

---

TEZA DE DOCTORAT

# **Evaluarea potențialului unor rase din specia *Bombyx mori* în perspectiva obținerii larvelor transgenice utilizate în sisteme de creștere de tip Farma-Farming**

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

---

Doctorand **Gabriela-Maria Baci** (Căs. Negrea-Baci)

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Daniel Severus Dezmirean**

---



## INTRODUCERE

Viermele de mătase din specia *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) reprezintă una din cele mai importante insecte din punct de vedere economic la nivel global. Această insectă este recunoscută pentru rolul său esențial în producția de mătase, reprezentând un pilon al industriei textile. Potențialul său în ariile biologice este exploatat masiv începând cu anul 2004, când a fost publicată întreaga sa secvență genomică (Mita et al., 2004; Moise et al., 2020). Aprofundarea din punct de vedere genetic a fiecărei specii reprezintă punctul de plecare în vederea ameliorării organismelor în ceea ce privește producția, atât din punct de vedere calitativ, cât și cantitativ (Pusta, 2018), în cazul de față, producția mătăsii.

Printre cele mai importante contribuții ale *B. mori* în domeniile științifice se evidențiază utilizările sale ca organism model și bioreactor. În ceea ce privește produsele derivate din creșterea viermilor de mătase, amintim fibroina și sericina, cele două componente majore ale firului de mătase. Din cele două proteine, fibroina prezintă o gamă largă de proprietăți cu un impact semnificativ asupra domeniului biotehnologic, cele mai importante fiind biodegradabilitatea, biocompatibilitatea și rezistența mecanică robustă. Din punct de vedere molecular, fibroina constă în două lanțuri: lanțul greu al fibroinei (*FIBH*) și lanțul ușor al fibroinei (*Fib-I*) (Matei et al., 1997; Mărghitaș et al., 2003).

În contextul Farma-Farming, ramura sericulturii și aria biologiei moleculare, reprezintă principalele componente implicate. Coroborarea celor două domenii reprezintă o abordare care are ca finalitate optimizarea procesului de obținere al compușilor esențiali pentru industria farmaceutică și pentru domeniul medical (Scholar et al., 2022). Consolidarea cunoștințelor asupra geneticii unui organism reprezintă fundamentul care stă la baza aplicării tehnicilor de inginerie genetică pentru editarea genomică (Coșier, 2007).

În prezenta teză, punctul de plecare a fost reprezentat de aplicarea tehnicii RAPD în vederea confirmării variației genetice între rasele și hibridii din specia *B. mori*. Rezultatele analizei menționate au facilitat alegerea a trei rase, respectiv Băneasa 1 (B1), Galben de Băneasa (GB) și JH3, pentru care au fost determinate benzi specifice, permițând identificarea acestora, dar evidențiind totodată variabilitatea genetică. În continuare, au fost analizate cele trei rase de viermi de mătase din punctul de vedere al caracteristicilor biologice, tehnologice și economice, conturând o abordare holistică asupra ameliorării și optimizării producției de mătase, care este ulterior utilizată atât în industria textilă, cât și în domenii precum medicina sau industria farmaceutică.

Atunci când vorbim despre obținerea proteinelor recombinante sau extracția fibroinei în vederea dezvoltării biomaterialelor, este esențială etapa de identificare a raselor superioare în ceea ce privește randamentul de sinteză al mătăsii. În această direcție, pilonul cercetărilor este reprezentat de evaluarea genelor implicate în sinteza mătăsii, respectiv *FIBH* și *Fib-I*. În prezenta cercetare a fost efectuată analiza secvenței genei *Fib-I*, mai exact a exonului 3, împreună cu secvența intronică aferentă din amonte. Această abordare reprezintă o strategie optimă în vederea evaluării exhaustive asupra rolului genei țintă în producția de mătase și identificarea diversității secvenței între rasele țintă. În urma identificării mutațiilor în comparație cu genomul de referință, a fost utilizată baza de date SilkBase și instrumentul de mapare CHIP-seq, pentru a evalua în detaliu impactul mutațiilor determinate în secvența *Fib-I*,

mai exact în secvențele de legare ale proteinei BmHP1a, aparținând celor trei rase *B. mori*, asupra potențialului de legare al proteinei menționate. Această proteină exercită un rol crucial în reglarea expresiei genice.

În continuare, a fost analizat profilul de expresie al genelor implicate în sinteza fibroinei, care prezintă o configurație distinctă în funcție de etapa de dezvoltare larvară. Mai mult de atât, variabilitatea acestor modele de expresie genică între rase distincte din specia *B. mori* poate servi drept indicator al diversității genetice, facilitând identificarea raselor și hibridilor.

Cercetările din această direcție, cu privire la profilul de expresie și mecanismul de reglare al celor două gene, asigură fundamentul procesului de îmbunătățire a caracteristicilor fibrei de mătase prin tehnici de inginerie genetică. După o evaluare exhaustivă a genelor implicate în sinteza fibroinei și identificarea variabilității în vederea realizării unei secvențe ghid care servește procesului de editare genică, primul pas a constat în optimizarea protocolului de microinjecție. Această tehnică este vitală pentru livrarea eficientă a constructului transgenic în larvele speciei *B. mori*. Optimizarea acestei metode este esențială pentru a crește eficiența și rata de succes a experimentelor, permițând inserția precisă a materialului genetic exogen în secvența genomică țintă a viermilor de mătase.

Prezenta teză de doctorat implică două părți distincte, respectiv „Stadiul actual al cunoașterii” și „Contribuția personală”. Prima parte cuprinde două capitole: „Cap. 1. Impactul sericiculturii în domeniile științelor vieții” și „Cap. 2. Farma-Farming: Concept și aplicabilitate”. A doua parte a tezei constă în opt capitole distincte, respectiv „Cap. 3. Obiectivele urmărite”, „Cap. 4. Analiză preliminară privind variația genetică dintre diferite rase din specia *Bombyx mori*”, „Cap. 5. Analiza comparativă a parametrilor biologici și economici la trei rase distincte de viermi de mătase”, „Cap. 6. Identificarea particularităților la nivelul genei *Fib-1* la trei rase din specia *Bombyx mori*”, „Cap. 7. Identificarea profilului de expresie al genelor implicate în sinteza fibroinei”, „Cap. 8. Optimizarea protocolului de microinjecție în vederea obținerii larvelor transgenice utilizate în sisteme de creștere Farma-Farming”, „Cap. 9. Concluzii și recomandări”, „Cap. 10. Originalitatea tezei”. În cadrul acestor capitole se regăsesc 22 de tabele și 31 de figuri.

## **1. Impactul sericiculturii în domeniile științelor vieții**

### **1.1. Sericicultura: O perspectivă generală**

Domesticirea uneia dintre cele mai importante insecte din punct de vedere economic, și anume viermele de mătase (*Bombyx mori*), datează de peste 5000 de ani. *B. mori* reprezintă o insectă oligofagă, cu metamorfoză completă. Principala sursă de hrană a viermelui de mătase din specia *B. mori* este reprezentată de frunzele de dud, o preferință nutrițională care are un impact direct asupra parametrilor săi biologici și economici (Mărghitaș, 1995; Pașca, 2004; Montali et al., 2022).

Reprezentând o insectă cu un impact semnificativ asupra sectorului economic, au fost descrise peste 4000 de rase și hibridi de viermi de mătase (Matei et al., 2005). În ceea ce privește genetica speciei *B. mori*, genomul acestei specii a fost complet secvențiat (Mita et al., 2004), fapt care a dezvăluit numeroase informații cu privire la evoluția viermelui de mătase, biologia sa, și a oferit de asemenea o privire clară asupra producției de mătase. Genomul speciei *B. mori*

Evaluarea potențialului unor rase din specia *Bombyx mori* în perspectiva obținerii larvelor transgenice utilizate în sisteme de creștere de tip Farma-Farming

---

cuprinde aproximativ 432 de milioane de pb, incluzând un număr de aproximativ 14.623 de gene (Mita et al., 2004; Dezmirean et al., 2010).

Principalul produs al sericiculturii este mătasea, care joacă un rol esențial ca materie primă în industria textilă. În afară de produsul principal, în urma practicării sericiculturii, se obține, de asemenea, un lanț de produse secundare la scară largă, cu un spectru întins de aplicații (Baci et al., 2022).

## **1.2. Produse secundare sericicole**

### **1.2.1. Fibroina**

Mătasea reprezintă unul dintre cei mai apreciați polimeri naturali, alături de celuloză și chitosan. Numeroase insecte produc acest biopolimer, însă, cea mai explorată este mătasea produsă de larvele din specia *B. mori*. Au fost expuse și alte caracteristici deosebite ale mătăsii, mai exact, biocompatibilitatea, versatilitatea și biodegradabilitatea. Pe baza acestor caracteristici, mătasea a fost folosită ca fir de sutură chirurgicală încă din antichitate. Proteomul mătăsii conține două proteine cheie, și anume fibroina și sericina (Baci et al., 2023).

Din punct de vedere molecular, fibroina implică două lanțuri: lanțul greu al fibroinei (FIBH) și lanțul ușor al fibroinei (Fib-I). Între cele două lanțuri există o punte disulfidică prin care cele două proteine sunt conectate. În afară de *FIBH* și *Fib-I*, fibroina mai include încă o proteină, și anume fibrohexamerina (P25). Lanțul *FIBH* conține mai multe secvențe repetitive care sunt implicate în dezvoltarea structurilor antiparalele. Pe de altă parte, lanțul *Fib-I* conține secvențe nerepetitive care sunt responsabile de hidrofilicitatea lanțului și de elasticitatea fibroinei. Raportul molar dintre cele trei proteine este de 6:6:1 (Lujerdean et al., 2022).

### **1.2.2. Sericina**

Chiar dacă fibroina captează atenția comunității științifice, iar sericina este îndepărtată prin anumite metode termochimice, recent au fost descrise studii care evidențiază utilizări variate ale sericinei. Cercetările respective subliniază potențialul acestei proteine pentru diferite aplicații. De exemplu, au fost publicate anumite studii în care au fost prezentate efectele terapeutice ale sericinei, incluzând efectul antiinflamator și antioxidant (Jian & Huan, 2024).

### **1.2.3. Dudul**

Dintre toate plantele terapeutice utilizate în scop terapeutic, una dintre cele mai bogate plante în componente bioactive este dudul. Un spectru larg de studii recente a evidențiat efectele benefice ale diferitelor părți ale dudului asupra sănătății umane. Este bine documentat faptul că această plantă prezintă efecte terapeutice specifice, incluzând fructele, frunzele sau rădăcinile sale. În ceea ce privește compoziția dudului, aceasta include un conținut considerabil de carbohidrați, proteine, dar și lipide, vitamine, minerale sau fibre (Pașca, 2004; Baci et al., 2023).

### **1.2.4. Crisalida**

Crisalida speciei *B. mori* conține o proporție semnificativă de substanțe nutritive, incluzând un conținut ridicat de proteine și grăsimi, de asemenea componența sa include și

minerale, vitamine sau compuși polifenolici. Proteinele reprezintă un procent de 55.6% din substanța uscată a pupei, fiind cea mai abundentă categorie de compuși. Ingredientele active din crisalidele viermilor de mătase prezintă o gamă largă de activități farmacologice, prezentând efecte terapeutice semnificative împotriva unor afecțiuni țintă (Hăbeanu et al., 2023).

### 1.3. *Bombyx mori* ca organism model

*B. mori* joacă un rol crucial în domeniile științelor vieții, fiind unul dintre cele mai utilizate organisme model datorită caracteristicilor sale unice. Această insectă prezintă un ciclu de viață scurt, stadiul larvar având o durată de 25-30 de zile. Un alt avantaj important, este faptul că produce un număr extins de descendenți. Mai mult de atât, nivelul de atenție primit ca organism experimental model a crescut semnificativ datorită faptului că întreaga secvența genomică a fost publicată (Matsumoto et al., 2021).

## 2. Farma-Farming: concept și aplicabilitate

Conceptul de Farma-Farming implică o abordare holistică, inovatoare, coroborând domeniile zootehniei și agriculturii cu aria industriei farmaceutice. Acest concept promovează valorificarea animalelor sau plantelor, la potențial maxim prin utilizarea integrală a acestora. Farma-Farming include de asemenea optimizarea practicilor din cele două domenii în vederea maximizării randamentului de obținere al produselor secundare de interes farmaceutic, urmărind totodată minimizarea impactului asupra mediului (Abiri et al., 2016).

### 2.1. Transgeneza la *Bombyx mori* în contextul Farma-Farming

Primul experiment care a vizat realizarea transgenezei la viermii de mătase a fost raportat de Maeda și colab. (1985). Autorii au folosit pentru prima dată virusul poliedrozei nucleare (BmNPV) ca sistem de expresie. După exprimarea proteinei recombinante, respectiv a interferonului  $\alpha$ -uman și secreția sa în hemolimfă, a fost observat faptul că proteina exogenă este degradată de tiol proteaze (Maeda et al., 1985).

Procesul de obținere al proteinelor recombinante de interes prin utilizarea viermilor de mătase transgenici ca platformă biotehnologică, are la bază sistemul de sinteză al mătăsii, implicând glanda sericigenă. În acest proces sunt implicate genele responsabile de sinteza fibroinei și sericinei. Până în prezent, au fost descrise multiple sisteme de expresie care au la bază sistemul de sinteză al mătăsii, fiecare dintre acestea prezentând atât avantaje, cât și dezavantaje. Alegerea sistemului de expresie se realizează în funcție de proteina țintă și reprezintă cel mai important pas pentru producerea de proteine recombinante (Baci et al., 2022).

Unul din cele mai importante progrese pentru domeniile de cercetare a fost dezvoltarea diferitelor instrumente de editare genomică. Prin utilizarea unor tehnici specifice de editare a materialului genetic, ADN-ul genomic aparținând unui organism viu poate fi supus unor modificări ghidate, cum ar fi deleții, inserții sau substituiri de secvențe (Martin et al., 2024). În ultimii ani au fost descrise numeroase astfel de instrumente în domeniul ingineriei genetice, iar printre acestea, există trei tehnologii proeminente, și anume cele care se bazează pe nucleaze

Evaluarea potențialului unor rase din specia *Bombyx mori* în perspectiva obținerii larvelor transgenice utilizate în sisteme de creștere de tip Farma-Farming programabile (de exemplu, TALEN), zinc-finger nucleaza (ZFN) și nucleazele asociate cu repetiții palindromice scurte interspațiate (CRISPR-Cas).

Proteinele sunt molecule complexe care prezintă o gamă largă de aplicații în diverse domenii, jucând un rol esențial în industria alimentară, chimică, textilă, agricolă și cosmetică. În ultimii ani, pentru a răspunde cererii ridicate de proteine cu aplicabilitate în domeniul farmaceutic, comunitatea științifică s-a concentrat asupra dezvoltării unor platforme fezabile pentru obținerea de proteine recombinante. În acest sens, cercetările descrise în literatura de specialitate au arătat că domeniul biotehnologiei aplicat în entomologie prezintă cele mai promițătoare rezultate. În această direcție, *B. mori* prezintă un mare potențial ca bioreactor pentru producerea de proteine țintă, datorită faptului că prezintă anumite avantaje (Tatemastu, 2012).

### 3. Obiectivele urmărite

Obiectivele stabilite în cadrul prezentei teze marchează stimularea progresului domeniului sericicol oferind un context asupra aplicării tehnologiilor inovative în vederea exploatarea viermilor de mătase în domeniile științelor vieții. Aceste obiective reprezintă punctul de plecare pentru cercetările viitoare care urmăresc editarea genomică a viermilor de mătase în vederea obținerii proteinelor recombinante sau a fibrelor de mătase cu proprietăți superioare.

În această teză s-au avut în vedere cinci obiective principale, respectiv „3.1. Evaluarea variației genetice dintre diferite rase din specia *Bombyx mori*”, „3.2. Identificarea particularităților economice și biologice la trei rase distincte de viermi de mătase” „3.3. Identificarea particularităților la nivelul genei *Fib-1* la trei rase din specia *Bombyx mori*”, „3.4. Identificarea profilului de expresie al genelor implicate în sinteza fibroinei”, „3.5. Optimizarea protocolului de microinjecție în vederea obținerii larvelor transgenice utilizate în sisteme de creștere Farma-Farming”.

### 4. Analiză preliminară privind variația genetică dintre diferite rase din specia *Bombyx mori*

În vederea atingerii primului obiectiv enunțat în cadrul aceste tezei de doctorat, a fost desfășurat primul studiu prin care s-a urmărit identificarea variațiilor genetice între 14 rase și hibridi din specia *B. mori*. Au fost utilizați markerii moleculari de tip RAPD descriși de Bajwa et al., (2017), aceștia fiind asociați cu productivitatea superioară în ceea ce privește producția de mătase. Utilizarea markerilor RAPD în cercetarea genetică aplicată în sericicultură deschide

calea spre dezvoltarea de strategii de îmbunătățire genetică mai precise și mai eficiente (Bajwa et al., 2017).

În cadrul acestui studiu au fost analizați cinci markeri de tip RAPD, în vederea identificării polimorfismelor ADN și evaluarea variației genetice între rasele și hibridii țintă din specia *B. mori*. Din totalul de cinci markeri analizați, trei au condus la obținerea unor benzi vizibile în baza amplificării ADN, respectiv Ga-12, CT-9 și Ca-9. Amplificarea produșilor PCR a condus la

obținerea unui număr variabil de benzi. Prin utilizarea primerilor menționați s-a obținut un total de 29 de benzi, indicând un polimorfism de 27.14%. Utilizând markerul genetic GA-12, s-a constatat un nivel de variație genetică de 21.42%, iar cel mai înalt grad de polimorfism a fost identificat în urma utilizării markerului CA-9, respectiv 60%. În contrast, utilizarea markerului CT-9 nu a relevat prezența secvențelor variabile. Benzi specifice au fost, de asemenea obținute, iar în urma identificării acestora, am selectat două rase în vederea derulării experimentelor ulterioare. O altă rasă a fost selectată pentru continuarea experimentelor în baza faptului că s-a confirmat amplificarea benzilor în cazul fiecărui marker, respectiv rasa B1. Pentru rasa JH3, au fost identificate caracteristici specifice la doi markeri genetici, GA-12 și CA-9. Markerul GA-12 a prezentat două benzi, dintre care una specifică rasei JH3, iar cealaltă comună cu o altă rasă. Pentru rasa GB, ambii markeri, GA-12 și CA-9, au produs amplificări, cu observația că GA-12 a rezultat într-o bandă specifică, în timp ce CA-9 a generat o secvență de aceeași dimensiune, însă asociată și cu o altă rasă. De asemenea, rasa B1 a fost inclusă în studiu, evidențiind benzi pentru toți cei trei markeri RAPD folosiți: GA-12, CT-9 și CA-9, fără a produce însă benzi specifice.

## 5. Analiza comparativă a parametrilor biologici și economici la trei rase distincte de viermi de mătase

Al doilea studiu al prezentei cercetării a presupus evaluarea raselor de viermi de mătase din punctul de vedere al caracteristicilor biologice, tehnologice și economice. Prin coroborarea acestui studiu cu identificarea variabilității genetice prin tehnici de biologie moleculară, este conturată o abordare holistică asupra ameliorării și optimizării producției de mătase. Analiza variabilității în toate dimensiunile sale, biologică, economică, și genetică, reprezintă un pilon în realizarea unei producții de mătase care răspunde cerințelor industriei în termeni de calitate.

În cadrul acestei cercetări am evaluat parametrii biologici și economici la trei rase de viermi de mătase (*B. mori*), respectiv B1 și GB, rase autohtone românești, și JH3, rasă cu origine japoneză. Au fost selectați în mod aleatoriu 10 indivizi din fiecare rasă și a fost determinată o serie de parametri precum: perioada de incubație a ouălor (zile), lungimea larvelor (mm), greutatea larvelor (g) și durata stadiului larvar (zile). În ultima etapă a stadiului larvar a fost evaluată greutatea glandelor sericigene (g). După formarea gogoșilor de mătase, a fost analizată o altă serie de măsurători, mai exact a fost determinată lungimea axei transversale a gogoșii de mătase (mm), lungimea axei longitudinale a gogoșii (mm), greutatea crisalidei (g), greutatea gogoșii (g), numărul ouălor depuse (nr.)

Parametrii determinați au fost supuși unei analize statistice. Cu scopul de a ajusta analizele statistice în funcție de distribuția datelor, a fost determinată normalitatea acestora prin intermediul unui set de teste, precum testul Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk. Totodată, s-au utilizat grafice sub formă de histograme și diagrame cuantilă-cuantilă (Q-Q) în asociere cu testul de normalitate. Rezultatele obținute au indicat faptul că datele corespunzătoare majorității măsurătorilor prezintă o distribuție normală, ceea ce a justificat alegerea de a efectua teste statistice parametrice. În cazul a trei dintre parametrii măsurați nu s-au înregistrat deosebiri semnificative din punct de vedere statistic între rasele evaluate în acest studiu, mai exact "Lungimea axei transversale a gogoșii", "Greutatea crisalidei" și "Greutatea gogoșii".

## 6. Identificarea particularităților la nivelul genei *Fib-1* la trei rase din specia *Bombyx mori*

Acest studiu s-a focusat pe identificarea variabilității secvențelor genelor implicate în sinteza fibrelor de mătase, reprezentând direcția cu cel mai mare potențial în vederea îmbunătățirii nu doar a calității firului de mătase, dar și a cantității. Utilizând genomul de referință, al speciei *B. mori*, rasa p50T, disponibil pe NCBI, s-a realizat designul primerilor cu ajutorul secvențelor de referință pentru cromozomul 14 (NC\_051371.1) și cromozomul 25 (NC\_051382.1). Pe parcursul procesului de elaborare a designului *in silico*, au fost consultate, de asemenea, baze de date specializate pentru specia *B. mori*, cum ar fi SilkBase. În vederea elaborării primerilor s-a utilizat un ansamblu de analize bioinformatică prin intermediul utilizării programelor online – BLAST, Primer 3, și sistemul de operare Ubuntu Linux 20.04. Examinarea specificității primerilor obținuți a fost realizată prin intermediul instrumentului BLAST pe platforma NCBI.

Au fost supuși secvențierii ampliconii rezultați în urma reacției PCR, mai exact produșii aferenți genei *Fib-1* având dimensiunea de 390 pb. Au fost considerate mutații orice diferențe înregistrate în raport cu secvența de referință. În ceea ce privește mutațiile identificate în exonul 3 al genei *Fib-1*, se evidențiază o particularitate în rasa JH3, unde s-au identificat două mutații sinonime: g.9,689,073A>G (G98G) și g.9,689,145A>G (D74D), celelalte rase, neprezentând mutații în comparație cu secvența de referință disponibilă în baza de date NCBI.

Pe de altă parte, în regiunea intronică din amonte față de exonul 3, au fost identificate mutații în cazul fiecărei rase evaluate. Rasa B1 se distinge prin prezența a patru mutații în această regiune, toate fiind în stare homozigotă, ceea ce constituie o caracteristică specifică acestei rase, în contrast cu celelalte rase care prezintă mutații heterozigote. Locusul g.9,689,398 a fost afectat de mutații în cadrul fiecărei rase, în timp ce locii g.9,689,403 și g.9,689,412 au suferit mutații în cazul raselor B1 și JH3, dar nu și GB. O caracteristică specifică rasei cu origine japoneză, ce o diferențiază de rasele cu origine românească, este reprezentată de mutația identificată la locusul g.9,689,269, totodată această rasă prezentând o inserție de dimensiuni mici la granița cu exonul 3. Mai mult, rasa JH3 are o mutație intronică particulară în stare heterozigotă, simbolizată g.9,689,272T>G/A, care în loc de T prezintă una dintre cele două nucleotide alternative, G sau A).

În continuare, a fost utilizată baza de date SilkBase și instrumentul de mapare ChIP-seq, pentru a evalua în detaliu impactul mutațiilor determinate în secvența *Fib-1*, mai exact în secvențele de legare ale proteinei BmHP1a, aparținând celor trei rase *B. mori*. Instrumentul de cartografiere ChIP-seq utilizează algoritmul BLAST pentru a alinia colecția de citiri ChIP-seq generate pentru BmHP1a, la o secvență de interogare selectată, oferind astfel estimări legate de frecvența și localizarea citirilor în cadrul aceleiași interogări. Rezultatele au indicat faptul că SNP-urile determinate pot influența numărul și poziționarea situsurilor prezumtive de legare ale BmHP1a.



## 7. Identificarea profilului de expresie al genelor implicate în sinteza fibroinei

În cadrul acestui studiu s-a urmărit evaluarea profilului de expresie a genelor *Fib-1* și *FIBH*, care reprezintă un pas crucial pentru înțelegerea diversității genetice între rasele de viermi de mătase, dar de asemenea joacă un rol esențial în procesele de editare genetică în care sunt vizate aceste două gene. În a V-a zi din ultimul stadiu larvar, a fost extrasă partea posterioară a glandei sericigene din nouă indivizi, care au fost aleși aleatoriu, aparținând celor trei rase. Tehnica qRT-PCR a fost utilizată pentru a determina expresia genică relativă a celor două gene responsabile de sinteza fibroinei, *Fib-1*, respectiv *FIBH*, în partea posterioară a glandei sericigene. Pentru fiecare genă s-au realizat trei replici tehnice. Analiza datelor qRT-PCR s-a efectuat folosind metoda Livak și scriptul R. În scopul vizualizării datelor qRT-PCR (media  $\pm$  eroarea standard sau SE), a fost folosit programul GraphPad Prism în versiunea 8.4.2.

În vederea evaluării datelor brute generate în urma reacției qRT PCR, a fost utilizată metoda  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  sau abordarea comparativă  $C_t$ . Aceasta reprezintă o procedură utilizată în experimente de biologie moleculară pentru a estima variația expresiei genice. Aceasta calculează diferența nivelului de expresie al unei gene prin compararea numărului de cicluri necesare pentru a ajunge la un nivel semnificativ de detectare a ADN-ului între eșantioane. Gena *Fib-1* a fost supraexprimată ( $p < 10^{-4}$ ) la indivizii din rasa B1 în comparație cu JH3 (FC = 3.552) și GB (FC = 2.706). În contrast, JH3 a arătat o inhibare statistic semnificativă a nivelurilor de expresie ale genei *Fib-1* în comparație cu rasa GB (FC = 0,895). În ceea ce privește gena *FIBH*, a fost generat un profil de expresie în oglindă cu o creștere semnificativă a nivelului de expresie genică în cazul rasei B1 în comparație cu rasa JH3 (FC = 1,141) și un nivel de expresie genic mai scăzut în comparație cu indivizii din rasa GB (FC = 0,688). În ceea ce privește comparația expresiei genei *FIBH* între rasa JH3 și GB, s-a înregistrat o supraexprimare, dar nesemnificativă din punct de vedere statistic.

De asemenea, a fost efectuată o comparație între nivelul de expresie al genei *Fib-1* și *FIBH* pentru fiecare rasă studiată. În cazul rasei B1, a fost înregistrată un nivel considerabil mai crescut al expresiei genei *Fib-1*, în comparație cu *FIBH* (FC = 9,267;  $p < 10^{-7}$ ). De asemenea, în cazul rasei GB, a fost înregistrată o supraexprimare statistic semnificativă a genei *Fib-1* comparativ cu *FIBH* (FC = 1,709). Pe de altă parte, la rasa JH3 nu s-a identificat o supraexprimare cu semnificație statistică în ceea ce privește nivelul de expresie al *Fib-1* și *FIBH*.

## 8. Optimizarea protocolului de microinjecție în vederea obținerii larvelor transgenice utilizate în sisteme de creștere Farma-Farming

În ceea ce privește livrarea materialului exogen în vederea obținerii larvelor transgenice din specia *B. mori*, a fost descris un protocol care prezintă rezultate superioare în privința supraviețuirii larvelor și a succesului editării genetice. Aplicarea tehnicii de microinjecție în sericicultură reprezintă una din cele mai importante direcții pentru obținerea viermilor de mătase transgenici, în vederea obținerii proteinelor recombinante, studiul funcției genelor și îmbunătățirea caracteristicilor firului de mătase.

În prima etapă a studiului, au fost colectate ouăle imediat după depunere, respectiv la mai puțin de o oră, acesta reprezentând primul lot experimental. În a doua fază a studiului, au fost prelevate ouăle depuse în intervalul patru-șase ore, în vederea evaluării impactului timpului de injectare asupra viabilității. Această variabilă a fost analizată în vederea maximizării atât a viabilității, cât și a ratei transformării genetice, în urma injectării. În vederea eficientizării procesului de obținere a larvelor transgenice, am adoptat o tehnologie de injectare care permite livrarea materialului genetic exogen cu precizie în celulele germinale primordiale.

Pentru început, controlul procesului inițial de împerechere, plasarea indivizilor la temperaturi joase, dar de asemenea și colectarea ouălor, asigură baza corectă a experimentelor ulterioare și contribuie semnificativ la succesul acestora. În acest context, procesul de selecție a ouălor care prezintă flotabilitate în vederea injectării ulterioare constituie un pas esențial în care este asigurată calitatea materialului biologic.

Observația conform căreia este necesară utilizarea unui element cu proprietăți adezive, contrar protocolului descris de către Tamura et al., (2007), subliniază importanța adaptării și optimizării metodologiei în funcție de rasele de viermi de mătase utilizate. Particularitățile fiecărei rase pot influența în mod semnificativ procesele de transformare genetică, în acest caz proprietățile fizice și chimice ale corionului ouălor au determinat o aderență scăzută la suprafața lamei de sticlă.

## 9. Concluzii și recomandări

Identificarea benzilor specifice cu ajutorul markerilor GA-12 și CA-9, a permis distingerea și selecția pentru experimentele ulterioare a două rase cu caracteristici potențial superioare, mai exact a raselor JH3 și GB, punând în evidență diversitatea genetică din cadrul speciei *B. mori*. Suplimentar, rasa B1 a fost selectată pentru studii ulterioare, având în vedere că a prezentat benzi în urma utilizării celor trei markeri RAPD, respectiv GA-12, CT-9 și CA-9, fără a genera benzi specifice.

Studiul referitor la evaluarea parametrilor biologici și tehnologici ai viermilor de mătase, concentrându-se pe rasele B1, GB și JH3 evidențiază necesitatea unei abordări holistice care combină selecția genetică atentă a raselor cu performanțe superioare și optimizarea dietei și a condițiilor de creștere. Utilizarea testelor statistice avansate a permis compararea raselor în funcție de parametrii specifici, subliniind rolul crucial al diversității genetice și al selecției în îmbunătățirea caracteristicilor economice ale viermilor de mătase. Această cercetare contribuie la progresul domeniului sericicol, accentuând importanța analizei aprofundate asupra parametrilor biologici și economici pentru maximizarea producției de mătase și promovarea sustenabilității.

În ceea ce privește al treilea studiu, la rasa B1, absența mutațiilor în exonul 3, combinată cu prezența a patru mutații homozigote în secvența intronică din amonte, corespunde caracteristicilor superioare observate în producția de mătase. Această corelație subliniază legătura dintre stabilitatea genetică a anumitor regiuni ale genei și performanța economică înaltă. Pe de altă parte, rasa JH3, prezintă mutații atât în exonul 3, cât și în secvența intronică adiacentă. Deși este puțin probabil ca aceste mutații să influențeze în mod direct secvențele cis-reglatoare, acestea pot avea impact asupra expresiei genice, sugerând un impact posibil asupra calității și cantității mătăsii produse. Analiza comparativă a regiunilor care conțin situsuri de

legare pentru proteina BmHP1a oferă o analiză aprofundată asupra modului în care variațiile genetice influențează expresia genică. Identificarea prezenței mutațiilor în aceste regiuni cruciale evidențiază modul în care expresia genei *Fib-1* este reglată, afectând direct producția și calitatea mătăsii de *B. mori*.

Utilizarea tehnologiei qRT-PCR a permis o evaluare amănunțită a expresiei a celor două gene implicate în producția de fibre de mătase, oferind o perspectivă asupra diferențelor dintre cele trei rase analizate. Analiza a relevat diferențe semnificative în profilul de expresie al genei *FIBH* comparativ cu gena *Fib-1*, cu un accent pe rasa B1. Aceste rezultate indică faptul că profilul de expresie genică poate servi ca un indicator pentru randamentul producției de fibre de mătase la specia *B. mori*.

În cadrul ultimului studiu, am întâmpinat provocări specifice, precum lipsa de aderență a ouălor la lamelele de microscop, și impactul critic al momentului injectării substanțelor exogene asupra ratelor de supraviețuire ale embrionilor. Aceste impedimente subliniază importanța adaptării protocolului standard în funcție de variabilitatea genetică pentru a îmbunătăți atât rata de ecloziune, cât și eficiența transformării genetice. Prin ajustarea metodelor standard, nu doar că putem îmbunătăți eficiența experimentală, dar oferim și o bază mai solidă pentru avansarea cercetării în sericicultură.

## 10. Originalitatea

Prezenta teză stabilește un fundament solid pentru exploatarea din punct de vedere biotehnologic a domeniului sericicol, propunând direcții de valorificare inovatoare ale speciei *B. mori*. Principalul aspect original al tezei constă în concentrarea experimentelor pe rasele românești din specia *B. mori*, un subiect care nu a fost extensiv explorat în literatura de specialitate. Concentrarea asupra raselor autohtone oferă o perspectivă asupra genofondului local, oferind oportunități asupra creșterii economice în sectorul românesc.

Această orientare oferă o nouă perspectivă în cercetarea genetică aplicată în sericicultură, evidențiind particularitățile raselor examinate în contextul Farma-Farming, subliniind aplicabilitatea viermilor de mătase în sfera biotehnologică. Contribuția acestei teze se distinge în domeniul sericiculturii prin coroborarea acestei arii cu biologia moleculară, în încercarea de a corela diferențele genetice identificate cu parametrii biologici și economici ai raselor țintă. În scopul analizei genei *Fib-1*, am recurs la tehnici specifice de secvențiere, metodologie ce a facilitat o comparație exhaustivă a secvențelor genice specifice între rasele studiate. Rezultatele obținute din secvențiere și din analiza qRT-PCR au fost corelate cu observații fenotipice asupra larvelor speciei *B. mori*, dar și cu aspectele economice. Această abordare a avut ca scop elucidarea legăturilor dintre variabilitatea genetică și caracteristicile fenotipice ale larvelor, precum și influența acestora asupra calității mătăsii produse. Această direcție de cercetare oferă perspective promițătoare pentru obținerea larvelor transgenice, destinate producerii de proteine recombinante. Utilizarea tehnicilor avansate în biotehnologie permite manipularea genetică a viermilor de mătase în vederea obținerii proteinelor cu un spectru larg de aplicabilitate în industria farmaceutică și alte domenii.

## Bibliografie selectivă

1. Abiri, R., Valdiani, A., Maziah, M., Shaharuddin, N. A., Sahebi, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., & Talei, D. (2016). A critical review of the concept of transgenic plants: Insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. *Current Issues in Molecular Biology*, 18(1), 21–42. <https://doi.org/10.21775/cimb.018.021>
2. Baci, G. M., Baci, E. D., Cucu, A. A., Muscă, A. S., Giurgiu, A. I., Moise, A. R., Zăhan, M., & Dezmirean, D. S. (2023). Sericultural By-Products: The Potential for Alternative Therapy in Cancer Drug Design. *Molecules*, 28 (2). <https://doi.org/10.3390/molecules28020850>
3. Baci, G. M., Cucu, A. A., Giurgiu, A. I., Muscă, A. S., Bagameri, L., Moise, A. R., Bobiș, O., Rațiu, A. C., & Dezmirean, D. S. (2022). Advances in editing silkworms (*Bombyx mori*) genome by using the crispr-cas system. *Insects*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/insects13010028>
4. Baci, E. D., Baci, G. M., Moise, A. R., & Dezmirean, D. S. (2023). A Status Review on the Importance of Mulberry (*Morus* spp.) and Prospects towards Its Cultivation in a Controlled Environment. *Horticulturae*, 9 (4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040444>
5. Bajwa, G.A., Ahmed, N., Shah, S.H. (2017). Genetic diversity analysis of mulberry silkworm *Bombyx mori* strains using RAPD markers. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(2).
6. Coșier, V. (2007). Inginerie genetică. Cluj-Napoca: Editura Risoprint.
7. Dezmirean, D., Pașca, I., Furdul, E., Bentea, M., Matei, A., Lenghel, G. (2010). Manual de prezentare a raselor din fondul genetic sericicol autohton. Cluj-Napoca: Editura AcademicPres.
8. Hăbeanu, M., Gheorghe, A., & Mihalcea, T. (2023). Nutritional Value of Silkworm Pupae (*Bombyx mori*) with Emphases on Fatty Acids Profile and Their Potential Applications for Humans and Animals. *Insects*, 14 (3). <https://doi.org/10.3390/insects14030254>.
9. Jian, W., & Huan, L. (2024). Development and Application of an Advanced Biomedical Material-Silk Sericin. *Advanced Materials*, 17.
10. Lujerdean, C., Baci, G. M., Cucu, A. A., & Dezmirean, D. S. (2022). The Contribution of Silk Fibroin in Biomedical Engineering. *Insects*, 13 (3). <https://doi.org/10.3390/insects13030286>.
11. Maeda, S., Kawai, T., & Obinata, M. (1985). Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315.
12. Martin, P., Oana, P., & Martin, J. (2024). Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. *Cell Press*, 17.
13. Matei, A., Brasla, A., Oprescu, A. (1997). Comparative study of several *Bombyx mori* L. silkworm races, focusing on feed utilization. XVII-th International Sericultural Congress, Londrina, Brazilia.
14. Matei, A., Petkov, N., Dezmirean, D.S., Petkov, Z., Vasileva, Y., Ciulu, M. (2005). Comparative study of the perspective silkworm hybrids *Bombyx mori* sp from Romania and Bulgaria destined to sericultural familial associations. *Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca*, 61.
15. Matsumoto, Y., Tateyama, Y., & Sugita, T. (2021). Evaluation of antibacterial drugs using silkworms infected by *Cutibacterium acnes*. *Insects*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/insects12070619>.
16. Mărghitaș, L. A. I., Dezmirean, D.S., Pașca, I. (2003). *Sericicultura*, Cluj-Napoca: Editura Mediamira.
17. Mărghitaș, L. A. I. (1995). *Creșterea viermilor de mătase*. București: Editura Ceres.
18. Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H., Yasukochi, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Ajimura, M., Ravikumar, G., Shimomura, M., Nagamura, Y., Shin, T., Abe, H., Shimada, T., Sasaki, T. (2004). The Genome Sequence of Silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11. <https://academic.oup.com/dnaresearch/article/11/1/27/342818>.
19. Moise, A. R., Pop, L. L., Vezeteu, T. V., Agoston, B., Pașca, C., & Severus Dezmirean, D. (2020). Artificial Diet of Silkworms (*Bombyx mori*) Improved With Bee Pollen-Biotechnological Approach in Global Centre of Excellence For Advanced Research in Sericulture and Promotion of Silk Production. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 77(1), 1843–536. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb>.

20. Montali, A., Berini, F., Saviane, A., Cappellozza, S., Marinelli, F., & Tettamanti, G. (2022). A *Bombyx mori* Infection Model for Screening Antibiotics against *Staphylococcus epidermidis*. *Insects*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/insects13080748>.
21. Scholar, P., Kamlesh, I. R., Attri, K., & Gupta, R. (2022). Potential use of sericultural by products: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 8, 1154–1158.
22. Pașca I., (2004). Cercetări privind influența condițiilor de mediu din Zona Transilvaniei asupra unor rase și hibrizi românești de viermi de mătase ai dudului (*Bombyx mori* L.), Teză de Doctorat Cluj-Napoca.
23. Pusta, D.L. (2018). Introductory Chapter: Challenges and Advances in Animal Genetics. *Animal Genetics - Approaches and Limitations*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82668>.
24. Tamura, T., Nobuo, K., Keiro, U., & Isao, K. (2007). An Improved DNA Injection Method for Silkworm Eggs Drastically Increases the Efficiency of Producing Transgenic Silkworms. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 6.