

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

**Geografická variabilita genů *period* a *cryptochrome 2*
u Ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*)**

Eva Stehlíková

2010

Mgr. David Doležel, Ph.D.

Bakalářská diplomová práce

Eva Stehlíková, 2010:

Geografická variabilita genů *period* a *cryptochrome 2* u Ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) [Latitudinal Cline of *period* and *cryptochrome 2* genes in *Pyrrhocoris apterus*]

Bachelor Thesis, Faculty of Sciences, The University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Period and *cryptochrome 2* genes are involved in molecular mechanism of circadian clock and fotoperiodism in *P. apterus*. DNA and amino-acid sequences of these genes were compared among three different originated lines of *P. apterus*. Some variances of these sequences were found both in *period* gene and in *cryptochrome 2* gene.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitelů.

V Českých Budějovicích dne 26. 4 .2010

Eva Stehlíková

Za vznik této práce bych chtěla poděkovat především Adamovi Bajgarovi a Davidu Doleželovi za neutuchající trpělivost, ochotu, pomoc a dobré rady. Děkuji také za vytvoření přátelského prostředí na pracovišti. Dále děkuji svým rodičům za neskonalou podporu, porozumění a lásku nejen během mého studia. V neposlední řadě děkuji také všem svým přátelům za podporu ve studiu.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1. Cirkadiální rytmy	1
1.2. Fotoperiodismus	2
1.3. Gen <i>period (per)</i>	3
1.4. Gen <i>Cryptochrome 2 (cry2)</i>	4
1.5. Geografická variabilita genů	5
1.6. Pokusné organismy	6
2. Cíle práce	7
3. Metody studia	7
3.1. Pokusní jedinci	7
3.2. Izolace RNA	7
3.3. Přepis RNA do cDNA – reversní transkripce	8
3.4. Příprava polymerázové řetězové reakce	9
3.5. Vlastní PCR reakce	12
3.6. Gelová elektroforéza	13
3.7. Izolace DNA	13
3.8. Měření koncentrace čištěných produktů polymerázové řetězové reakce	13
3.9. Sekvenační reakce	14
3.10. Vyhodnocení	14
3.11. Klonování bakterií	14
4. Výsledky	17
5. Diskuse	25
6. Závěr	28
Seznam citované literatury	29

+Příloha

1. Úvod

1.1. Cirkadiální rytmy

Cirkadiální (z lat. *circa* - přibližně, *dies* - den) rytmus je přibližně 24hodinový cyklus biochemických i fyziologických dějů a projevů chování u rostlin, živočichů, hub i některých bakterií; u živočichů se projevuje především při řízení spánku, příjmu potravy, tělesné teploty a hormonální sekrece, u rostlin pak např. pohyby listů. Tento cyklus koreluje s pohyby Země, je nepostradatelný pro regulaci a koordinaci vnitřních metabolických procesů a interakci organismu s vnějším prostředím (Sharma, 2003) a přetrvává i v případě, že je sledovaný organismus umístěn v prostředí s konstantními podmínkami (např. stálá absence světla). Tyto rytmy byly studovány na genetické a molekulární úrovni např. u rostliny z čeledi Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* (Yanovsky a kol., 2002; Tóth a kol., 2001) či druhu *Drosophila melanogaster* (Hardin, 2005), u savců pak především u myši (Vitaterna a kol., 1994), krysa (Welsh a kol., 1995) i u člověka (Jones a kol., 1999).

Cirkadiální rytmus je řízen signály z vnějšího prostředí, především distribucí světla, dále pak teplotou prostředí, příjmem potravy, či sociálními interakcemi (Hall, 2003). Jako funkční centrum endogenních cirkadiálních hodin se zde uplatňuje tzv. cirkadiální oscilátor (cirkadiální pacemaker), který přijímá signály z vnějšího prostředí pomocí receptorů a prostřednictvím několika regulačních drah formuje specifickou odpověď organismu v různých částech dne.

První blíže identifikovanou složkou mechanismu cirkadiálních hodin byl gen *period* a jeho protein: bylo pozorováno, že tři mutantní linie druhu *D. melanogaster* projevují rozdílné vnímání délky dne - jedna linie se projevovala výrazně kratší denní periodou (19hodin), druhá linie výrazně delší (28hodin) a třetí nevykazovala žádné periodické chování; tyto tři mutace byly lokalizovány na jednom genu pojmenovaném *period* (Konopka a Benzer, 1971).

Molekulární mechanismus cirkadiálního oscilátoru byl do detailu prostudován u druhu *D. melanogaster*; je řízen řadou negativních a pozitivních zpětných vazeb. (Hardin, 2005). Genetické analýzy objevily několik tzv. hodinových genů účastnících se řízení cirkadiálních rytmů. Byly objeveny inhibiční transkripční faktory TIMELESS (TIM) a PERIOD (PER) – tyto proteiny tvoří heterodimer PER-TIM (Glossop a kol., 1999); exprese genů *per* a *tim* je pozitivně regulována heterodimerem transkripčních faktorů CLOCK (CLC) a CYCLE (CYC) (Darlington a kol., 1998). S časovým odstupem PER-TIM heterodimer inhibuje transkripci

genů *Clk* a *cyc* a tím také expresi svých vlastních genů (Darlington a kol., 1998). Časový odstup je způsoben proteiny, které upravují stabilitu a buněčnou lokalizaci zúčastněných faktorů. Jedná se především o kasein-kinázu DOUBLETIME (DBT), která destabilizuje PER protein, kasein-kinázu 2 (CK2) destabilizující PER a ovlivňující jeho jadernou lokalizaci; glukoso-syntetázová kináza 3 (GSK3) mění jadernou lokalizaci TIM-PER heterodimerů (Gallego a kol., 2007). Dále je zde přítomna protein-fosfatáza 2a (PP2a) stabilizující PER defosforylací (Sathyanarayanan a kol., 2004) a degradační protein SLIMB (SLMB), který navádí fosforylovaný PER do proteasomů (Grima a kol., 2002). Další zpětná vazba zahrnuje negativní regulaci genu *Clc* prostřednictvím proteinu VRILLE a jeho pozitivní regulaci Par domain proteinem 1ε (PDP1ε) (Hardin, 2005).

Hladiny PER a TIM v cytoplazmě začínají vzrůstat na začátku noci; během noci se tyto proteiny přemisťují do buněčného jádra, kde negativně regulují expresi svých vlastních genů. Za úsvitu dojde k aktivaci cirkadiálního fotoreceptoru CRYPTOCHROME (CRY), který interaguje s proteinem TIM a způsobí jeho fosforylaci a následnou degradaci (Gallego a kol., 2007). Pokud je organismus vystaven stálé tmě, dojde k degradaci TIM drahou nezávislou na CRY (Hardin, 2005). Za nepřítomnosti TIM proteinu je také PER protein vystaven fosforylaci DBT kinázou a degradován (Hardin, 2005). K expresi genů *tim* a *per* dochází u druhu *D. melanogaster* v neuronech na každé straně mozku, gliálních buňkách a fotoreceptorech (Helfrich-Forster a kol., 2003).

1.2. Fotoperiodismus

Pravidelné cykly se u organismů projevují ve spojitosti s rozdílnou délkou dne a noci během střídání ročních období. Tento fenomén se nazývá fotoperiodismus a umožňuje organismům předvídat nastávající podmínky prostředí. Zahrnuje schopnost organismu rozlišit světlo a tmu, měřit dobu jejich trvání a na jejich poměr specificky reagovat. U rostlin se projevuje především regulací doby kvetení či dormance semen, u živočichů reguluje např. jejich reprodukční cykly či tahy ptáků. Jedny z prvních výzkumů vedoucích k objevení fotoperiodismu byly prováděny u rostlinného druhu z čeledi Fabaceae *Glycine max* (sója) (Garner a Allard, 1920). Čím dále od rovníku organismus žije, tím větší jsou během roku změny poměrů mezi délkou dne a noci, kterým je vystaven. Organismy jsou této fotoperiodě přizpůsobeny, jsou na ní závislé a podle ní mění své tzv. sezónní aktivity.

(<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/Circadian.html#Photoperiodism>).

Předpokládá se, že cirkadiální oscilátor hraje ve funkčním mechanismu fotoperiodických hodin podstatnou roli, ale tento mechanismus je stále nejasný. V posledních několika letech je role cirkadiálních hodinových genů ve fotoperiodismu velice diskutována (Saunders a kol., 2004; Tauber a Kyriacou, 2001).

1.3. Gen *period (per)*

Gen *period* a jeho protein PER byly první blíže identifikovanou složkou mechanismu cirkadiálních hodin; mutace v jeho lokusu působí výrazné změny biorytmů (Konopka a Benzer, 1971). Tento gen je nejlépe prostudován u modelového organismu druhu *D. melanogaster*. K jeho expresi dochází v řadě tkání a v různých typech buněk. PER protein společně s proteinem TIM tvoří heterodimer a působí tak jako represor ovlivňující svou vlastní transkripci a transkripci genů *Clc* a *cyc* v mechanismu cirkadiálního oscilátoru (viz výše). V cirkadiálním mechanismu druhu *D. melanogaster* existují také funkční PER-PER homodimery; přerušení těchto homodimerů má za následek silné narušení molekulární rytmicity a rytmicity chování – to poukazuje na důležitý význam této struktury (Landskron a kol., 2008). Bylo zjištěno, že na hladinu *per* mRNA u druhu *D. melanogaster* má vliv fotoperioda i teplota okolního prostředí (Majercak a kol., 1999). Arytmická mutace genu *per* vyvolává u samic druhu *D. melanogaster* diapauzu (Saunders a kol., 1989). Bylo prokázáno, že různá úroveň transkripce genu *per* ovlivňuje fotoperiodickou indukci reprodukční diapauzy u druhu *Pyrrhocoris apterus*: jedinci tohoto druhu chovaní za podmínek krátkého dne (12hodin světlo, 12hodin tma) vyvolávajících diapauzu vykazovali asi desetinásobně vyšší hladinu *per* mRNA než jedinci chovaní za podmínek dne dlouhého (18hodin světlo, 6hodin tma). U mutantů druhu *P. apterus*, kteří neprocházeli diapauzou vůbec, byly hladiny *per* mRNA nízké za obou fotoperiod (Hodková a kol., 2003; Syrová a kol., 2003). Tento fenomén byl sledován také u druhu *Chymomyza costata* (Košťál a Shimada, 2001) nebo *Sarcophaga bullata* (Goto a kol., 2006). Avšak křížení dvou genotypově odlišných mutantů druhu *P. apterus* ukázala, že nediapauzující charakter fenotypu tohoto druhu není přímo geneticky propojen s expresí genu *per* (Doležel a kol., 2005). U druhu *D. melanogaster* byli pozorováni mutanti s defektním nebo dokonce chybějícím lokusem genu *per*; tyto mutanti byly i nadále schopni rozlišit mezi krátkou a dlouhou denní periodou a projevovali fotoperiodický cyklus blízký hodnotě 24hodin – byl tedy učiněn závěr, že gen *per* není přímo zapojen do fotoperiodického měření času (Saunders, 1990).

U člověka je znám výskyt sekvence podobné tomuto genu, ale její vliv na cirkadiální rytmus člověka není objasněn ([http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Period+\(gene\)](http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Period+(gene))).

1.4. Gen *cryptochrome* (*cry*)

Gen *cryptochrome* je také jedním z genů účastnících se cirkadiálního měření času. U většiny organismů jsou známy přinejmenším dvě varianty genu *cryptochrome* (Doležel, 2010). Proteiny vzniklé jejich expresí patří do skupiny flavoproteinů a jsou podobné fotolýzám; u vyšších rostlin regulují např. klíčení semen či dlouhivý růst, účastní se cirkadiálního a fotoperiodického řízení organismu u rostlin i živočichů a u mnoha organismů také vnímání magnetického pole Země (<http://en.wikipedia.org/wiki/Cryptochrome>). Je dokázáno, že u druhu *D. melanogaster* dochází k expresi těchto genů v celém těle i hlavně (Klarsfeld a kol., 2004), u savců jsou vysoké hladiny proteinů CRY1 a CRY2 přítomny především v gangliových buňkách a v buňkách sítnice (Miyamoto a Sancar, 1998). Byla prokázána důležitá role proteinů CRY1 a CRY2 ve fotorepci u rostlinného druhu z čeledi Brassicaceae *A. thaliana* (Somers a kol., 1998), dále u druhu *D. melanogaster* (Stanewsky a kol., 1998) a u myši (Thresher a kol., 1998). Pokusy na myších také ukazují, že proteiny CRY by mohly být součástí mechanismu cirkadiálních hodin vytvářejících periodicitu nezávislou na světle. U druhu *D. melanogaster* dochází k expresi pouze jednoho typu genu *cry* – „*Drosophila*-like“ *cry*, nazvaný *cry1* (Zhu a kol., 2005); protein CRY1 je lokalizován spolu s proteiny TIM a PER v buňkách zajišťujících cirkadiální rytmicitu; CRY1 je zde vnitřním fotoreceptorem citlivým na modré a ultrafialové světlo; prostřednictvím tohoto světla způsobuje rozpad heterodimeru PER:TIM, fosforylaci TIM proteinu a jeho následnou degradaci v proteasomu (Naidoo a kol., 1999). Důležitá úloha CRY1 byla prokázána také v souvislosti s navigací podle Slunce u motýla druhu *Danaus plexippus* (Hyatt, 1993; Reppert a kol., 2004). U dalších druhů hmyzu, které jsou v této oblasti dostatečně prozkoumány, se oproti rodu *Drosophila* vyskytuje ještě druhá forma genu *cry* – „vertebrate-like“ *cry*, nazvaný *cry2* (Zhu a kol., 2005). Protein CRY2 není fotosenzitivní, jako represivní transkripční faktor reguluje aktivitu cirkadiálního oscilátoru; tento fenomén byl popsán u motýla druhu *D. plexippus* (Zhu a kol., 2008); u včely druhu *Apis mellifera* a brouka druhu *Tribolium castaneum* byl identifikován pouze gen *cry2* (Zhu a kol., 2005; Rubin a kol., 2006). Přesný mechanismus účinku a další možné funkce proteinů CRY nejsou dosud objasněny.

1.5. Geografická variabilita genů

Se změnou zeměpisné šířky na Zemi se mění také teplota a fotoperioda prostředí, lze tedy předpokládat, že se určité rozdíly budou vyskytovat i v projevech cirkadiálních rytmů mezi populacemi stejného druhu obývajících geograficky rozdílné lokality. Přirozené populace druhu *D. melanogaster* vykazují v různých geografických oblastech významné genetické rozdílnosti, jejichž původ lze nalézt v evoluční historii tohoto druhu; jako příčiny jejich vzniku zde působí především genetický drift, omezený genový tok mezi vzdálenými populacemi, adaptace na podmínky prostředí či invaze mobilních elementů (David a Capy, 1988). Tento druh projevuje za teplejšího dne větší aktivitu jen v ranních hodinách oproti předpokládané večerní aktivitě; tento jev je způsoben omezením sestřihu 3' intronu genu *per*, což vede ke zpoždění nárůstu hladiny produktu tohoto genu a tím i zpoždění večerní pohybové aktivity (Majercak a kol., 1999).

U druhu *D. melanogaster* je znám tzv. Thr-Gly polymorfismus v genu *per*, vyznačující se různým počtem opakování threonin-glycinových párů následujících nepřerušeně za sebou. Byly srovnávány populace druhu *D. melanogaster* pocházející z různých zeměpisných šířek severní Afriky a Evropy; byl pozorován výskyt dvou základních typů alel (Thr-Gly)₁₇ a (Thr-Gly)₂₀ – tyto alely představovaly 90% všech alel přítomných ve sledovaných populacích. Bylo zjištěno, že v severní Evropě je v populacích druhu *D. melanogaster* podstatně častěji zastoupena alela (Thr-Gly)₂₀ než v populacích pocházejících z jižnějších lokalit. Alela (Thr-Gly)₁₇ vykazovala opačný trend výskytu (Costa a kol., 1992). Podobná frekvence výskytu těchto alel u druhu *D. melanogaster* byla pozorována také v Austrálii (Sawyer a kol., 2006; Kyriacou a kol., 2007). Lze tedy odvodit, že tento jev je ovlivněn klimatickou selekcí. Fenotypově projevovaly severní populace s vyšším výskytem (Thr-Gly)₂₀ alel cirkadiální periodu stabilní za širokého rozsahu teplot asi o 15-20min kratší než 24hodin; populace, u kterých byla více zastoupena alela (Thr-Gly)₁₇ vykazovaly zkracování fotoperiodického rytmu se snižující se teplotou (Sawyer a kol., 1997). Alela (Thr-Gly)₂₀ tedy pravděpodobně způsobuje lepší přizpůsobení nižším teplotám i jejich výkyvům, zatímco alela (Thr-Gly)₁₇ je přizpůsobená teplejšímu středomořskému podnebí s menšími výkyvy teplot.

Přirozený polymorfismus se u druhu *D. melanogaster* vyskytuje také v sekvencích genu *timeless*. Zde jsou charakteristické singlenukleotidové inserce (Rosato a kol., 1997).

Geografická variabilita genu *cryptochrome* a její vliv na dobu kvetení byly sledovány u rostlinného druhu z čeledi Fabaceae *Glycine max*; bylo zjištěno, že na fotoperiodě závislá

rytmická exprese jednoho z typů genu *cry* (*GmCry1a*) je spojena s geografickou ovlivněnou variabilitou počátku doby kvetení u této rostliny (Zhang a kol., 2008).

1.6. Pokusné organismy

Druh *Riptortus pedestris* ze třídy hmyzu je organismem nejpříbuznějším druhu *P. apterus*, na kterém byly prováděny studie zaměřené na molekulární charakterizaci genů účastnících se mechanismu cirkadiálních rytmtů. Bylo zjištěno, že při indukci diapauzy u druhu *R. pedestris* transkripční regulace těchto tzv. hodinových genů nehraje žádnou důležitou roli (Ikeno a kol., 2008); mechanismus cirkadiálních hodin je u skupiny hemimetabola relativně málo prozkoumán.

Ruměnice pospolná - *Pyrrhocoris apterus* (řád Hemiptera, podřád Heteroptera) je druh velmi rozšířený v Evropě, severní Africe, severní Asii a Střední Americe. Pro molekulární biologii a genetiku je již po léta klasickým modelovým organismem, intenzivní studie jsou zaměřené především na její endokrinní soustavu a cirkadiální a fotoperiodické rytmy. *P. apterus* je vhodným organismem pro studium fotoperiodické indukce diapauzy, neboť narozdíl od druhu *D. melanogaster* vykazuje silnou diapausní odpověď již při teplotě 26°C (Doležel a kol., 2005); jedinci chovaní při pokojové teplotě v podmínkách dlouhého dne (18hodin světlo, 6hodin tma) jsou reprodukčně aktivní, zatímco jedinci chovaní v podmínkách krátkého dne (12hodinsvětlo, 12hodin tma) nastupují do diapauzy. Procento diapauzních jedinců se liší v závislosti na podmínkách prostředí (délka dne, teplota). Čím vzdálenější je místo původu zkoumané linie od rovníku, tím delší den organismy potřebují k rozhodnutí vstoupit do nediapauzního módu (Doležel, 2010). Tento trend a případná účast hodinových genů budou nadále předmětem zkoumání.

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo porovnat nukleotidové sekvence genů *period* a *cryptochrome 2* a sekvence aminokyselin jejich proteinů mezi třemi liniemi *Pyrrhocoris apterus* a určit možný vztah případných genových mutací a rozdílného geografického původu pokusných linií.

3. Metody studia

3.1. Pokusní jedinci

Ke zkoumání byly použity linie druhu *Pyrrhocoris apterus* sebrané ze tří geograficky rozdílných lokalit – střední a základní lokalita se nacházela v okolí obce Chelčice v České republice (49°s.š.), nejsevernější lokalita se nacházela poblíž estonského města Tartu (58°s.š.), nejjižnější poté v oblasti Ma'agal Michael v Izraeli (33°s.š.). Populace pokusných zvířat *P. apterus* byly chovány v insektáriu Entomologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích při teplotě 25°C, fotoperiodě LD (18hodin světlo, 6hodin tma) nebo SD (12hodin světlo, 12hodin tma) a byly živeny lipovými semeny. Pokusní jedinci byli vybíráni náhodně z obou fotoperiod najednou, v různou denní dobu.

3.2. Izolace RNA

Z výše zmíněných linií *P. apterus* byla postupně izolována RNA následujícím způsobem: do 1,5ml mikrozkušavky byly vloženy tři jedinci pocházející z jedné linie a zcentrifugováni. Dále byl přidán izolační pufr Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc.) v množství 0,2ml na jednu mikrozkušavku a plošnice v něm byly homogenizovány. Ke vzorku bylo přidáno dalších 0,8ml Tri Reagent; poté byl vzorek inkubován 5min při pokojové teplotě.

Dalším krokem izolace RNA byla fázová separace složek: ke vzorku bylo přidáno 0,2ml chloroformu, vzorek byl důkladně zvortexován a ponechán 10min v klidu při pokojové teplotě. Následovala centrifugace (14 000rpm, 10min, 4°C) - zde došlo k rozdělení vzorku do tří vrstev – spodní fáze obsahovala proteiny, střední organická fáze DNA a horní vodná fáze námi požadovanou RNA. Tato fáze byla opatrně odebrána pipetou do čisté 1,5ml mikrozkušavky a použita pro další kroky.

Následovala precipitace RNA alkoholem: k odpipetované fázi obsahující RNA bylo přidáno 0,5ml 100% isopropylalkoholu; vzorek byl mírně zvortexován, 10min inkubován na

ledu a poté centrifugován (14 000rpm, 10min, 4°C) – zde došlo k usazení RNA v podobě peletu na dně mikrozkušavky.

Dále bylo provedeno promytí RNA v alkoholu: supernatant byl odstraněn pomocí pipety; k peletu byl přidán 1ml 70% ethanolu – 70% ethanol udržuje RNA ve formě sraženiny, 30% vody rozpustí soli, které je třeba z roztoku RNA odstranit. Následovala centrifugace vzorku (14 000rpm, 5min, 4°C), odstranění supernatantu a opětovná centrifugace (14 000rpm, 5min, 4°C). Zbytky ethanolu byly opatrně odstraněny pipetou a vzorek ponechán 5min při pokojové teplotě, aby došlo k jeho vyschnutí.

Následovalo rozpouštění RNA ve vodě: ke vzorku bylo přidáno 50ml DEPC vody (superčistá voda – z této vody byly odstraněny RNázy působením DEPC a ten byl poté odstraněn autoklávováním); tento byl inkubován 20min při pokojové teplotě.

Takto bylo vyizolováno přibližně 50 μ l roztoku RNA; její koncentrace byla změřena pomocí spektrofotometru a softwaru NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Pro ověření kvality vyizolované RNA byla použita horizontální gelová elektroforéza (viz níže); bylo nanášeno 5 μ l vzorku.

Pozn.: Vzhledem k všudypřítomným ribonukleázám vyžaduje izolace RNA přísné podmínky k zamezení případné degradaci RNA ve vzorku.

3.3. Přepis RNA do cDNA – reversní transkripce

Roztok RNA byl zředěn vodou tak, aby výsledná koncentrace RNA v roztoku byla menší nebo rovná 5 μ g/ml.

Dále byla připravena reakce k vlastní reversní transkripci pomocí komerčního kitu SuperScript II (Invitrogen™): Do čisté mikrozkušavky bylo napipetováno 7 μ l DEPC vody, 4 μ l 200 μ M dNTP mix, 1 μ l 20 μ M Primer poly dT a 1 μ l roztoku vyizolované RNA o koncentraci asi 5 μ g/ml. Vzorek byl promíchán a inkubován 5min v 65°C (zde dochází k denaturaci RNA), poté rychle zchlazen na ledu. Ke vzorku bylo přidáno 4 μ l First Strand Buffer 5x (250mM Tris-HCl, pH 8.3; 375mM KCl; 15mM MgCl₂) a 2 μ l 0,1M DTT (dithiothreitol); následovala inkubace 2min ve 42°C. Poté byl přidán 1 μ l reversní transkriptázy RT Superskript II a vzorek byl inkubován 50min ve 42°C. Reakce byla zastavena inkubací vzorku 15min v 70°C (došlo k nevratné denaturaci transkriptázy).

3.4. Příprava polymerázové řetězové reakce (PCR)

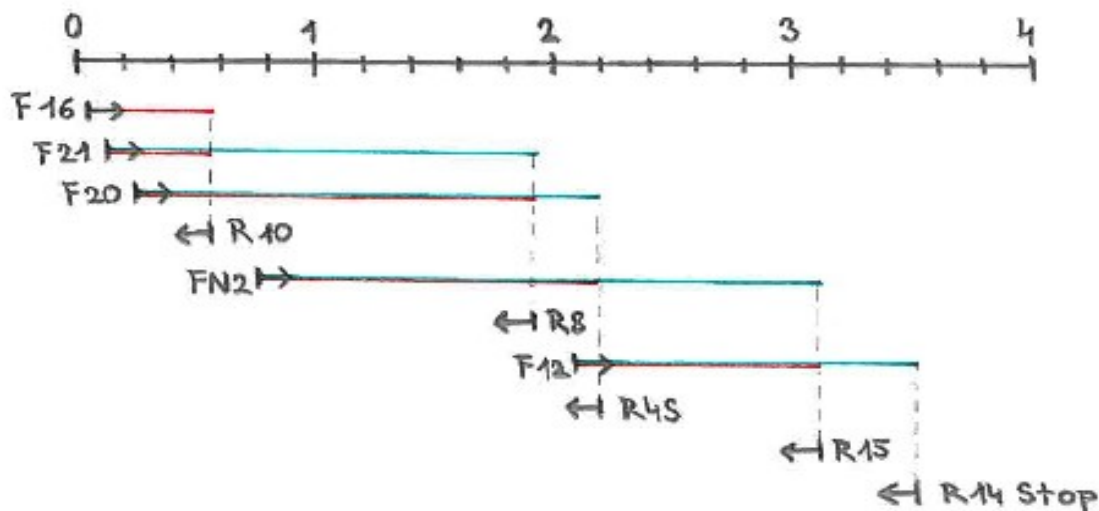
PCR slouží k amfplikaci určitých krátkých úseků DNA ohraničených specifickými primery. Byly použity specifické primery pro sledované geny (*per*, *cryp2*) u *P. apterus* navržené školitelem. Tyto byly objednány u firmy Generi Biotech s.r.o. Popis použitých primerů je uveden v Tabulkách č.1 a č.2, lokalizace primerů na genech s vyznačením amfplikovaných úseků znázorňují Obr.č.1 a Obr.č.2; použité kombinace primerů jsou uvedeny v Tabulce č.3. Kombinace primerů forward a reverse byly voleny tak, aby délka amfplikovaných úseků byla asi do 2000bp (tyto délky poskytují lepší výsledky při sekvenační reakci) a tyto úseky „skládaly dohromady“ co největší část sledovaného genu.

Tabulka č.1: Přehled primerů použitých pro amfplikaci úseků genu *period*

Název primeru	Sekvence primeru
P.a. Per F12	5'- GAA AAC TCA GGT GAA AAT ACA ATC C -3'
P.a. Per F16	5'- AAT AAG AAA GTA AAA GAA CAG TTC TTA G -3'
P.a. Per F20	5'- GAC AAA AGT CTG GGA TTC TGG G -3'
P.a. Per F21	5'- TTC GTC GTT CTT GAG GTC TCG -3'
P.a. Per FN2	5'- GGG CTG GTA GAT CAC TTT TAG AC -3'
P.a. Per R8	5'- TCT GTT ACC TCA TCT GAT GCA GTA G -3'
P.a. Per R10	5'- TGT AAC TGT TCA TTA GAC TTG ATT -3'
P.a. Per R15	5'- ACA TTT GTG AGA GCT GCT CCG -3'
P.a. Per R4S	5'- AAG TTG TTC AGT AAG AGC AGT AG -3'
P.a. Per R14Stop	5'- CTC TCT TTC TTG ATT ACT TAG -3'

Pozn.: Zkratka P.a. v názvech primerů je vztažena k latinskému názvu pokusného organismu.

Obr. č.1: Lokalizace primerů forward a reverse na genu *period* s vyznačenými amfikovanými úseky



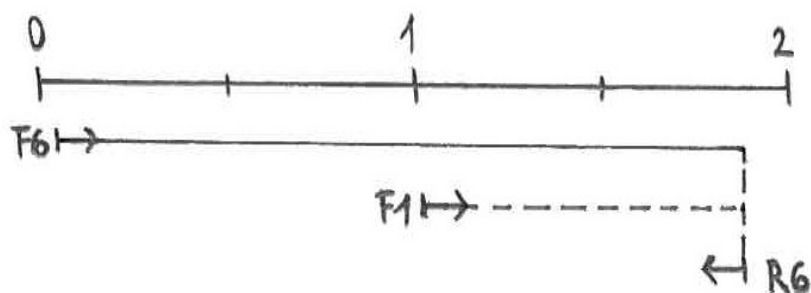
Popis: Měřítka je uvedeno v jednotkách kb; amfikované úseky jsou vyznačeny červeně a zeleně.

Tabulka č.2: Přehled primerů použitých pro amfikaci úseků genu *cryptochrome 2*

Název primeru	Sekvence primeru
P.a. Cry F1	5'- GCG GTC GCC TGT TTT TTG ACT CG -3'
P.a. Cry F6	5'- TTG AAG AAG ACC CAG AAC CAT TT -3'
P.a. Cry R6	5'- CAA ATA CAT TTC GTA AAA ATA AAA TTA G -3'

Pozn.: Primer P.a. Cry F1 byl použit pouze při sekvenační reakci (viz dále)

Obr. č.2: Lokalizace primerů forward a reverse na genu *cryptochrome 2*



Popis: Měřítka je uvedeno v jednotkách kb; amfplikovaný úsek genu je vyznačen plnou čarou, primer P.a. Cry F1 byl použit pouze při sekvenční reakci.

Tabulka č.3: Přehled kombinací primerů použitých pro amfplikaci úseků DNA

Forward primer	P.a. Per F12	P.a.Pe r F16	P.a.Pe r F20	P.a.Pe r F21	P.a.Pe r FN2	P.a.Cry F6
Reverse primer	P.a.Per R15	P.a.Pe r R10	P.a.Pe r R8	P.a.Per R8	P.a.Pe r R15	P.a.Per Cry R6
	P.a.Per R14Stop		P.a.Pe r R4S	P.a.Pe r R10	P.a.Pe r R4S	

Byly připravovány PCR reakce o celkovém objemu 50 μ l na jednu reakci:

36,8 μ l MILLI Q vody

5 μ l 10x ExTaq Buffer 1x

4 μ l 200 μ M dNTP mix (2,5mM each)

0,2 μ l polymeráza Ex Taq HS

1 μ l forward primeru

1 μ l reverse primeru

2 μ l templátu cDNA z jedné linie *P. apterus*

Ke každé reakci byla připravována také negativní kontrola o celkovém objemu 10 μ l:

7,75 μ l MILLI Q vody

1 μ l 10x ExTaq Buffer 1x

0,8 μ l 200 μ M dNTP mix (2,5mM each)

0,05 μ l polymeráza Ex Taq HS

0,2 μ l forward primeru

0,2 μ l reverse primeru

Pozn.: Polymeráza ExTaq HS, 10x buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol), dNTP mix (Takara Bio, Inc.)

K přípravě PCR reakcí byl využíván také komerčně dostupný PPP Master Mix (2x conc.; 150mM Tris-HCl, pH 8,8, 40mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, stabilizátory, aditiva; Top-Bio, s.r.o.) a PCR H₂O (Top-Bio, s.r.o).

Byly připravovány amfiplikační reakce o celkovém objemu 50 μ l (+ negativní kontroly po 10 μ l) následujícím způsobem (množství na jednu reakci):

25 μ l PPP Master Mix

21 μ l PCR H₂O

1 μ l 20 μ M forward primeru

1 μ l 20 μ M reverse primeru

2 μ l cDNA

3.5. Vlastní PCR reakce

Vlastní průběh PCR reakce byl proveden v 0,2ml PCR mikrozkuvkách v XP Cycleru (Bioer) nastaveném na následující program:

Denaturace.....	94°C.....	3min	
Denaturace.....	94°C.....	30s	
Nasedání primerů.....	50-55°C.....	35s	}cyklus 35x
Syntéza nového řetězce DNA.....	72°C.....	2min	
Dokončení neúplných produktů.....	72°C.....	8min	

3.6. Gelová elektroforéza

K vyhodnocování PCR amifikace byla používána horizontální gelová elektroforéza. Gely byly připravovány o koncentraci 1 – 1,5% agarózy v pufru 1x TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA). Gel byl před utuhnutím obarven barvivem Gel Red 10 000x (Biotium, Inc.). Oproti komerčně uvedenému doporučení bylo určeno jako dostačující ředit barvivo 20 000x (ústní sdělení školitele).

Na gel bylo nanášeno 5μl od každého vzorku a 5μl markeru 1Kb Plus DNA Ladder, podle kterého byly odečítány velikosti namnožených úseků cDNA. Gel byl vyhodnocen a vyfotografován pomocí transiluminátoru (UVP, Inc.) a softwaru GrabIt (UVP, Inc.).

3.7. Izolace cDNA

V případě, že primery specificky nasedaly pouze na určená místa na cDNA a byl tak namnožen jen jeden její úsek, byl produkt čištěn od solí a primerů přímo ze zbylé PCR směsi o objemu 45μl. Pokud bylo namnožených úseků více, byla provedena elektroforéza se zbývajícím objemem reakce 45μl, vyříznut odpovídající produkt a DNA izolována z gelu. V obou případech byly izolace a čištění produktu prováděny pomocí komerčního kitu MiniElute (Qiagen®) nebo Qiaex II (Qiagen®); postup dle návodu výrobce kitu.

Pozn.: Při použití obou kitů byl pro získání většího objemu roztoku DNA v závěrečném kroku použit EB pufr o objemu 15μl oproti uvedenému doporučení.

3.8. Měření koncentrace čištěných produktů polymerázové řetězové reakce

Koncentrace vyizolované cDNA byla měřena pomocí kitu Quant It dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™): na každý vzorek DNA byl připraven roztok o 199 μ l dsDNA BR Buffer, 1 μ l dsDNA BR Reagent 200x a 1 μ l měřeného vzorku; tento byl ponechán 2min ve tmě, poté byla změřena koncentrace cDNA pomocí Qubit Fluorometr (Invitrogen™).

Koncentrace cDNA ve vzorku byla také měřena pomocí přístroje NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Thermo Fisher Scientific, Inc.): na čidlo přístroje byl nanášen 1 μ l měřeného vzorku a pomocí softwaru NanoDrop byla zjištěna koncentrace cDNA.

3.9. Sekvenační reakce

Vzorky vyizolované cDNA byly posílány do Koreje firmě Macrogen, Inc. k sekvenaci. Podle požadavků laboratoře byl k sekvenační reakci připravovány vzorky cDNA o objemu 20 μ l a koncentraci 20-50ng/ μ l (bylo uvedeno, že pro optimální výsledky sekvenace by koncentrace cDNA v zaslaných vzorkách měla dosahovat 50ng/ μ l, ale koncentrace 20ng/ μ l byla pro sekvenační reakci dostačující).

Společně se vzorky bylo zasíláno 5 μ l 10pM primerů forward a reverse odpovídající sekvenovaným úsekům. Výsledky sekvenací byly staženy z dna.macrogen.com.

3.10. Vyhodnocení

Ověření a vyhodnocení osekvenovaných úseků bylo provedeno pomocí programů SeqMan (Lasergene, DNASTAR, Inc.) a Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pomocí těchto programů byly porovnány báze DNA určených genů a jejich přepis do proteinů všech tří linií.

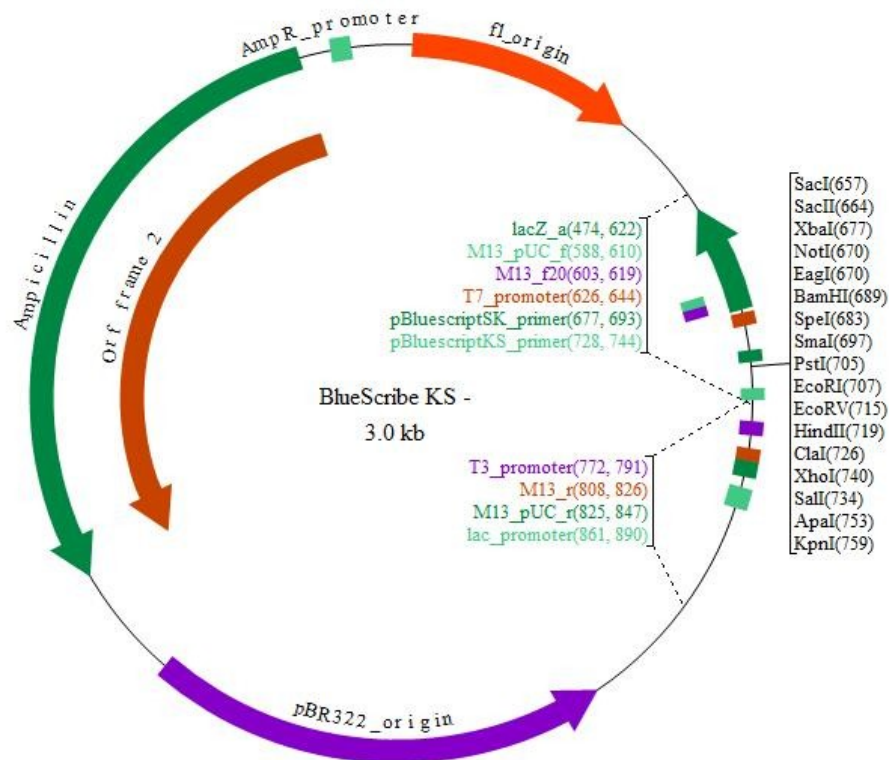
3.11. Klonování bakterií

Jako další metoda k přípravě sekvenace bylo provedeno klonování bakterií:

1. den – Ligace

Byly použity 2 μ l vektoru – plazmid BlueScribe KS - (vytvořen školitelem; mapa plazmidu viz Obr. č.3), 1 μ l T4 DNA ligázy (Roche, Ltd.), 1 μ l T4 DNA ligačního pufru (Roche, Ltd.) a 6 μ l PCR produktu. Reagencie byly smíchány v mikrozkušavce a ponechány přes noc v termosce na ledu.

Obr. č.3: Mapa plazmidu BlueScribe KS –



2. den – Transformace

Do 100µl roztoku kompetentních buněk *Escherichia coli* XL-1 v 1,5ml mikrozkuhavce bylo přidáno 5µl ligační směsi z předešlého dne a ponecháno inkubovat na ledu 20min. Byl proveden heat-shock (42°C, 45s) a inkubace na ledu 1min. Dále bylo přidáno 250µl SOC media (20g tryptone, 5g yeast extract, 0,5g NaCl, 20mM glucose per liter) a ponecháno třepat při 37°C 60min.

Na předeřáté petriho misky s LB médiem (10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract, 10g NaCl, 1l ddH₂O) a ampicilinem bylo sterilně naneseno 50µl X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) a po zaschnutí 50µl transformované směsi kompetentních buněk (každý vzorek byl rozetřen na 2 misky). Misky byly na noc umístěny do 37°C.

3. den – Překřížkování kolonií

Z každé misky bylo podle modro-bíle selekce vybráno několik bílých kolonií a špičkou pipety byly přeneseny na novou petriho misku s LB médiem; miska byla opět ponechána inkubovat přes noc ve 37°C.

4. den – Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu

Byly připraveny PCR reakce o celkovém objemu 10 μ l na reakci:

5 μ l PPP Master Mix

4,5 μ l PCR H₂O

0,25 μ l 10 μ M forward primeru M13

0,25 μ l 10 μ M reverse primeru M13

Primery M13 forward a M13 reverse nasedají specificky na ssDNA vlákno vektoru nedaleko restrikčního místa a umožňují tak amfiplikaci inzertu. Do každé reakční směsi bylo špičkou pipety naneseo malé množství kompetentních buněk z překřížkových kolonií z předešlého dne (z každé misky bylo provedeno několik PCR reakcí). Byla provedena PCR amfiplikace a gelová elektroforéza (viz výše); bylo vyhodnoceno, které kolonie obsahují vektor s vloženým inzertem.

Z kolonií obsahujících inzert v plazmidu bylo provedeno nasazení miniprepů:

Do 10ml zkumavky s 3ml tekutého LB media s ampicilinem byl špičkou pipety vložen stěr z pozitivní kolonie a takto ponecháno třepat přes noc 37°C.

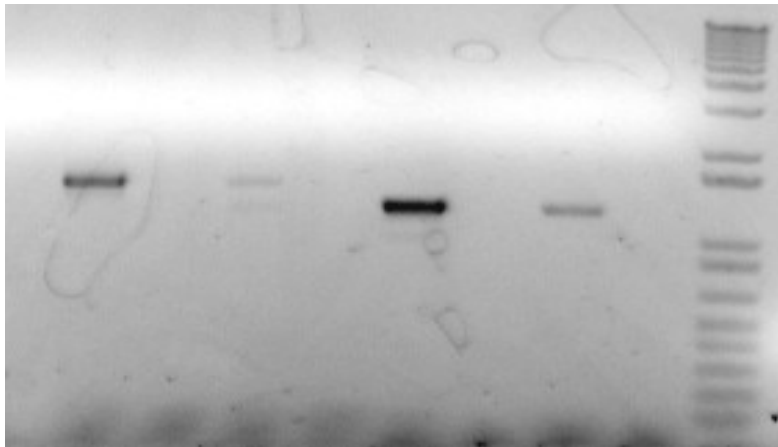
5. den – Izolace plazmidů z miniprepů

Izolace plazmidů z miniprepů byla provedena pomocí komerčního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Ltd.) podle přiloženého návodu. Byla změřena koncentrace DNA v roztoku (viz výše) a připravena sekvenační reakce podle požadavků sekvenační laboratoře – v případě sekvenace plazmidů 50 μ l vzorku DNA o koncentraci 50-100ng/ μ l (bylo uvedeno, že pro optimální výsledky sekvenace by koncentrace cDNA v zaslaných vzorkách měla dosahovat 100ng/ μ l, ale koncentrace 50ng/ μ l byla pro sekvenační reakci dostačující); vzorky byly odeslány do firmy MacroGen, Inc. k sekvenaci a vyhodnoceny (viz výše).

4. Výsledky

Byla vyizolována RNA z několika jedinců z každé pokusné linie *Pyrrhocoris apterus*. S těmito vzorky RNA byla provedena reversní transkripce a PCR amfiplikační reakce s použitím specifických primerů pro geny *period* a *cryptochrome 2*. Obr. č.4 a č.5 představují vzorové fotografie elektroforetických gelů se specificky namnoženými úseky DNA těchto genů zviditelněnými pomocí UV záření. Délky namnožených úseků byly odečítány pomocí komerčního markeru 1KB Plus (Invitrogen™; viz Obr. č.6).

Obr. č.4: Fotografie elektroforetického gelu se zviditelněnými úseky amfiplikované DNA genu *period*



Popis: Do jamek byly nanášeny PCR produkty - úseky DNA genu *period* amfiplikované pomocí forward a reverse primerů - a negativní kontroly.

Zleva: Primer P.a. Per F20 + primer P.a. Per R8 + DNA linie 1

Primer P.a. Per F20 + primer P.a. Per R8

Primer P.a. Per F20 + primer P.a. Per R8 + DNA linie 2

Primer P.a. Per F20 + primer P.a. Per R8

Primer P.a. Per FN2 + primer P.a. Per R4S + DNA linie 1

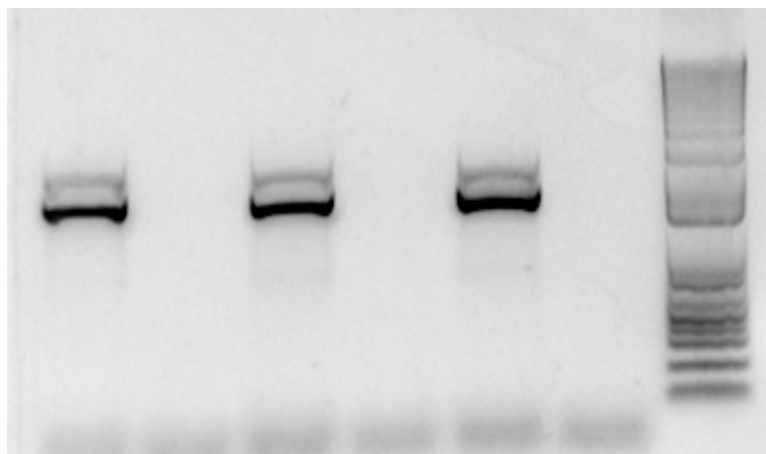
Primer P.a. Per FN2 + primer P.a. Per R4S

Primer P.a. Per FN2 + primer P.a. Per R4S + DNA linie 2

Primer P.a. Per FN2 + primer P.a. Per R4S

Marker 1KB Plus

Obr. č.5: Fotografie elektroforetického gelu se zviditelněnými úseky namnožené DNA genu *cryptochrome 2*



Popis: Do jamek byly nanášeny PCR produkty - úseky DNA genu *cryptochrom 2* amfplikované pomocí forward a reverse primerů - a negativní kontroly.

Zleva: Primer P.a. Cry F6 + P.a. Cry R6 + DNA linie 3

Primer P.a. Cry F6 + P.a. Cry R6

Primer P.a. Cry F6 + P.a. Cry R6 + DNA linie 3

Primer P.a. Cry F6 + P.a. Cry R6

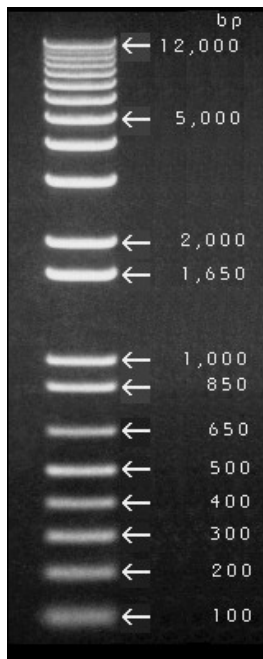
Primer P.a. Cry F6 + P.a. Cry R6 + DNA linie 3

Primer P.a. Cry F6 + P.a. Cry R6

Marker 1KB Plus

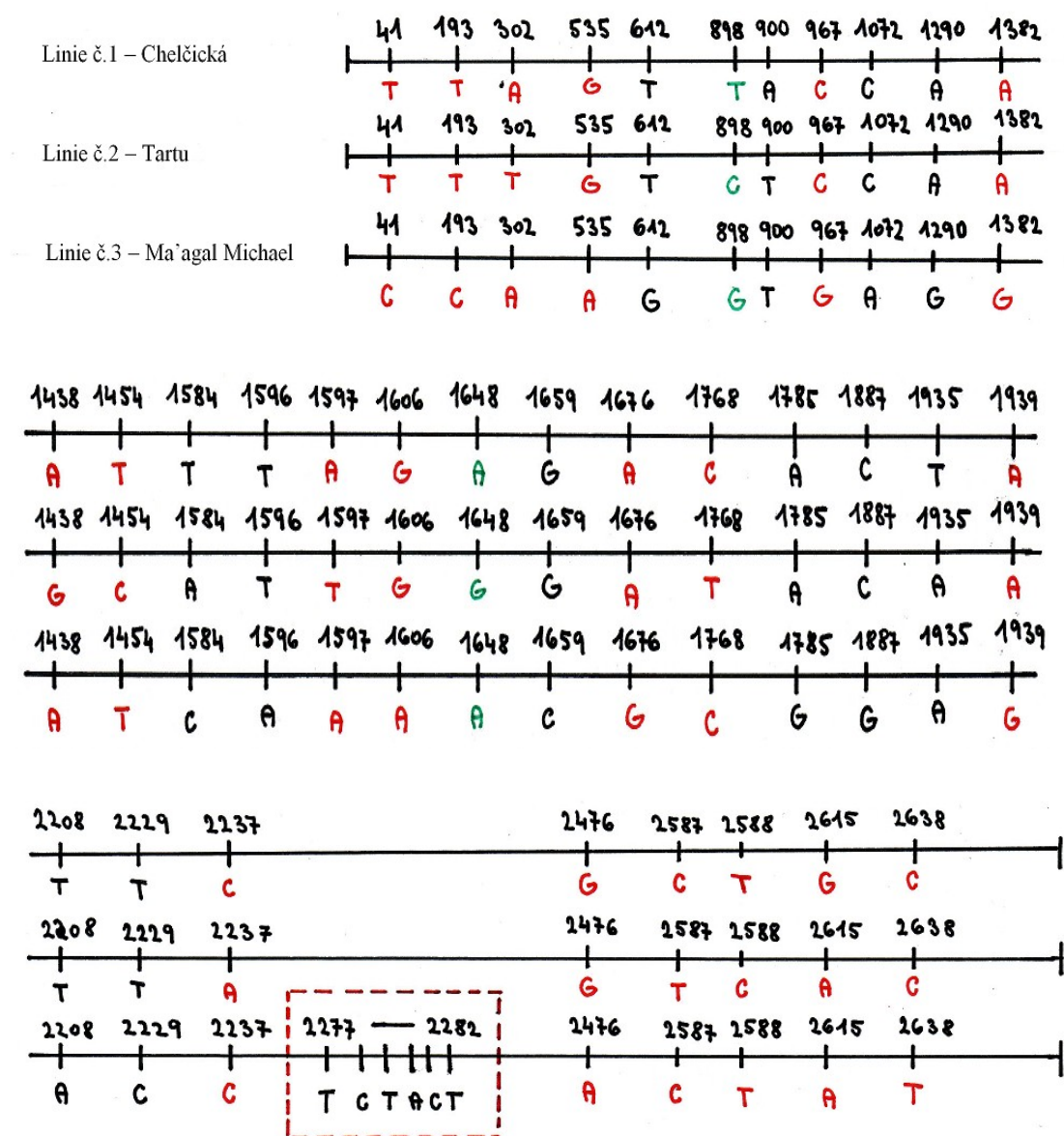
Pozn. k Obr. č.5: Takto byly amfplikovány 2 nestejně dlouhé úseky DNA (primery specificky nasedaly na 2 místa DNA); podle markeru 1KB Plus (viz Obr. č.6) byly odečteny velikosti těchto úseků, odpovídající úsek byl izolován z gelu a použit pro další postup.

Obr. č.6: Předpis markeru 1KB Plus (Invitrogen™)



DNA byla vyizolována z gelu nebo PCR produktu a její vzorky o určité koncentraci byly zasílány k sekvenční reakci. Pomocí programů SeqMan (Lasergene, DNASTAR, Inc.) a Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) byly vyhodnoceny rozdíly v sekvencích genů *per* a *cry2* mezi jednotlivými liniemi; pomocí programu SeqMan byl také proveden přepis čtecího rámce bází do pořadí aminokyselin každým genem kódovaných a bylo vyhodnoceno, které rozdílnosti bází mezi jednotlivými liniemi způsobují také odlišnost v určité aminokyselině a které nikoli. Obrázek č.7 znázorňuje výskyt odlišných bází v DNA sekvencích genu *per* u jednotlivých linií *P. apterus*, obrázek č.8 poté výskyt odlišných aminokyselin kódovaných tímto genem u jednotlivých linií. Obr. č.9 znázorňuje odlišnosti v pořadí bází v sekvencích genu *cry2* mezi jednotlivých liniemi *P. apterus*; Obr. č.10 znázorňuje výskyt rozdílných aminokyselin kódovaných genem *cry2* u jednotlivých linií.

Obr. č.7: Znázornění výskytu rozdílných bází v genu *per* mezi třemi pokusnými liniemi

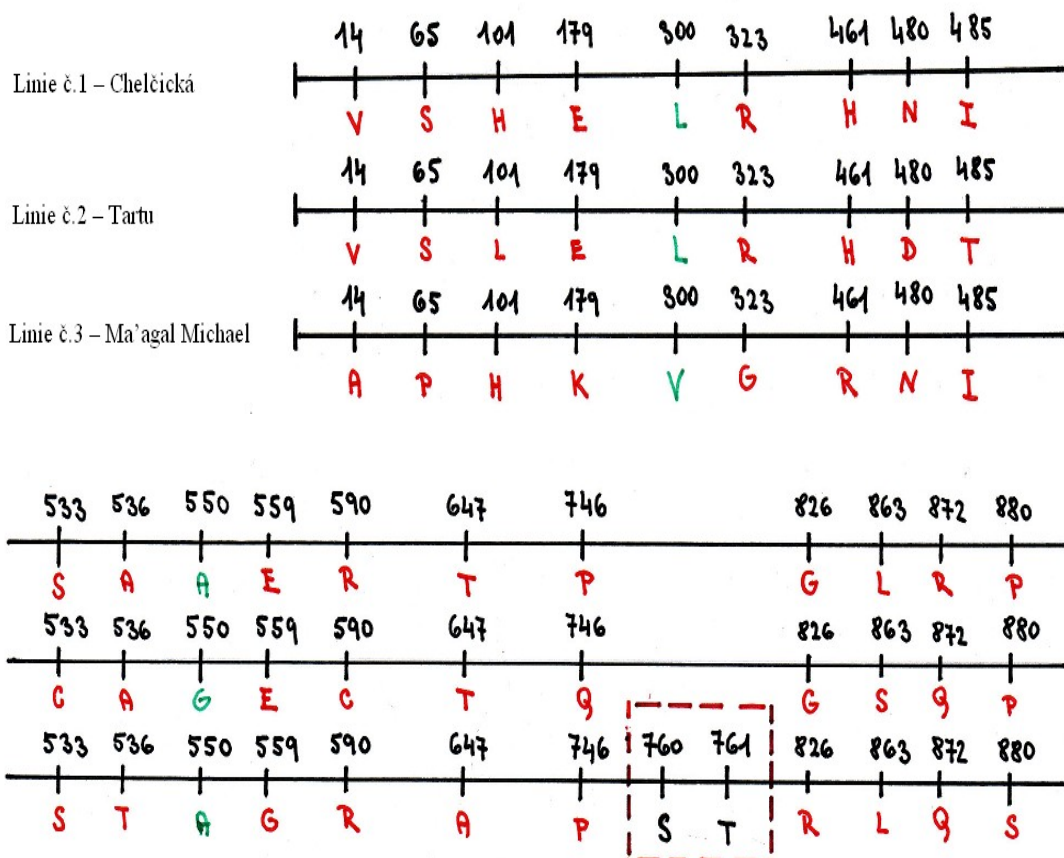


Popis: Měřítko je orientační, je uvedeno v pořadí bází genu; A- adenin, C-cytosin, G-guanin, T-thymin.

Červeně jsou označeny singlenukleotidové polymorfismy, které při translaci genu způsobují změnu aminokyseliny za aminokyselinu jiného charakteru, zeleně jsou vyznačeny polymorfismy způsobující změnu aminokyseliny za aminokyselinu podobného charakteru (popis aminokyselin viz Příloha, Tabulka

č.1), černě poté mutace, které se neprojeví změnou aminokyseliny. Červeně je orámována inserce dvou nukleotidových tripletů v sekvenci linie č.3.

Obr. č.8: Znázornění výskytu rozdílných aminokyselin kódovaných genem *per* mezi třemi pokusnými liniemi

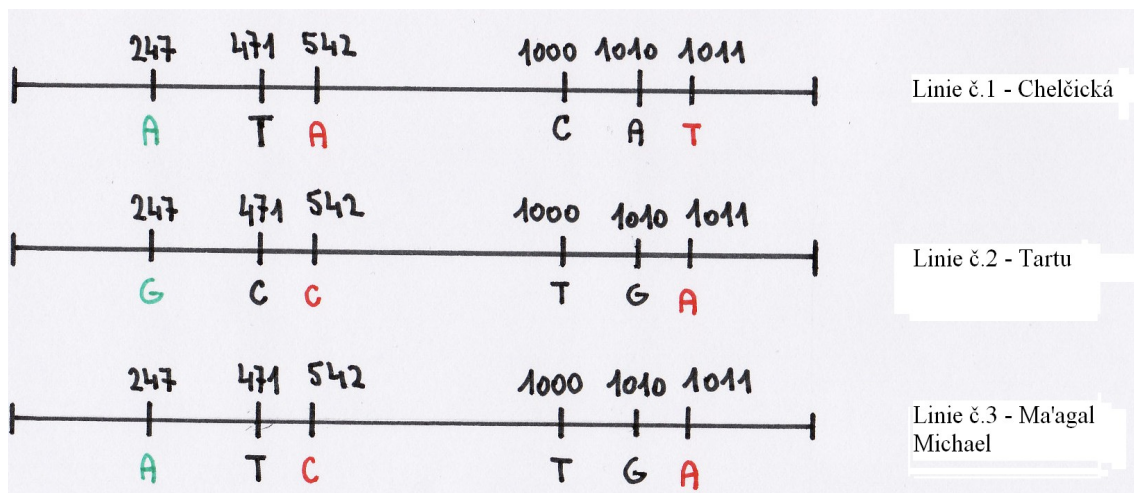


Popis: Měřítka je uvedeno v pořadí aminokyselin kódovaných genem *per*;

zkratky aminokyselin jsou uvedeny v Příloze v Tabulce č. 1.

Červeně jsou označeny záměny aminokyseliny za aminokyselinu jiného charakteru, zeleně záměny aminokyseliny za aminokyselinu podobného charakteru (popis aminokyselin viz Příloha, Tabulka č.1), červeně orámovány jsou aminokyseliny vzniklé prepisem inserce dvou trinukleotidových sekvencí u linie č.3.

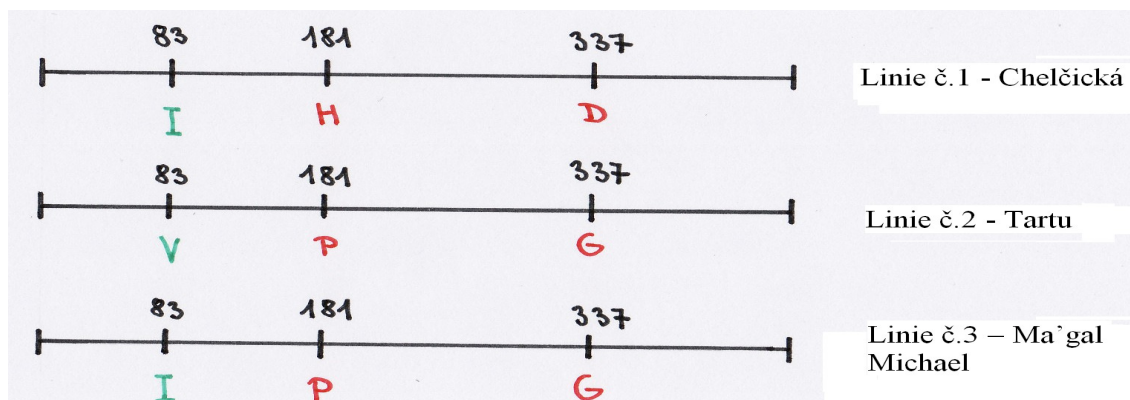
Obr. č.9: Znázornění výskytu rozdílných bází v genu *cry2* mezi třemi pokusnými liniemi



Popis: Měřítka je orientační, je uvedeno v pořadí bází genu; A- adenin, C-cytosin, G-guanin, T-thymin;

Červeně jsou označeny singlenukleotidové polymorfismy, které při translaci genu způsobují změnu aminokyseliny za aminokyselinu jiného charakteru, zeleně jsou vyznačeny polymorfismy způsobující změnu aminokyseliny za aminokyselinu podobného charakteru (popis aminokyselin viz Příloha, Tabulka č. 1), černě poté mutace, které se neprojeví změnou aminokyseliny.

Obr. č.10: Znázornění výskytu rozdílných aminokyselin kódovaných genem *cry2* mezi třemi pokusnými liniemi



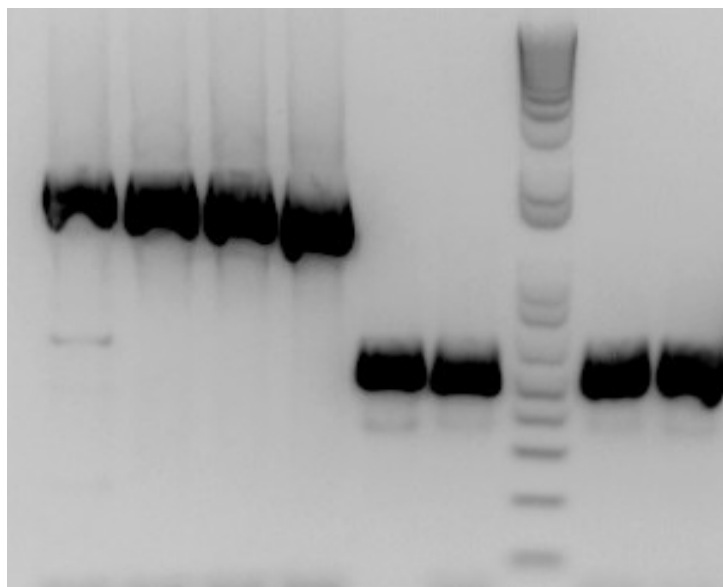
Popis: Měřítka je uvedeno v pořadí aminokyselin kódovaných genem *cry2*;

D-kyselina asparagová, G-glycin, H-histidin, I-isoleucin, P-prolin, V-valin;

Červeně jsou označeny záměny aminokyseliny za aminokyselinu jiného charakteru, zeleně záměna aminokyseliny za aminokyselinu podobného charakteru (popis aminokyselin viz Příloha, Tabulka č.1).

Při přípravě sekvenační reakce pomocí klonování bakterií bylo prováděno ověřování přítomnosti inzertu v bakteriálním vektoru pomocí PCR reakce s použitím specifických primerů M13 forward a M13 reverse; velikosti amfplikovaných úseků byly odečítány pomocí markeru 1KB Plus (viz Obr. č.6). Toto ověření znázorňuje obrázek č.11.

Obr. č.11: Fotografie elektroforetického gelu - ověření přítomnosti inzertu v bakteriálním vektoru



Popis: Do prvních čtyř jamek zleva byl nanášen vektorový PCR produkt obsahující inzert vytvořený amfplikací úseku genu *cryptochrome 2* pomocí primerů P.a. Cry F6 a P.a. Cry R6; do dalších čtyř jamek byl

nanesen vektorový PCR produkt obsahující inzert vzniklý amfiplikací úseku genu *period* pomocí primerů P.a. Per F21 a P.a. Per R10 - mezi těmito vorky byl nanesen marker 1KB Plus (viz Obr. č.6). Byly odečteny velikosti namnožených úseků a posouzeno, zda zaklonování inzertu do bakteriálního vektoru proběhlo úspěšně.

5. Diskuse

O cirkadiálních a fotoperiodických rytmech a o funkčním mechanismu těchto endogenních hodin živých organismů bylo publikováno mnoho prací zaměřených na rostlinné i živočišné druhy. V posledních letech se také stále častěji objevují studie zaměřené na možnou geografickou variabilitu zúčastněných genů. V mé práci byly porovnány nukleotidové sekvence genů účastnících se tohoto periodismu, genů *period* a *cryptochrome 2* a sekvence aminokyselin proteinů vzniklých translací těchto genů u tří linií druhu *Pyrrhocoris apterus* odlišného geografického původu.

U jednotlivých linií byly pozorovány především singlenukleotidové mutace. Gen *cry2* se podle výsledků jeví jako méně senzitivní ke vzniku těchto mutací, v jeho 1 400 bází dlouhé sekvenci bylo pozorováno pouze šest singlenukleotidových mutací. Ve srovnání s genem *cry2* vykazuje gen *per* mnohem častější výskyt mutací – ve srovnání tří linií *P. apterus* se v sekvencích genu *per* objevuje průměrně 12 singlenukleotidových záměn na každých 1000 bází; u linie č.3 (místo původu Izrael, Ma'agal Michael) byla ve srovnání s liniemi č.1 a č.2 rozpoznána dokonce inserce dvou nukleotidových tripletů (viz Výsledky, Obr. č.7).

Porovnání počtu rozdílných nukleotidových sekvencí genu *per* a genu *cry2* mezi jednotlivými dvojicemi pokusných linií je popsáno v Tabulce č.4:

Tabulka č.4: Počet rozdílných bází genů *per* a *cry2* a aminokyselin PER a CRY2 proteinů mezi dvojicemi pokusných linií

Srovnávané linie	Celkový počet rozdílných bází genu <i>per</i>	Počet rozdílných bází způsobujících změnu aminokyseliny proteinu PER	Celkový počet rozdílných bází genu <i>cry2</i>	Počet rozdílných bází způsobujících změnu aminokyseliny proteinu CRY
1 x 2	14	9	6	3
1 x 3	24	12	4	2
2 x 3	30	19	2	1

Ze vztahů uvedených v Tabulce č.4 je zřejmé, že podle mých výsledků se nejmarkantnější rozdíly v sekvencích genu *per* vyskytují mezi liniemi 2 a 3, které jsou si místem původu nejvíce vzdáleny – pochází z lokalit, jejichž zeměpisná šířka se liší o 25° severní šířky. Mezi liniemi *P. apterus*, jejichž místa původu se geograficky liší nejméně (Chelčice x Tartu, 9°s.š.), bylo v sekvencích genu *per* pozorováno nejméně singlenukleotidových rozdílů. Linie *P. apterus* pocházející z Izraele vykazovala v sekvencích tohoto genu největší diferenciaci v porovnání s ostatními dvěmi pokusnými liniemi, dokonce se u ní vyskytla inserce dvou nukleotidových tripletů, čili inserce dvou aminokyselin do proteinu PER.

Porovnáním sekvencí genu *cry2* mezi dvojicemi pokusných linií byl pozorován opačný trend výskytu singlenukleotidových mutací (viz Tabulka č.4). Nejvíce singlenukleotidových záměn u tohoto genu bylo zjištěno mezi sekvencemi linií 1 a 2, a naopak, srovnáním sekvencí tohoto genu mezi liniemi 2 a 3 byly odhaleny tyto záměny pouze dvě. Tento jev naznačuje, že v případě singlenukleotidových záměn pozorovaných u tohoto genu u tří pokusných linií *P. apterus* se nejedná o adaptaci na rozdílnou zeměpisnou šířku a tím také rozdílnou fotoperiodu prostředí, ale že tyto mutace pravděpodobně vznikly v populacích náhodně.

Porovnání sekvencí genu *per* jednotlivých dvojic linií *P. apterus* může naznačovat, že geografický gradient mutací tohoto genu by mohl být součástí adaptace organismu na rozdílnou zeměpisnou šířku a fotoperiodu. Stejně tak ale může jít o náhodnou selekci určitých alel, či časové hromadění mutací u jednotlivých populací vzhledem k jejich nezanedbatelným geografickým i časovým vzdálenostem. Použitý pokusný vzorek je však příliš malý, než aby bylo možno posuzovat obecně a jednoznačně jakékoli jevy. K potvrzení domněnek by bylo třeba uskutečnit několik genetických křížení mezi pokusnými liniemi a zjistit, zdali pozorované mutace a změny aminokyselin proteinů nějakým způsobem segragují s fenotypem určité linie. Pro další případné experimenty by také bylo vhodné ověřit uvedené mutace, zdali se nejedná o artefakt; k chybnému určení přítomné báze mohlo dojít především při sekvenačním čtení.

Některé z vysledovaných mutací patří mezi tzv. mutace tiché – změna nukleotidu v určitém místě nezpůsobí při translaci tripletu změnu aminokyseliny; toto se děje především při záměně báze na třetí pozici kódujícího tripletu. Jindy může být aminokyselina vlivem mutace nahrazena aminokyselinou podobných vlastností (např. záměnou druhé báze v kódonu AAG pro zásaditý lysin může vzniknout kódon AGG, který kóduje rovněž zásaditý arginin).

Pokud však dojde vlivem mutace k substituci zcela odlišné aminokyseliny, může dojít k částečné změně prostorové konformace výsledného proteinu a tím i k modifikaci jeho funkce. Při srovnávání genů *per* a *cry2* v této práci byly pozorovány všechny tyto typy mutací (viz Výsledky, odlišeno barevně).

Některé pozice nukleotidů v genech jsou charakteristické častými záměnami bází během evoluce genů, jiné jsou u příbuzných organismů konzervované. Srovnání nukleotidových sekvencí sledovaných genů *P. apterus* s odpovídajícími sekvencemi příbuzných organismů ukázalo, které z pozorovaných mutací lze považovat za originální pro danou linii; uvedené sekvence byly vloženy z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Většina singlenukleotidových polymorfismů se u obou sledovaných genů vyskytovala v relativně málo konzervovaných pozicích; vyskytlo se však i několik originálních mutací. U pokusné linie *P. apterus* pocházející z okolí obce Chelčice se v genu *per* nevyskytovala žádná jedinečná báze, u genu *cry2* potom pouze v poloze 1011. Nejvíce originálních nukleotidů bylo zaznamenáno v sekvencích linie *P. apterus* pocházející z Estonska – tři jedinečné báze v genu *per* a jedna v genu *cry2* (viz Příloha, Obr. č.1, Obr. č.2). Všechny z těchto pozorovaných jedinečných záměn působí při translaci genů substituci aminokyseliny v určeném místě, mohlo by se tedy jednat o mutace funkčně se projevující v mechanismu cirkadiálních hodin a fotoperiodismu. Podobné tvrzení by se mohlo potvrdit či vyvrátit genetickým křížením jedinců pocházejících z jednotlivých linií, sledováním jejich fenotypu za různých fotoperiod a jeho segregace s daným genotypem. U linie pocházející z Izraele byl pozorován výskyt unikátní mutace v podobě inserce dvou nukleotidových tripletů, čili inserce dvou aminokyselin do pořadí bází kódovaného proteinu. I tento jev by mohl v důsledku pozměnit funkci tohoto proteinu.

6. Závěr

U tří linií *Pyrrhocoris apterus* pocházejících z geograficky odlišných lokalit byly sledovány dva geny účastníci se mechanismu cirkadiálních a fotoperiodických rytmů – gen *period* a gen *cryptochrome 2*. U každé linie byla určena sekvence nukleotidů těchto genů a tyto sekvence byly pak mezi jednotlivými liniemi porovnány. Byly pozorovány rozdíly v sekvencích uvedených genů mezi pokusnými liniemi, a to převážně singlenukleotidové polymorfismy. Dále bylo zjištěno, že velká část sledovaných mutací působí substituci příslušné aminokyseliny při translaci genu.

Seznam citované literatury

Costa R., Peixoto A.A., Barbujani G., Kyriacou C.P., 1992: A latitudinal cline in a *Drosophila* clock gene. *Proc. Biol. Sci.* 250: 43–49.

Darlington T.K., Wager-Smith K., Ceriani M.F., Staknis D., Gekakis N., Steeves T.D., Weitz C.J., Takahashi J.S., Kay S.A., 1998: Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280: 1599–1603.

David J. R., Capy P., 1988: Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends in Genetics, Volume 4, Issue 4:* 106-111.

Doležel D., Vaněčková H., Šauman I., Hodková M., 2005: Is *period* gene causally involved in the photoperiodic regulation of reproductive diapause in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*? *Journal of Insect Physiology* 51: 655–659.

Doležel D., 2010: Ústní sdělení.

Gallego M., Virshup D.M., 2007: Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 139–148.

Garner W.W., Allard H.A., 1920: Effects of the relative length of day and night and other factors of environment on growth and reproduction in plants; *J. Agric. Res.* 18: 553-606.

Glossop N.R., Lyons L.C., Hardin P.E., 1999: Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286: 766–768.

Goto S.G., Han B., Delinger D.L., 2006: A nondiapausing variant of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, that shows arrhythmic adult eclosion and elevated expression of two circadian clock genes, *period* and *timeless*. *Journal of Insect Physiology, Vol. 52, Issue 11-12:* 1213-1218.

Grima B., Lamouroux A., Chelot E., Papin C., Limbourg-Bouchon B., Rouyer F., 2002: The F-box protein SLIMB controls the levels of clock proteins *period* and *timeless*. *Nature* 420: 178–182.

Hall J.C., 2003: Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv. Genet.* 48: 1–280.

Hardin P. E., 2005: The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. *Cell press, Volume 15, Issue 17, R714-R722.*

Helfrich-Forster C., 2003: The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsc. Res. Tech.* 62: 94–102.

Hodková M., Syrová Z., Doležel D., Šauman I., 2003: *Period* gene expression in relation to seasonality and circadian rhythms in a heteropteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *European Journal of Entomology* 100: 267–273.

Hyatt M.B., 1993: The use of sky polarization for migratory orientation by monarch butterflies. *Pittsburgh (Pennsylvania): Graduate Faculty of Arts and Sciences, University of Pittsburgh, 107 p.*

Ikeno T., Numata H., Goto S.G., 2008: Molecular characterization of the circadian clock genes in the bean bug, *Riptortus pedestris*, and their expression patterns under long- and short-day conditions. *Gene, Vol. 419, Issue 1-2: 56-61.*

Jones Ch.J., Campbell S.S., Zone S.E., Cooper F., Desano A., Murphy P.J., Jones B., Czajkowski L., Ptáček J., 1999: Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. <http://medicine.nature.com>.

Klarsfeld A., Malpel S., Michard-Vanhee C., Picot M., Chelot E., Rouyer F., 2004: Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J. Neurosci.*: 1468–1477.

Konopka R.J., Benzer S., 1971: Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 68, No. 9: 2112-2116.*

Košťál V., Shimada K., 2001: Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal Insect Physiology* 47: 1269-1274.

Kyriacou C.P., 2007: A cline in the *Drosophila melanogaster period* gene in Australia: neither down nor under. *J. Evol. Biol.* 20: 1649–1651.

Landskron J., Chen K.F., Wolf E., Stanewsky R., 2008: A Role for the PERIOD:PERIOD Homodimer in the *Drosophila* Circadian Clock. *PLoS Biol.* 7(4): e1000003. doi:10.1371/journal.pbio.1000003.

Majercak J., Sidote D., Hardin P.E., Edery I., 1999: How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* 24: 219–230.

Miyamoto Y., Sancar A., 1998: Vitamin B₂-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6097–6102.

Naidoo N., Song W., Hunter-Ensor M., Sehgal A., 1999: A role for the proteasome in the light response of the TIMELESS clock protein. *Science* 285: 1737–1741.

Reppert S.M., Zhu H., White R.H., 2004: Polarized light helps monarch butterflies navigate. *Curr. Biol.* 14: 155–158. _

Rosato E., Trevisan A., Sandrelli F., Zordan M., Kyriacou C.P., Costa R., 1997: Conceptual translation of *timeless* reveals alternative initiating methionines in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 25: 455–458.

Rubin E.B., Shemesh Y., Cohen M., Elgavish S., Robertson H.M., Bloch G., 2006: Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Res.* 16: 1352–1365.

Sathyanarayanan S., Zheng X., Xiao R., Sehgal A., 2004: Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116: 603–615.

Saunders D.S., 1990: The circadian basis of ovarian diapause regulation in *Drosophila melanogaster*: is the *period* gene causally involved in photoperiodic time measurement? *Journal of Biological Rhythms* 5: 315–331.

Saunders D.S., Henrich V.C., Gilbert L.I., 1989: Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: Photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3748-3752.

Saunders D.S., Lewis R.D., Warman G.R., 2004: Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. *Physiological Entomology* 29: 1–15.

Sawyer L.A., 1997: Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science* 278: 2117–2120.

Sawyer L.A., Sandrelli F., Pasetto C., Peixoto A.A., Rosato E., Costa R., Kyriacou C.P., 2006: The *period* gene Thr-Gly polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. *Genetics* 174: 465–480.

Sharma V.K., 2003: Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology International* 20 (6): 901-19.

Somers D., Devlin P., Kay S., 1998: Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282: 488-490.

Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S., Rosbash M., Hall J., 1998: The cryb Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. *Cell, Volume 95, Issue 5: 681-692.*

Syrová Z., Doležel D., Šauman I., Hodková M., 2003: Photoperiodic regulation of diapause in linden bugs: are *period* and *Clock* genes involved? *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 2510–2515.

Tauber E., Kyriacou C.P., 2001: Insect photoperiodism and circadian clocks: models and mechanisms. *Journal of Biological Rhythms* 16: 382–391.

Thresher R.J., Vitaterna M.H., Miyamoto Y., Kazantsev A., Hsu D.S., Petit C., Selby C.P., Dawut L., Smithies O., Takahashi J.S., Sancar A., 1998: Role of Mouse Cryptochrome Blue-Light Photoreceptor in Circadian Photoresponses. *Science, Vol. 282, no. 5393: 1490-1494.*

Tóth R., Kevei É., Hall A., Millar A.J., Nagy F., Kozma-Bognár L., 2001: Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127: 1607–1616.

Vitaterna M.H., King D.P., Chang A.M., et al., 1994: Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behaviour. *Science* 264 (5159): 719-25.

Welsh D.K., Logothetis D.E., Meister M., Reppert S.M., 1995: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14(4): 697-706.


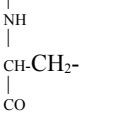


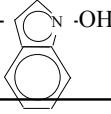

Yanovsky M.J., Kay S.A., 2002: Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308–312.

Zhang Q., Li H., Li R., Hu L., Fan Ch., Chen F., Wang Z., Liu X., Fu Y., Lin Ch., 2008: Association of the circadian rhythmic expression of GmCRY1a with a latitudinal cline in photoperiodic flowering of soybean. *PNAS*, vol. 105, no. 52.

Zhu H., Šauman I., Yuan Q., Casselman A., Emery-Le M., Emery P., Reppert S.M., 2008: Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol.* 2008 Jan;6(1): e4.

Zhu H., Yuan Q., Briscoe A.D., Froy O., Casselman A., et al., 2005: The two CRYs of the butterfly. *Curr. Biol.* 15: R953–954.

Příloha

Obr. č.1: Srovnání zbytku v bílkovině	Název	Zkratka tří/jedno písmenová	acid	gen	period	ze tří pokusů	Křídlo	ředitel P. a	Zkratka tří/jedno písmenová
1.	glycin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Gly	G					
2.	L-alanin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Ala	A					
3.	L-valin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH} < \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Val	V					
4.	L-leucin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} < \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Leu	L					
5.	L-isoleucin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH} < \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Ile	I					
6.	L-prolin	$\begin{array}{c} \text{N} / \text{CH}_2 \backslash \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH} \quad \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad / \\ \text{CO} \quad \quad \quad \text{CH}_2 \end{array}$	Pro	P					
7.	L-serin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Ser	S					
8.	L-threonin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CO} \quad \text{OH} \end{array}$	Thr	T					
9.	L-cystein	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Cys	C					
10.	L-methionin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CO} \end{array}$ 	Met	M					
11.	L-histidin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{CO} \end{array}$ 	His	H					
12.	L-lysin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Lys	K					
13.	L-arginin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHC}=\text{NH} \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Arg	R					
14.	kyselina L-asparagová	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Asp	D					
15.	kyselina L-glutamová	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Glu	E					
16.	L-asparagin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{CO} \end{array}$	Asn	N					
17.	L-glutamin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{CO} \end{array}$ 	Gln	Q					
18.	L-fenylalanin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{CO} \end{array}$ 	Phe	F					
19.	L-tyrosin	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{CO} \end{array}$ 	Tyr	Y					
20.	L-tryptofan	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{CO} \end{array}$ 	Trp	W					

Tabulka č.1: Charakterizace aminokyselin

Ve sloupci pořadových čísel jsou postupně tmavším stínováním označeny skupiny: neutrálních aminokyselin s alifatickým postranním řetězcem, s OH skupinou, se sírou, amidy karbonových kyselin, aromatické a heterocyklické aminokyseliny. Ve sloupci názvů jsou kyselé aminokyseliny (a jejich amidy-neutrální) stínované světle, basicke tmavě.

<http://rum.bf.jcu.cz/public/vlasak/molbiol/>, mb1.zip, str.3

	37 - 46b	189 - 195b	298 - 307b	531 - 540b
Per P.apterus Linie 1 - Chelcice	GTAGTAAACAG	AACGTCG	TCGCACCTCTC	CACCGAGAGT
Per P.apterus Linie 2 - Tartu	GTAGTAAACAG	AACGTCG	TCGCTCTCTC	CACCGAGAGT
Per P.apterus Linie 3 - Maagal Michael	GTAGCAACAG	AACGCCG	TCGCACCTCTC	CACCAAGAGT
Per Riptortus pedestris	CTCATCACGT	TACTTCC	AGCGATACTC	AAGTACAGAA
Per Blattella germanica	AACAGCAGCA	ATTGTCC	AGCGAAGCTA	AACGCCTTTG
Per Periplaneta americana	AATAGCAGTA	TTCTGTT	AACGAGGCTC	CACGCCTCTT
Per Drosophila melanogaster	AACAGCTGCA	CGCCGGC	CCCTCGCCGC	CATTGCGGAA

	608 - 617b	894 - 903b	963 - 972b	1068 - 1077b
Per P.apterus Linie 1 - Chelcice	GTGTTATGGA	CTTTTTAAAA	ATTTCTGTAGC	TTTACGGGGA
Per P.apterus Linie 2 - Tartu	GTGTTATGGA	CTTTCCTAAA	ATTTCTGTAGC	TTTACGGGGA
Per P.apterus Linie 3 - Maagal Michael	GTGTGATGGA	CTTCTGTTAAA	ATTTGGTAGC	TTTAAAGGGGA
Per Riptortus pedestris	CTGTAACAGA	TTTTCTTAAA	GTTTCGCAGC	TTTAAAGAGGA
Per Blattella germanica	GCGTCACGGA	ATTTTTGAAA	GTTTAGGATC	TCTGAAGGGT
Per Periplaneta americana	GTGTGACAGA	TTTCCCTGAAA	CTTTAGATCT	TCTCAAGGGT
Per Drosophila melanogaster	GCGTCATCGG	AGTCATGAAG	CTTCCCTCATC	CTTTCAGGGGA

	1286 - 1295b	1378 - 1387b	1434 - 1443b	1450 - 1459b
Per P.apterus Linie 1 - Chelcice	TTACAAAACC	CACCATGATT	GCTCAATTAC	AAATATTCAA
Per P.apterus Linie 2 - Tartu	TTACAAAACC	CACCATGATT	GCTCGATTAC	AAACTTCAA
Per P.apterus Linie 3 - Maagal Michael	TTACGAAAACC	CACCGTGATT	GCTCAATTAC	AAATATTCAA
Per Riptortus pedestris	TAACCAAAGCC	CATCATGAAT	ACTCAATTAC	AACTTTCAA
Per Blattella germanica	TTTCCAAAGCC	CATCACGAAT	GCTAAACTAC	AACTTGCAA
Per Periplaneta americana	TTACCAAACC	CATCATGACT	GCTAAATTAC	AACATTCAGC
Per Drosophila melanogaster	TGTCCCGGGC	CACCACGACT	GCTAAACTAT	AACTTGCTGC

	1581 - 1609b
Per P.apterus Linie 1 - Chelcice	TGGTGGAAAGTGGGCTTAGTTCTGGCGCAC
Per P.apterus Linie 2 - Tartu	TGGAGGAAGTGGGCTTTGTTCTGGCGCAC
Per P.apterus Linie 3 - Maagal Michael	TGGCGGAAGTGGGCTAAGTTCTGGCACAC
Per Riptortus pedestris	TGGTGGAAAGCGGAGGAAGTTCCAGGAGCAC
Per Blattella germanica	TTGCGGGAGCGGCAGTGGAAAGCGGAAGCG
Per Periplaneta americana	TTGCGGGAGCGGTAGTGGTAGTGGGAGTG
Per Drosophila melanogaster	CTTTCGGAACGGGAACAGGTACAGGCACAG

	1645 - 1680b
Per P.apterus Linie 1 - Chelcice	ACAAATCCCCGGCTCGAATAAACAAATTCAACTGAGAAC
Per P.apterus Linie 2 - Tartu	ACAGTCCCCGGCTCGAATAAACAAATTCAACTGAGAAC
Per P.apterus Linie 3 - Maagal Michael	ACAAATCCCCGGCTCCAATAAACAAATTCAACTGGGAAC
Per Riptortus pedestris	ACAACAAATGGATCAAACAATAATTCCTGCTAAGAAC
Per Blattella germanica	GGG-----AGTGCCACCAACACGTCCGAGGGCTCT
Per Periplaneta americana	GCGGAGAGCAGTGCCACCAATACTCTCACGGCTCT
Per Drosophila melanogaster	GGCACCGGAAGCTCATCCAAGGCGGAAGCGCCGCC

	1765 - 1790b	1883 - 1892b
Per <i>P.apterus</i> Linie 1 - Chelcice	CAGCGCTCAAAAATCTGATAGAGATAC	AAGGCGAACC
Per <i>P.apterus</i> Linie 2 - Tartu	CAGTGCTCAAAAATCTGATAGAGATAC	AAGGCGAACC
Per <i>P.apterus</i> Linie 3 - Maagal Michael	CAGCGCTCAAAAATCTGATAGGGATAC	AAGGGGAACC
Per <i>Riptortus pedestris</i>	TCCCGAGCAAAAATCTGACCGAGACTT	AAGGTGAGCC
Per <i>Blattella germanica</i>	CTGCGCACCAAGGGCGGAGGTGACCG	AAGGGGAGGT
Per <i>Periplaneta americana</i>	CAGAGGAACAAAGGTAGT---	GAGAGAGGGCGAGGT
Per <i>Drosophila melanogaster</i>	TCGCGCGGACGGACGGGT---	GAGAAAGGGAGAGGC

	1931 - 1944b	2204 - 2213b	2226 - 2240b
Per <i>P.apterus</i> Linie 1 - Chelcice	TTACTCCTACGATC	CACCTCCTCC	GGATCTACCACCGCC
Per <i>P.apterus</i> Linie 2 - Tartu	TTACACCTACGATC	CACCTCCTCC	GGATCTACCACAGCC
Per <i>P.apterus</i> Linie 3 - Maagal Michael	TTACACCTGCGATC	CACCACCTCC	GGACCTACCACCGCC
Per <i>Riptortus pedestris</i>	CAGCTCCATCTGCA	CACCCCCACC	ATCTCAACCTCAGGC
Per <i>Blattella germanica</i>	AAGAA-----	AAGCGGGGT	GGGCTTGGCCCTCA
Per <i>Periplaneta americana</i>	AGGAACCTTAACTCT	-----	-----
Per <i>Drosophila melanogaster</i>	CGATCAAGGGAGCG	ACCTCTGGCC	GGGCATCACACCGCC

	2273 - 2286b	2472 - 2481b	2583 - 1593b	2611 - 1620b
Per <i>P.apterus</i> Linie 1 - Chelcice	GCCT-----TCTA	AGTGGGGAAA	TCACCTTGAAGA	TTGCGAACCT
Per <i>P.apterus</i> Linie 2 - Tartu	GCCT-----TCTA	AGTGGGGAAA	TCATCTGAAGA	TTGCAAAACCT
Per <i>P.apterus</i> Linie 3 - Maagal Michael	GCCTTCTACTTCTA	AGTGAAGGaaa	TCACCTTGAAGA	TTGCGAACCT
Per <i>Riptortus pedestris</i>	AACT-----	GCAAGGGGAG	CCCCCTTGAACA	TTACAGGCTC
Per <i>Blattella germanica</i>	TGGG-----	CGGAGTTTCT	GCCGAACCAAGG	ATAGCTTTCGG
Per <i>Periplaneta americana</i>	T-----	-----	-----	-----
Per <i>Drosophila melanogaster</i>	CAGC-----	GTACCCGCAT	CGTCCGTTGGG	AACAAGTCCG

	2635 - 2644b
Per <i>P.apterus</i> Linie 1 - Chelcice	CAACCGGAGC
Per <i>P.apterus</i> Linie 2 - Tartu	CAACCGGAGC
Per <i>P.apterus</i> Linie 3 - Maagal Michael	CAATCGGAGC
Per <i>Riptortus pedestris</i>	CAACCGAAGC
Per <i>Blattella germanica</i>	GGAAATGAGCG
Per <i>Periplaneta americana</i>	-----
Per <i>Drosophila melanogaster</i>	CCGGCGTCCA

Popis: Černou šipkou jsou vyznačeny výskyty diskutovaných polymorfismů v nekonzervované poloze u pokusných linií *P. apterus*; zeleně jsou vyznačeny polymorfismy vyskytující se v poloze, která nejeví u srovnávaných organismů evoluční konzervovanost, avšak daná polymorfnní báze u některé linie *P. apterus* je v tomto srovnání originální; červeně jsou označeny mutace, které se vzhledem ke

konzervovanosti báze v dané poloze jeví jako originální pro určitou linii. Červenou linkou je vyznačena pozice inserce dvou nukleotidových tripletů u linie 3.

Obr. č.2: Srovnání diskutovaných mutací genu *cryptochrome 2* ze tří pokusných linií *P. apterus* s odpovídajícími sekvencemi příbuzných organismů

	243 - 252b	467 - 479b	538 - 547b	996 - 1015b
cry2 <i>P. apterus</i> Linie 1 - Chelcice	AAACATTATG	ACGATGATAA	TGGCATGGTG	TTTTCTGACTCGAGATAAC
cry2 <i>P. apterus</i> Linie 2 - Tartu	AAACGTTATG	ACGACGATAA	TGGCCTGGTG	TTTTTTGACTCGAGGAAAC
cry2 <i>P. apterus</i> Linie 3 - Maagal Michael	AAACATTATG	ACGATGATAA	TGGCCTGGTG	TTTTTTGACTCGAGGAAAC
cry2 <i>Riptortus pedestris</i>	AAACATCATG	ATGATGAAAA	TGGCAAGGAG	TTTTCTGACAAGAGGTGAC
cry2 <i>Danaus plexippus</i>	TAATATTATG	ACGACGAAAA	TGGATCGGCG	TTTCCTCACGAGGGGGGAC

Popis: Černou šipkou jsou vyznačeny výskyty diskutovaných polymorfismů v nekonzervované poloze u pokusných linií *P. apterus*; červeně jsou označeny mutace, které se vzhledem ke konzervovanosti báze v dané poloze jeví jako originální pro určitou linii.