

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Charakteristika cirkadiánních a fotoperiodických hodin u  
diapauzních a mutantních linií ruměnice pospolné  
(*Pyrrhocoris apterus*)**

Diplomová práce

**Olga Pecková**

Školitel: Mgr. David Doležel Ph.D.

České Budějovice 2012

PECKOVÁ O., 2012: Charakteristika cirkadiánních a fotoperiodických hodin u diapauzních a mutantních linií ruměnice pospolné, *Pyrrhocoris apterus* [Characterizing circadian and photoperiodic clocks in wild-type and non-diapause mutant strains of *Pyrrhocoris apterus*, Mgr. Thesis, in Czech] 56p., Faculty of Science University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace:

This thesis compares circadian and photoperiodic characteristics between two mutant non-diapause and several wild type strains of the Linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. The focus is especially adult reproductive diapause, behavioral rhythmicity under constant conditions and interaction of these two phenomena.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 dne 30.4.2012

.....

Olga Pecková

## PODĚKOVÁNÍ:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat za ochotu, vstřícnost a nesmírnou trpělivost svému školiteli Davidu Doleželovi. Také děkuji dalším členům naší laboratoře, především Hance Vaněčkové, Romanu Neužilovi, Olze Bazalové a Adamu Bajgarovi za cenné rady, pomoc při pokusech a seznámení s novými postupy. V neposlední řadě bych ráda poděkovala za trvalou podporu své rodině a Štěpánu Vondráškovi.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	1
1.1 Cirkadiánní rytmy .....	2
1.2 Sezónní rytmy .....	4
1.3 Fotoperiodismus .....	4
1.4 Dormance .....	6
1.4.1 Diapauza .....	7
1.5. Modelový organismus – ruměnice pospolná ( <i>Pyrrhocoris apterus</i> ) .....	8
1.6 Možné propojení cirkadiánních hodin a fotoperiodismu .....	10
2. CÍLE PRÁCE .....	12
3. MATERIÁLY A METODY .....	13
3.1 Charakteristika diapauzních a nediapauzních linií <i>P.apterus</i> .....	13
3.1.1 Chov <i>P. apterus</i> .....	13
3.1.2 Křížení diapauzních linií s nediapauzními liniemi .....	13
3.1.2.1 Určení konstituce diapauzní mutace .....	14
3.1.2.1.1 Reakce na změnu teploty .....	15
3.1.2.2 Měření fotoperiody – světelný gradient .....	16
3.1.3 Křížení dvou nediapauzních linií .....	17
3.1.4 Měření pohybové aktivity v permanentní temnotě .....	18
3.1.5 Vliv okolí (nediapauzních jedinců) na diapauzní jedince .....	20
4. VÝSLEDKY .....	21
4.1 Křížení diapauzních linií s nediapauzními .....	21
4.1.1 Určení konstituce diapauzní mutace .....	21
4.1.1.1 Reakce na změnu teploty .....	24
4.1.2 Měření fotoperiody – světelný gradient .....	27
4.2 Křížení dvou nediapauzních linií .....	28
4.3 Měření pohybové aktivity .....	29
4.4 Vliv okolí (nediapauzních jedinců) na diapauzní jedince .....	42
5. DISKUZE .....	43
6. ZÁVĚR .....	48

7. PŘÍLOHA - Obrázky .....	49
8. CITOVANÁ LITERATURA .....	53

# 1. ÚVOD

Již od počátku vzniku života, jsou všechny živé organismy ovlivňovány periodickými změnami, jako jsou denní a sezónní vlivy řízené rotací Země kolem své osy (střídání dne a noci), kolem Slunce (střídání ročních období) a v neposlední řadě také rotací Měsíce kolem Země (slapové jevy).

Přirozené rytmy vyskytující se u všech skupin živočichů v závislosti na vnějším prostředí zaujaly francouzského astronoma De Mairana již v 18. století. Ten poprvé popsal pravidelný pohyb listů u rostliny citlivky (*Mimosa*) v průběhu dne, přičemž rostlina s nástupem noci své listy sklápí ke stonku (Saunders, 2002).

V důsledku pravidelného střídání dne a noci (světa a tmy) a změn v délce trvání dne a noci spolu s teplotními výkyvy v průběhu roku, musí především suchozemští živočichové mnohdy čelit prudkým, často nepříznivým vlivům vnějšího prostředí (Danks, 2002). Proto se u nich během evoluce vyvinuly mechanismy, které jim napomáhají vyrovnat se s těmito jevy. Pravidelné střídání vnějších podmínek vedlo k vytvoření mechanismů s rytmickým průběhem. Některé z nich jsou přímou odpovědí na změny v jejich okolí, jiné, a to mnohem častější jsou zřejmým projevem endogenní (vrozené) periodicity.

Rytmické chování řízené prostřednictvím faktorů vnějšího prostředí je ovládáno především vnímáním světla, zejména změnou jeho délky (fotoperiody) v průběhu roku. Ta má totiž v čase kontinuální charakter a jeví se jako nejvhodnější prostředek pro řízení rytmů a nejlepší indikátor předznamenávající příchod nepříznivého období, kterému se musí všechny organismy rychle přizpůsobit, aby přežily. Adaptací na pravidelně se měnící délku dne a noci během roku vzniká fotoperiodismus. Světla jako řídicího faktoru využívá velké množství živočišných skupin od rostlin přes hmyz až po ptáky. Relativní délka dne často reguluje veškerý jejich vývoj (Menaker, 1970). Kromě rozmnožování jsou i další aspekty fyziologie a chování hmyzu řízeny biologickými hodinami. Patří mezi ně: pohyb, příjem potravy, kuklení a mnoho dalších aktivit a činností, jež jsou omezeny na přesnou část roku popřípadě dne či noci (Saunders *et al.*, 2002). Jen díky všem těmto vymoženostem evoluce jsou organismy schopny přežít i v nepříznivých podmínkách.

Rytmy můžeme dělit podle délky trvání jejich periody na ultradiánní s periodou kratší než 24 hodin, infradiánní s periodou delší než 24 hodin, cirkadiánní, jejichž perioda se přibližně rovná 24 hodinám, cirkalunární s měsíční periodou, cirkanuánní s roční periodou a cirkatidální neboli přílivové (Dunlap *et al.*, 2004).

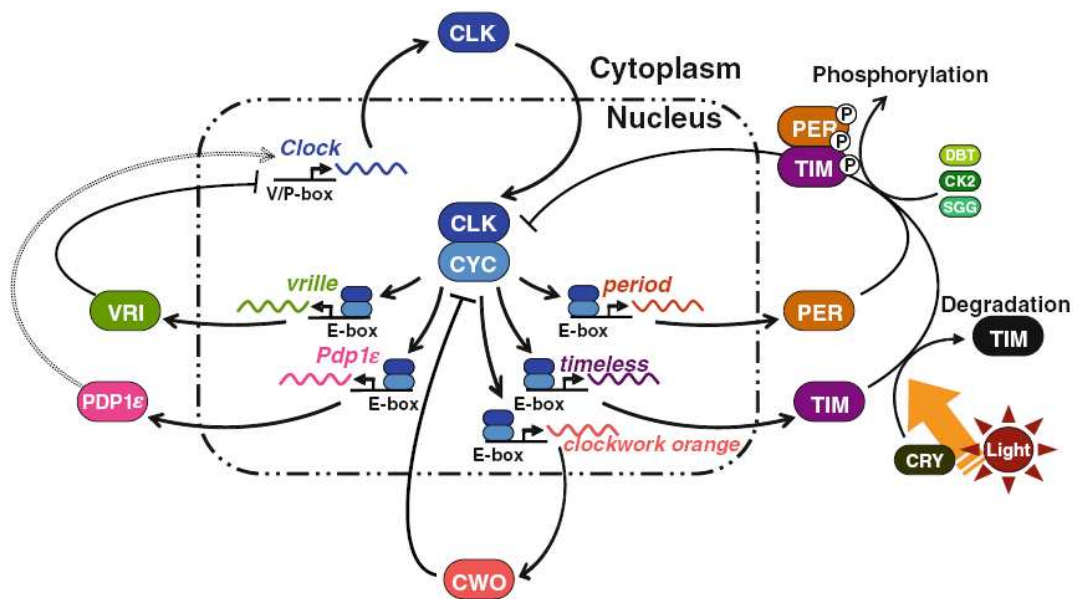
## 1.1 Cirkadiánní rytmy

Zvláštní význam mají endogenní oscilace, které se vyvinuly s periodou blízkou 24 hodinám, tedy rytmy cirkadiánní, jež jsou determinovány geneticky. Zdá se, že základ hodin je přítomen v každé buňce a jejich chod je synchronizován centrálními hodinami. O existenci vnitřních hodin svědčí i fakt, že se rytmicita zachovává po určitou dobu i v případech, že je daný živočich umístěn do permanentní temnoty, přičemž délka jednotlivých period se může v průběhu těchto podmínek poněkud zkracovat nebo naopak prodlužovat (Sehgal, 2004). Tyto rytmy byly pozorovány jak u živočichů, tak i u rostlin.

Jak již bylo řečeno, i cirkadiánní rytmy jsou řízeny nejčastěji vnímáním světla. U hmyzu je světlo pro nastavení hodin vnímáno specifickými na světlo reagujícími neurony, které obsahují světločivné pigmenty lišící se však od pigmentů retiny oka. Rytmy jsou teplotně kompenzované, tedy na teplotě nezávislé v akceptovatelném teplotním rozmezí.

Podstata fungování hodin je uložena v genomu jednotlivých organismů, jedná se tedy o výdobytek evoluce ovládající řadu biochemických a fyziologických procesů. Na molekulární úrovni je jejich podstata již známa. Molekulární mechanismus hlavního oscilátoru je studován u mnoha modelových organismů od těch nejjednodušších, k nimž patří sinice nebo houby k složitějším jako jsou drobní savci. Oscilátor, který procesy řídí pracuje na principu zpětné vazby tak, že hromadí se genový produkt, inhibuje vlastní transkripci, která se znovu rozběhne až poté, co koncentrace produktu poklesne pod určitou mez (Rosato, 2007).

Mezi hlavní hodinové “clock” geny, které společně vytvářejí zpětnovazebné smyčky patří *period*, *cycle*, *timeless*, *clock*, *doubletime* a *cryptochrom* (Ueda *et al.*, 2001, Tomioka and Matsumoto, 2010)).



Obr.1. Schéma fungování cirkadiálních hodin (Tomioka, 2010).

Zjednodušené schéma fungování cirkadiálních hodin je založeno na světlo-citlivém proteinu cryptochrom a několika zpětnovazebných smyčkách tvořených transkripčními a translačními procesy, do nichž jsou zapojeny pozitivní a negativní elementy řídicí tempo hodin. Transkripcí a následnou translací genů *cycle* a *clock* se vytváří proteiny tvořící heterodimer CYC/CLK, který podporuje transkripci *periodu* během dne a noci. *per* mRNA je transportována do cytoplazmy, kde je translatována do proteinu PER. Vzniklý protein vytváří komplex s TIM (kódovaný genem *timeless*), který vstupuje do jádra, kde potlačuje svou transkripci inhibicí CLK/CYC heterodimeru. Vlivem potlačené transkripce dochází ke snížení hladiny proteinů PER a TIM, tím již CLK/CYC není inhibován a dojde k reaktivaci transkripce genů *per* a *tim*.

PER protein translatovaný v cytoplazmě vyváří kromě heterodimeru PER/TIM ještě další, a to se dvěma proteiny CRY1 a CRY2 (kódované cryptochromem). CRY1 pravděpodobně funguje jako fotoreceptor, který umožňuje cirkadiálním hodinám vstoupit do denního (light : dark) cyklu. CRY2 je na světlo necitlivý protein fungující jako hlavní inhibitor transkripce (Bradshaw and Holzapfel, 2010).



## 1.2. Sezónní rytmy

Kromě rytmů cirkadiánních, jak už bylo zmíněno, existují i rytmy s delší periodou, mezi něž patří i rytmy sezónní. Ty souvisí s množstvím dopadajícího energie na zemský povrch, které se mění spolu s poměrnou délkou dne a noci směrem od rovníku k pólům a spolu se střídáním ročních období. Do vhodného období je tak pomocí vnitřních hodin například načasována pohlavní aktivita organismů a vnějším podnětem je pro ni, i v tomto případě, změna délky dne – fotoperioda (Hodkova, 1976). Dalším příkladem může být sezónní výskyt dormantních stádií či diapauzních stádií v životní cyklu nebo migrace motýlů monarchů (Sauman *et al.*, 2005).

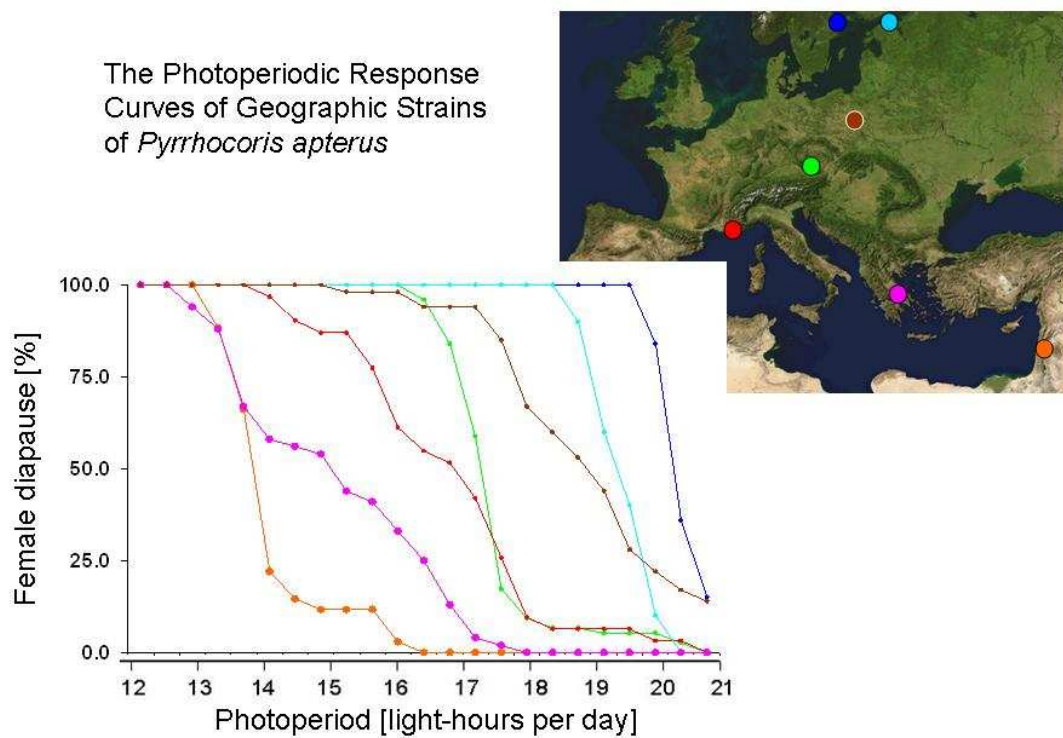
## 1.3 Fotoperiodismus

Fotoperiodismus je směsicí jevů, jejichž pomocí jsou organismy schopny rozlišit dlouhé dny letních měsíců od kratších dnů podzimu či zimy. Tím jsou organismy schopny získat informaci z prostředí ohledně toho, v jaké fázi roku se právě nacházejí a mohou tím pádem přizpůsobit dané situaci své životní cykly. Rozhodující je pro organismy přechod z letního období na zimní, kdy přecházejí z aktivního způsobu života na pasivní a řada jejich fyziologických procesů je utlumena, aby snáze přečkaly nepříznivé období.

Fotoperiodismus jako přírodní fenomén byl poprvé popsán Garnerem a Allardem roku 1920 (Garner, Allard, 1920), kteří zjistili, že mnoho rostlin včetně tabáku, sóji, ředkvičky, mrkve a dalších může kvést a rodit pouze při dlouhém dni letních měsíců. Již tyto první vědecké výzkumy dospěly k tomu, že sezónní aktivita, ať už hmyzu, ptáků, plazů nebo savců, funguje podle stejného principu.

U hmyzu je nejrozšířenějším projevem fotoperiodismu indukce a ukončení diapauzy (Saunders *et al.*, 2002). Fotoperiodismus jako prostředek adaptace na sezónní vlivy závisí na jejím vhodném načasování a ostatních reakcích spojených s výkyvy během sezóny. U všech jedinců nedochází k rozhodnutí stejně – obvykle jej zobrazujeme fotoperiodickou křivkou a podmínky, kdy 50% jedinců diapauzuje označujeme jako kritickou fotoperiodu, která je určena geneticky. Kritická fotoperioda se liší v závislosti na zeměpisné šířce, je tedy ovlivněná dlouhodobým přizpůsobením živočicha danému prostředí. Diapauza jedinců v severských oblastech (na severní polokouli), kde je klima

studenější a vegetační období kratší, je delší. Oteplení, na které organismy v diapauze čekají zde totiž nastupuje s větší prodlevou a vegetační sezóna v těchto oblastech končí dříve. Rozmnožovací cykly tedy přicházejí na řadu později, kdy je den již o několik hodin delší a teplota je příznivější než je tomu v oblastech položených jižněji (Denlinger *et al.*, 2001; Lumme *et al.*, 1975; Lankinen & Forsman, 2006; Lankinen, 1986). Tento fakt potvrzují i naše experimenty viz graf 1. V naší laboratoři máme jedince *P.apterus* pocházející z různých geografických oblastí, u kterých jsme sledovali, zda se mezi sebou liší z hlediska načasování rozmnožování (ukončení diapauzy). Zjistili jsme, že různé geografické linie pocházející z různých podnebných pásů se liší právě kritickou fotoperiodou, která se pro ně jeví jako dostačující pro načasování pohlavní aktivity do období, které je pro ně z celého roku nejpříznivější.



Graf 1. Fotoperiodická odpověď různých geografických linií *P.apterus*, předběžné výsledky (Vaněčková, Bajgar, Pecková, Doležel, nepublikováno). Různými barvami jsou na obrázku označeny lokality, ze kterých pocházely jednotlivé divoké linie ruměnic. Oranžově – Izrael, růžově – Athény, červeně – Lyon, zeleně – Chelčice, světle modře – Toila, tmavě modře – Stockholm (Švédsko).

Z grafu je patrná závislost fotoperiodické odpovědi na geografické poloze místa původu jedince. Pro *P. apterus* z nejižnějšího místa (Izrael) je dostačující kratší fotoperioda pro ukončení diapauzy, naopak nejseverněji žijící jedinci (Toila, Stockholm) reagují ukončením diapauzy (zahájením pohlavní aktivity) s nejdelší fotoperiodou.

Metody studia, které přispívají k pochopení molekulárních mechanismů řídicích fotoperiodismu, lze rozdělit do dvou kategorií. Jednou z nich je klasická genetik, která využívá jedinců lišících se navzájem svým fenotypem, přičemž genetický rozdíl není znám a právě ten se snažíme nalézt. Výhodou klasické genetiky je, že umožňuje identifikovat mutace prakticky na všech možných úrovních regulace (poškození promotorů, vytvoření stop kodonu v genu, nebo naopak vzniku dominantních mutací). O to pracnější je potom tyto mutace nalézt – zejména u nemodelových organismů to může být takřka nemožné, nebo velmi komplikované.

Druhou kategorií představuje genetik reverzní, která naopak postupuje opačným směrem – nejprve známe gen a u toho se snažíme zjistit jeho úlohu (Michels, 2002).

## 1.4 Dormance

Ekologicky je možné rozlišit tři typy dormance: hibernaci, estivaci a třetím zvláštním typem je diapauza. Fyziologické mechanismy jejich řízení jsou velmi různorodé. Hibernace, nazývaná též jako zimní spánek a estivace (letní spánek) jsou stavy sobě velmi podobné. Živočich je při nich nucen vzhledem k nepříznivému klimatickému období v průběhu roku zredukovat veškeré fyziologické pochody na minimum, snížit srdeční tep, tělesnou teplotu a zredukovat metabolismus, a to vše proto, aby šetřil energií a byl schopen přečkat v tomto stavu nepříznivé období zimy či sucha ve vhodném úkrytu (Wilz, Heldmaier, 2000).

Estivace je označována jako stádium sníženého metabolismu, díky němuž jsou organismy schopné přečkat nepříznivé podmínky aridních oblastí. Organismy žijící v těchto podmínkách jsou aktivní vždy jen po několik týdnů v roce, kdy přijímají potravu a množí se. Pak se opět uchylují k estivaci v chráněném úkrytu, nejčastěji pod zemí (Storey, 2002).

Hibernace je charakterizována dlouhými stavy strnulosti, které se objevují s frekvencí několika dní až několika týdnů. Během stavu strnulosti dochází k redukci

metabolických pochodů, snížení tepové frekvence a tělesné teploty. Tyto stavy jsou přerušovány obdobím intenzivní metabolické aktivity, při nichž tělesná teplota roste a je udržována po určitou dobu než se živočich opět vrací do stádia srtnulosti (Carey, et. Al, 2003).

Organismus je schopen se z dormantního stavu velmi rychle zotavit hned po odeznění nepříznivých podmínek, jeho fyziologické procesy se obnoví a dosahují normálních hodnot. Například hmyz ve stavu strnulosti vlivem nízkých teplot pokračuje v činnosti, když teplota stoupne nad určitou mez. V tropických oblastech je nejčinnější obdobím pro hmyz období dešťů a stává se dormantním s nástupem období sucha. V temperátních oblastech hmyz zahajuje své nejčinnější období na jaře a přechází do dormantního stádia v zimě. V některých subtropických oblastech, kde jsou léta horká a suchá a zimy studené nebo chladné, mohou nastat dvě období spojená s vegetačním klidem - v zimních a letních měsících (Hodek & Kostal, 1997).

### **1.4.1 Diapauza**

Třetím zvláštním typem dormance je diapauza. Jedná se o dědičně podmíněnou dormanci, která synchronizuje životní cyklus druhu s roční dobou a je definována jako stav, při které dochází k zastavení vývoje prostřednictvím spíše fyziologických mechanismů než podmínkami vnějšího prostředí (Beck, 1962). Jedná se tedy o aktivně indukovaný proces, který často zahrnuje změny neurokrinní aktivity. Ačkoliv diapauza není přímo udržována vlivem faktorů vnějšího prostředí, sehrávají tyto faktory důležitou roli při její indukci a ukončení. Tyto faktory slouží jako stimul z prostředí signalizující nástup nepříznivých podmínek, patří mezi ně například teplota, vlhkost či změna fotoperiody, jejíž vliv je rozhodující (Jervis, 2005). Navíc může být diapauza mnohdy vyvolána s předstihem, a to v době, kdy jsou vnější podmínky ještě přijatelné, ale hrozí zhoršení, které je živočich schopen předpovědět na základě zkracujícího se dne. Podnět vyvolávající diapauzu v tomto případě často působí na dřívější vývojové stádium než je to, ve kterém se pak projeví. Tento mechanismus tak může sloužit k synchronizaci životního cyklu s ročním obdobím (Adkinsson, Roach, 1971). Diapauza v sobě zahrnuje zastavení dalšího vývoje nebo hmyzí proměnu, skladování charakteristických metabolitů v hemolymfě, snížení metabolismu, rezistenci k vysychání a někdy také stavbu

specializovaných zimovišť (Kostal *et al.*, 2008). Jak je informace determinující diapauzu v organismu uchována však není doposud známo.

Hmyzí diapauza je klasifikována na několik typů. Liší se podle toho, v jaké fázi životního cyklu k ní dojde, další kritériem je například to, jestli se jedná o obligatorní nebo fakultativní diapauzu. Vstup do obligatorní diapauzy se děje bez ohledu na vlivy vnějšího prostředí. Do diapauzy fakultativní vstupuje jedinec jen tehdy, pokud to podmínky prostředí vyžadují (Jervis, 2005). Klasifikaci typů provedl Müller, který rozlišuje tři základní typy, a to parapauzu, eudiapauzu a oligopauzu (Müller, 1970).

Parapauza je obligatorní diapauza pozorovaná u jednogeneračních druhů. Její nástup je pro každý druh specifický a dochází k němu v konkrétním vývojovém stupni larválního stádia hmyzu (instar). Počátek tohoto typu diapauzy je geneticky determinován a ukazuje se, že je nezávislý na vlivu vnějšího prostředí.

Eudiapauza je obvykle indukována fotoperiodickým způsobem a bývá ukončena výraznější změnou teploty, která je spojena s nástupem chladnějšího období. Jedná se tedy o vzájemné propojení biologických hodin a biologického kalendáře.

Oligodiapauza má rovněž fakultativní povahu, která spočívá ve fotoperiodické citlivosti (Saunders *et al.*, 2002).

## **1.5 Modelový organismus – ruměnice pospolná (*P. apterus*)**

*Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) se díky své krátké generační době, nenáročným podmínkách chovu a zájmu pracovníků Entomologického ústavu stala významným fyziologickým a molekulárně - genetickým modelem. Tento živočich patří původně mezi subtropické druhy, ale dnes je rozšířen téměř po celém světě, čehož využíváme při našich experimentech. K dalším důležitým vlastnostem tohoto druhu bezpochyby patří také pohlavní dimorfismus (obr.P1., P2.), který je nezbytný pro provádění experimentů, závislých na kontrolovaném křížení vybraných jedinců.

Chov ruměnic lze docela snadno zajistit v laboratorních podmínkách. Páření je jednoduché, dospělí samci se stávají pohlavně aktivními 5.-6. den po dosažení dospělosti, spolu s přibývajícím věkem se jejich pohlavní aktivita pomalu snižuje. Svou partnerku samci vyhledávají pomocí čichu a dalších stimulů, neboť sexuálně aktivní samička

produkuje atraktivní látky stimulující samce k páření. Diapauzní samci se nepáří, oproti tomu diapauzní samičky, u kterých je diapauza vyvolána podmínkami krátkého dne, jsou schopny se pářit s aktivními samci (Socha, 1993). Na tento fakt je třeba si dávat pozor, provádíme-li křížení jedinců diapauzních s nediapauzními.

Po spáření samička klade vajíčka po snůškách v intervalu 2-5 dní, přičemž v každé snůšce naklade asi 50- 80 vajíček. Spolu s vývojem embrya mění vajíčka svou barvu od bílé přes žlutou po oranžovou, která předznamenává brzké vylíhnutí larviček. Vývoj larev zahrnuje pět instarů. Při běžných laboratorních podmínkách (long-day - LD - 18L:6D a 25°C) trvají první 4 instary okolo 10-14 dní, přičemž poslední pátý, trvá sám o sobě 7 až 10 dní. Od vajíčka po dospělé tedy vývoj trvá přibližně 1 měsíc. V přírodě je však tento vývoj o poznání pomalejší (2-3 měsíce). Délka života dospělé je různá, může být od 2 měsíců až po 1 rok (Socha, 1993). Samičky kladou vajíčka i v případě, že nebyly oplozeny, z vajíček se však v tom případě nelíhnou žádní jedinci.

*P.apterus* se s velkou oblibou shlukují do větších skupin, a to pomocí vizuálních a chemických stimulů. Co se týče potravy preferují rostliny ze skupiny slézovitých (*Malvales*). Jedná se o fytofágní druh, který se adaptoval na potravu ve formě zralých suchých semen.

Diapauza jedinců je charakterizována ukončením rozmnožování. Obvykle je řízena fotoperiodou, a to tak, že během krátkých dní (SD) s periodou 12L:12D jedinci diapauzují, zatímco během dlouhých dní (LD) s periodou 18L:6D je diapauza ukončena a dospělci se začínají rozmnožovat (Hodek, 1968). Alternativně lze také diapauzu indukovat snížením teploty, která v přírodě s klesající délkou dne rovněž klesá. Indukci diapauzy vyvolá vystavení teplotě okolo 0 °C po dobu 2-4 dnů nebo velmi vysokou hustotou populace (Hodek, 1971).

Chceme-li rozeznat, která samice je diapauzní a která ne, je třeba jedince samiččího pohlaví rozdělit po jedné do Petriho misek (obr.P4.) a sledovat, které samičky vajíčka kladou a které ne. Pokud chceme rozlišit mutantní samice od divokých, totéž provedeme v podmínkách krátkého dne. Samice kladoucí v SD pak označujeme jako mutantní, naopak samice, které v SD nekladou jsou divoké, protože dodržují diapauzní chování, které za normálních okolností nastává v podmínkách SD.

Dalším způsobem pro rozeznání samic diapauzních od nediapauzních v dospělosti je přistoupení k jejich pitvám. Při pitvách se zaměřujeme na samiččí reprodukční orgány. Reprodukční orgány dospělé samice jsou tvořeny párem ovárií, při čemž každý je složený

ze 7 ovariol (Sláma *et al.*, 1974). Diapauzní samičku od nediapauzní v tomto případě odlišíme vzájemným porovnáním jejich vaječnicků.

U nediapauzních samiček probíhá v ovariolách růst a vývoj vajíček již několik dní po dosažení dospělosti (Socha, 1993) a formující se oocyty jsou snadno pozorovatelné pod mikroskopem. U diapauzních samiček jsou ovaria zakrnělá a žádná vajíčka se zde nevyvíjí, pod mikroskopem nevidíme na ovarii žádné změny (obr.P5.).

Oba postupy určení diapauzního nebo nediapauzního chování mají své výhody i nevýhody. Výhodou druhého postupu, je že údaj o tom jestli je samice diapauzní nebo ne získáme rychleji a s větší jistotou se na něj můžeme spolehnout. Mezi nevýhody tohoto postupu patří bezpochyby jeho pracnost pracujeme-li s velkým počtem jedinců a nelze ho aplikovat, plánujeme-li samice použít k dalším experimentům, neboť po vypitvání jsou již nepoužitelné.

V naší laboratoři pracujeme s několika dříve popsanými mutantními (nediapauzními) liniemi *P.apterus* (Socha, Hodková 1994), (Socha, nepublikováno) a též jednou nově izolovanou linií (Vaněčková, Dobrovodský, Doležel, nepublikováno). K dispozici máme také divoké (diapauzní) linie odebrané z různých lokalit (označeny podle místa původu).

Oba typy linií jak diapauzní, tak i nediapauzní byly získány odchylem z volné přírody, přičemž v laboratorním prostředí následně došlo k jejich vyselektování a namnožení.

## **1.6 Možné propojení cirkadiánních hodin s fotoperiodismem**

Přestože jsme relativně dobře schopni pozorovat fotoperiodické procesy, na různých druhích živočichů, jejich podstata je nám stále na molekulární úrovni nejasná. Již v první polovině 20. století odborníci uvažovali o tom, že cirkadiánní rytmicitata je základem pro měření času v případě rytmů sezónních, tedy že do řízení cirkadiánních rytmů a rytmů sezónních (fotoperiodismu) jsou zapojeny stejné nebo obdobné prvky. Můžeme tak soudit z toho důvodu, že oba typy chování jsou závislé na střídání světla a tmy (Ikeno *et al.*, 2010). Mnoho dosavadních studií tuto hypotézu podpořilo, někteří autoři ale s interpretací dat nesouhlasí a navrhli alternativní vysvětlení (Bradshaw, Holzapfel, 2010). Například

bylo prokázáno, že hodinový gen *timeless* má vliv na diapauzu u *Drosophily*. Rovněž u *Drosophily* byly prováděny experimenty, zaměřené na “vypnutí” klíčových genů cirkadiálních hodin jakými jsou *period* a *cycle* (Ikeno *et al.*, 2010), přičemž se sledovalo, jaký dopad bude mít vyřazení genů z činnosti na fotoperiodismus. Dosavadní výsledky však zatím molekulární podstatu fungování sezónních rytmů neobjasnily (Bradshaw, Holzapfel, 2010).

Za účelem komplexního pochopení přizpůsobení organismů podmínkám vnějšího prostředí je třeba provést ještě mnoho experimentů a využít rozličných metod molekulární biologie, které by přispěly k rozšíření dosavadních znalostí o těchto jevech.

Naším cílem v této práci je pokusit se rozšířit dosavadní znalosti o fotoperiodických jevech. Jakou úlohu hraje v řízení fotoperiodické odpovědi světlo? Je průběh fotoperiodické odpovědi ovlivněn změnou teploty? Jaká je charakteristika mutantních jedinců? Další naše snaha směřuje k zodpovězení alespoň některých dosud nejasných otázek týkajících se vztahu obou dlouho studovaných jevů – fotoperiodismu a cirkadiálních rytmů. Existuje nějaký mechanismus propojující řízení cirkadiálních hodin a fotoperiodismu? Lze testováním obou jevů zároveň na tomtéž modelovém organismu nalézt rysy poukazující na společné řídicí prvky?



## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je charakterizovat diapauzní (divoké) a nediapauzní (mutantní) linie *P.apterus*.

1. Určit, zda diapauzní mutace je v dominantní či recesivní konstituci.
2. Charakterizovat průběh cirkadiánní odpovědi u mutantních a divokých linií.
3. Otestovat, jestli jsou cirkadiánní fenotypy vázány s fotoperiodickými.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Charakteristika diapauzních a nediapauzních linií

##### *P.apterus*

##### 3.1.1 Chov *P. apterus*

Používali jsme dospělé ruměnice pospolné (*P. apterus*), pro některé pokusy jsme využili jedince výhradně samčího nebo samičího pohlaví, do jiných pokusů byli zařazeni jedinci obou pohlaví společně. Pracovali jsme s níže uvedenými nediapauzními a diapauzními liniemi.

#### Nediapauzní (mutantní) linie

- Lyon L (LyL) - beze změny barvy – červená (Socha, Hodková, 1994)
- Lyon Yellow body (LyY.b.) - bílá mutace (Socha, nepublikováno)

#### Diapauzní (divoké) linie

- Švédsko (izolovaná v roce 2010, Stockholm)
- Žaclěř (Žac.) (izolovaná v roce 2008)
- Oldřichovec (Oldř.) (izolovaná v roce 2009)
- Toila (izolovaná v roce 2010)

Ruměnice byly chovány v ½ litrových sklenicích, uzavřených prodyšnou sítí a umístěných v inkubátorech, které simulovaly příslušné podmínky daného experimentu (délka dne, teplota). Jako potrava se nám nejlépe osvědčila lipová semínka. Ta byla ošetřována tak, aby bylo zabráněno zavlečení infekce z prostředí do našich chovů. Případné patogeny byly eliminovány promýváním semínek vroucí vodou, semínka byla

následně usušena a až poté používána. Zdrojem vody bylo ruměnicím “pitítko” s buničinovou zátkou (obr. P3.).

Podmínky pro chov jedinců byly nastaveny v závislosti na prováděných experimentech. Někteří jedinci byli chováni při standardní teplotě 25°C v podmínkách krátkého dne SD: 12L:12D nebo dlouhého dne LD: 18L:6D, jiní byli podle zvolených pokusů umístováni do nižších či vyšších teplot.

## **3.1.2 Křížení diapauzních linií s nediapauzními liniemi**

### **3.1.2.1 Určení konstituce diapauzní mutace**

V rodičovské generaci (P) jsme křížili stejně staré jedince mutantních (nediapauzních) linií s jedinci divokými (diapauzními), čímž jsme získali jejich potomky (F<sub>1</sub>), u kterých jsme sledovali fenotyp. F<sub>1</sub> generaci jsme dále použili pro zpětná křížení s rodičovskou nediapauzní linií za zisku B<sub>1</sub>. Z B<sub>1</sub> jsme vybrali pouze diapauzující jedince a křížili je v dalším zpětném křížení s nediapauzujícím rodičem za zisku B<sub>2</sub>. Zpětná křížení jsme tímto způsobem opakovali po několika generacích až do B<sub>4</sub>, jak je naznačeno v tabl.

Jedince samičího a samčího pohlaví jsme navzájem křížili v podmínkách dlouhého dne, LD: 18L:6D, za standardní teploty 25°C, aby jedinci nediapauzovali a co největší počet byl schopen se rozmnožit.

Diapauznost v dílčích generacích jsme u potomků z jednotlivých zpětných křížení sledovali pouze u samic, neboť u nich jsme byli schopni bezpečně rozhodnout, jestli jsou diapauzní nebo ne. Samce jsme k pokusům nevyužívali, přestože i to by bylo možné. V tom případě bychom však museli přistoupit k jejich pitvám, abychom rozlišili diapauzní jedince od nediapauzních a nebylo by možné je dále použít do dalších křížení. Selekcí samic do dalšího křížení jsme prováděli ve 4.-5. instaru, aby bylo zajištěno, že dosud nebyly oplozeny. Selektované potomstvo samičího pohlaví v dílčích generacích jsme umístili do podmínek krátkého dne SD: 12L:12D za standardní teploty 25°C. V těchto podmínkách diapauzní samice nekladou vajíčka a naopak je tomu u samic nediapauzních, které vajíčka kladou. Abychom mohli určit, která samice vajíčka klade a která ne, museli jsme samice rozdělit po jedné do Petriho misek (obr.P4).

Diapauzní jedinci z těchto pokusů byli zamrazeni pro případné využití v dalších experimentech, které však již nebudou předmětem této práce.

Tab.I. Model vzájemného křížení jednotlivých linií. Křížení č. 6 bylo v následujících zpětných křížení ukončeno vzhledem k malému počtu jedinců, které by nebylo možné udržet do dalších generací. Podobně u křížení č.3 došlo k nedostatku jedinců LyY.b., ti však byli v tomto křížení nahrazeni linií LyL, která chováním odpovídá původní linii LyY.b, liší se pouze absencí mutace způsobující bílou barvu jedinců. V případě křížení č.3 se jednalo o již dříve kříženou linii, do našeho pokusu tedy byla zařazena po již několikatém zpětném křížení. Po provedení našich zpětných křížení tedy získáváme pro toto křížení B<sub>7</sub> u ostatních B<sub>4</sub>.

<u>P:</u>	<u>B<sub>1/4</sub>:</u>	<u>B<sub>2/5</sub>:</u>	<u>B<sub>3/6</sub>:</u>	<u>B<sub>4/7</sub>:</u>
1. Švédsko x Ly.Y.b	F <sub>1</sub> x Ly.Y.b.	» nekladoucí B <sub>1</sub> x Ly.Y.b.	» nekladoucí B <sub>2</sub> x CHF	» B <sub>3</sub> ----
2. Toila x Ly.L.	F <sub>1</sub> x LyL.	» nekladoucí B <sub>1</sub> x LyL.	» nekladoucí B <sub>2</sub> x LyY.b.	» B <sub>3</sub> ----
3. B <sub>3</sub> (Žaclěř x Ly.L.)	F <sub>1</sub> x LyL.	» nekladoucí B <sub>4</sub> x LyL.	» nekladoucí B <sub>5</sub> x LyL.	» B <sub>6</sub> x LyL
4. Švédsko x ChF	F <sub>1</sub> x ChF	» nekladoucí B <sub>1</sub> x ChF	» nekladoucí B <sub>2</sub> x ChF	» B <sub>3</sub> x ChF
5. Žaclěř x LyY.b.	F <sub>1</sub> x LyY.b.	» nekladoucí B <sub>1</sub> x LyY.b	» nekladoucí B <sub>2</sub> x LyY.b.	» B <sub>3</sub> ---
6. Oldř. x LyY.b.	F <sub>1</sub> x LyY.b.	» nekladoucí B <sub>1</sub> -----	-----	-----

### 3.1.2.1.1 Reakce na změnu teploty

Do tohoto experimentu jsme vybrali pouze jedince z po sobě jdoucího 4. zpětného křížení (B<sub>7</sub>) č.3 a (B<sub>4</sub>) č.4 (tab.I.), která byla zastoupena dostatečně velkým počtem jedinců. Záhy po vylíhnutí byli jedinci umístěni do inkubátorů zajišťujících různé teplotní podmínky SD. Z jedinců jsme v 4.-5. instaru selektovali pouze samice a zjišťovali jejich diapauznost. Samci byli použiti pro měření pohybové aktivity v permanentní temnotě v dalších experimentech (kap. 3.1.4).

Jedince jsme umisťovali do různých teplot na základě jejich chování v předchozím pokusu, kde jejich chování vykazovalo odlišný trend (kap. 3.1.2.1). Potomky z křížení č.3 (B<sub>7</sub> (Žac x Ly)) jsme vzhledem k jejich chování umístili do nižší teploty a naopak jedince z křížení č.4 (B<sub>4</sub> (Šv x ChF)) do dvou vyšších teplot. Teploty jsme se snažili vychýlit do co nejkrajnějších hodnot. Nebyli jsme si jisti jaká teplota je pro plošnice ještě snesitelná, proto jsme u minimální a maximální teploty volili kombinaci dvou teplot, které se lišili během dne a noci. Teplota během dne nebyla tolik vychýlena od standartní teploty (25°C), v noci se teplota ještě o něco snížila či zvýšila.

Jedinci z křížení č.3 byli chováni v podmínkách krátkého dne (SD) 12L:12D při teplotách:

- 1)  $t_1 - 25^{\circ}\text{C}$ , která odpovídala teplotě, ve které byli jedinci původně kříženi (kap. 3.1.2.1.)
- 2)  $t_2 - 22^{\circ}\text{C}$  přes den a  $20^{\circ}\text{C}$  přes noc.

Jedinci z křížení č.4 byli umístěni rovněž do podmínek krátkého dne (SD) 12L:12D v teplotách:

- 1)  $t_1 - 25^{\circ}\text{C}$  odpovídající teplotě předhozího křížení.
- 2)  $t_2 - 27^{\circ}\text{C}$ .
- 3)  $t_3 - 28,5^{\circ}\text{C}$  přes den a  $25^{\circ}\text{C}$  přes noc.

Diapauzní jedinci byli po tomto experimentu zamrazeni pro případné další analýzy, které však nebudou předmětem této práce.

### **3.1.2.2 Měření kritické fotoperiody - světelný gradient**

V tomto experimentu jsme testovali jen některé jedince samičího pohlaví opět vyselektované v 4.-5.instaru (tab.II.). Samce a zbytek samic jsme využili pro měření pohybové aktivity v permanentní temnotě (kap. 3.1.4).

Jedince vyvíjející se v krátkém dni (SD) jsme, po dosažení dospělosti a s odstupem 3 týdnů, umístili do inkubátoru se světelným gradientem. Počáteční stav inkubátoru byl nastaven na 12L:12D. Poměr .mezi délkou dne a noci (L : D) se v inkubátoru postupně měnil tak, že se délka dne každý týden o jednu hodinu prodlužovala a noc se tím pádem o hodinu zkracovala. Pokus probíhal za konstantní teploty  $25^{\circ}\text{C}$  tak dlouho, dokud nebylo dosaženo stálého světla (24L:0D), v němž byli jedinci ponecháni ještě několi týdnů.

Aby nemohlo dojít k ovlivnění pokusu například chybou inkubátoru, prováděli jsme pokusy nezávisle na sobě ve dvou inkubátorech.

Naměřená data byla následně zpracována v programu Microsoft Excel.

Tab.II. Schéma křížení diapauzních linií s nediapauzními za zisku F<sub>1</sub> použité v experimentu.

Linie	♂LyY.b.	♂ChF
♀Švédsko	F <sub>1</sub>	F <sub>1</sub>

### 3.1.3 Křížení dvou nediapauzních linií navzájem

Z diapauzních linií jsme křížili v podmínkách LD (18L:6D) za standartní teploty (25°C) dvě nediapauzní linie navzájem v obou směrech (jedince samičího i samčího pohlaví z jedné linie se samičím i samčím pohlavím z druhé linie) tab.III. Jedince do křížení jsme selektovali v 4.-5. instaru. Z F<sub>1</sub> generace jsme testovali pouze samice, u kterých jsme byli schopni snadno určit, jestli jsou diapauzní nebo ne, podle toho, zda podmínkách SD kladou vajíčka či nikoliv. F<sub>1</sub> samce jsme využili pro měření pohybové aktivity v permanentní temnotě (kap. 3.1.4).

Sledovali jsme jaký charakter chování bude vykazovat F<sub>1</sub> generace, jestli bude spíše diapauzní nebo naopak.

Tab.III. Schéma křížení dvou nediapauzních linií.

Linie	♀ChF	♂ChF
♀LyY.b.	-	F <sub>1</sub>
♂LyY.b.	F <sub>1</sub>	-

### 3.1.4 Měření pohybové aktivity v permanentní temnotě

Pohybovou aktivitu v permanentní temnotě jsme měřili u všech vyselektovaných jedinců samčího pohlaví (4.-5.instar) z předchozích experimentů, které nebylo v pokusech využíváno. V některých případech byly měřeny oba typy pohlaví.

Vzhledem k tomu, že jedinci byli chováni v předchozích experimentech především v podmínkách SD, před umístěním do permanentní temnoty byli po několik dní „entrainováni“ ve standartních podmínkách dlouhého dne LD: 18L:6D, 25°C, aby bylo zajištěno, že budou pro měření pohybové aktivity dostatečně aktivní.

Jedince ze všech měřených skupin (A, B, C) s rytmickým průběhem chování jsme zamrazili pro případné další analýzy, které však nebudou předmětem této práce.

A) Testovali jsme jedince F<sub>1</sub> generace obou pohlaví z křížení rodičovských linií diapauzních (Šv) s nediapauzními (Ly, ChF). Po změření jedinců F<sub>1</sub> jsme z této generace zkřížili navzájem ty, kteří v experimentu vykazovali adekvátní pohybovou aktivitu (s měřitelnou periodou). V F<sub>2</sub> generaci těchto jedinců pohybovou aktivitu rovněž měříme (tab.IV.)

B) V F<sub>1</sub> generaci pocházející z křížení dvou nediapauzních linií (Ly, ChF) (tab.V.) jsme testovali pouze samečky. Samice byly použity k jiným pokusům.

C) Testovali jsme pouze samečky ze zpětných křížení B<sub>4</sub>/B<sub>7</sub> generace jedinců: B<sub>4</sub> (Šv x ChF) a B<sub>7</sub> (Žac x LyY.b) (tab.VI.), samice byly využity k jiným experimentům.

Tab.IV. Testování jedinci A.

Linie	♂LyY.b.	♂ChF
♀Švédsko	F <sub>1</sub> a F <sub>2</sub>	F <sub>1</sub> a F <sub>2</sub>

Tab.V. Testování jedinci B.

Linie	♂LyY.b.
♀ChF	F <sub>1</sub>

Tab.VI. Testování jedinci C.

Linie	♂LyL <sub>214</sub>	♂ChF <sub>92</sub>
♀(♀(♀(♀(♀3.g. (LyY.b x Žac.) x ♂LyY.b) x ♂LyL <sub>209</sub> ) x ♂LyL <sub>210</sub> ) x ♂LyL <sub>211</sub> ) x ♂LyL <sub>213</sub>	B <sub>7</sub>	-
♀(♀(♀(♀(♀ChF <sub>84</sub> x ♂Švédsko) x ♂ChF <sub>84</sub> ) x ♂ChF <sub>87</sub> ) x ♂ChF <sub>90</sub> ) x ♂ChF <sub>91</sub>	-	B <sub>4</sub>

Pohybovou aktivitu jsme měřili pomocí zařízení LAM - Locomotor Activity Monitor (TriKinetics Inc Waltham, MA USA) (obr.P6,7). Jedinci zde byli umístěni do měřících panelů po 32 zkumavkách délky 15 cm a průměru 2,5 cm. Každá zkumavka obsahovala pitítko s vodou na jedné straně, potravu v podobě lipových semínek uchycených v síťce umístěných na straně druhé a jednoho měřeného jedince *P.apterus* (obr. P6.). Jedinci byli ve zkumavkách uzavřeni prodyšnou sítíkou.

Pohybová aktivita jedinců byla měřena pomocí několika tří svazků infračervených paprsků (obr.P7.), které procházely přibližně středem zkumavky. Pohyb byl zaznamenáván, pokud došlo k přerušení kontinuity paprsku, způsobené proběhnutím ruměnice středem zkumavky. Pohyb měřených jedinců byl automaticky nahrán do počítače pomocí programu (DAMsystem303, TriKinetics, Inc Waltham, Massachusetts). Skupiny jednotlivých linií jedinců stejného stáří jsme měřili v několika panelech najednou přibližně po dobu 7 – 10 dnů v inkubátorech v permanentní tmě za konstantní teploty 25°C.

Naměřená data v podobě aktogramů pro jednotlivé *P. apterus* byla zpracovávána pomocí programu ImageJ s aplikací ActogramJ (Benjamin Schmid and Taishi Yoshii). Pro každou plošticí byla stanovena přibližná cirkadiánní perioda zachovávaná v permanentní tmě. Data byla následně vyhodnocena v programu Microsoft Excel.



### 3.1.5 Vliv okolí (nediapauzních jedinců) na diapauzní jedince

Do tohoto pilotního experimentu jsme zařadili jedince LyY.b., jako zástupce mutantní linie a jedince diapauzní linie Švédsko. Ruměnice z příslušných linií, vyvíjející se v podmínkách SD 12L : 12D za konstantní teploty 25°C jsme v 4.-5. instaru selektovali podle pohlaví a „smíchali“ dohromady. Dohromady jsme „míchali“ vždy samice Švédsko v kombinaci se samicemi LyY.b.. V případě, že se nám samic LyY.b. nedostávalo, využili jsme k pokusu i samce z této linie.

Následně jsme testovali jsme jejich diapauznost/nediapauznost. Pokus jsme prováděli tak, že jsme „přimíchávali“ vždy jen malé množství jedinců diapauzních mezi jedince nediapauzní. Samice/samci LyY.b. byli zastoupeni vždy v nadbytečném množství vzhledem k jedincům Švédsko, kteří se zde vyskytovali v menšině. Konkrétní poměr mezi jedinci linií LyY.b. : Švédsko byl 20:5. Ke každé směsici jedinců jsme použili čistou linii samic Švédsko, které nebyly „míchány“ s žádnou další linií a sloužily tedy jako kontrolní skupina, v níž měli všichni jedinci diapauzovat.

Pro stanovení sledované vlastnosti (diapauznosti/nediapauznosti) jsme využili jinou metodu než v předešlých pokusech. Jestli jsou jedinci diapauzní či nikoliv jsme tentokrát zjišťovali pomocí pitev jedinců samičího pohlaví (kap. 1.5) pod binolupou. Pitvy jsme prováděli pouze u jedinců samičího pohlaví cca 10 – 14 dní po té, co byli jedinci „smícháni“ dohromady, u samců jsme nezjišťovali, zda jsou diapauzní. Určení této vlastnosti na reprodukčních orgánech samců je mnohem obtížnější a mnohdy nejednoznačné.

Pitvy samic jsme prováděli následovně: ruměnici jsme narkotizovali, odstříhli jsme krovky, kutikulu jsme nastříhli podél těla na obou bocích, následně prostříhli těsně za thoraxem. Entomologickým špendlíkem jsme ruměnici připevnili na preparační misku s fyziologickým roztokem (PBS, Phosphate Buffered Saline) dorsální stranou vzhůru. Z této strany jsme ruměnici otevřeli. Odstanili jsme pinzetou střevo a tukovou tkáň. Ovária jsme pozorovali a určili, zda jsou diapauzní či nikoliv.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Křížení diapauzních linií s nediapauzními

#### 4.1.1 Určení konstituce diapauzní mutace

Jedním z našich cílů bylo určit v jaké konstituci se objevuje diapauzní mutace (zodpovědná za absenci diapauzy) u nediapauzních jedinců *P. apterus*. Je-li v recesivní nebo dominantní konstituci. Předpokládali jsme, že jedinci z mutantních linií jsou v homozygotně recesivní konstituci. Pro ověření vzájemného vztahu obou alel jsme využili metodu vzájemného křížení. Podle štěpných poměrů získaných jednotlivými zpětnými kříženími, jsme byli schopni blíže identifikovat, v jaké konstituci se mutantní plošnice vyskytovaly a jestli tedy byly potvrzeny naše hypotézy.

Vzhledem k tomu, že jsme do dalších generací křížili pouze vybrané potomstvo diapauzních samic s nediapauzními samci rodičovské linie, byla zachována schopnost diapauzovat ve všech generacích. Vlivem těchto opakovaných křížení by se měl poměr genotypů diapauzního jedince vzhledem k poměru genotypu nediapauzujícího jedince stále zmenšovat, ale neměl by vymizet úplně. Právě ta část (gen nebo geny), která zde z diapauzujících jedinců „zbyde“, by měla být pravděpodobně zodpovědná za námi zkoumanou vlastnost - diapauzovat. Díky schopnosti rekombinovat se však sledované úseky budou pravděpodobně vyskytovat na různých částech chromozomu, v různých lokusech. Některé lokusy se mohou objevovat s větší pravděpodobností a právě zde by měly být s největší pravděpodobností lokalizovány gen/geny determinující námi sledovanou vlastnost.

Pokud by se potvrdila naše hypotéza o recesivní konstituci mutace, u které jsme předpokládali monogenní charakter, byli bychom schopni v dalších experimentech identifikovat pomocí metod molekulární biologie gen/geny řídící diapauzu.

Křížením rodičovské generace (P) jsme podle našich předpokladů v dceřinné (F<sub>1</sub>) generaci získali uniformní potomstvo diapauzních jedinců, kteří nevykazovali mutantní znaky, což přispělo k potvrzení naší hypotézy o homozygotně recesivní konstituci mutace, kdy v F<sub>1</sub> získáváme uniformní potomstvo heterozygotů. Po provedení zpětných křížení s mutantní (nediapauzující) rodičovskou generací (P), pro potvrzení tohoto výsledku jsme dostali B<sub>1</sub> s příslušným zastoupením jedinců viz tab.VII.

Tab. VII. Zastoupení jedinců kladoucích/nekladoucím při zpětném křížení (B<sub>1</sub> v případě křížení č.3 - B<sub>4</sub>).

Linie	Celkem ♀/Bílá mutace	Kladoucí (nediap.) ♀/Bílá mutace	Nekladoucí (diap.) ♀/Bílá mutace	Mrtvé ♀/ Bílá mutace	Procentuální zastoupení nekladoucích ♀
1. ♀(♀(♀LyY.b x ♂Švédsko) x ♂LyY.b.	191/98	102/66	75/27	14/5	39%
2. ♀(♀(♀LyL <sub>209</sub> x ♂Toila) x ♂LyL <sub>209</sub>	138/-	78/-	59/-	9/-	43%
3. ♀(♀(♀3.g. (LyY.b x Žac.) x ♂Ly.L <sub>209</sub> ) x ♂Ly.L <sub>210</sub>	140/-	84/-	53/-	3/-	38%
4. ♀(♀(♀ChF <sub>84</sub> x ♂Švédsko) x ♂ChF <sub>84</sub>	346/-	69/-	266/-	11/-	77%
5. ♀(♀(♀3.g. (LyY.b x Žac.) x ♂ Ly.Y.b.) x ♂ Ly.Y.b.	221/88	154/67	36/12	21/9	17%
6. ♀(♀(♀Ly.Y.b. x ♂Oldřichovec) x ♂LyY.b.	96/41	71/34	10/-	15/7	10%

V B<sub>1</sub> generaci by měl, podle naší hypotézy, genotypový i fenotypový štěpný poměr odpovídat poměru 1:1, tedy polovina jedinců by měla být divoká (diapauzující) a polovina mutantní (nediapauzující). Ne všechna křížení však splnila tyto předpoklady. Za odpovídající bychom mohli označit křížení č. 1, 2 a 3.. Štěpný poměr se zde nejvíce blíží optimálnímu poměru. Výkyvy od optima mohou být způsobeny různými faktory. Pro další ověření výsledků jsme zpětné křížení opakovali a výsledné štěpné poměry navzájem porovnávali (tab.VII., VIII., IX.).

Tab.VIII. Zastoupení jedinců kladoucích/nekladoucím při zpětném křížení (B<sub>2</sub>, v případě křížení č.3 - B<sub>5</sub>).

Linie	Celkem ♀/Bílá mutace	Kladoucí (nediap.) ♀/Bílá mutace	Nekladoucí (diap.) ♀/Bílá mutace	Mrtvé ♀/ Bílá mutace	Procentuální zastoupení nekladoucích ♀
1. ♀(♀(♀(♀LyY.b x ♂Švédsko) x ♂LyY.b.) x ♂LyY.b.) x ♂LyY.b.	116/67	92/50	14/8	10/9	12%
2. ♀(♀(♀(♀LyL <sub>209</sub> x ♂Toila) x ♂LyL <sub>209</sub> ) x ♂LyL <sub>210</sub> ) x ♂LyL <sub>211</sub>	92/-	61/-	14/-	17/-	15%
3. ♀(♀(♀(♀3.g. (LyY.b x Žac.) x ♂LyY.b.) x ♂LyL <sub>209</sub> ) x ♂LyL <sub>210</sub>	287/-	213/-	40/-	34/-	14%
4. ♀(♀(♀(♀ChF <sub>84</sub> x ♂Švédsko) x ♂ChF <sub>84</sub> ) x ♂ChF <sub>87</sub> ) x ♂ChF <sub>90</sub>	416/-	27/-	359/-	30/-	86%
5. ♀(♀(♀(♀ (LyY.b x Žac.) x ♂ LyY.b.) x ♂LyY.b.) x ♂LyY.b.	106/54	77/40	22/11	7/3	21%

Tab.IX. Zastoupení jedinců kladoucích/nekladoucích při zpětném křížení (B<sub>3</sub> v případě křížení č.4, B<sub>6</sub> v případě křížení č.3) .

Linie	Celkem ♀	Kladoucí (nediap.) ♀	Nekladoucí (diap.) ♀	Mrtvé ♀	Procentuální zastoupení nekladoucích ♀
3. ♀(♀(♀(♀(♀3.g. (LyY.b. x Žac.) x ♂LyY.b.) x ♂LyL <sub>209</sub> ) x ♂LyL <sub>210</sub> ) x ♂LyL <sub>211</sub> ) x ♂LyL <sub>213</sub>	529	403	60	56	11%
4. ♀(♀(♀(♀(♀ChF <sub>84</sub> x ♂Švédsko) x ♂ChF <sub>84</sub> ) x ♂ChF <sub>87</sub> ) x ♂ChF <sub>90</sub> ) x ♂ChF <sub>91</sub>	484	60	381	43	79%

Dalšími zpětnými kříženími se ukázalo, že štěpný poměr neodpovídá předpokládanému (1:1) a s další generací se od optimálního poměru stále více odchyluje. Z tohoto výsledku lze vyvodit, že námi testovaná vlastnost není určena pouze jedním genem, jak jsme usuzovali, ale s největší pravděpodobností je určena kombinací více genů.

Zajímavým jevem je, že křížením některých linií ve stejných podmínkách dostáváme více kladoucích jedinců a u jiných linií je tomu přesně naopak, kdy získáváme více nekladoucích jedinců. Počet kladoucích jedinců je výrazně nižší v potomstvu křížení č. 3 a výrazně vyšší u křížení 1., 2., 4. a 5..

Můžeme soudit, že výkyvy na jednu, či druhou stranu mohou souviset s teplotou. Rozhodnutí jedinců, jestli klást budou nebo nikoliv by pak záviselo na teplotě, jejíž optimum by se mezi různými liniemi lišilo. Proto jsme v dalším experimentu otestovali chování jedinců v závislosti na jejich umístění do různých teplotních podmínek.

#### **4.1.1.1 Reakce na změnu teploty**

Vzhledem k výsledkům získaným z několikageneračního křížení *P. apterus* (kap. 4.1.1) byl zařazen další experiment, ve kterém jsme se pokusili otestovat, jak budou jedinci z vybraných křížení reagovat na umístění do různých teplot. Hlavním úkolem bylo zjistit, zda bude mít změna teploty vliv na diapauzu testovaných samic, jestli bude diapauzovat/nediapauzovat jiný počet jedinců než tomu bylo v podmínkách při předchozím křížení, prováděném ve standardní teplotě (kap. 3.1.2.1).

Z několikageneračního křížení jedinců diapauzních s jedinci nediapauzními jsme vybrali do tohoto pokusu pouze křížení č. 3. a 4, která jsou zastoupena dostatečně velkým počtem jedinců. Velký počet jedinců nám zaručuje jejich schopnost množit se do dalších generací s dostatečně velkým počtem potomků a je také kritériem statistické průkaznosti experimentů. Zároveň křížení č. 3 zastupuje ty linie, v jejíž potomstvu se podle našich dosavadních výsledků objevuje více kladoucích jedinců vůči nekladoucím a křížení č. 4 je linií, ve které dostáváme potomstvo opačného charakteru, tedy s větším množstvím nekladoucích jedinců ve stejných podmínkách (25°C) (kap. 4.1.1).

Předpokládali jsme, že počet kladoucích jedinců se v nižší teplotě pro křížení č.3 sníží, naopak tomu pravděpodobně bude u křížení č.4, kde jsme očekávali naopak zvýšení počtu kladoucích jedinců. Teplotu jsme se snažili vychýlit na obě strany co nejvíce to bylo

možné, nemůže však být snižována či zvyšována neomezeně. Je-li teplota příliš vysoká/nízká, jedinci nejsou schopni takovou teplotu akceptovat během svého vývoje, který v tom případě nebude probíhat správně nebo se zcela zastaví a jedinci v těchto podmínkách nepřežijí.

Ze získaných výsledků v tomto experimentu můžeme vyvodit, že změna teploty měla na chování jedinců zásadní vliv. Jejich umístění do nižších nebo vyšší teploty jednoznačně vedlo podle typu křížení ke změně počtu kladoucích/nekladoucích, jak jsme předpokládali a naše hypotézy se tedy potvrdily.

Podle tab.X. pro křížení č. 3 ( $B_7$  (Žac x Ly), jehož jedinci byli umístěni do nižší teploty ( $t_2 - 22/20^\circ\text{C}$ ) se procentuální zastoupení nekladoucích jedinců rapidně zvýšilo vůči procentuálnímu zastoupení jedinců v teplotě,  $t_1 - 25^\circ\text{C}$ , ve které byli jedinci křížení po celou dobu několikageneračního křížení. Zde  $t_1 - 25^\circ\text{C}$  sloužila jako kontrolní. Zároveň je zajímavé, že v průběhu několikageneračního křížení se v standardní teplotě ( $25^\circ\text{C}$ ) měnilo procentuální zastoupení nekladoucích jedinců mezi jednotlivými generacemi ( $B_4 - B_7$ : 38%, 14%, 11%, 10%).

Zároveň jsme zaznamenali, že v o několik stupňů snížené teplotě je vývoj jedinců od larev po dospělce výrazně pomalejší. Experimenty jsme proto museli provádět v těchto teplotních podmínkách mnohem delší dobu, aby neúplný vývin nezpůsobil zkreslení výsledků ve smyslu ještě vyššího procentuálního zastoupení nekladoucích jedinců, kteří by nekladli vajíčka ne proto, že by tato teplota u nich způsobila přechod do diapauzy, ale spíše proto, že jejich reprodukční orgány dosud nebyly plně vyvinuty.

Podle tab.XI. můžeme říci, že v případě křížení č.4 ( $B_4$  (Šv x ChF)), jehož jedinci byli umístěni do dvou odlišných vyšších teplot ( $t_2 - 27^\circ\text{C}$  a  $t_3 - 28,5/25^\circ\text{C}$ ) se procentuální zastoupení nekladoucích jedinců také rapidně snížilo ve srovnání s procentuálním zastoupením jedinců v teplotě,  $t_1 - 25^\circ\text{C}$ , ve které byla prováděna zpětná křížení přechozích generací. Zde tato teplota sloužila též jako kontrolní.

Není nám však zcela jasné proč se i v tomto případě procentuální zastoupení nekladoucích jedinců ve standardní teplotě  $25^\circ\text{C}$  (kontrolní) měnilo mezi generacemi po sobě jdoucích zpětných křížení ( $B_1 - B_4$ : 77%, 86%, 79%, 40%).

Tab.X. Počet kladoucích jedinců z křížení č.3 v závislosti na různých teplotách.

	t <sub>1</sub> - 25°C		t <sub>2</sub> - 22/20°C	
	Kladoucí (nediap.) ♀	Nekladoucí (diap.) ♀	Kladoucí (nediap.)♀	Nekladoucí (diap.)♀
3. ♀(♀(♀(♀(♀(♀3.g. (LyY.b. x Žac.) x ♂LyY.b.) x ♂LyL <sub>209</sub> ) x ♂LyL <sub>210</sub> ) x ♂LyL <sub>211</sub> ) x ♂LyL <sub>213</sub> )	120	13	18	151
Celkem jedinců/mrtvé♀	135/2		158/7	
Procentuální zastoupení nekkladoucích (diap.) ♀	10%		96%	

Tab.XI. Počet kladoucích jedinců z křížení č.4 v závislosti na různých teplotách. t<sub>2</sub> je oproti ostatním t výrazně méně zastoupena, což bylo zapříčiněno počáteční chybou inkubátoru, která byla odstraněna až v průběhu pokusu, čímž jsme ztratili některé jedince.

	t <sub>1</sub> - 25°C		t <sub>2</sub> - 27°C		t <sub>3</sub> - 28,5/25°C	
	Kladoucí (nediap.) ♀	Nekladoucí (diap.) ♀	Kladoucí (nediap.) ♀	Nekladoucí (diap.) ♀	Kladoucí (nediap.) ♀	Nekladoucí (diap.) ♀
4. ♀(♀(♀(♀(♀(♀ChF <sub>84</sub> x ♂Švédsko) x ♂ChF <sub>84</sub> ) x ♂ChF <sub>87</sub> ) x ♂ChF <sub>90</sub> ) x ♂ChF <sub>91</sub> )	264	186	118	3	350	22
Celkem jedinců/mrtvé ♀	468/18		143/22		416/44	
Procentuální zastoupení nekkladoucích (diap.) ♀	40%		2%		5%	

## 4.1.2 Měření kritické fotoperiody - světelný gradient

Měřením jsme byli schopni najít minimální kritickou délku dne, která je rozhodující pro ukončení diapauzy jedinců, a to tak, že jsme sledovali při kolika hodinách světla již začínají jedinci klást vajíčka, což je pro nás příslušným signálem.

V experimentem jsme se pokusili stanovit, jak se liší kritická fotoperioda jedinců z čistých diapauzních a nediapauzních linií vůči jedincům  $F_1$  generací pocházející z P diapauzní x nediapauzní.

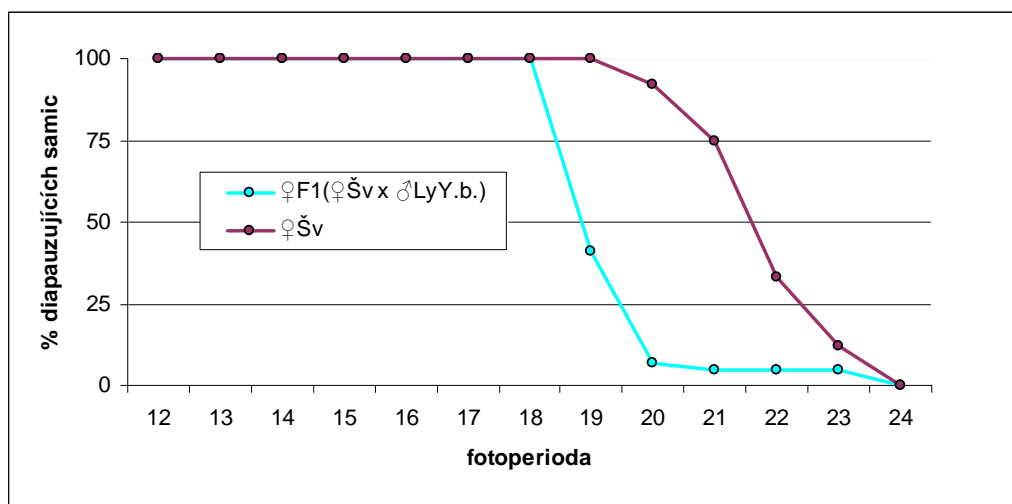
V případě nediapauzních linií délka dne nemá na jejich nediapauzní chování vliv a jedinci z těchto linií kladou stále bez ohledu na světelné podmínky. Tyto údaje jsme doplnili o naměřená data u  $F_1$  generace linií křížených podle tab.IV. Mohli jsme tak sledovat, jak se budou získané křivky navzájem lišit. Jako kontrola ke každému měření byla použita čistá linie samic Švédsko.

Získané grafy popisují chování *P. apterus* v podmínkách světelného gradientu. Byli měřeni jedinci  $F_1$  z ( $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  x  $\text{♂}\text{LyY.b.}$ ),  $F_1$  z ( $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  x  $\text{♂}\text{ChF}$ ) a kontrolními jedinci  $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  (graf 2., 3.).

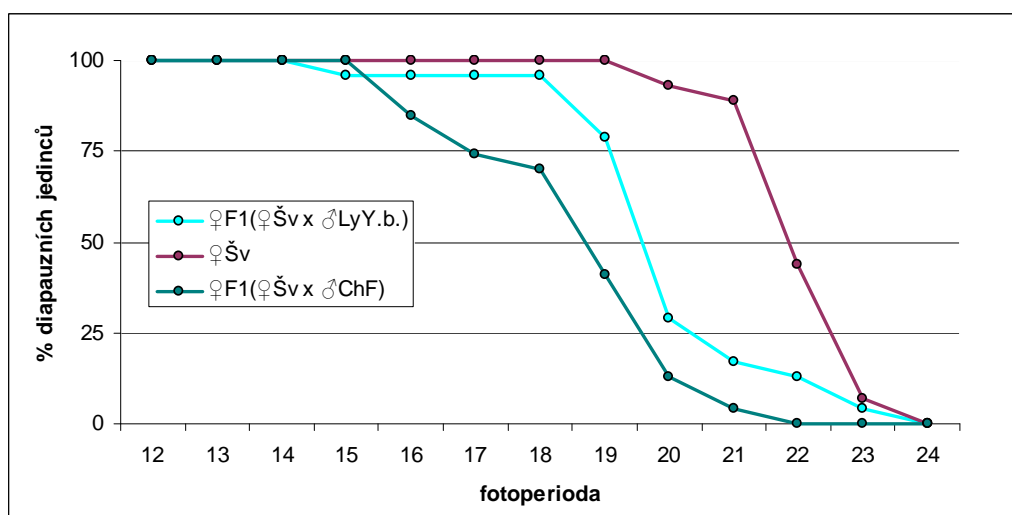
Průběh křivek pro jedince z týž křížení vychází v obou grafem obdobně s malými odchylkami, ty mohou být zapříčiněny celkově nižším počtem sledovaných jedinců v experimentu. Jedinci  $F_1$  z ( $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  x  $\text{♂}\text{ChF}$ ) ukončují diapauzu nejdříve, po nich následují  $F_1$  z ( $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  x  $\text{♂}\text{LyY.b.}$ ) a s největší časovou prodlevou reagují na prodlužující se den  $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$ . Kritická fotoperioda (délka dne, při níž dochází u 50% jedinců k terminaci diapauzy) byla stanovena :

- u kontrolních jedinců  $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  - 22h světla podle obou grafů
- u  $F_1$  z ( $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  x  $\text{♂}\text{LyY.b.}$ ) se kritická perioda mezi grafy o hodinu liší – graf 2. – 19h, graf 3. – 20h světla
- $F_1$  z ( $\text{♀}\check{\text{S}}\text{v}$  x  $\text{♂}\text{ChF}$ ) – 19h světla





Graf 2. Procentuální zastoupení diapauzujících samic v závislosti na počtu hodin světla (délce dne).



Graf 3.. Procentuální zastoupení diapauzujících samic v závislosti na počtu hodin světla (délce dne).

## 4.2 Křížení dvou nediapauzních linií navzájem

Křížili jsme dvě nediapauzní linie navzájem a u jejich potomstva ( $F_1$ ) sledovali, jestli bude vykazovat převážně nediapauzní nebo naopak diapauzní chování. Pokud by jedinci v  $F_1$  vykazovali chování diapauzní, bylo by to pro nás signálem k tomu, že mutace je dána více geny. Pokud by chování bylo naopak nediapauzní signalizovalo by to mutaci ve stejných genech.

Křížení ukázalo, že ho nelze provádět z neznámých důvodů obousměrně. V kombinaci ♀ChF x ♂LyY.b. křížení probíhá normálně, po páření jedinci kladou vajíčka, ze kterých se následně líhnou potomci. Avšak v kombinaci ♀LyY.b. x ♂ChF se jedinci sice páří, ale nekladou vajíčka a záhy umírají. Přestože jsme křížení v tomto směru několikrát opakovali, výsledek byl vždy stejný a nepodařilo se nám v tomto případě získat jedince F<sub>1</sub> generaci.

Podle výsledků uvedených v tab.XII. jsme křížením dvou nediapauzních rodičů v F<sub>1</sub> generaci získali sice většinu potomků rovněž nediapauzního charakteru chování, ale výsledky nelze označit za jednoznačné. Jedince vykazující opačné chování jsme se pokusili zpětně zkřížit s rodičovskou linií obou typů, aby se potvrdila jejich diapauznost, avšak B<sub>1</sub> se nám v tomto případě nepodařilo získat. Vzhledem k nejednoznačnosti výsledku, nemůžeme říci se jedná o mutaci v totéž geny nebo v různých genech.

Možnou příčinou tohoto výsledku by mohl být fakt, že jedinci nediapauzní by mohli nějakým způsobem ovlivňovat pohlavní aktivitu jinak diapauzních jedinců. Případný vliv nediapauzních jedinců se v jednom z následujících experimentů pokusíme otestovat.

Tab.XII. Zastoupení počtu kladoucích/nekladoucím jedincům v F<sub>1</sub> generaci získané křížením dvou nediapauzních linií navzájem.

Linie	Celkem ♀	Kladoucí (nediapauzní) ♀	Nekladoucí (diapauzní) ♀	Mrtvé ♀	Procentuální zastoupení nediapauzních (kladoucích) ♀
F <sub>1</sub> z (♀ChF x LyY.b)	226	161	47	18	71%

### 4.3 Měření pohybové aktivity v permanentní temnotě

Již v dřívějších studiích bylo potvrzeno, že *P. apterus* jsou schopné udržovat cirkadiánní rytmy i v případě, že jsou umístěny do permanentní temnoty (Hodková *et al.*, 2003). I my jsme v naší laboratoři testovali, zda bude cirkadiánní rytmicitata zachována po určitou dobu i v podmínkách permanentní temnoty a zda se bude cirkadiánní perioda

blízká 24 hodinám vychylovat od optima (prodlužovat, zkracovat) v závislosti na křížení, ze kterých měření jedinci pocházeli.

Vybrané čisté linie již byly měřeny v dříve prováděných experimentech - Ly.Y.b., Žac, Šv, ChF. Tato naměřená data jsme využili pro porovnání s našimi stávajícími měřeními, konkrétně s  $F_{1a2}$  (Šv x LyY.b.),  $F_{1a2}$  (Šv x ChF). Bude-li se chování čistých linií lišit od chování  $F_1$  a  $F_2$  generace, pravděpodobnou příčinu je třeba hledat v nediapauzní linii, neboť diapauzní rodič zůstává stejný (Šv) a diapauzní se mění. Proto použité nediapauzní linie (Ly.Y.b a ChF) křížíme rovněž mezi sebou za zisku  $F_1$  (LyY.b. x ChF). Chování potomků z křížení dvou nediapauzních jedinců porovnáváme spolu s předešlými kříženími ( $F_1$  (Šv x LyY.b.),  $F_1$  (Šv x ChF)).

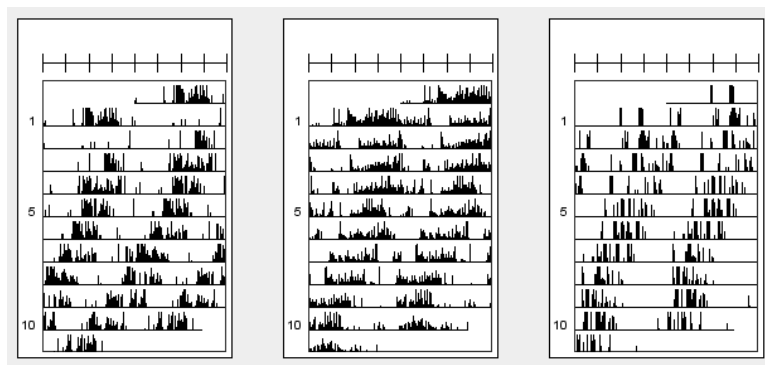
Další měřenou skupinu představují  $B_4$  (Šv x ChF) a  $B_7$  (Žac x LyY.b.) pocházející z několikageneračního křížení ( tab .I.) (3.1.2.1), kteří byli navíc v pokusu v kap. 3.1.2.1.1 umístěni do různých teplot. I tato data byla porovnávána s dříve naměřenými daty pro čisté linie (Žac, ChF, LyY.b.), přičemž jsme sledovali, zda se opakovanými zpětnými kříženími diauzních jedinců s nediapauzními po několik generací nevysegregovali jedinci, kteří by byli svým chováním podobní některému z rodičů parentální generace. Právě proto, že diapauzní potomci v každém křížení byli do dalších generací opakovaně kříženi s jedinci nediapauzními, mohla by se u  $B_4$  (Šv x ChF) a  $B_7$  (Žac x LyY.b.) projevit podobnost s odpovídajícím typem diapauzního rodiče. Pokud bychom k takovému výsledku dospěli, jednalo by se o velmi cennou informaci. Dokázali bychom tak, že za řízení diapazy je zodpovědná ta samá část genomu (tytéž geny) jako ta, která řídí cirkadiánní rytmy, tedy že opakovaným zpětným křížením diapauzních potomků s nediapauzním rodičem došlo k “vyředění genomu”, tedy části řídící jak diapauzu, tak i cirkadiánní rytmy a že právě tato část zodpovídá za korelaci chování zpětně křížených jedinců s diapauzní čistou linií týž jedinců.

Následující grafy byly sestaveny z hodnot cirkadiánních period ruměnic, které jsme odečítali z aktogramů stanovených pro jednotlivé ploštice. Grafy popisují cirkadiánní chování jedinců z různých křížení po umístění do permanentní temnoty. V závislosti na typu křížení někteří jedinci cirkadiánní periodu blízkou 24 hodinám podle naměřených dat zachovávali, jiní ji nepatrně prodlužovali, další naopak zkracovali.

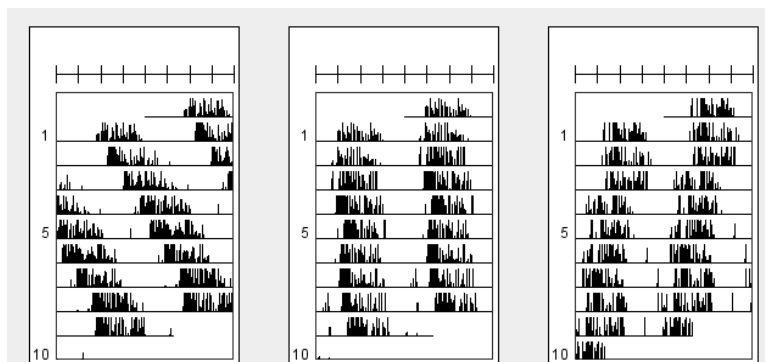
Porovnáme-li mezi sebou křivky rodičovských linií – Šv a LyY.b, liší se udržovanou cirkadiánní periodou. Jedinci lyonské linie optimální periodu výrazně zkracovali, švédská linie ji naopak prodlužovala. V  $F_1$  generaci pocházející z křížení těchto jedinců, vidíme, že výsledný fenotyp potomků se od rodičovských lišil. Jedinci  $F_1$

udržovali cirkadiánní periodu právě někde na pomezí mezi rodičovskými fenotypy, přičemž nejvíce jedinců udržovalo periodu 23,4h. To naznačuje, že znak zodpovědný za udržování cirkadiánní periody není ani dominantní ani recesivní (žádnému rodičovskému fenotypu se nepodobá). Můžeme zvažovat dvě varianty, buď je vztah obou alel daného genu v kodominanci a u potomků se projevuje alela obou rodičů nebo je do řízení cirkadiánní odpovědi zapojeno více genů.

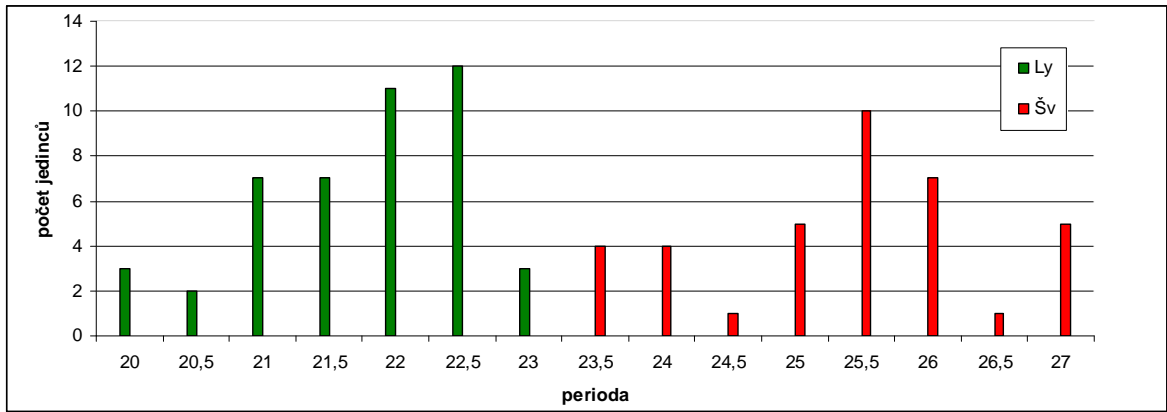
Ruměnice z  $F_1$  (Šv x LyY.b.) jsme křížili i do další generace, čímž jsme získali  $F_2$  (Šv x LyY.b.). Z grafu pro  $F_2$  je patrné, že chování těchto jedinců přibližně odpovídá chování též jedinců v  $F_1$  generaci ( $F_1$  (Šv x LyY.b.)), porovnáme-li nejčastěji naměřenou cirkadiánní periodu, v případě  $F_1$  generace - 23,4h, v  $F_2$  generaci - 23,3h, můžeme je označit za téměř shodné. To, čím se grafy 5., 6. pro  $F_1$  a  $F_2$  generaci liší, je rozložení zastoupených různých cirkadiánních period na ose x. Z grafu 6. vidíme, že v  $F_2$  generaci jedinci zachovávali širší rozmezí různých cirkadiánních period včetně krajních minim a maxim. Domníváme se, že jedinci udržující periody v těchto krajních hodnotách by se svým genotypem pravděpodobně mohli podobat více jedincům té či oné rodičovské generace. Tedy, že jedinci udržující kratší periodu jsou podobnější rodiči LyY.b. a naopak jedinci zachovávající delší periodu jsou podobnější rodiči Šv.



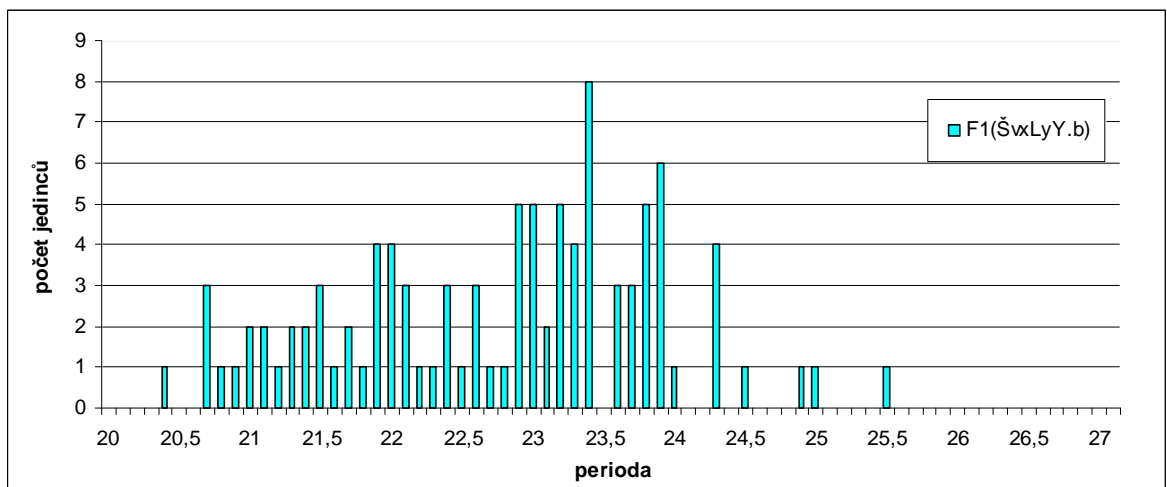
Obr.2. Získané aktogramy pro  $F_1$ (Šv x LyY.b.) –  
převažuje kratší perioda.



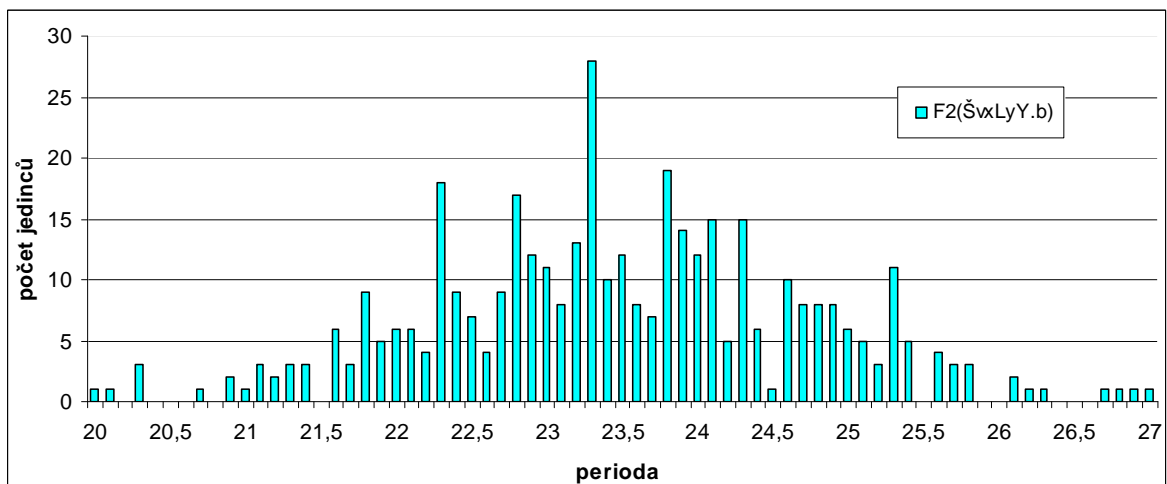
Obr.3. Získané aktogramy pro  $F_2$  (Šv x LyY.b.) –  
zastoupeny všechny periody (kratší, dešší i 24h).



Graf 4. Zachování cirkadiálních rytmů rodičovských linií Ly a Šv v permanentní temnotě.



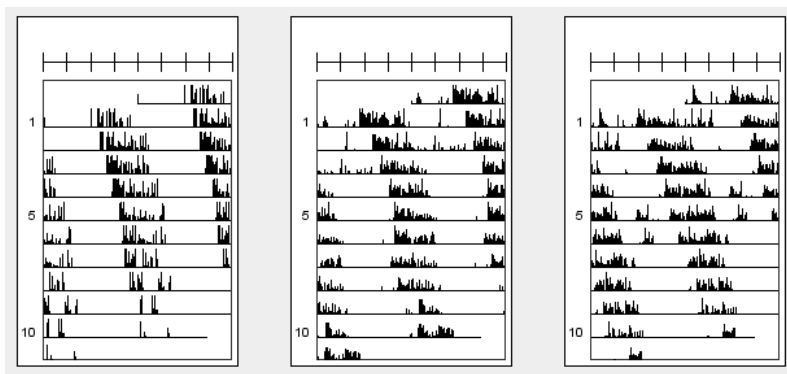
Graf 5. Zachování cirkadiálních rytmů F<sub>1</sub> generace získané křížením diapauzní a nediapauzní rodičovské linie (Šv x Ly Y.b.) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.



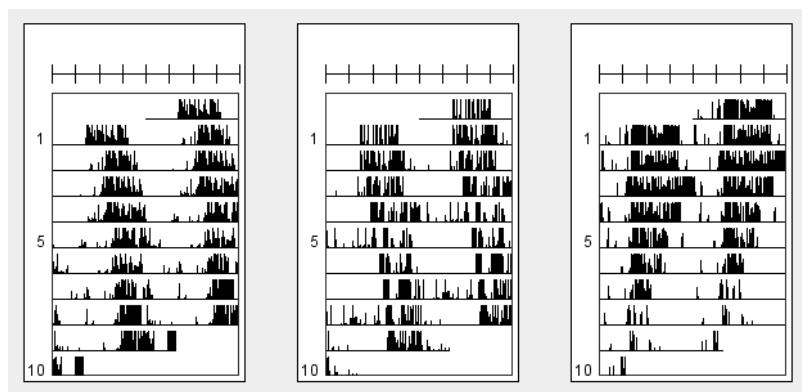
Graf 6. Zachování cirkadiálních rytmů F<sub>2</sub> generace získané křížením rodičovské linie diapauzní s nediapauzní (Šv x Ly Y.b.) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.

Porovnáme-li mezi sebou křivky rodičovských linií Šv a ChF, příliš se od sebe zachovávanou cirkadiánní periodou neliší. V F<sub>1</sub> generaci vzniklé křížním těchto jedinců, sledujeme, že výsledný fenotyp potomků se od rodičovských linií také neliší. Největší počet jedinců F<sub>1</sub> udržoval cirkadiánní periodu mezi hodnotami 24,4h a 25,6h, nejčastější periodu nelze jednoznačně určit. Příčinou nejednoznačnosti periody může být nižší počet měřených jedinců.

Jedince F<sub>1</sub> jsme opět i v tomto případě křížili do další generace, čímž jsme získali F<sub>2</sub> (Šv x ChF). Podle grafu 9. se jedinci F<sub>2</sub> chovají podobným způsobem jako F<sub>1</sub> generace téhož křížení. Nejastěji naměřená hodnota cirkadiánní periody byla stanovena v přibližně stejném rozmezí, a to mezi hodnotami 24,2 a 24,9h. Grafy 8., 9. F<sub>1</sub> a F<sub>2</sub> se i zde vzájemně liší zastoupením různých cirkadiánních period. Zdá se, že i zde je pravděpodobné, že jedinci zastupující minimální a maximální hodnoty genotypově odpovídají rodičům (minimum - rodič Šv, maximum - rodič ChF).

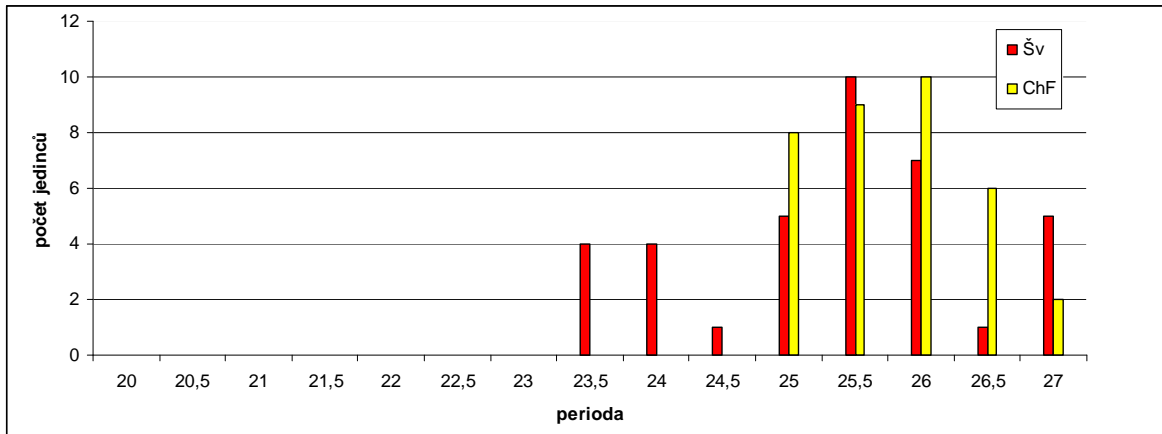


Obr.4. Získané aktogramy pro  $F_1$  (Šv x ChF) – převažuje delší perioda.

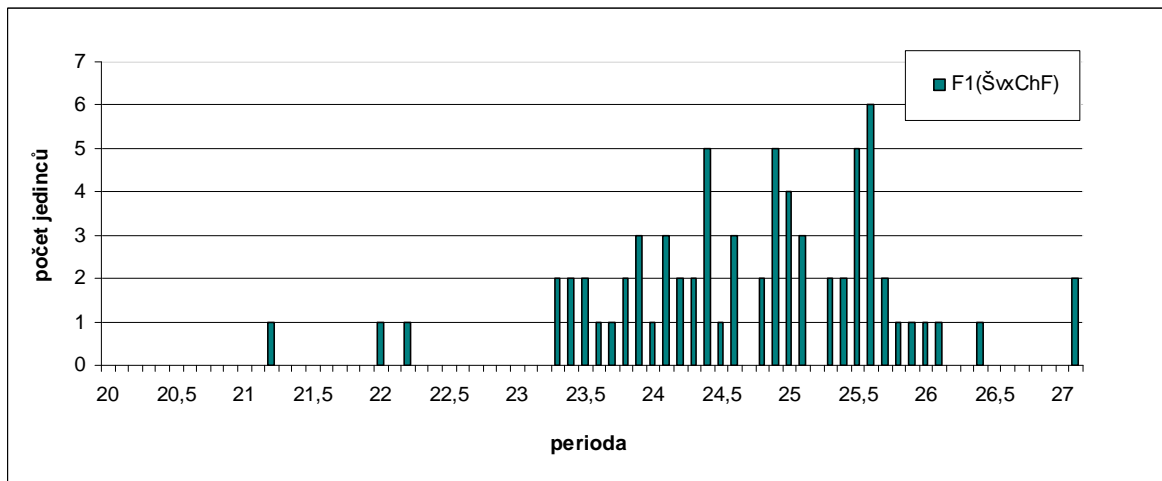


Obr.5. Získané aktogramy pro  $F_2$  (Šv x ChF) – zastoupeny všechny periody.

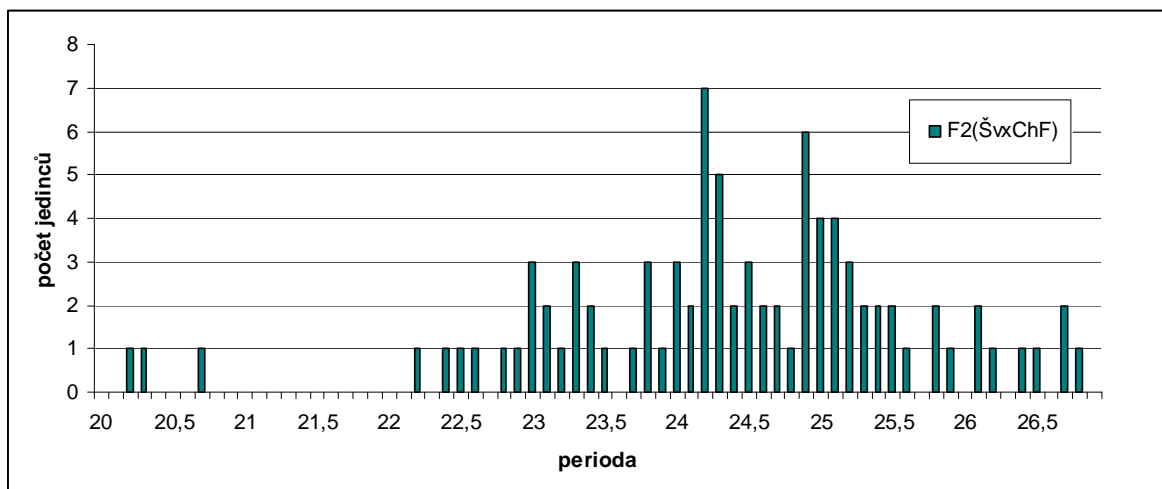




Graf 7. Zachování cirkadiálních rytmů rodičovských linií Šv a ChF v permanentní temnotě.

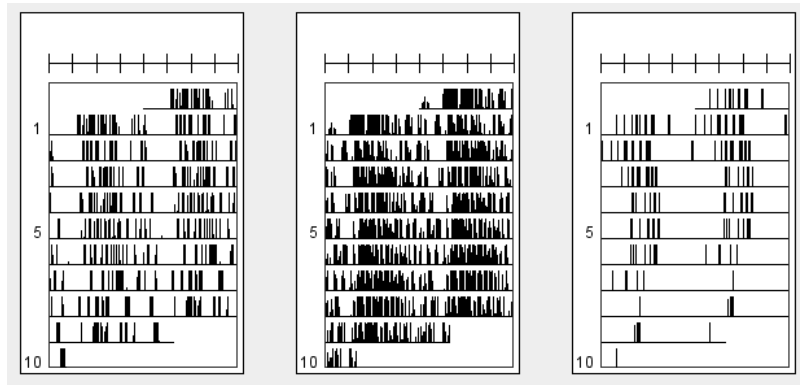


Graf 8. Zachování cirkadiálních rytmů F<sub>1</sub> generace získané křížením diapauzní a nediapauzní rodičovské linie (Šv x ChF) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.

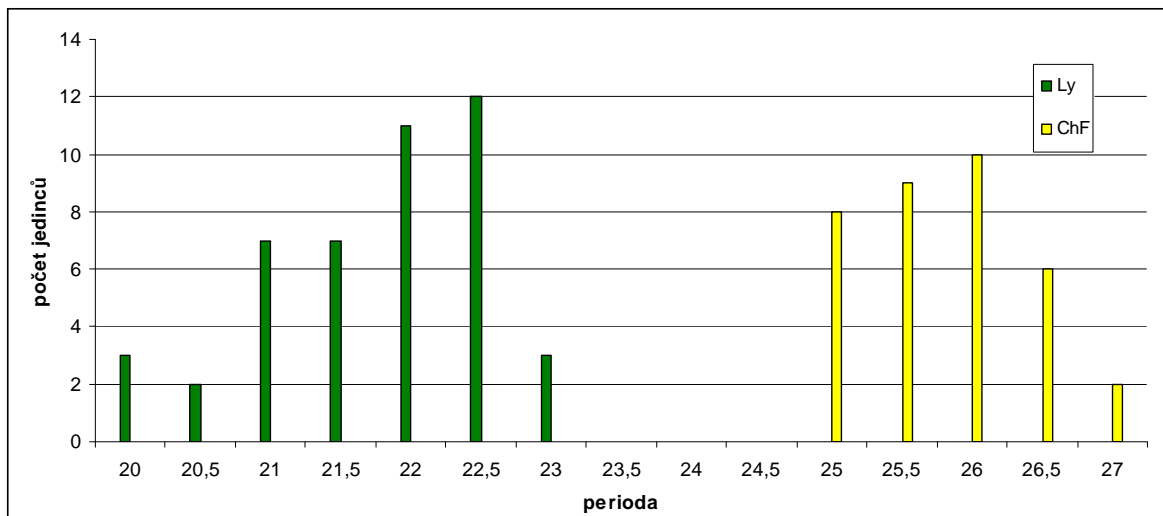


Graf 9. Zachování cirkadiálních rytmů F<sub>2</sub> generace získané křížením rodičovské linie diapauzní s nediapauzní (Šv x ChF) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.

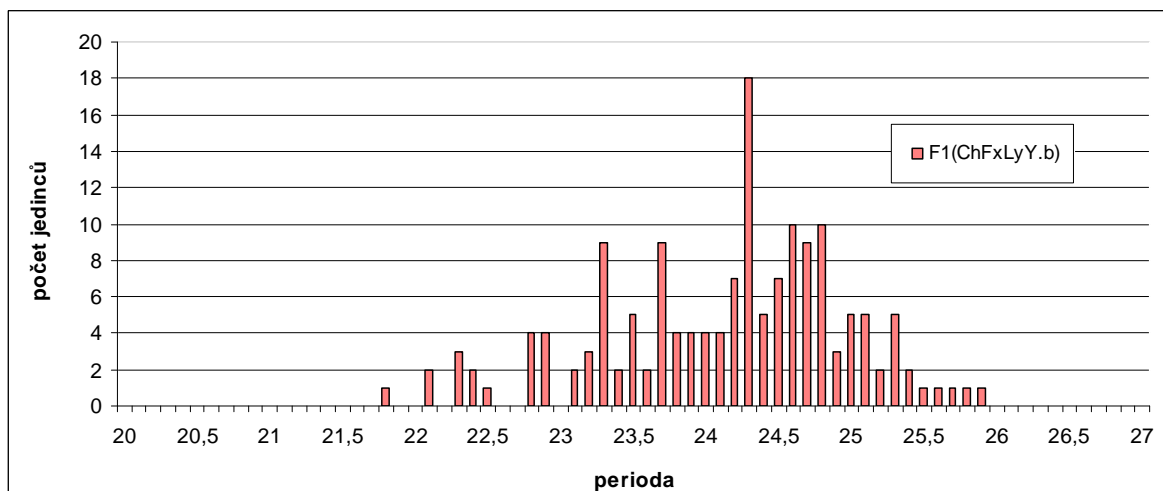
Sledovali jsme i chování nediapauzních rodičů, zaznamenali jsme, že linie lyonská má výrazně kratší periodu než linie chelčická. Vzájemným křížením jsme získali  $F_1$  (ChF x LyY.b). Jak jsme očekávali tito jedinci udržovali cirkadiánní periodu opět právě někde mezi hodnotami pro rodičovské linie. Nejvíce jedinců zachovávalo cirkadiánní periodu 24,3h.



Obr.6. Získané aktogramy pro  $F_1$  (ChF x LyY.b.) – zastoupeny převážně periody cca 24h.



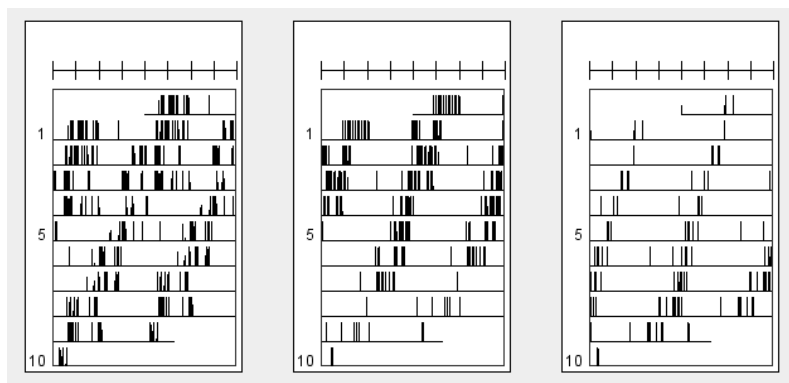
Graf 10. Zachování cirkadiálních rytmtů rodičovských linií LyY.b. a ChF v permanentní temnotě.



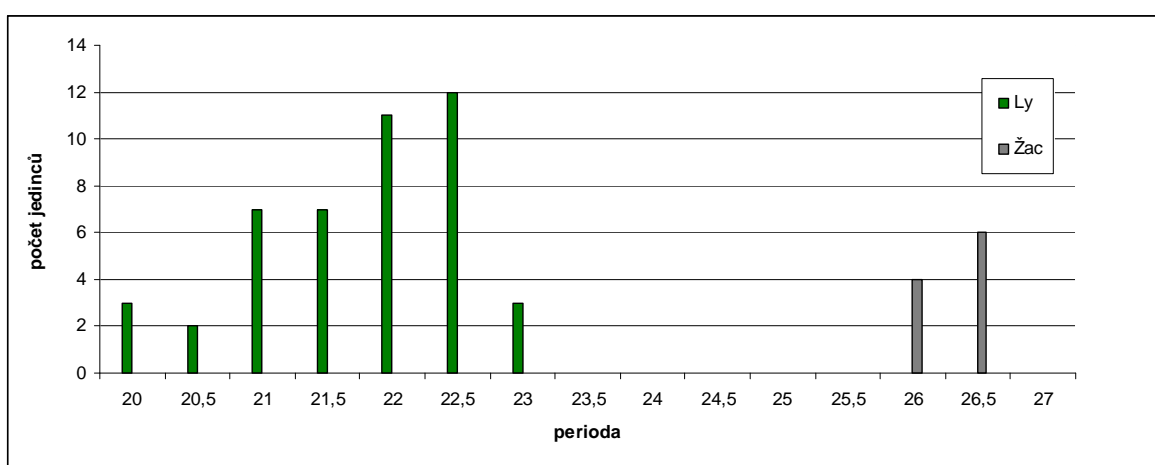
Graf 11. Zachování cirkadiálních rytmtů  $F_1$  generace získané křížením dvou nediapauzních rodičovských linií (ChF x LyY.b) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.

Naměřená data z poslední sledované skupiny, B<sub>4</sub> (Šv x ChF) a B<sub>7</sub> (Žac x LyY.b.) pocházející z několikageneračního křížení, jsme se pokusili porovnat, jak již bylo řečeno s již dříve získanými daty pro čisté linie. Sledovali jsme, zda lze odhalit podobnost v chování B<sub>7</sub>(Žac x LyY.b.) s některou odpovídající rodičovskou linií. V případě B<sub>4</sub> (Šv x ChF) podobnost s některou z rodičovských linií porovnávat nemůžeme, protože jsou si rodičovské linie svým chováním příliš podobné.

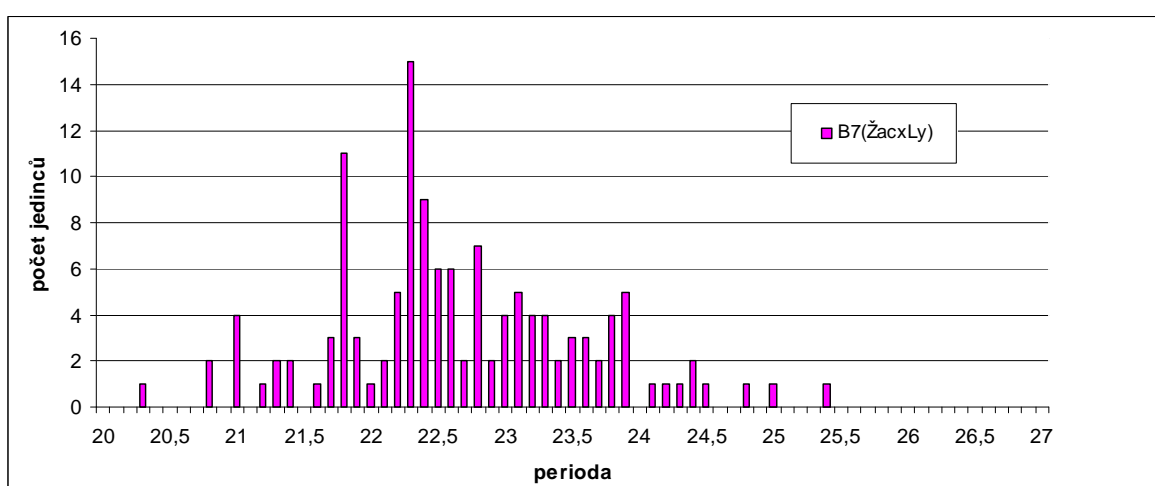
Získaná data ukazují, že jedinci B<sub>4</sub>(Šv x ChF) se svým chováním podobají spíše nediapauzní rodičovské linii (ChF). Naše předpoklady v tom smyslu, že by se mohli opakovanými zpětnými kříženími diauzních jedinců s nediapauzními vysegregovat jedinci, kteří by byli svým chováním podobní rodičovskému fenotypu se nepotvrdili.



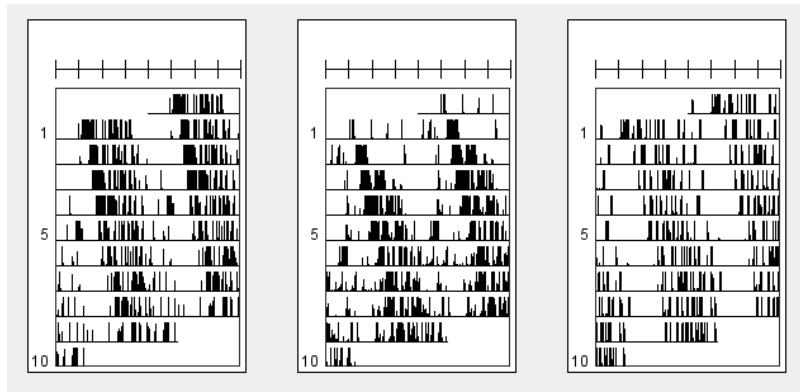
Obr.7. Získané aktogramy pro B<sub>7</sub> (Žac x LyY.b.) –  
převažuje kratší perioda.



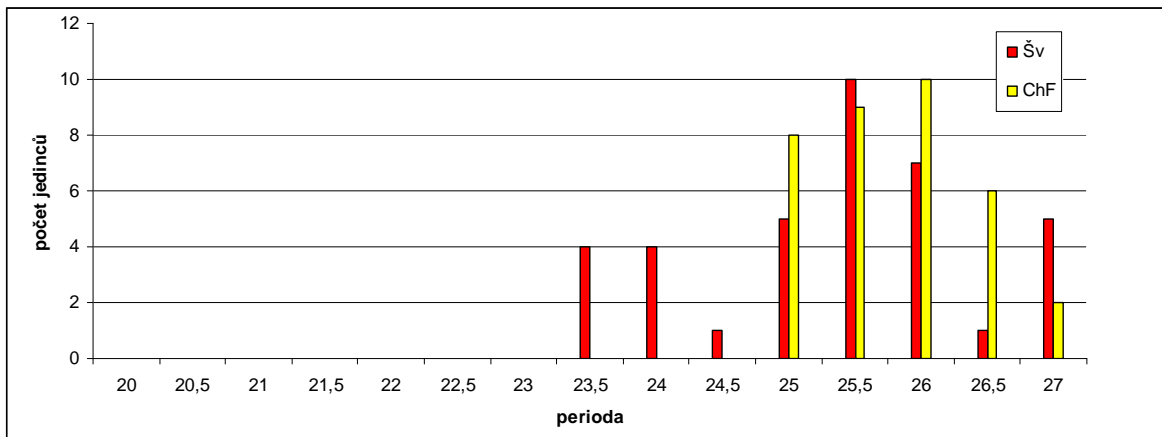
Graf 12. Zachování cirkadiánních rytmů rodičovských linií LyY.b. a Žac v permanentní temnotě.



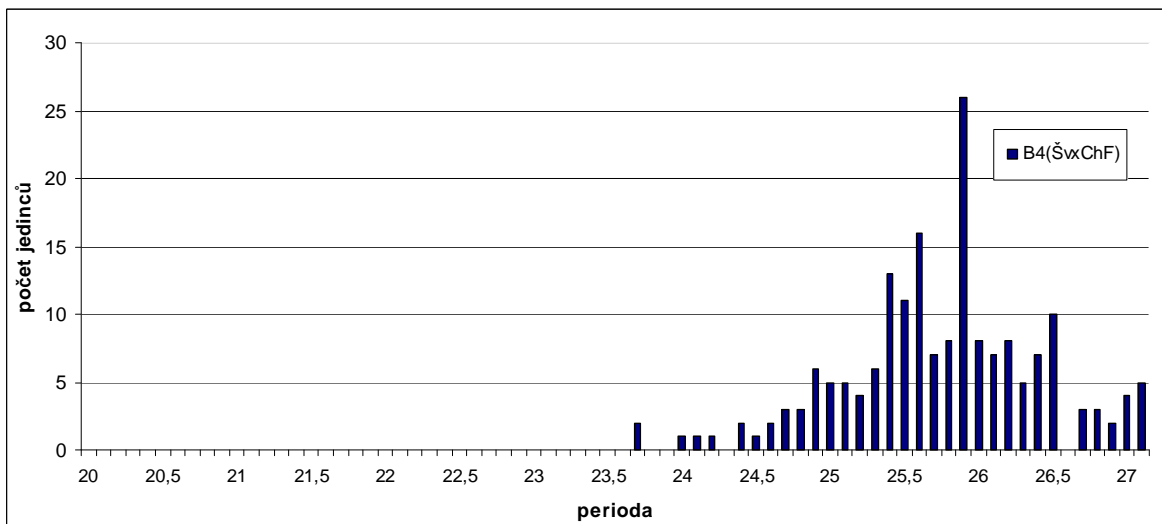
Graf 13. Zachování cirkadiánních rytmů B<sub>7</sub> rodičovských linií (Žac x Ly) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.



Obr.8. Získané aktogramy pro B<sub>4</sub> (Šv x ChF) – převažuje delší perioda.



Graf 14. Zachování cirkadiálních rytmů rodičovských linií Ly Y.b. a Žac v permanentní temnotě.



Graf 15. Zachování cirkadiálních rytmů B<sub>4</sub> rodičovských linií (Šv x ChF) v permanentní temnotě. Závislost počtu jedinců na délce periody.

## 4.4 Vliv okolí (nediapauzních jedinců) na diapauzní jedince

Vzhledem k nejednoznačným výsledkům testování fenotypu potomků dvou nediapauzních rodičů, jsme uvažovali o tom, zda nemůže docházet k ovlivnění chování jedinců diapauzních jedinci nediapauzními. Vlivem mutantních rumenic by mohlo docházet k "nastartování" pohlavní aktivity u jedinců jinak diapauzních v podmínkách SD, ve kterých není pohlavní aktivita jinak přípustná. K otestování tohoto jevu jsme do této práce zařadili pilotní experiment, který by měl situaci objasnit.

Z dosavadních výsledků viz tab XIII. se zdá, že přítomnost diapauzních samic mezi nediapauzními samicemi v podmínkách SD nemá na "nastartování" pohlavní aktivity jinak diapauzních samiček vliv.

Pouze v případě, že se diapauzní samice vyskytovaly společně s nediapauzními samečkami, byli samci schopni se s těmito nediapauzními samičkami aktivně pářit ve velkém množství. Pitvy těchto samic však ukázaly, že přestože se jedinci pářili, ovária diapauzních samic zůstala nadále v diapauzním stavu a páření na ně tedy nemělo vliv. Bylo zjištěno, že samice jsou v tomto případě schopny přezimovat a uchovat si životaschopné spermie. Po nástupu příznivého období pak dochází produkci potomstva bez nutnosti dalšího páření (Socha, 2010).

Tab.XIII. Vliv nediapauzních jedinců na diapauzní.

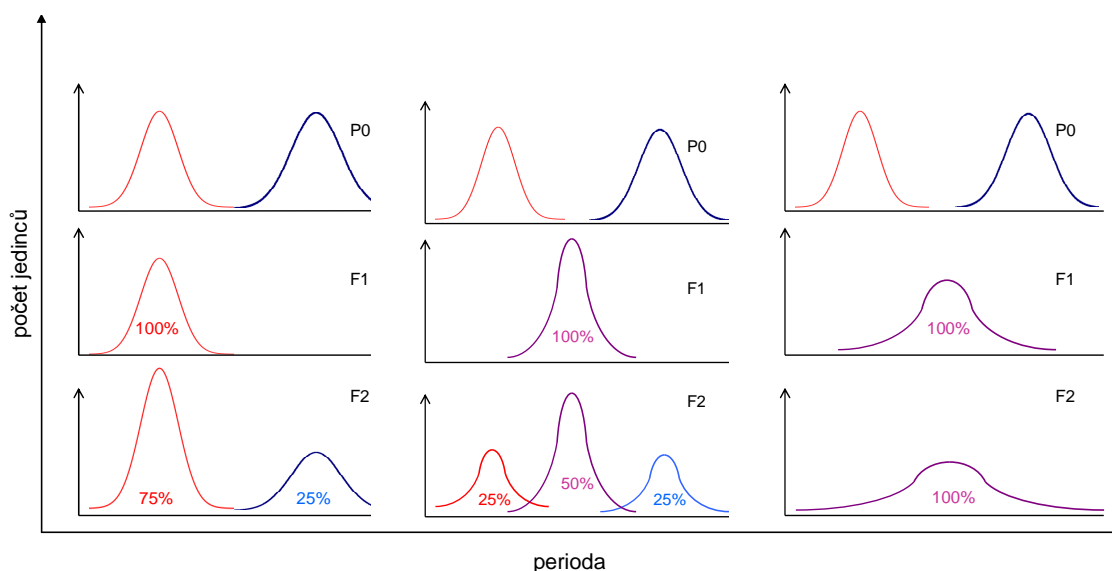
	Celkem ♀ Švédsko	♀ Švédsko nediap./diap.	♀ Švédsko kontrola nediap./diap.	Celkem ♀LyY. b	Celkem ♂LyY. b	♀ Ly Y.b. nediap./dia p
♂ Ly Y.b. (nediap.) + ♀ Švédsko (diap.)	24	2/22	-/46	-	100	-
♀ Ly Y.b. (nediap.) + ♀ Švédsko (diap.)	22	1/24		116	-	116/-

## 5. DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na charakterizaci cirkadiánních a fotoperiodických hodin dvou nediapauzních (mutantních) a několika divokých linií *P. apterus*. Podařilo se nám ukázat, že jednotlivé kmeny se liší v periodě, se kterou se zachovává pohybová aktivita dospělců v konstantních podmínkách v permanentní temnotě. Toto zjištění bylo slibné zejména ve světle publikací charakterizujících nediapauzní mutaci v mušce *Chymomyza costata* (Stehlík *et al.*, 2008), kde se ukázalo, že fotoperiodický fenotyp koreluje se ztrátou cirkadiánního chování (Kobelková *et al.*, 2010; Kostal, Shimada, 2001). I v několika dalších případech byla popsána změna v diapauzní odpovědi korelující s poruchou čtyřadvacetihodinové rytmicity: samovolná mutace u masařky způsobuje opět arytmicitu a zároveň neschopnost diapauzovat (Han, Denlinger, 2009a; Han, Denlinger, 2009b). Vypnutí cirkadiánních genů pomocí RNA interference u plošnice *Riptortus pedestris* vede jak k rozbití periodického růstu kutikuly, tak k dopadu na diapauzní odpověď (Ikeno *et al.*, 2011a; Ikeno *et al.*, 2011b; Ikeno *et al.*, 2010). V případě ruměnic se mutantní linie Lyon výrazně odlišovala svou periodou jak od divokých (diapauzu nastupujících) linií (Švédsko), tak od druhé nediapauzní linie Chelčice (graf 4, 10, 11). Těchto vlastností můžeme využít a sledováním chování kříženců těchto linií pak odvozovat, jakým způsobem je cirkadiánní aktivita děděna.

Existují tři teoretické varianty cirkadiánní odpovědi kříženců, které by měly odlišovat fenotypy jedinců v  $F_1$  a  $F_2$  generacích:





Obr.9. Možné varianty cirkadiánní odpovědi v  $F_1$  a  $F_2$  generacích.

Vlevo, rozdíl mezi dvěma liniemi je způsoben jedním genem, přičemž krátká (červená) perioda je dominantní, proto budou všichni jedinci v  $F_1$  generaci (červená) vykazovat fenotyp shodný s jednou rodičovskou linií. V  $F_2$  generaci pak budou fenotypy segregovat v poměru 3:1 (červená:modrá). Prostřední obrázek, rozdíl je opět způsobený jedním genem, přičemž kombinace (u heterozygota) způsobuje intermediální fenotyp (fialová) (všichni jedinci  $F_1$  generace), v  $F_2$  generaci pak získáme tři fenotypické skupiny, segregující v poměru 1:2:1 (červená:fialová:modrá). Třetí možnost (vpravo), rozdíl mezi dvěma liniemi je způsoben více geny, přičemž jejich účinek na fenotyp je aditivní. V případě aditivního efektu více genů mohou být některé dominantní, jiné recesivní a pak bude situace kombinací (fialová).

Která z nastíněných variant splňuje naše získaná data? Podle získaných grafů, můžeme 1. variantu spíše vyloučit a upřednostnit variantu 3 – kombinaci vlivu více genů.

Vzhledem k tomu, že jsme jedince v  $F_2$  generacích zamrazovali, můžeme dalšími experimenty hledat konkrétní gen, popřípadě geny zodpovědné za danou variabilitu v  $F_2$  a tím správnou variantu specifikovat blíže. Experimentem, který by mohl rozhodnout o tom, která ze zbývajících variant je ta správná by testoval jedince krajních fenotypů (s nejkratší a nejdelší periodou), které jsme získali v  $F_2$ . Pokud bychom u jedinců, kteří udržovali v  $F_2$  krátkou periodu našli geny shodující se s odpovídající rodičovskou linií, která udržovala také krátkou periodu a stejně tak pro jedince v  $F_2$ , kteří udržovali periody nejdelší, potvrdila by se varianta 2.

Zároveň jsme testovali cirkadiánní chování dvou nediapauzních linií (ChF, Ly), které se lišily svým fenotypem (stejně jako diapauzní a nediapauzní), jeden měl cirkadiánní chování kratší periody, druhý naopak delší. Tyto rodičovské linie jsme zkřížili a sledovali vývoj dalšího chování. Kříženci vykazovali obdobné chování jako F<sub>1</sub> varianty 2/3 křížení diapauzního jedince s nediapauzním, zachovávala cirkadiánní periody na hranici mezi oběma rodiči a ani jednomu z rodičů se nepodobaly. Do F<sub>2</sub> jsme v křížení však nepokračovali, jen těžko můžeme předpokládat, jak by jedinci vypadali. Pravděpodobně by chování vykazovalo stejné charakteristiky jako v předchozím případě varianty 2/3 (křížení diapauzního jedince s nediapauzním).

Měření cirkadiánní periody zachovávané v permanentní temnotě u jedinců ze série zpětných křížení nepotvrdila, že by se jimi vysegregovali jedinci, kteří by charakterem svého chování odpovídali diapauznímu rodiči. Výsledky ukazují, že se naopak podobají rodiči nediapauznímu. Znamená to, že do řízení cirkadiánních a fotoperiodických jevů jsou zapojeny jiné řídicí prvky.

Další experiment zaměřený na zisk štěpných poměrů ve zpětných kříženích a stanovení konstituce diapauzní mutace ukázal, že štěpné poměry nejsou v opakovaných zpětných kříženích zachovávány. Snažili jsme se proto nalézt možnou příčinu. Variant, proč štěpné poměry neodpovídaly předpokládaným 1:1 (křížíme-li jedince homozygotně recesivního s dominantním) je několik:

1. Neodpovídající štěpné poměry by mohly být způsobeny vlivem okolních ploštic, tedy rozhodne-li se k reprodukci více jedinců, by teoreticky mohlo nějakým způsobem ovlivnit i rozhodnutí ostatních (Levine, 2002). Tuto teorii jsme však vyvrátili v pilotním experimentu (kap.4.4).

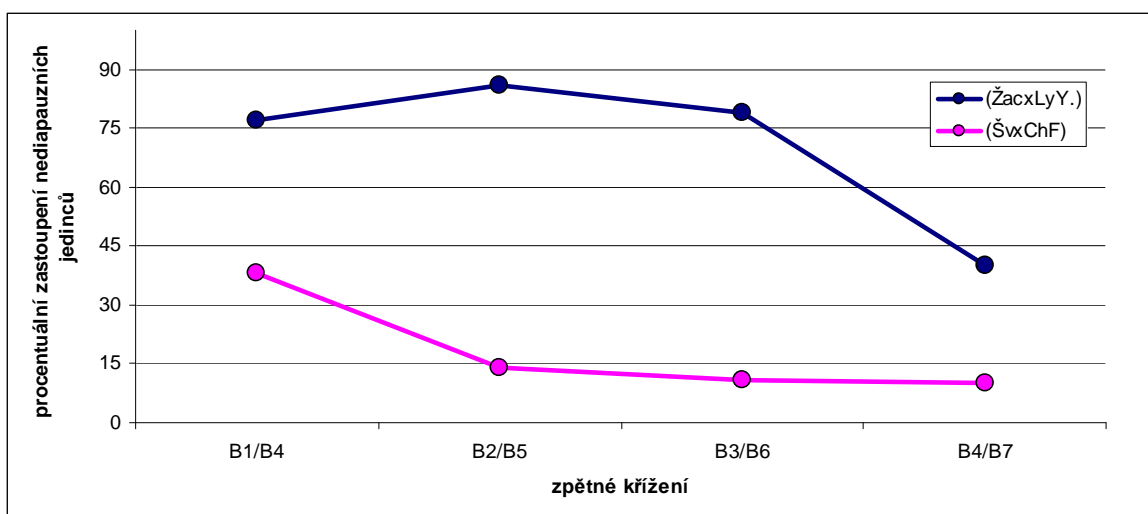
2. Další možností je, že potomci nejsou stejně vitální a tudíž stejné fenotypové poměry neodpovídají hodnotám, jaké bychom předpokládali. Nemůžeme to zcela vyloučit, ale vzhledem k tomu, že získané štěpné poměry barevné mutace odpovídaly předpokládaným, věříme, že vitalita nebyla ovlivněna.

3. Poslední možností je ovlivnění štěpných poměrů teplotou. Vliv teploty na to, kolik jedinců je v diapauze, se nám podařilo potvrdit. Zvýšení či snížení teploty vůči standardní (25°C) se projevuje změnou počtu jedinců diapauzních a nediapauzních v podmínkách SD. Na zvýšení teploty reagují jedinci z 25°C nárůstem počtu nediapauzních jedinců a naopak je tomu v případě, kdy teplotu snížíme. Na nižší teplotu odpovídají jedinci z 25°C indukci diapauzního chování. Přestože jsme zjistili, že štěpné poměry byly nejspíš zatíženy chybou, způsobenou vlivem teploty, jsou křížené linie stále užitečné.

Opakovaným křížením se podařilo výrazně naředit divoký genotyp genotypem mutantním. Opakování pak výrazně zvyšuje frekvenci divoké alely v jinak mutantním pozadí. Mutantní a diapauzní linie použité v křížení pocházely z odlišných lokalit a tudíž obsahují rozdíly v DNA, které většinou nemají funkční dopad (tiché mutace, použití jiných kodónů). Tyto mutace ale poslouží jako markery pro určení, jestli daný gen pochází z mutantní, či diapauzní linie. Vzhledem k tomu, že zpětná křížení byla prováděna opakovaně s mutantní linií, bude genom jednotlivých ploštic odpovídat mutantní linii, a to kromě úseku pocházejícího s divoké linie, který je zodpovědný za diapauzní fenotyp. Při ideálním štěpném poměru by to po čtyřech generacích bylo 6,25%.

Zároveň je stále zarážející opačný trend v případě křížení s lyonskými plošticemi, kdy ve zpětných křížení dostáváme více reprodukčních samic a v případě křížení s chelčickými převažují procentuálně diapauzující samice. Je tedy možné, že za diapauzní mutací stojí kombinace více různých znaků. To jsme se snažili odhalit vzájemným křížením nediapauzních linií, pokud bychom křížením získali jedince nediapauzní, znamenalo by to, že se jedná o mutaci ve stejných genech. Kdyby nastala situace opačná a získali bychom jedince diapauzní, mutace by byla dána různými geny. Ani jednu z variant se nám nepodařilo potvrdit, protože chování jedinců v  $F_1$  nebylo jednotné.

Dalším zajímavým jevem je fakt, že se procentuální zastoupení nediapauzujících jedinců u linií opačného trendu mezi jednotlivými zpětnými kříženími ( $B_1/B_4$ - $B_4/B_7$ ) lišilo a nebylo zachovááno na stejné hladině. Příčina je nám nejasná.



Graf 16. Opačný trend v zastoupení nediapauzních jedinců v závislosti na použitých liniích. Zpětná křížení linií (ŠvxChf) jsme prováděli od počátku, v případě linií (ŽacxLyY.b), jsme již získali po třetím zpětném křížení.

V našich experimentech jsme rovněž sledovali fotoperiodickou odpověď u  $F_1$  generace (Šv x LyY.b.), (Šv x ChF) vůči čistým rodičovským liniím (Šv, LyY.b, ChF). Průběh křivek naznačuje, že diapauzní mutace se chová jako recesivní a divoká alela se tedy chová jako dominantní. Proměřením fotoperiodických křivek se ukazuje, že se heterozygoti od homozygotů liší, dochází tedy k posunu kritické fotoperiody ke kratším fotoperiodám. Křivka se tímto směrem posouvá zřejmě z toho důvodu, že obě mutantní linie (LyY.b. a ChF) pochází z jižnějších oblastí než Šv (graf 1.) a tudíž předpokládáme, že dochází k posunu jejich směrem (graf 2., 3.). Podíváme-li se na divoké linie, ChF (graf 1) má výrazně kratší fotoperiodu než linie Šv, heterozygoti, které získáváme vzájemným křížením těchto linií se nacházejí někde mezi oběma křivkami. Podobně je tomu u linie LyY.b., přestože pro ni divokou linii nemáme, známe linie z též oblastí, které mají křivku rovněž posunutou ke kratším hodnotám (domníváme se, že u LyY.b. to bude obdobné).

## 6. ZÁVĚR

Výsledky získané v této práci bych shrnula následujícím způsobem:

Podářilo se nám metodicky vyřešit měření pohybové aktivity ploštic a změřit periodu cirkadiánního chování dvou diapauzních a dvou mutantních (nediapauzních) linií. Ukázalo se, že linie Lyon má výrazně krátkou cirkadiánní periodu 22h, čímž se odlišuje od obou diapauzních i druhé mutantní linie, které mají periodu delší než 24h. Zpětnými kříženími jsme dokázali, že geny zodpovědné za krátkou cirkadiánní periodu lyonské linie nesegreguje s fotoperiodickou mutací, projevující se neschopností této linie diapauzovat.

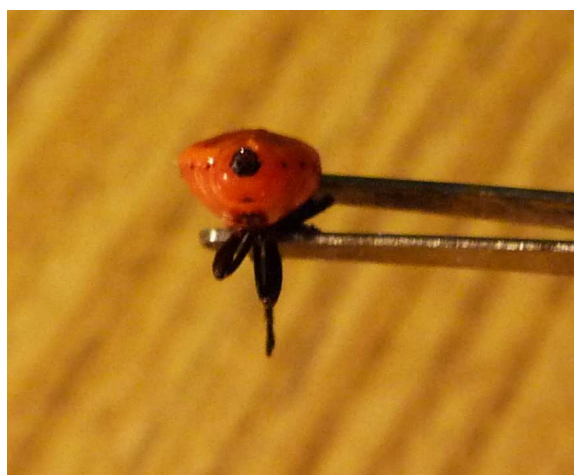
Zjistili jsme, že křížením mutantních linií s divokými, získáme heterozygotní potomky, jejichž fotoperiodické křivky jsou posunuty směrem ke kratším fotoperiodám. Příčinou tohoto posunu je pravděpodobně odlišný geofekický původ linie Šv a linií ChF a LyY.b. Nezadařilo se nám však u fotoperiodické odpovědi křížením dvou mutantních linií a získáním štěpných poměrů v  $F_1$  prokázat, zda je diapauzní mutace dána jedním či více geny. Křížením dvou mutantních linií se nám nepodařilo zjistit, zda je za tyto diapauzní mutace zodpovědný jeden či více genů.

Zpětnými kříženími rodičovských diapauzních a nediapauzních jedinců jsme zjistili, že štěpné poměry neodpovídají předpokládaným (1:1), které bychom očekávali v případě recesivní mutace. Pravděpodobnou příčinou těchto neodpovídajících štěpných poměrů je vliv teploty na diapauzu jedinců. Měřením diapauzního chování v různých teplotách jsme totiž zjistili, že fotoperiodická odpověď je na teplotu citlivá. Nízká teplota indukuje větší počet diapauzních jedinců a naopak je tomu u vyšší teploty.

## 7. PŘÍLOHA - Obrázky



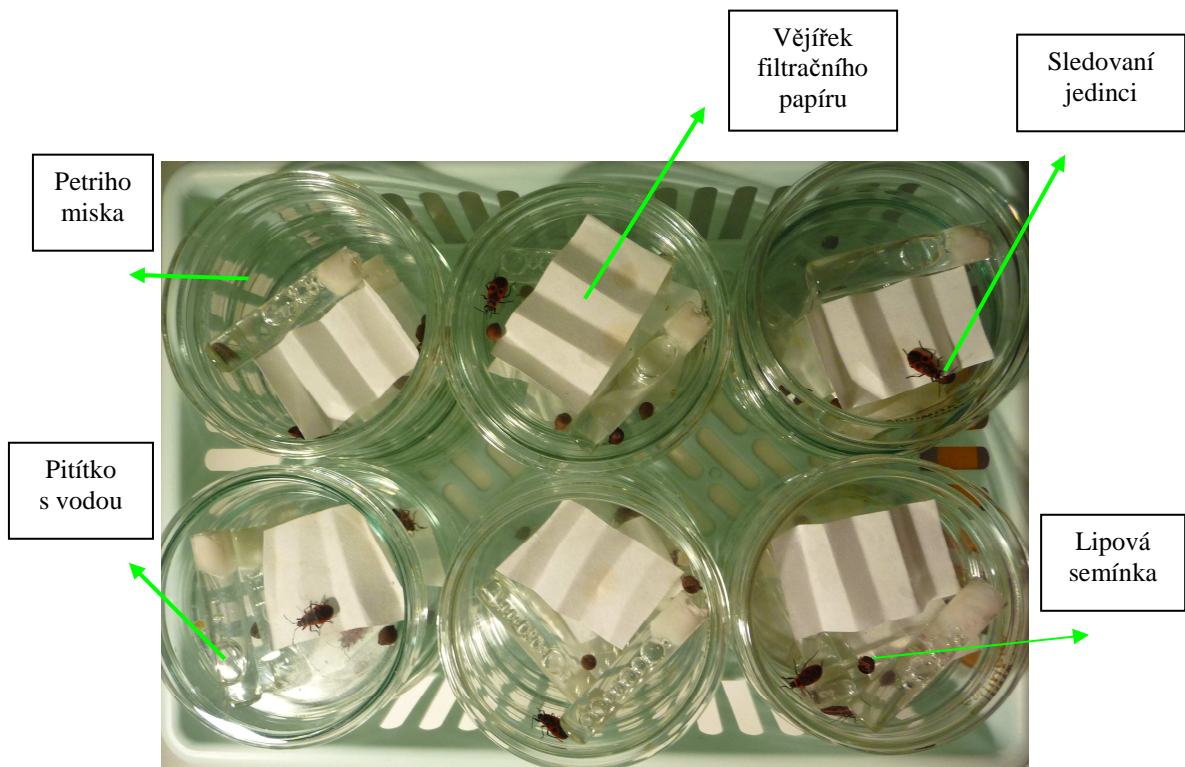
Obr. P1. Pohlavní dimorfismus *P.apterus* – vlevo samice (dospělec), vpravo samec (dospělec).



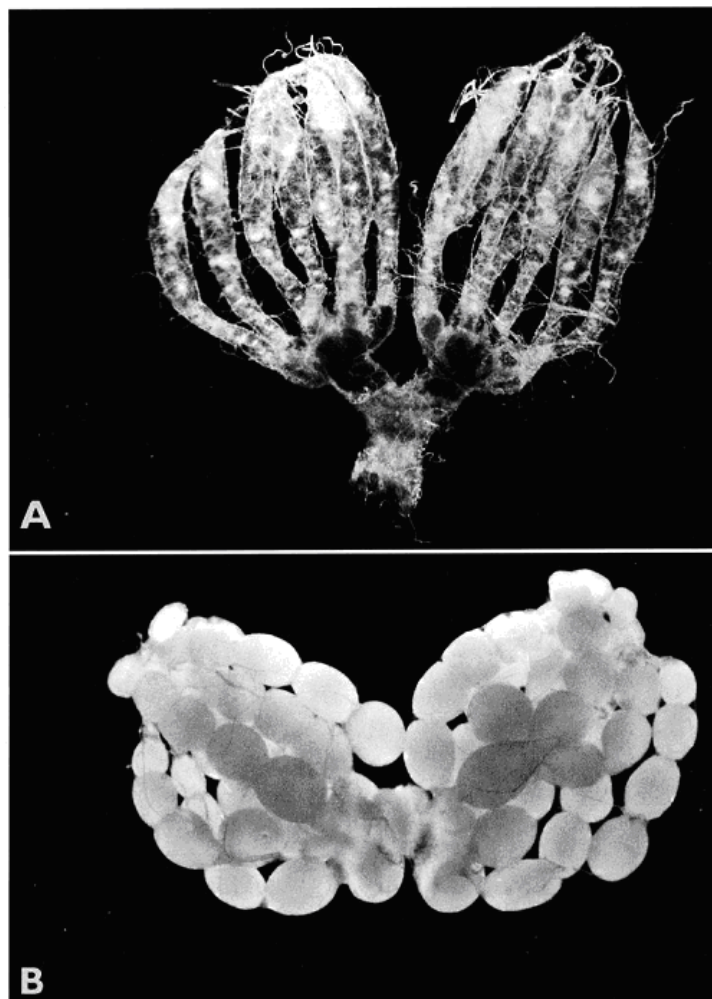
Obr. P2. Pohlavní dimorfismus *P.apterus* – vlevo samice (5. instar), vpravo samec (5. instar).



Obr. P3. Sklenice pro chov *P.apterus*. Obsahuje potravu ve formě lipových semínek, pitítko jako zdroj vody a vějířek z filtračního papíru pro možnost úkrytu.

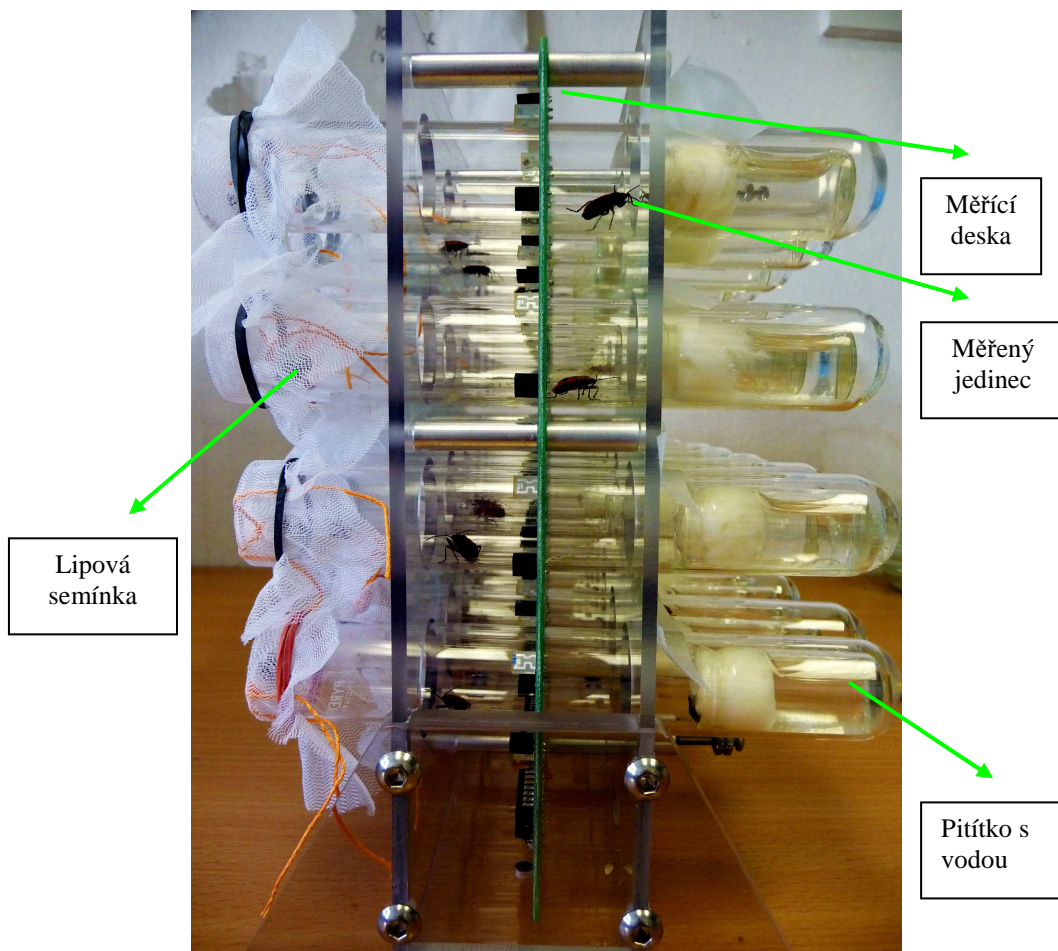


Obr. P4. Jednotlivě rozdělené samice *P.apterus* v Petriho miskách, zjišťování počtu kladoucích jedinců.

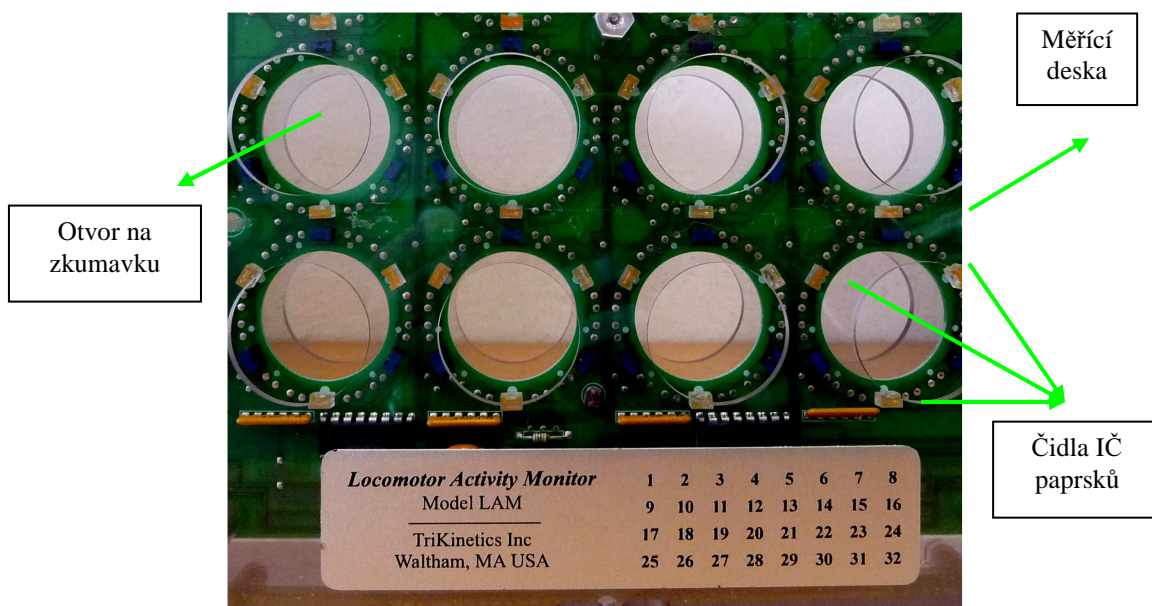


Obr. P5. Ovária diapauzní (A) a nediapauzní (B)  
dospělé samice *P.apterus* (Socha, 1993).





Obr. P6. Měřicí deska LAM se zkumavkami, pítítkem vody, lipovými semínky a měřenými jedinci *P.apterus*.



Obr. P7. Měřicí deska LAM s otvory na zkumavky a čidly infračervených paprsků.

## 8. CITOVANÁ LITERATURA

- Adkinsson PL, Roach SH (1971) A mechanism for seasonal discrimination in photoperiodic induction of pupal diapause in the bollworm *Heliothis zea* (Boddie), *Biochronometry*, Proceeding of a symposium, National Academy of Science, Washington D.C., 662pp.
- Beck SD (1962) Photoperiodic induction of diapause in an insect, *The biological bulletin published by the marine biological laboratory* 122: 1-12.
- Bradshaw WE, Holzapfel ChM (2010) Circadian clock genes, ovarian development and diapause, *BioMed Central Biology* 8: 115.
- Carey HV, Andrews MT, Martin SL (2003) Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature, *Physiological Reviews* 83: 1153-1181.
- Danks HV (2002) The range of insect dormancy responses, *European Journal of Entomology* 99: 127-142.
- Denlinger DL, Giebultowicz JM, Sanders DS (2001) *Insect Timing, Circadian rhythmicity to seasonality*, Elsevier science B.V., Amsterdam, The Netherlands 234pp.
- Dunlap JC, Loros J, DeCoursey PJ (2004) *Chronobiology: biological timekeeping*, Journal of Heredity, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 91-92.
- Garner WW and Allard HA (1920) Effect of the relative length of the day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants, *Journal of Agricultural Research* 18: 553-606.
- Han B and Denlinger DL (2009a) Mendelian inheritance of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, *Journal of Heredity* 100: 251-255.
- Han B and Denlinger DL (2009b) Length variation in a specific region of the period gene correlates with differences in pupal diapause incidence in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, *Journal of Insect Physiology* 55: 415-418.
- Hodek I (1968), Diapause in female of *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera), *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 65: 422-435.
- Hodek I (1971), Sensitivity of larvae to photoperiodic controlling the adult diapause in *Pyrrhocoris apterus* L. by short cold, *Oecologia* 6: 109-117.
- Hodek I, Kostal V (1997) Photoperiodism and control of summer diapause in the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica*, *Journal of Insect Physiology* 43: 767-77.

- Hodkova M (1976) Nervous inhibition of corpora allata by photoperoid in *Pyrrhocoris apterus*, *Nature* 263: 521-3.
- Hodková M, Syrová Z, Doležel D, Šauman I (2003) Period gene expression in relation to seasonality and circadian rhythms in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera), *European Journal of Entomology* 100: 267–273.
- Ikeno T, Numata H and Goto SG (2011a) Circadian clock genes period and cycle regulate photoperiodic diapause in the bean bug *Riptortus pedestris* males, *Journal of Insect Physiology* 57: 935-938.
- Ikeno T, Numata H and Goto SG (2011b) Photoperiodic response requires mammalian-type cryptochrome in the bean bug *Riptortus pedestris*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410: 394-397.
- Ikeno T, Tanaka SI, Numata H and Goto SG (2010) Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect, *BioMed Central Biology* 8: 116.
- Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG (2010) Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect, *BioMed Central Biology* 8:116.
- Jervis MA (2005) *Insect as natural enemies : A practical perspective*, Springer, Dodrecht, The Netherlands, 751pp.
- Kenneth B. Storey (2002) Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 133: 733-754.
- Kobelkova A, Bajgar A and Dolezel D (2010) Functional Molecular Analysis of a Circadian Clock Gene timeless Promoter from the Drosophilid Fly *Chymomyza costata*, *Journal of Biological Rhythms* 25: 399-409.
- Kostal V and Shimada K (2001) Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, *Journal of Insect Physiology* 47: 1269-1274.
- Kostal V, Tollarova M, Dolezel D (2008) Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*, *Journal of Insect Physiology* 54: 77-88.
- Lankinen P (1986) Genetic correlation between circadian eclosion rhythm and photoperiodic diapause in *Drosophila littoralis*, *Journal of Biological Rhythms* 1: 101-18.
- Lankinen P, Forsman P (2006) Independence of genetic geographical variation between photoperiodic diapause, circadian eclosion rhythm, and Thr-Gly repeat region of the period gene in *Drosophila littoralis*, *Journal of Biological Rhythms* 21: 3-12.

- Levine JD, Funes P, Dowse HB and Hall JC (2002) Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*, *Science* 298: 2010-2012.
- Lumme J, Lakovaara S, Oikarinen A, Lokki J (1975) Genetics of the photoperiodic diapause in *Drosophila littoralis*, *Hereditas*, 79: 143-8.
- Menaker M (1970) Rhythms, Reproduction, and Photoreception, *Biology of reproduction*, 4: 295-308.
- Michels CA (2002) Genetic techniques for biological research, A case study approach, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 241pp.
- Müller HJ (1970) Formen der Dormanz bei Insekten, *Nova Acta Leopoldina*, Leipzig Barth, 191: 1-27.
- Rosato E (2007) Circadian rhythms, Methods and protocols, Totowa, Humana Press Inc., New Jersey, 578pp.
- Sauman I, Briscoe AD, Zhu H, Shi D, Froy O, Stalleicken J, Yuan Q, Casselman A, Reppert SM (2005) Connecting the navigational clock to sun compass input in monarch butterfly brain, *Neuron* 46: 457-67.
- Saunders DS, Steel CGH, Vafoupoulou X, Lewis RD (2002) *Insect clocks*, Third edition, Elsevier science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 560pp.
- Sehgal A (2004) *Molecular biology of circadian rhythms*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 271pp.
- Sláma R, Romanuk M, Šorm F (1974) *Insect Hormones and Bioanalogues*, Springer Verlag, Wien 477pp.
- Socha R (1993) *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) – an experimental model species: *European Journal of Entomology* 90: 241-286.
- Socha R (2010) Pre-diapause mating and overwintering of fertilized adult females: New aspects of the life cycle of the wing-polymorphic bug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae), *European Journal of Entomology* 107: 521–525.
- Socha R, Hodková M (1994) Selection for Non-Diapause in the Heteropteran *Pyrrhocoris Apteris*, *Hereditas* 120: 81–85.
- Stehlik J, Zavodska R, Shimada K, Sauman I and Kostal V (2008) Photoperiodic induction of diapause requires regulated transcription of timeless in the larval brain of *Chymomyza costata*, *Journal of Biological Rhythms* 23: 129-139.
- Tomioka K and Matsumoto A (2010) A comparative view of insect circadian clock systems, *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 1397-1406.

- Ueda HR, Hagiwara M, Kitano H (2001) Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm, *Journal of Theoretical Biology* 210(4):401-6.
- Vaněčková H, Bajgar A, Pecková O, Doležel D (nepublikováno) Effect of Photoperiod on the Diapause Termination in Geographic strains of *P. apterus*.
- Wilz M, Heldmaier G (2000) Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*, *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 511-521.