Maverick* patří do podtřídy II, protože jsou na rozdíl od transpozonů podtřídy I při transpozici replikovány a netvoří dvouřetězcové zlomy DNA při inzerci.

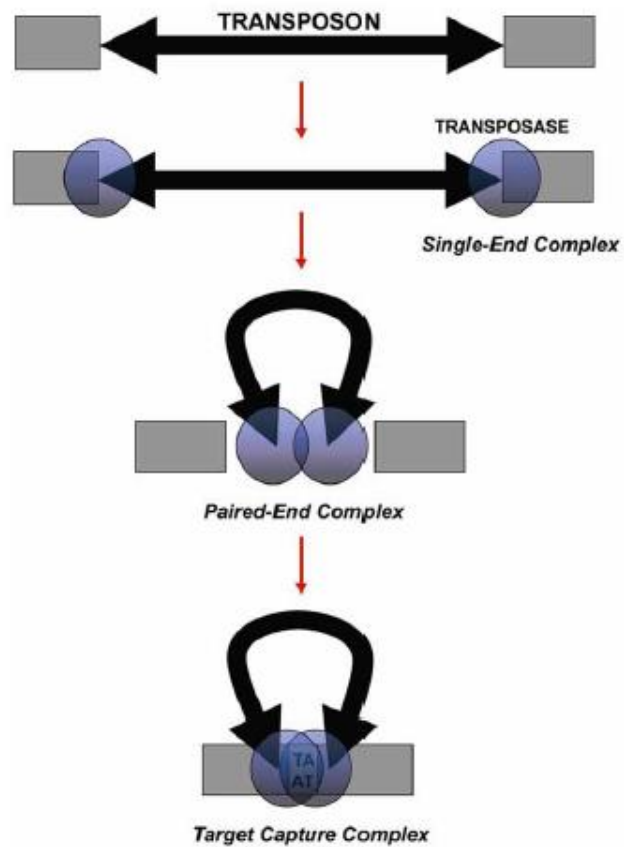
V obou třídách (retrotranspozony a DNA transpozony) můžeme kromě autonomních transpozonů najít i neautonomní transpozony, které nekódují enzym potřebný k jejich přemístění.

2.4.4. Skupina *piggyBac*

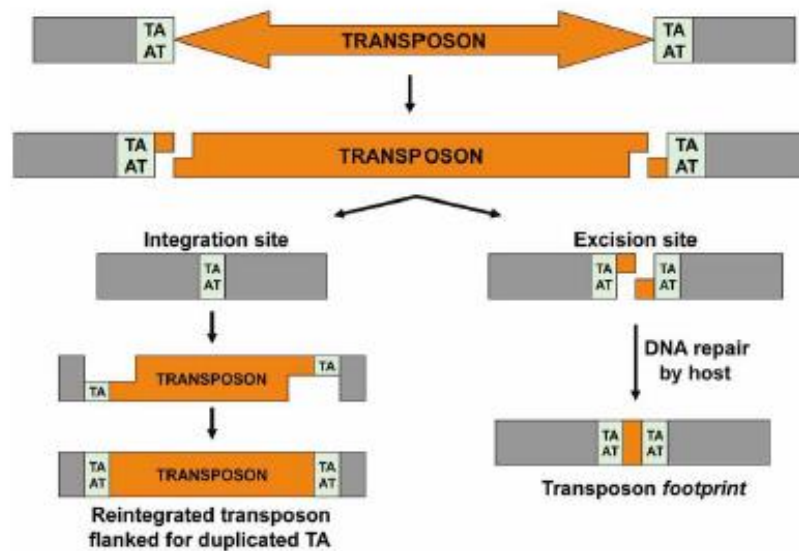
piggyBac je DNA transpozon poprvé identifikovaný v genomu můry *Trichoplusia ni*. Transpozon *piggyBac* je 2,4 kb dlouhý, obsahuje 13 bp terminálních invertovaných repetitiv (TIR) a dalších 19 bp vnitřních invertovaných repetitiv. Cílovým místem inzercce *piggyBac* je sekvence TTAA a transpozon obsahuje jeden otevřený čtecí rámeček (Open Reading Frame, ORF), dlouhý 1,8 kb, který kóduje funkční transposázu.

2.4.5. Mechanismus transpozice

- 1) Dvě molekuly transposázy rozpoznávají sekvence TIR a vážou se na ně prostřednictvím strukturního HTH (helix-turn-helix) motivu za vzniku dvou „Single-End“ komplexů (Single-End Complex, SEC; Obr. 5).
- 2) Obě transposázy štěpí 5' konce terminálních invertovaných repetitiv (TIR) hydrolýzou fosfodiesterových vazeb a uvolňují tak nepřenášené úseky, které se dále na procesu transpozice nepodílejí (Obr. 6).
- 3) Transposázy dále interagují a přibližují k sobě oba konce transpozonu za vzniku „Paired-End“ komplexu (Paired-End Complex, PEC) a dimeru transposáz (Obr. 5). V tomto okamžiku probíhá hydrolýza fosfodiesterových vazeb na 3' konci a tvoří přenášený úsek.
- 4) PEC se naváže na vlákno DNA v místě inzercce a vytvoří tzv. „Target Capture Complex“. Mezery v řetězcích jsou opraveny homologní rekombinací. V místě inzercce vzniká duplikace cílového místa (Target Site Duplications, TSD) a v místě vystřížení může vznikat při nehomologním připojení konců (NHEJ) stopa po původním transpozonu.



Obr. 5: Mechanismus přemístění transpozonu skupiny Tc1/mariner (Muñoz-López a García-Pérez, 2010).



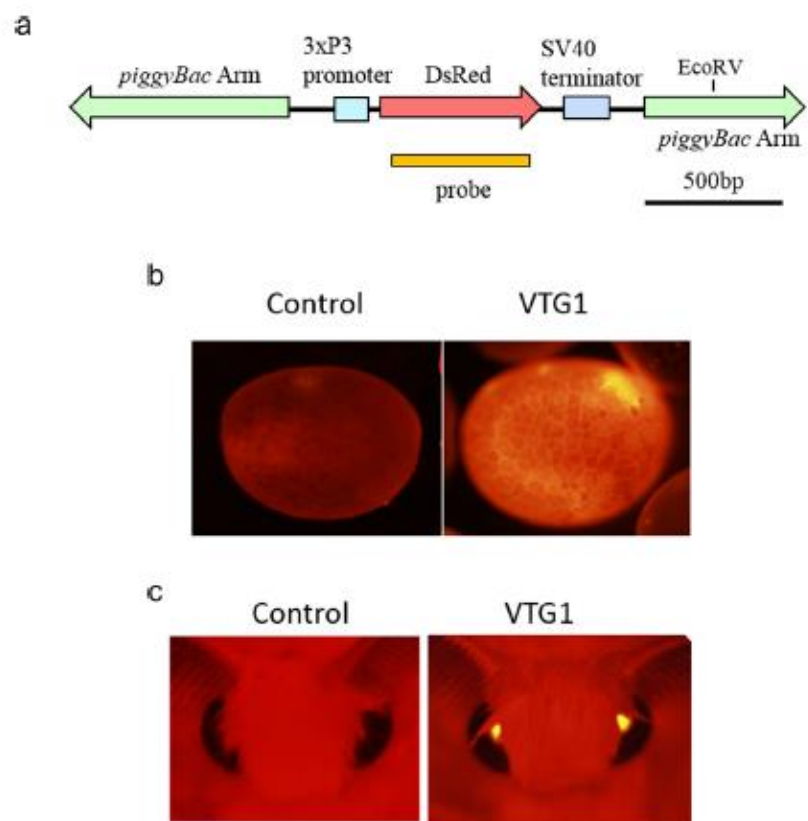
Obr. 6: Mechanismus vystřížení a vložení transpozonu skupiny Tc1/mariner (Muñoz-López a García-Pérez, 2010).

Po transpozici musí hostitelské buňky opravit dvouřetězcové zlomy na místě vystřížení. Jednou možností je homologní rekombinace, kdy se poškození úseku DNA opravuje podle informace na nepoškozeném homologním úseku DNA (homologním chromozomu, sesterské chromatidě či homologní sekvenci na stejném chromozomu). Druhou možností je oprava prostřednictvím nehomologního spojování volných konců, která vede k vytvoření stopy po původním transpozonu obklopené TTAA duplikacemi.

2.4.6. Příprava partenogenetické transgenní linie

Zabelina *et al.* (2015a) popisují získání transgenní partenogenetické linie bource morušového. Schopnost partenogenetického vývoje je výhodou, díky níž může být genom s vneseným genem beze změny klonován do dalších a dalších samičích generací. Navíc lze působením nízké teploty (-11 °C, 30 min) získat transgenní samce a následným křížením s partenogenetickými transgenními samice vytvořit potomstvo homozygotní v cílovém genu.

Pro úspěšnou transgenozu je potřeba použít nediapauzní vajíčka. Protože použitý partenoklon klade vajíčka diapauzní bylo zapotřebí diapauzu eliminovat. Ošetření vajíček kyselinou chlorovodíkovou, které používají chovatelé bource, se v případě transgenozy neosvědčilo (Zabelina *et al.* 2015a). Ani jiné postupy nebyly úspěšné, osvědčila se však dříve vyvinutá a technicky poměrně náročná transplantace vaječnic k partenoklonu do samčích housenek standardní linie (Zabelina a Klymenko, 2008). Vajíčka, která se plně vyvinula v transplantovaných vaječnicích, nevstupovala do diapauzy a jejich vývoj mohl být aktivován pomocí tepelného šoku (46 °C, 18 min). Po 12 h v 15 °C byly do vajíček injikovány transgeny s pomocným plazmidem. Po třech dnech v 15 °C byla vajíčka přendána do 25 °C, kde se vylíhly housenky. Protože konstrukt transgenu obsahoval i sekvenci kódující fluoreskující protein DsRed, mohla být přítomnost a exprese transgenu zjištěna již ve vajíčku a ověřena u dospělců (Obr. 7) a v dalších generacích.



Obr. 7: Tvorba partenogenetické transgenní linie VTG1. (a) Mapa vektoru, (b) exprese červeného fluorescenčního proteinu v embryích, (c) exprese červeného fluorescenčního proteinu u dospělců (Zabelina *et al.* 2015a).

3. Cíle práce

Diplomová práce je založena na nedávno vyvinutých metodikách, které bylo nutno dopracovávat a optimalizovat pro konkrétní použití. Mezi cíle práce bylo zařazeno zvládnutí následujících metodik:

- (a) chov partenoklonů a standardních linií bource morušového na umělé potravě a indukce partenogeneze;
- (b) transplantace vaječnicků do housenek obou pohlaví a získání plně vyvinutých vajíček z implantátů a v případě samic současně z vaječnicků *in situ*;
- (c) dopracování metody fixace vajíček, odstranění chorionu a barvení jader;
- (d) vypracování metody pro hodnocení výstupů z konfokálního mikroskopu.

Asi polovina vynaložené práce se týkala použitých metodik, **hlavním cílem práce** však bylo

- (e) zjištění příčin nízké úspěšnosti transgeneze u bourců z partenoklonů ve srovnání s bourci standardních linií a odhadnutí vhodné doby pro injekci konstruktů DNA do partenogenetických vajíček bource, u kterých byla diapauza eliminována transplantací do samčích housenek standardní linie.

4. Metodika práce

4.1. Použité linie bource morušového

Ke studiu embryonálního vývoje po standardním oplození samcem byla použita monovoltinní linie K23. Tato linie má velmi nízkou schopnost partenogeneze a obsahuje pohlavní marker – pigmentovaná vajíčka dávají vzniknout samicím, vajíčka bez pigmentu samcům (Strunnikov 1971). Linie K23 je identická s linií Soviet-5 (Charikov, Ukrajina), ale pochází z italské kolekce (Padova, Itálie).

Samčí housenky linie K23 byly použity jako příjemci transplantovaných vaječníků od linie PK1 za účelem získání nediapauzních partenogenetických vajíček (Zabelina a Klymenko 2008). Vaječnky linie PK1 byly transplantovány i samičím housenkám linie K23, aby bylo možné porovnat embryonální vývoj implantátů. K porovnání embryonálního vývoje byla použita i vlastní vajíčka samic K23, která se vyvíjela v přítomnosti implantátu.

Diploidní monovoltinní partenoklon PK1 (Astaurov 1973) byl použit pro studium embryonálního vývoje po aktivaci partenogeneze tepelným šokem. Tento klon se vyznačuje vysokou životaschopností, několika genetickými markery a téměř 100% schopností partenogeneze.

Ke studiu embryonálního vývoje transgenních bourců byla použita nedávno získaná transgenní linie VTG1 (Zabelina *et al.* 2015a). VTG1 je monovoltinní partenogenetická linie exprimující červený fluorescenční protein (DsRed).

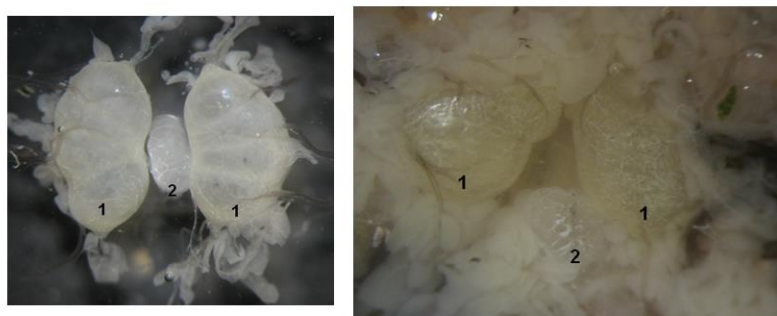
Všechny linie bource morušového byly chovány při 25 °C za vysoké vzdušné vlhkosti a krmeny umělou dietou založenou na listech morušovníku (dodavatel Agricultural Research Council – Research Unit for Agriculture and Sericulture, Padova, Itálie).

4.2. Transplantace vaječníků

Postup transplantace vaječníků dle Spiridonové *et al.* (1987) byl stejný, jako v mé bakalářské práci. K transplantaci byly používány housenky ve čtvrtém instaru, které byly před zákrokem narkotizovány ponořením na 20 min do vlažné vody. Nejprve byly extirpovány vaječnky dárců linie PK1. Z narkotizované housenky byla vystříh-

nuta dorzální část pátého abdominálního segmentu, která byla upevněna pomocí entomologických špendlíků v misce vylité parafinem a zalita fyziologickým roztokem. Vaječník byl opatrně vyjmut a uložen na 5 – 20 min v chladném fyziologickém roztoku.

Narkotizovaní příjemci linie K23 obou pohlaví byli jednotlivě nastříženi dorzálně mezi pátým a šestým abdominálním segmentem a do vzniklého otvoru byl mezi gonády vsunut jeden vaječník (Obr. 8) tak, aby nedošlo k poškození vlastních gonád. Rána byla osušena buničinou a ošetřena etanolem.



Obr. 8: Vložení vaječnicků dárce (2) mezi gonády příjemce (1). Vlevo varlata, vpravo vaječníky.

Po transplantaci vaječnicků byly housenky umístěny v čisté plastové nádobě při pokojové teplotě. Krmeny byly stejným způsobem jako dosud.

4.3. Indukce partenogeneze

Po vylíhnutí imág s transplantovanými vaječníky byla extirpována zralá vajíčka. V případě samců byl odstříhnut zadeček v místě připojení hrudi a vajíčka byla vytlačena na jemnou síťovinu. Síťovina s vajíčky byla napnuta na skleněnou nálevku a opatrným tlakem špičkou ukazováčku za současného splachování tenkým proudem vody byla vajíčka protlačena do sběrné kádinky. Vajíčka byla několikrát propláchnuta vodou a po jejich usazení ke dnu kádinky byla slita přebytečná voda s nečistotami a vajíčka byla přenesena na kousek bavlněné látky. Látka byla opět napnuta na nálevku a jemným tlakem bříška ukazováčku byla vajíčka promnuta, aby byl simulován průchod vejcovodem. Poté byla vajíčka přenesena na kus čisté látky a opatřena etiketou.

Odebírání implantátu u samic probíhalo pod binolupou. Zadeček byl podélně na ventrální straně nastříhnut a kutikula byla přichycena entomologickými špendlíky do

misky vylité parafinem. Implantát, který tvořil nepřichycený shluk uprostřed těla, byl přenesen na síťovinu a pročištěn stejným způsobem jako implantát u samců. Vlastní vaječníky samic byly uvolněny přestřížením terminálního filamentu a přeneseny také na síťovinu k pročištění.

Po oschnutí vajíček byly jednotlivé kousky tkaniny s etiketami zavázány nití a vzniklé pytlíčky byly vloženy do vodní lázně o teplotě 46 °C. Z pytlíčků byl opatrně vymačkán vzduch a poté byly ponechány ve vodní lázni 18 minut. Z vodní lázně byly dále přemístěny do studené vody (vyndané z lednice), kde zůstaly dalších 11 minut. Po tomto teplotním šoku byly jednotlivé pytlíčky uloženy na čistých Petriho miskách do termostatu o teplotě 15 °C. Vajíčka samic linie VTG1 byla ošetřena stejným způsobem.

Vajíčka samic VTG1, vajíčka z transplantovaných vaječníků a vlastní vajíčka samic K23, která se vyvíjela v přítomnosti implantátu, byla ve dvanácti hodinových intervalech odebírána z 15 °C a fixována. První odběr proběhl po dvanácti hodinách od aktivace partenogeneze, poslední ve dvaasedmdesáti hodinách.

4.4. Vajíčka standardně se rozmnožující linie

Vajíčka standardně se rozmnožující linie K23 byla získána za použití metodiky z práce Tamury *et al.* (1990). Po vylíhnutí imág byly utvořeny páry, které se 3 – 4 h pářily při teplotě 25 °C. Ještě spojený pár byl poté vložen do termostatu o teplotě 5 °C, tam byl ponechán přes noc. Ráno byl samec odstraněn a samice přendána do 25 °C, kde za tmy začala klást vajíčka. Každých 15 – 30 min od začátku kladení byla vajíčka odebírána a se zapsaným časem bez prodlení vkládána do 15 °C. Odtud byla vždy ve dvanácti hodinových intervalech sbírána a fixována jako vajíčka z implantátů. Některá vajíčka byla po oplození a vykladení uchovávána při 25 °C, odkud byla také ve dvanácti hodinových intervalech od vykladení sbírána a fixována.

4.5. Zpracování vajíček

Po sebrání vajíček následovalo odstranění chorionu, fixace embrya a odstranění vitelinní membrány dle práce You *et al.* (2013). Sebraná vajíčka byla umístěna do skleněných misek a zalita 30% KOH na dobu 6 minut. Poté byl roztok KOH odsán opatrně mikropipetou, aby nedošlo k poškození vajíček. Následně byla vajíčka zalita 2%

roztokem NaClO (50% roztok Sava), který působil 3 minuty. Po odsátí roztoku NaClO byla vajíčka zalita fyziologickým roztokem (komerční PBS = Phosphate Buffered Saline; pH 7,4). Vajíčka zbavená chorionu byla dále fixována v roztoku 2,5 ml PBS, 0,5 ml formaldehydu (38%) a 3 ml n-heptanu. Za pomoci mikropipety s ustříhnutou špičkou byla vajíčka přenesena do centrifugační zkumavky s připraveným roztokem. Zkumavky byly vloženy do kádinky, zajištěny lepicí páskou a umístěny do třepačky (50 min, 28 °C, 180 rpm). Po skončení třepání byla ze zkumavek postupně odsáta vrchní fáze a zbylý roztok s vajíčky byl promyt metanolem vychlazeným v mrazničce při teplotě -20 °C. Jemným třepáním byly uvolněny vitelinní membrány a přebytečný roztok byl odsán a vyměněn za čistý vychlazený metanol. Toto promytí vychlazeným metanolem bylo provedeno alespoň třikrát. Nakonec byla promytá vajíčka vložena do mikrozukumavky s čistým metanolem a uchovávána byla v mrazáku.

4.6. Barvení zárodků

Před samotným barvením bylo potřeba vajíčka zavodnit. Vajíčka byla přenesena do skleněných misek a pomocí mikropipety byl odsán metanol, ve kterém byly vzorky uchovávány v mrazáku. Do misek byl nalit 90% metanol a misky byly přemístěny na třepačku, kde se obsah volně promíchával 10 min. Po deseti minutách byl 90% metanol vyměněn za 70% metanol. Misky se opět nechaly 10 min promíchávat. Po 70% metanolu následoval 50% a 30% metanol, vždy s 10 minutami promíchávání. Nakonec byly misky zality roztokem PBS, 10 min ponechány na třepačce a roztok PBS byl vyměněn za čistý.

Byly vyzkoušeny tři následující způsoby barvení preparátů:

Propidium jodid (Sigma) – barvení DNA a RNA. Vlastní barvení začalo odsátím PBS z misek a zalitím vajíček roztokem propidium jodidu (40 µg/ml; Nagy *et al.* 1994). Misky byly umístěny v temnu na 15 min na třepačku. Poté byla všechna vajíčka třikrát promyta čistým PBS, vždy s 15 min promíchávání na třepačce. Obarvená vajíčka byla uchovávána ve tmě.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma) – barvení DNA. Z misek byl odsán PBS a vajíčka byla zalita roztokem DAPI (1 µg/ml). Misky byly umístěny v temnu

na 10 – 15 min na třepačku. Poté byla všechna vajíčka třikrát promyta destilovanou vodou. Obarvená vajíčka byla uchovávána ve tmě.

Imunohistochemická detekce – detekce mikrofilament. Vzorky byly zbaveny PBS a následně blokovány 10% normálním kozím sérem v PBS s přidavkem 0,5 – 1% Tritonu X-100 (PBS-T) po dobu 2 h při pokojové teplotě. Poté byly inkubovány s myší monoklonální protilátkou proti α -tubulinu (Developmental Studies Hybridoma Bank, 12G10 anti-alpha-tubulin) ředěnou 1:10 v blokovacím roztoku po dobu 2 dní v teplotě 4 °C. Vajíčka byla třikrát promyta roztokem PBS-T (po 10 minutách v pokojové teplotě). Následovala inkubace s kozí protilátkou proti myším imunoglobulinům G značenou fluoroforem Alexa Flour 649 (Invitrogen) ředěnou 1:200 v blokovacím roztoku přes noc při teplotě 4 °C. Vajíčka byla třikrát po 10 minutách promyta v PBS-T, poté 5 min v destilované vodě a byla dobarvena pomocí DAPI (viz výše).

4.7. Příprava preparátů

Na podložní sklíčko byly nalepeny ve třech vrstvách dvě podložky (Obr. 9; výrobce Herma, kat. č. 5898). Doprostřed každé podložky bylo kápnuto médium Vectashield (Vector Laboratories) a do něj opatrně přenesena nepoškozená vajíčka. Každá skupina podložek byla přikryta krycím sklem a volné prostory byly vyplněny opět médiem Vectashield. Nakonec byly hrany krycích skel přetřeny bezbarvým lakem.



Obr. 9: Schéma podložního skla s nalepenými podložkami.

Hotové preparáty byly skladovány v temnu a v chladu (lednice).

4.8. Skenování vajíček na konfokálním mikroskopu

Konfokální mikroskop je schopen snímat obraz pouze z vybrané optické roviny vzorku. Paprsky z mimoohniskových rovin jsou zachyceny bodovou clonkou (tzv.

pinhole). Poskládáním snímků z různých optických rovin, lze pomocí počítače vytvořit trojrozměrný obraz.

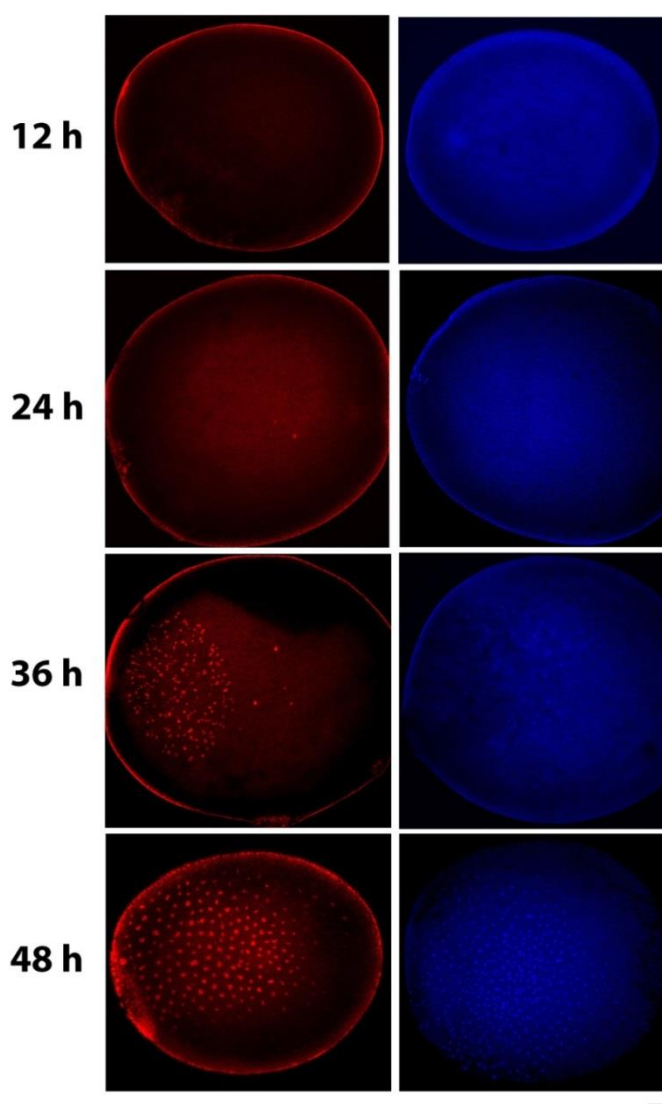
Vzorky vajíček byly skenovány na konfokálním mikroskopu (Olympus IX81) a výsledné skeny byly upraveny pomocí programů Imaris a Adobe Photoshop Elements.

U každého vzorku z každého času byla prohlédnuta všechna vajíčka v dostupných optických rovinách. Byl zaznamenán počet vajíček, poškozená vajíčka byla vyřazena ze statistiky. Subjektivně bylo vyhodnoceno stádium vývoje jednotlivých vajíček jednoho vzorku a nejčastěji se vyskytující stádium bylo vybráno jako reprezentativní pro následné skenování a použití ve výsledcích.

5. Výsledky

5.1. Výběr vhodné barvicí techniky

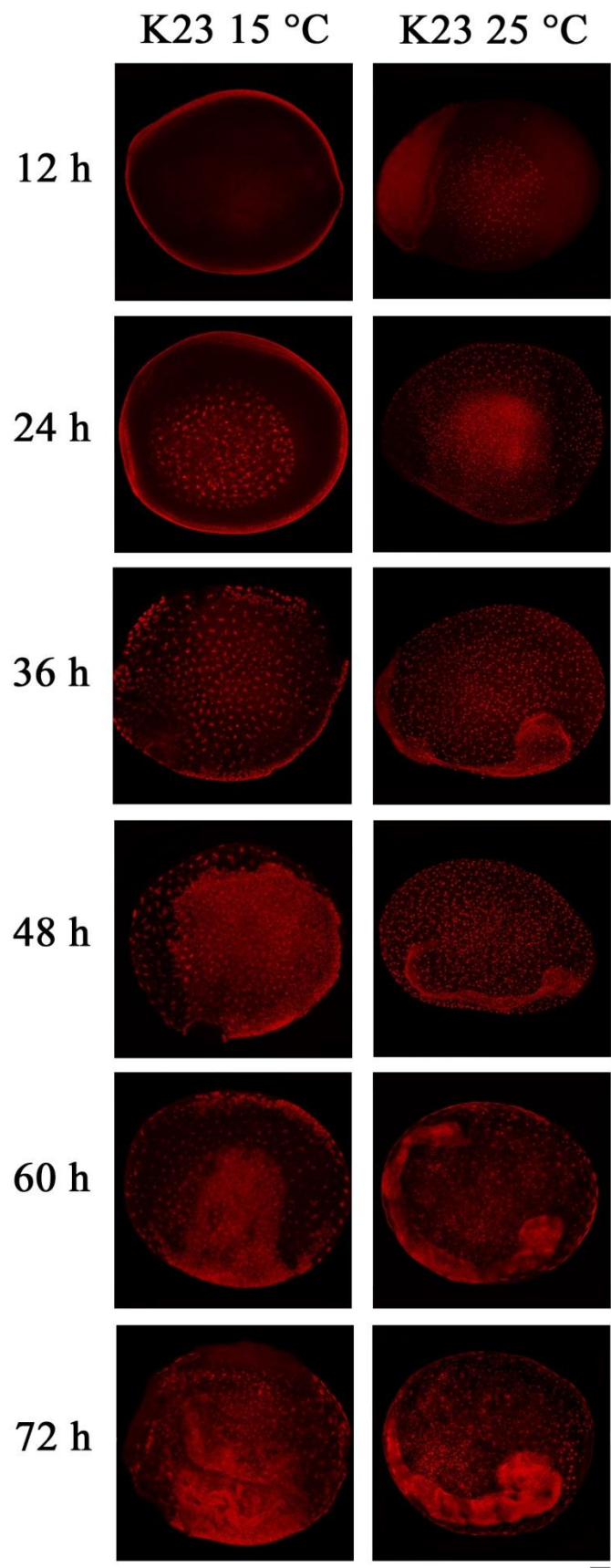
Na začátku práce byl zvolen vhodný způsob barvení vzorků pro následné skenování konfokálním mikroskopem. Na pravé straně obrázku (Obr. 10) je použito fluorescenční barvivo DAPI, na levé straně je použit propidium jodid. Dělicí se jádra jsou v tomto zvětšení daleko více patrná při použití propidium jodidu, proto jím byly obarveny všechny získané vzorky.



Obr. 10: Porovnání dvou barvicích technik u linie VTG1, vpravo DAPI, vlevo propidium jodid. Měřítko 100 μm .

5.2. Vliv teploty na normální průběh embryogeneze

Vajíčka, u nichž byla aktivována partenogeneze pomocí tepelného šoku, byla dle dříve vypracované metodiky uložena po tři dny v 15 °C (Astaurov 1940). Proto byla i kontrolní vajíčka standardně se rozmnožující linie inkubována v této teplotě. Pro srovnání vlivu teploty na rychlost vývoje byla některá vajíčka standardní linie K23 inkubována od vykladení při teplotě 25 °C (Obr. 11). Z obrázku je patrné, že zpočátku je vývoj v 25 °C asi o 12 h rychlejší než vývoj v 15 °C. Za 12 h vývoje při 25 °C zabírají dělicí se jádra přibližně ½ vajíčka a nedosahují až k zadnímu pólu. Při inkubaci v 15 °C je tohoto stupně rýhování dosaženo ne dříve, než za 24 h od naklazení. S přibývajícím časem je rozdíl mezi vajíčky inkubovanými v 25 a 15 °C ještě zřetelnější. Zatímco u vajíček v 25 °C se embryo tvoří už ve 36 h, u vajíček v 15 °C nelze embryo rozlišit ani v 72 h. Je patrná pouze tvorba zárodečného proužku, která začíná u vajíček K23 uchovávaných v 15 °C ve 48 h.

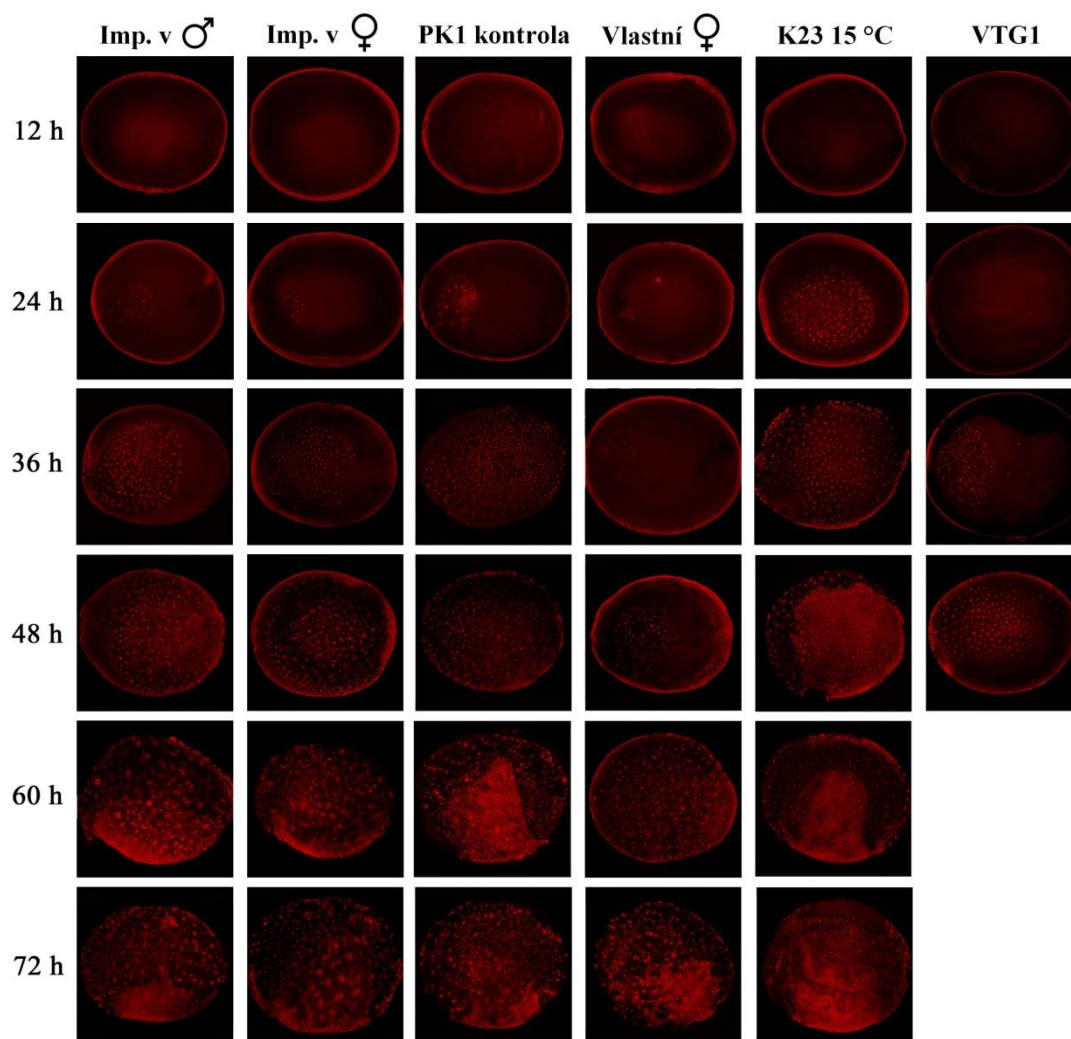


Obr. 11: Porovnání vývoje standardně se rozmnožující linie K23. Vajíčka se vyvíjela v 25 °C a v 15 °C. Měřítko 100 μm.

5.3. Vliv různých zákroků na rýhování v 15 °C

Celkové výsledky jsou shrnuty na následujícím obrázku (Obr. 12). V prvních dvou sloupcích jsou vajíčka PK1 získaná z vaječníků transplantovaných do housenek K23 a po extirpaci aktivovaná tepelným šokem. Pohlaví příjemce implantátu nemělo vliv na rychlost rýhování. Ve 12 h ještě nejsou patrná žádná rýhující se jádra. Ve 36 h je posteriorní pól stále bez jader. V 60 h se začíná tvořit zárodečný proužek, ale ani v 72 h nelze rozlišit embryo. Jako kontrola byla použita vajíčka linie PK1 ponechaná *in situ* a aktivovaná tepelným šokem. Vývoj těchto vajíček a vajíček z implantátů je srovnatelný. Vývoj partenogenetických vajíček PK1 a vajíček standardní linie K23 15 °C je obdobný. Ve 12 h po aktivaci partenogeneze, popř. oplození, je stav stejný, ale už za dalších 12 h se vývoj standardní linie zrychluje, avšak ani u linie K23 nelze rozlišit embryo v 72 h. Vlastní vajíčka samic K23, která se vyvíjela v přítomnosti implantátu, by měla získat částečnou schopnost partenogeneze (Zabelina a Klymenko 2008, Doroshenko a Klymenko 2010). V našich pokusech byl vývoj těchto vajíček nejpomalejší, zárodečný proužek se objevil až za 72 h. V posledním sloupci je transgenní partenogenetická linie VTG1 (Zabelina *et al.* 2015a). V době dokončení diplomové práce jsem ještě neměla k dispozici zbývající dva vzorky (v 60 a 72 h), ale pro následnou publikaci budou doplněny. Z prvních čtyř vzorků je patrné, že vývoj probíhá pomaleji než u partenogenetické linie PK1, se kterou by měl být srovnatelný.

V Tabulce 1 dále uvádím pravděpodobnost výskytu zobrazeného vývojového stádia ze všech vajíček daného vzorku (Tab. 1). Hodnocení vývojového stádia bylo subjektivní. Některá vajíčka byla během manipulace zničena a nebylo možné odhadnout jejich vývojové stádium, několika vajíčkům zůstala vitelinní membrána a také nebylo možné odhadnout vývojové stádium. Objevila se i vajíčka s nepodařenou aktivací partenogeneze, nejvíce patrný byl tento stav u vlastních vajíček K23 vyvíjejících se společně s implantátem.



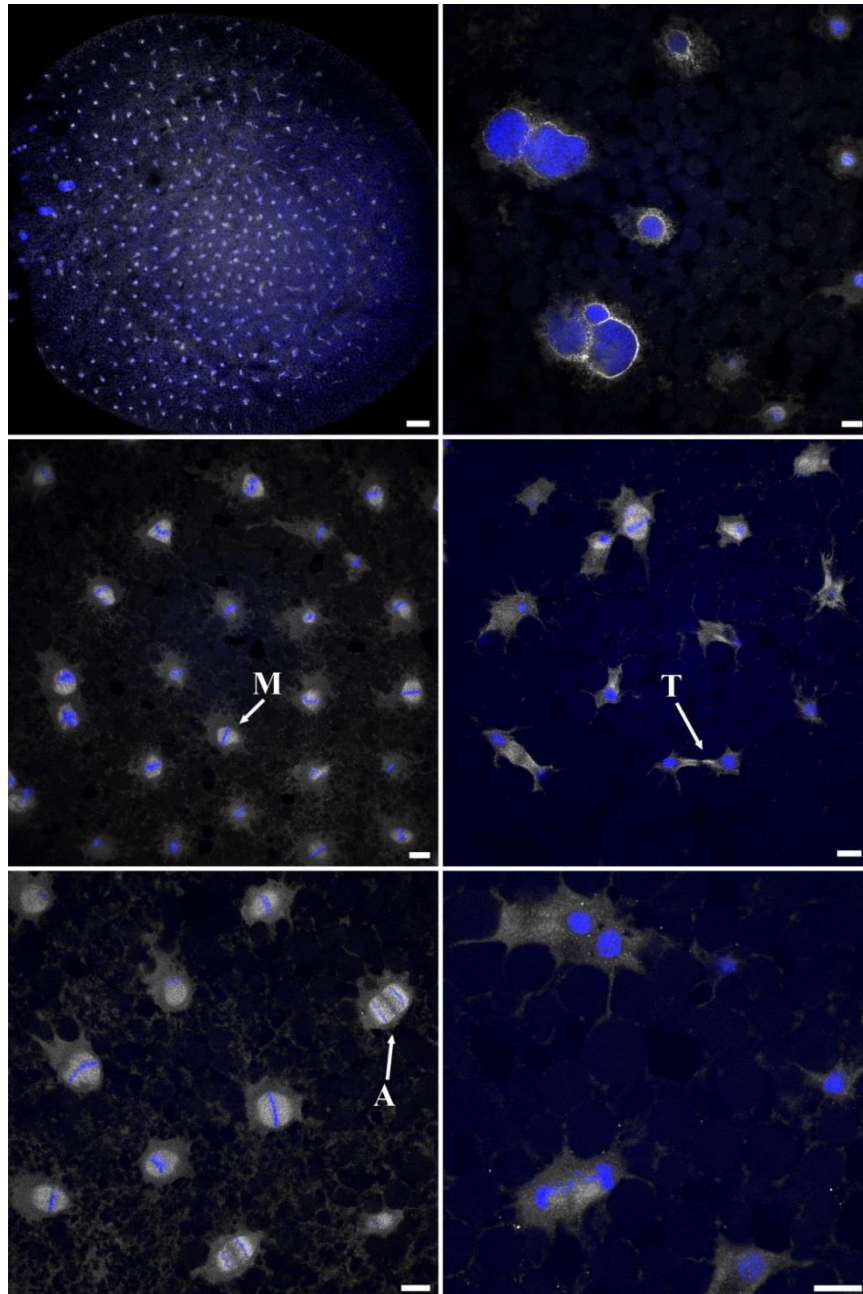
Obr. 12: Imp. v **M**: vajíčka linie PK1 v samčích housenkách K23 aktivované tepelným šokem; imp. v **F**: vajíčka linie PK1 v samičích housenkách K23 aktivované tepelným šokem; PK1 kontrola: vajíčka linie PK1 bez zásahu aktivovaná tepelným šokem; vlastní **F**: vlastní vajíčka samic K23, která se vyvíjela v přítomnosti implantátu, aktivovaná tepelným šokem; K23 15 °C: vajíčka po standardním oplození vyvíjející se v 15 °C; VTG1: vajíčka transgenní partenogenetické linie VTG1 aktivované tepelným šokem. Měřítka 100 μ m.

Tab. 1: Pravděpodobnost (%) výskytu zobrazeného vývojového stádia.

Čas sběru (h)	Imp. v m		Imp. v F		PK1 kontrola		Vlastní F		K23 v 15 °C	
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
12	100	16	100	8	100	12	86	7	91	11
24	100	14	100	8	100	16	43	28	42	12
36	73	15	67	9	60	10	43	46	80	10
48	63	16	100	9	91	11	62	29	81	27
60	100	2	89	9	100	14	80	10	75	12
72	89	9	100	16	100	10	73	15	86	21

5.4. Dělení jader

Na posledním doplňujícím obrázku (Obr. 13) bylo použito barvení fluorescenčním barvivem DAPI a imunohistochemickou detekcí mikrofilament. Jsou zde v detailu zobrazena velká jádra, pravděpodobně vzniklá polyploidizací. Dále lze pozorovat jednotlivá stádia mitózy. Jádra se nacházejí v různé fázi mitózy, dělení není synchronní.



Obr. 13: Detail jader v různém stádiu mitózy. Použito fluorescenční barvivo DAPI a protilátka proti α -tubulinu. (M) metafáze, (T) telofáze, (A) anafáze. Měřítka 100 μ m (celé vajíčko), 10 μ m (detaily).

6. Diskuze

Úspěšnost transgenozy závisí na správné volbě součástí konstruktů DNA, ale také na čase, kdy je konstrukt do vajíček injikován. Protože konstrukt neprojde přes plazmatické membrány, je nutné provést injekci před vytvořením buněčného blastodermu, tedy v 25 °C nejpozději do 12 h po vykladení (Tazima 1978). Tamura *et al.* (1990) zjistil, že pro injekci transgenů je vhodných prvních 8 h po naklazení vajíček, zatímco o 4 h později (po vytvoření blastodermu) jsou injekce neúčinné. Na základě těchto poznatků se nyní u standardních linií bource injikují při 25 °C konstrukty DNA 2 – 6 h po vykladení vajíček (např. Tamura *et al.* 1990, Uhlířová *et al.* 2002). Účinnost tohoto postupu je 20 – 60 % (Tamura *et al.* 2000 a 2007), zatímco účinnost injekcí do vajíček partenoklonu P14 byla nižší než 2 % (Zabelina *et al.* 2015a). Možnou příčinou je nevhodné načasování injekce konstruktů DNA do vajíčka, další překážky však nejsou vyloučeny.

V případě použití partenogenetické linie byl transgen injikován 12 h po aktivaci partenogeneze a inkubaci v 15 °C (Zabelina *et al.* 2015a). Z mé práce vyplývá, že v implantátech během prvních 12 h po aktivaci a inkubaci v 15 °C ještě nedochází k dělení jádra a injekce transgenů tedy není v tomto čase efektivní. Jako vhodnější se nabízí časový interval mezi 24 a 36 h po aktivaci partenogeneze a inkubaci v 15 °C.

Použití partenogenetické linie bource morušového pro transgenozu má tu výhodu, že jakmile je transgen úspěšně zabudován do genomu bource, aktivováním partenogeneze u neoplozených vajíček několika málo samic se získá početné potomstvo s naprosto identickým genomem. Následné generace budou vykazovat stejnou expresi vloženého genu i stejné morfologické a fyziologické vlastnosti. To je důležité při použití bource jako bioreaktoru pro výrobu proteinů použitelných v lékařství, kde je potřeba zajistit stejnou kvalitu a stejné množství požadovaného produktu.

Problémem zůstává, že pro úspěšnou transgenozu je důležité užití nediapauzních vajíček. U standardních linií lze použít bi- a polyvoltinní rasy, partenogenetické linie ale tvoří diapauzní vajíčka. Grenier *et al.* 2004 se pokusili vytvořit partenogenetickou polyvoltinní linii, ta ale zatím není použitelná pro transgenozu a její praktické využití si žádá další výzkum. Jedinou finančně dostupnou, ale pracnou možností je trans-

plantace vaječníků do samčích housenek, v nichž dozrávají nediapuzní vajíčka (Zabelina a Klymenko 2008).

Implantáty partenogenetických vaječníků do samčích a samičích housenek standardních linií se vyvíjely srovnatelně rychle a nebyl u nich patrný morfologický rozdíl mezi diapauzními vajíčky ze samic a nediapauzními vajíčky ze samců, což bylo potvrzeno i v pracích Sonoba *et al.* (1986) a Nagy *et al.* (1994). V obou pracích byl zkoumán standardně se rozmnožující mutant bource (*pnd*; pigmented, nondiapasing), jehož původní „divoká“ forma (wild type) produkuje diapauzní vajíčka a ta vstupují do diapauzy v pozdním stádiu gastrulace. Tyto výsledky vyžadují ověření nejen kvůli transgenozí, ale i z hlediska determinace, hormonálního řízení a průběhu embryonální diapauzy. Při porovnání vývoje vajíček z implantátů s vývojem vajíček dárcovské linie PK1 je patrné mírné opoždění ve vývoji vajíček z implantátů, které je pravděpodobně způsobeno manipulací s vaječníky a možnými rozdíly ve složení žloutku vytvářeného příjemcem.

Celkový pohled na raný embryonální vývoj bource (Obr. 12) potvrzuje dřívější studie, které se zabývaly interakcí implantovaného vaječníku a vlastních vaječnicků příjemce (Zabelina a Klymenko 2008, Doroshenko a Klymenko 2010). Dárcovské vaječníky partenogenetické linie ovlivňují vlastní vaječníky linie K23, která nemá schopnost partenogeneze. Zřejmě působí neznámé faktory odpovědné za indukci partenogeneze prostřednictvím hemolymfy. Vaječníky linie K23 díky interakci s vaječníky linie PK1 získávají částečnou schopnost partenogeneze. Vývoj byl ovšem pomalejší než u dárcovské linie PK1 a asi třetina vajíček obsažených ve vzorku se vůbec nevyvíjela.

Vývoj partenogenetické transgenní linie VTG1 byl zařazen jako srovnání s partenogenetickou linií PK1. Překvapivě byl vývoj VTG1 podle dostupných vzorků asi o 12 a více h pomalejší než u PK1. Exprese transgenu pravděpodobně vývoj zpomaluje, ale není pro budoucí embryo letální. Pro vysvětlení tohoto jevu by bylo potřebné provést další studie.

Kolem transgenoze je ještě řada problémů, které se budou průběžně řešit. Zatím je třeba spokojit se se stávající metodikou, jejíž použitelnost byla prakticky ověřena.

7. Závěr

I přes počáteční neúspěchy při chovu standardní a partenogenetické linie způsobené infekcemi, byla zvládnuta metodika chovu bourců na umělé dietě a indukce partenogeneze za použití tepelného šoku. Transplantací vaječníků partenogenetické linie do housenek standardní linie byla získána plně vyvinutá vajíčka a současně byla získána i vlastní vajíčka samic standardní linie vyvíjející se v přítomnosti implantátu. Pro úspěšnější zvládnutí této metodiky by byla potřebná větší praxe.

U získaných vajíček bylo provedeno odstranění chorionu, fixace a odstranění viteliniční membrány. K obarvení dělicích se jader pro následné pozorování v konfokálním mikroskopu se osvědčil roztok propidium jodidu.

Byla vyzkoušena metodika hodnocení stupně embryonálního vývoje, bude však nutné její dopracování.

Embryonální vývoj standardní linie je při inkubaci vajíček v 25 °C asi dvakrát rychlejší než při inkubaci v 15 °C.

Čas vhodný pro injekci transgenů do partenogenetického nediapauzního vajíčka byl odhadnut na 24 h po aktivaci partenogeneze a inkubaci v 15 °C.

Vlastní vaječnický nepartenogenetické linie K23 mohou získat od implantátu partenogenetické linie schopnost partenogeneze.

Embryonální vývoj partenogenetické transgenní linie VTG1 je pomalejší ve srovnání s partenogenetickou linií PK1. Příčiny zatím nejsou jasné.

8. Literatura

- Astaurov B. L. (1940). Artificial parthenogenesis in the silkworm (Moskva-Leningrad: USSR Academy of Science).
- Astaurov B. L. (1973). Selection for high ability for artificial thermic parthenogenesis and obtaining clones of the silkworm advanced in this direction. *Genetika*. 9, 93-106.
- Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Helling R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *PNAS USA*. 70(11), 3240–3244.
- Doroshenko K. A., Klymenko V. V. (2010). Cloning *Bombyx mori* L. female genotypes by implantation of donor's ovaries into parthenoclonal females. *Séricologia*. 50(2), 187-197.
- Grenier AM., Rocha M. Da, Jalabert A., Royer C., Mauchamp B., Chavancy G. (2004). Artificial parthenogenesis and control of voltinism to manage transgenic populations in *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*. 50(8), 751-760. DOI 10.1016/j.jinsphys.2004.06.002.
- Horn D. J. (1978). *Biology of Insects*. Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company.
- Jacobs C. G. C., Rezende G. L., Lamers G. E. M., van der Zee M. (2013). The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proceedings of the Royal Society B*. 280(1764). DOI: 10.1098/rspb.2013.1082.
- Keino H., Takesue S. (1982). Scanning Electron microscopic Study on the Early Development of Silkworm Eggs (*Bombyx mori* L.). *Development: Growth and Differentiation*. 24(3), 287-294. DOI: 10.1111/j.1440-169X.1982.00287.x.
- Kim YG., Cha J., Chandrasegaren S. (1996). Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. *PNAS USA*. 93(3), 1156-1160.
- Klymenko V. V. (2001). Parthenogenesis and Cloning in the Silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and Prospects. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. 70(3), 155-165. DOI 10.11416/jibs2001.70.155.
- Kogure M. (1933). The Influence Of Light And Temperature On Certain Characters Of The Silkworm, *Bombyx Mori*. *Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University*. 4(1), 1-93.

- Ma S., Zhang S., Wang F., Liu Y., Liu Y., Xu H., Liu C., Lin Y., Zhao P., Xia Q. (2012). Highly Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. *PLoS ONE*. 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0045035.
- Muñoz-López M., García-Pérez J. L. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*. 11(2), 115-128. DOI: 10.2174/138920210790886871.
- Nagaraju J. G., Klimenko V., Couble P. (2001). The Silkworm, *Bombyx mori*: a model genetic system. In: Reeve E. C. R. (ed.). *Encyclopedia of genetics*. Chicago: Fitzroy Dearborn Publishers, s. 219-239. ISBN 1 884964 36 6.
- Nagy L., Riddiford L., Kiguchi K. (1994). Morphogenesis in the Early Embryo of the Lepidopteran *Bombyx mori*. *Developmental Biology*. 165(1), 137-151. DOI: 10.1006/dbio.1994.1241.
- Nation J. L. (2015). *Insect physiology and biochemistry*. Third edition. New York: CRC Press.
- Ohtsuki Y., Murakami A. (1968). Nuclear Division in the Early Embryonic Development of the Silkworm, *Bombyx mori* L.. *Zoological Magazine (Tokyo)*. 77, 383-387.
- Rasmussen S. W. (1976). The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Chromosoma*. 54(3), 245–293. DOI: 10.1007/BF00293453.
- Sajwan S., Takasu Y., Tamura T., Uchino K., Sezutsu H., Zurovec M. (2013). Efficient disruption of endogenous *Bombyx* gene by TAL effector nucleases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43(1), 17-23. DOI: 10.1016/j.ibmb.2012.10.011.
- Sonobe H., Maotani K., Nakajima H. (1986). Studies on embryonic diapause in the *pnd* mutant of the silkworm, *Bombyx mori*: Genetic control of embryogenesis. *Journal of Insect Physiology*. 32(3), 215-220. DOI: 10.1016/0022-1910(86)90061-2.
- Spiridonova T. L., Shchegelskaya E. A., Klymenko V. V. (1987). Gonad transplantation in the larvae of *Lepidoptera*. *Izvestija Akademii Nauk Moldavskoj SSR*. 2, 69-71.
- Strunnikov V. (1971). Obtaining silkworm hybrids whose ova can be separated into white (female) and dark (male). *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 201, 1223-1226.
- Takasu Y., Kobayashi I., Beumer K., Uchino K., Sezutsu H., Sajwan S., Carroll D., Tamura T., Zurovec M. (2010). Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger

nuclease mRNA injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40(10), 759-765. DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.07.012.

Tamura T., Kuwabara N., Uchino K., Kobayashi I., Kanda T. (2007). An improved DNA injection method for silkworm eggs drastically increases the efficiency of producing transgenic silkworms. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. 76(3), 155-159.

Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Kômoto N., Thomas JL., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme JC., Couble P. (2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*. 18(1), 81-84. DOI: 10.1038/71978.

Tamura T., Kanda T., Takiya S., Okano K., Maekawa H. (1990). Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryos of the domesticated silkworm *Bombyx mori*. *The Japanese Journal of Genetics*. 65(6), 401-410.

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

Uhlířová M., Asahina M., Riddiford LM., Jindra M. (2002). Heat-inducible transgenic expression in the silkworm *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*. 212(3), 145-151. DOI: 10.1007/s00427-002-0221-8.

Wang Y., Li Z., Xu J., Zeng B., Ling L., You L., Chen Y., Huang Y., Tan A. (2013). The CRISPR/Cas System mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Research*. 23, 1414–1416. DOI: 10.1038/cr.2013.146.

You Z., Sun C., Chen L., Yao Q., Chen K. (2013). A novel method of silkworm embryo preparation for immunohistochemistry. *Biotechnology Letters*. 35(8), 1209-1214. DOI: 10.1007/s10529-013-1202-x.

Zabelina V. Y., Klymenko V. V. (2008). Ovary Transplantation in the Silkworm *Bombyx mori* L.: Parthenocloning by Eggs Produced in Male Recipient. *Séricologia*. 48(2), 123-128.

Zabelina V., Klymenko V., Tamura T., Doroshenko K., Liang H., Sezutsu H., Sehnal F. (2015b). Genome engineering and parthenocloning in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biosciences*. 40(3), 645-655. DOI: 10.1007/s12038-015-9548-y.

Zabelina V., Uchino K., Mochida Y., Yonemura N., Klymenko V., Sezutsu H., Tamura T., Sehnal F. (2015a). Construction and long term preservation of clonal transgenic silkworms using a parthenogenetic strain. *Journal of Insect Physiology*. 81, 28-35. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2015.06.011.