

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Lada Čejková

Plasticita cirkadiánních rytmů štěnice domácí
Plasticity of circadian rhythms of the common bed bug

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Ondřej Balvín, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jitka Vilímová, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Abstrakt

Cirkadiánní rytmy jsou přítomné u všech organismů od prokaryot přes rostliny až po živočichy. Jsou značně plastické, schopné se adaptovat na okolní klimatické podmínky a na aktuální dostupnost potravy, takové rozdíly v podmínkách vedly i ke vzniku vnitrodruhových polymorfismů cirkadiánních rytmů. Tato práce shrnuje známá data o plasticitě cirkadiánních rytmů, mechanismech, kterými jsou cirkadiánní rytmy řízené, a jejich vzájemnou závislost. Cirkadiánní rytmy byly u ektoparazita člověka štěnice domácí (*Cimex lectularius*) studovány pouze sporadicky, obrácení rytmu je možné docílit pouhou změnou osvitů. Se znalostmi o plasticitě cirkadiánních rytmů bude možné přesně zjistit, jaké změny v mechanismech řízení cirkadiánních rytmů se u štěnice dějí.

Klíčová slova: cirkadiánní rytmy, štěnice domácí, plasticita cirkadiánních rytmů, polymorfismus cirkadiánních rytmů

Abstract

Circadian rhythms can be found in all organisms from prokaryotes through plants to animals. They are very plastic, able to adapt to the climatic conditions of the environment and the current availability of food, such differences in conditions led to origin of intraspecific polymorphisms of circadian rhythms. This bachelor thesis summarizes the known data on the circadian rhythm plasticity, managing mechanisms of circadian rhythms and their interdependence. Circadian rhythms were studied only sporadically in the human ectoparasite a bed bug (*Cimex lectularius*), rhythm reversal can be achieved just by changing the illumination. With knowledge about plasticity of circadian rhythms it shall be possible to identify the changes in the managing mechanisms of circadian rhythms in the bed bug.

Key words: circadian rhythms, bed bug, plasticity of circadian rhythm, polymorphism of circadian rhythms

Obsah

1	Úvod	1
2	Cirkadiánní rytmy	2
2.1	Historie výzkumu	2
2.2	Definice	3
3	Mechanismy řízení	6
3.1	Hormonální	6
3.2	Genetické	8
3.2.1	Model molekulárních hodin octomilky obecné (<i>Drosophila melanogaster</i>)	9
3.3	Nervové	10
4	Plasticita cirkadiánních rytmů	12
5	Vnitrodruhový polymorfismus cirkadiánních rytmů	14
6	Charakteristika druhu <i>Cimex lectularius</i>	16
7	Cirkadiánní rytmy štěnice	18
7.1	Porovnání cirkadiánních rytmů štěnice a zákeřnice (<i>Triatoma infestans</i>)	20
8	Metodika	21
9	Závěr	23
10	Použitá literatura:	24

1 Úvod

Žijeme ve vcelku stabilním prostředí. Naše Země se otáčí kolem své osy a tím se nám střídá den a noc. To je příležitost pro organismy provádět různé úkony ve správný čas. Tedy například správně si rozvrhnout, ve kterou dobu získávat potravu, aby se vyhnuly nepříznivým podmínkám. Předpokládá se tedy, že je výhodné, aby vznikly mechanismy, které budou ovlivňovat chování organismů v různých denních dobách. Těmto mechanismům se říká cirkadiánní hodiny (Abhilash and Sharma 2016).

Ne všude na Zemi panují stejné podmínky, z čehož lze soudit, že organismy jsou schopné se adaptovat na okolní prostředí a že cirkadiánní rytmy tedy nejsou uniformní, ale existují polymorfismy závislé na vnějších podmínkách. Například štěnice žijí na lidech i na netopýrech a ptácích, byly tedy schopné se adaptovat na různé hostitele.

Tato práce představuje problematiku cirkadiánních rytmů, jejich význam, spouštěče a zjistit, zda existují vnitrodruhové polymorfismy cirkadiánních rytmů a demonstrovat jejich proměnlivost. Dalšími cíli je zjistit mechanismy řízení rytmů, zaměřit se na úroveň řízení, popsat cirkadiánní rytmy štěnice domácí a zjistit jejich determinanty. Tato práce bude sloužit jako podklad pro diplomovou práci, jejímž tématem bude vliv denního rytmu hostitele na cirkadiánní rytmy parazita a vyhodnocení, zda se u štěnice domácí jedná o genetickou adaptaci, nebo fenotypovou plasticitu.

2 Cirkadiánní rytmy

2.1 Historie výzkumu

Následující text shrnuje hlavní milníky v objevení a popsání cirkadiánních rytmů. První organismy, u kterých byly cirkadiánní rytmy popsány, byly rostliny. Hill zmiňuje výzkum francouzského vědce M. de Mairana publikovanou v roce 1729, ve které popisoval pokus s rostlinou citlivkou (*Mimosa*). Všiml si, že rostlina v určitou denní dobu otevírá listy a poté je zase zavírá. Chtěl zjistit, zda toto chování bude pokračovat i ve stálé tmě, nebo jestli rostlina potřebuje světelný podnět. Zjistil, že rostlina i ve stálé tmě pokračuje v otevírání a zavírání listů. Výsledky pokusu tedy nasvědčovaly tomu, že rostlina musí mít nějaké vnitřní biologické hodiny, které řídí cirkadiánní rytmy (Hill et al. 2018).

O další prvenství se postarali Darwin a Darwin. Jako první se začal zajímat o adaptivní význam cirkadiánních rytmů. Ve své knize *The Power of Movement in Plants* napsal o adaptivní roli 24 hodinového režimu pohybu listů. Sledoval pohyby u mnoha druhů rostlin a navrhl, že některé pohyby jsou adaptací na vnější podmínky (Darwin and Darwin 1989).

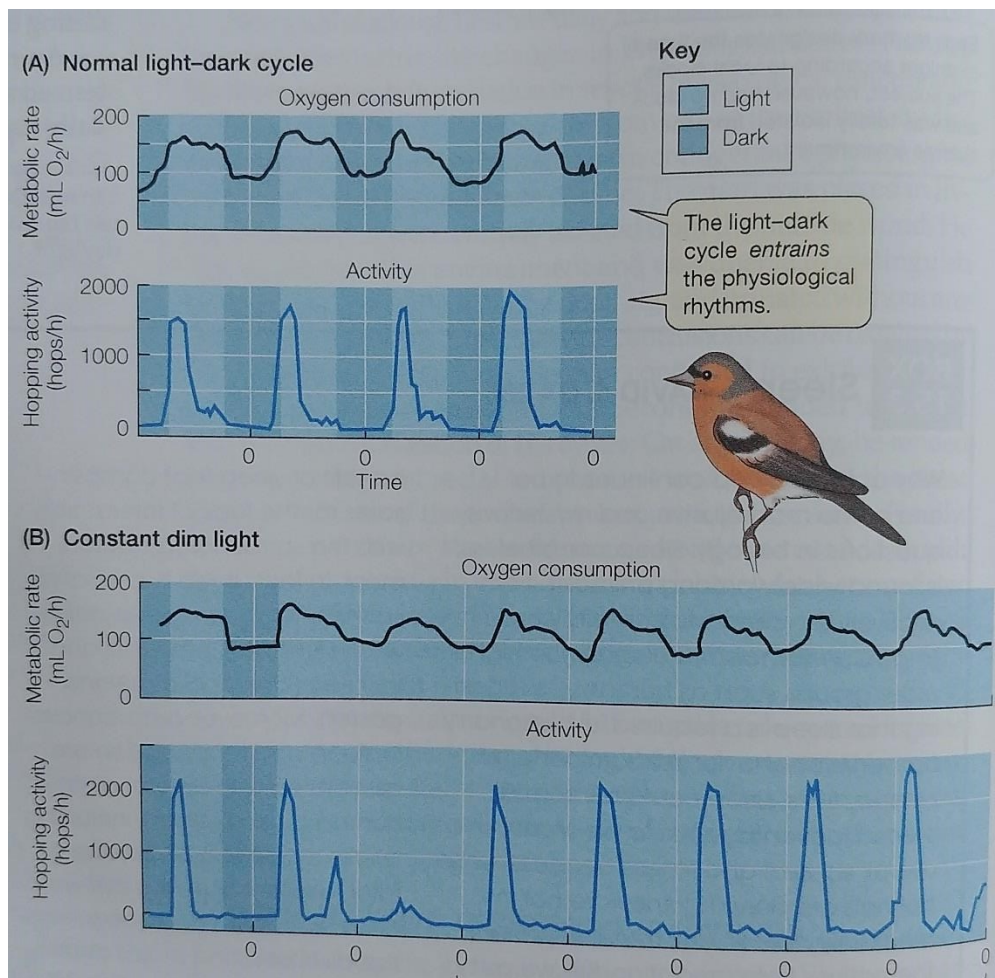
Za zmínku jistě stojí objevení prvního hodinového genu u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Objev učinili dva američtí vědci, a to Ronald Konopka a Seymour Benzer. Gen se jim podařilo nalézt díky odlišným délkám cirkadiánních rytmů, které octomilky vykazovaly. Při genetickém mapování octomilek našli různé mutace tohoto genu, který pojmenovali *period (Per)* (Konopka and Benzer 1971).

Milníkem, který se jistě vepsal do historie je udělení Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství v roce 2017 a to za výzkum v oblasti chronobiologie. Výzkum se zaměřil na octomilky. Vědci izolovali gen, který řídí cirkadiánní rytmy, pomocí tohoto genu vytvořili bílkovinu, která se v noci hromadí v buňkách a přes den se rozkládá. Posléze tento pokus aplikovali i u řas a člověka a tím potvrdili, že princip řízení cirkadiánních hodin je u všech stejný a objasňuje, na jaké molekulární úrovni fungují naše biologické hodiny. Ocenění si zasloužili tři američtí vědci a to Jeffrey Hall, Michael Young, Michael Rosbash (Huang 2018).

2.2 Definice

Cirkadiánní rytmy jsou všudypřítomné. Vyznačují se tím, že funkce daného organismu dosahuje maxima, minima, nebo rovnováhy vždy ve stejný čas v rámci dne. Rytmy nalezneme ve všech organismech od sinic, rostlin až po živočichy (Rosbash 2009). Jsou charakteristické svou přibližně 24 hodinovou délkou. Například u člověka je délka 24,5-25,9h, u mouchy domácí (*Musca domestica*) je to kolem 24h a u octomilek (*Drosophila spp.*) přibližně 23,9h. (Vaneckova et al. 2016). Cyklus tedy nemusí mít přesně 24h a je nutné ho seřizovat, jinak by nebyl synchronní s okolním střídáním dne a noci. K seřizování slouží periodické změny prostředí (Langmeier 2009). Cirkadiánní rytmy mají dvě složky, které je ovlivňují a to exogenní a endogenní. Exogenní neboli zevní závisí na rotačním pohybu Země, tedy na střídání světla a tmy (L-D cyklus). Endogenní neboli vnitřní do jisté míry nejsou závislé na střídání dne a noci. Jsou schopny běžet volně dál i přesto, že už na organismus nepůsobí změna světla (Trojan 2003). Existenci endogenní složky cirkadiánních rytmů dokazuje výzkum na octomilce obecné (*Drosophila melanogaster*). Velké populace octomilek byly drženy po dobu více než 600 generací v konstantních podmínkách (ve tmě, teplota 25°C, vlhkost 90%, potravu měly neustále). I přes takto dlouhou dobu se u nich cirkadiánní rytmy nemizely (Sheeba et al. 1999).

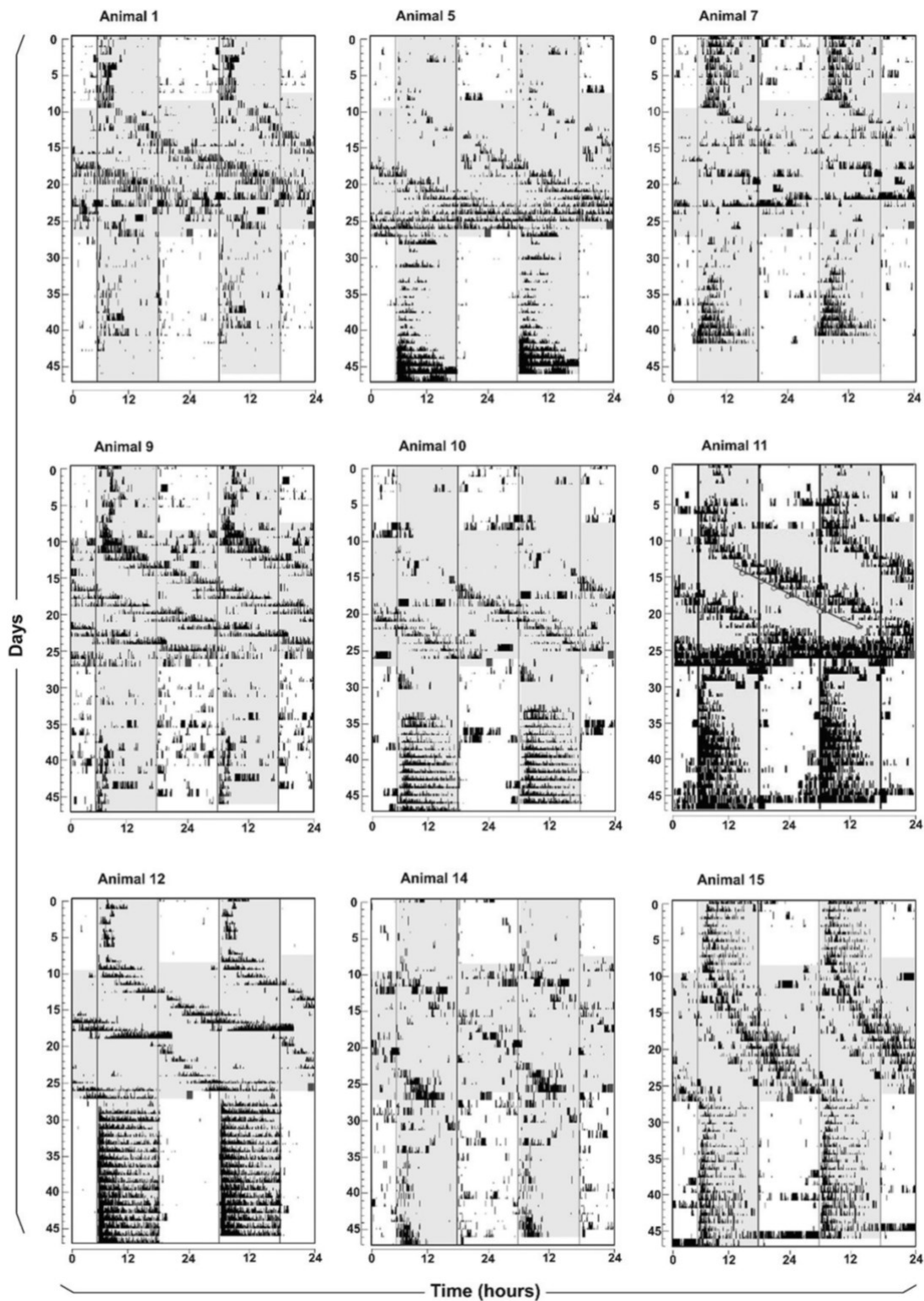
Stav, kdy přestanou environmentální podněty působit a rytmus dále pokračuje, nazýváme free-running rytmus. Perioda není přesně 24 hodin dlouhá, ale aktivita organismu se pravidelně střídá (obrázek 1) (Hill et al. 2018). Free-running rytmus je jen výjimečně dlouhý přesně 24 hodin, většinou se jeho délka pohybuje mezi 23-26 hodinami. Některé studie se zabývaly porovnáním free-running cyklu u stejných nebo příbuzných druhů, například u vosičky (*Nasonia girault*) je cyklus dlouhý od 22,5 hodin do 23,7 hodin a u vosičky (*Nasonia vitripennis*) je dlouhý od 24,5 hodin do 26,4 hodin, nebo u komára pisklavého (*Culex pipiens*) se délka rytmu pohybuje od 21 hodin u komárů z Íránu po 24,4 hodin u komárů pocházejících z Japonska. Další experiment byl proveden na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*), u které bylo při porovnání 5187 jedinců z 56 lokalit zjištěno, že i u nich je free-running cyklus závislý na zeměpisné šířce původu. U ruměnic měli jedinci ze severnějších poloh delší cykly než z jižnějších. Důvody existence těchto rozdílů ve free-running cyklu nejsou zatím známe (Shinkawa et al. 1994, Bertossa et al. 2013, Vaneckova et al. 2016).



Obrázek 1: Free-running rytmus: v první části označené A je vidět, jak běží cyklus při normálním L-D režimu. První graf zobrazuje spotřebu kyslíku, druhý pohybovou aktivitu. V části B je vidět pokračující cyklicky se měnící aktivita za konstantního světla (Hill et al. 2018)

Endogenní, vnitřní rytmy mají svůj vlastní vnitřní synchronizátor neboli pacemaker (Rokyta 2000). Cirkadiánní pacemakery jsou velice důležité pro synchronizaci chování organismů při L-D cyklu. Endogenní cykly pokračují i bez střídání dne a noci, ale délka jejich fází je ovlivněná světelnou intenzitou, environmentálními podněty a teplotou (Dubruille et al. 2009).

Pokud je organismus umístěn ve stálé tmě, tak jeho periodické chování přetrvá, ale chybí mu podnět, který by seřizoval rytmus na přesných 24h. Čím více cyklů proběhne bez seřízení, tím se cyklus prodlužuje. Tomuto jevu se říká entrainment (unášení). Entrainment můžeme vidět na obrázku 2. (Hill et al. 2018).



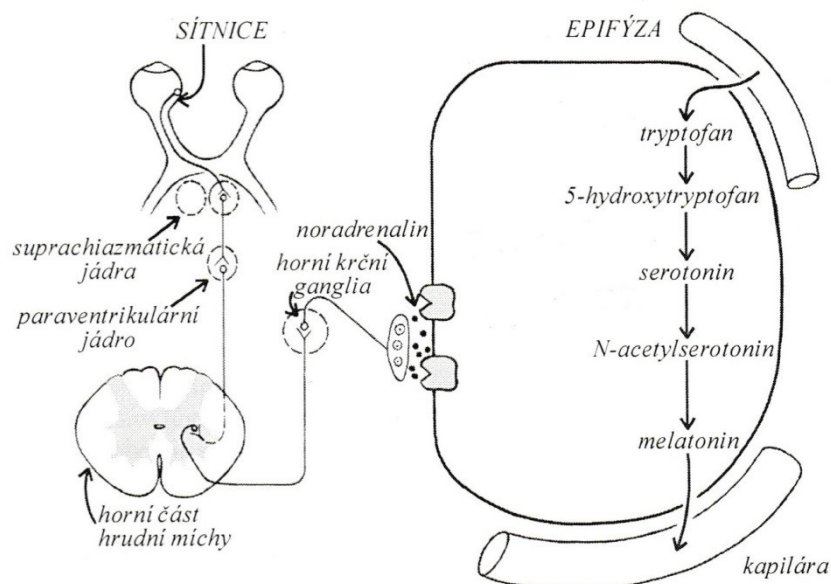
Obrázek 2: Entrainment: Grafy znázorňují pohyb zákeřnic (*Triatoma infestans*). Na vodorovné ose jsou dny (0-47), na svislé ose jsou hodiny (0-24). Graf zobrazuje aktivitu při zhasnutém (šedá pole) a rozsvíceném světle. Prvních 9 dnů se pravidelně ve stejný čas měnil svit, od 9. dne jsou zvířata ve stálé tmě. Ve stálé tmě sledujeme entrainment cyklu. U všech zvířat se cyklus prodlužuje. Po opětovném cyklickém střídání světla a tmy se cyklus ihned vrací zpátky na 24 hodinový režim (Valentinuzzi et al. 2014).

3 Mechanismy řízení

Cirkadiánní rytmy jsou většinou řízené světlem, ale to je pouze synchronizuje na přesný 24 hodinový režim. Osvětlení je přímo neřídí, ale jen ovlivňuje. Tato kapitola se zaměřuje na mechanismy, které rytmy řídí uvnitř těla. Tedy na endogenní systémy.

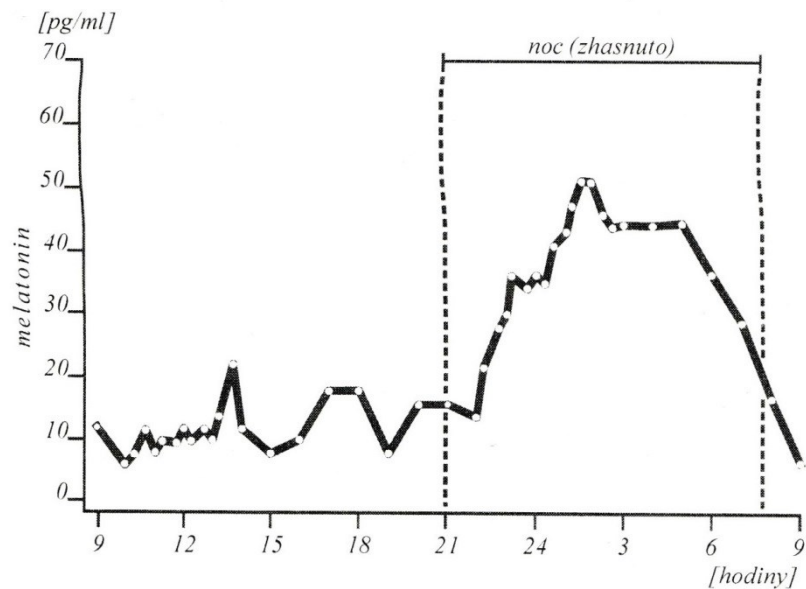
3.1 Hormonální

Hlavní hormony řídící cirkadiánní rytmy u savců jsou melatonin a serotonin. Oba hormony se vytvářejí v epifýze. Serotonin vzniká z prekursoru aminokyseliny tryptofanu, melatonin, označovaný také jako hormon tmy, se tvoří v noci ze serotoninu. Fotoreceptory zaznamenají světelný podnět a informaci vedou do suprachiasmatických jader. Ve tmě množství vzruchů v suprachiasmatických jádrech stoupá a uvolňuje se noradrenalin, čím se zvýší aktivita enzymu N-acetyltransferázy, který je potřeba k syntéze melatoninu ze serotoninu. Světlo snižuje množství vzruchů, tím se sníží uvolňování noradrenalinu a zastaví se tvorba melatoninu. Celá řídicí dráha je ukázána na obrázku 3 (Rokyta 2000).



Obrázek 3: Řídicí dráha melatoninu začíná dopadem světla na sítnici oka. Signál pokračuje do suprachiasmatických jader v mozku, které jsou součástí epifýzy, kde se z tryptofanu tvoří melatonin (Rokyta 2000).

Hladina melatoninu stoupá po zhasnutí, nejvyšší je mezi 2-3 ráno a poté postupně začne klesat. Přes den je hladina melatoninu velmi nízká (obrázek 4) (Rokyta 2000).



Obrázek 4: Hladina melatoninu v závislosti na denní době. Na vodorovné ose jsou hodiny, na svislé ose je koncentrace melatoninu v krvi. Od 9:00 do 21:00 je den a hladina melatoninu je poměrně nízká. Po zhasnutí se hladina melatoninu rychle zvyšuje. (Rokyta 2000)

Melatonin se podobně chová i u hmyzu. Největší sekreci zaznamenáváme ve tmě. Je potvrzeno, že hladina melatoninu vede ke změně pohybové aktivity u hmyzu. U savců je tvorba melatoninu řízená suprachiasmatickými jádry v epifýze, u hmyzu signály k řízení tvorby melatoninu pochází také z oblasti hlavy (Schwarzenberger and Wacker 2015).

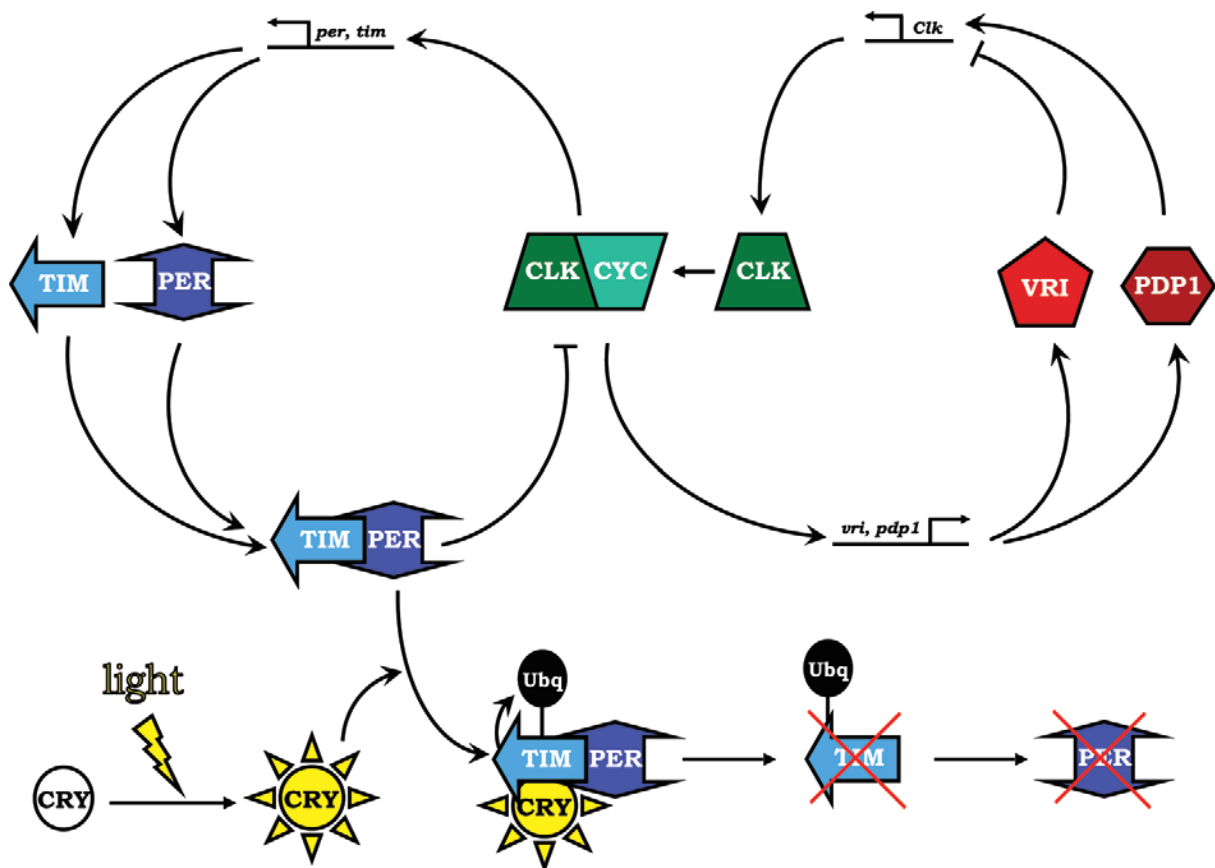
3.2 Genetické

Cirkadiánní hodiny mají genetický základ, byly nalezené celé sady genů ovlivňující mechanismy regulující cirkadiánní hodiny různých organismů od sinic, rostlin, octomilky k savcům (Sharma 2003). Dlouho se věřilo, že cirkadiánní hodiny existují pouze u eukaryotických organismů. První důkazy o denních cyklech u *Escherichia coli* a *Klebsiella* byly opomíjeny, protože se předpokládalo, že není výhodné udržovat 24h režim u organismů, které se dělí rychleji než jednou za 24h. První nalezené geny řídící cirkadiánní rytmus u sinic byly KaiA, KaiB, KaiC. Tím se tedy potvrdilo, že cirkadiánní rytmy jsou řízeny geneticky i u prokaryotických organismů (Johnson and Golden 1999). Cirkadiánní rytmy jsou velice důležité pro fotosyntetická prokaryota, díky nim se nejspíše staly před 2,5 miliardami let dominantními organismy na Zemi. Ve fotosynteticky aktivních organismech jsou buněčné procesy, které jsou citlivé na UV záření, přesunuté na noc, aby se zamezilo poškození fotosyntetického aparátu (Dvornyk et al. 2003).

Blíže ke studovaným štěnicím mají druhy octomilek (*Drosophila spp.*), které jsou skvělým modelovým organismem v mnoha disciplínách. První geny, které u nich byly nalezeny, jsou *period (Per)* a *timeless (Tim)*. Tyto geny poprvé popsali Konopka a Benzer (1971) na základě výzkumů na octomilkách domácích (*Drosophila melanogaster*). Studovali mutanty, kteří měli odlišnou délku cirkadiánních hodin. Nalezli 3 varianty mutace genu *Per*. Jsou to Per^0 , Per^s , Per^l . Per^0 je nefunkční mutantní varianta genu a mutantní mušky jsou arytmičné, líhnou se náhodně během dne. Per^s neboli short, mají kratší periodu než divoký typ (19h, zatímco divoký typ má periodu 24h). Poslední mutant Per^l , neboli long, má periodu delší než divoký typ. Perioda tohoto mutanta je 28h (Konopka and Benzer 1971).

3.2.1 Model molekulárních hodin octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*)

Cirkadiální cyklus je na molekulární úrovni řízen pomocí transkripčních a translačních smyček, které jsou autonomní a nacházejí se v mnoha buněčných typech. Dvě hlavní smyčky jsou kódovány transkripčními faktory *clock* (*Clk*) a *cycle* (*Cyc*). V první smyčce se proteiny zvané *period* (*Per*) a *timeless* (*Tim*) začnou hromadit v cytoplasmě. Protein *Per* je samostatně nestabilní, proto se musí vyskytovat s proteinem *Tim*, který ho stabilizuje. Po spojení se dimer dostane do jádra a uzavře se pomocí sekvence *Clk/Cyc*. Bez aktivace, kterou vyvolá *Clk/Cyc* se množství *Tim* a *Per* začne snižovat. Ve druhé smyčce je transkripce *Clk* regulována pomocí *vrille* (*Vri*) a *PAR-domain protein 1* (*Pdp1*). Zatímco *Vri* potlačuje transkripci *Clk*, *Pdp1* jí aktivuje. K synchronizaci hodin je třeba světlo, které aktivuje senzor *Cryptochrome* (*Cry*). Po aktivaci se naváže na *Tim*. Na *Tim* se naváže ubiquitin a protein je degradován. *Per* je samostatně nestabilní, tak také zaniká (obrázek 5) (Sosniyenko et al. 2010, Meireles-Filho and Kyriacou 2013).



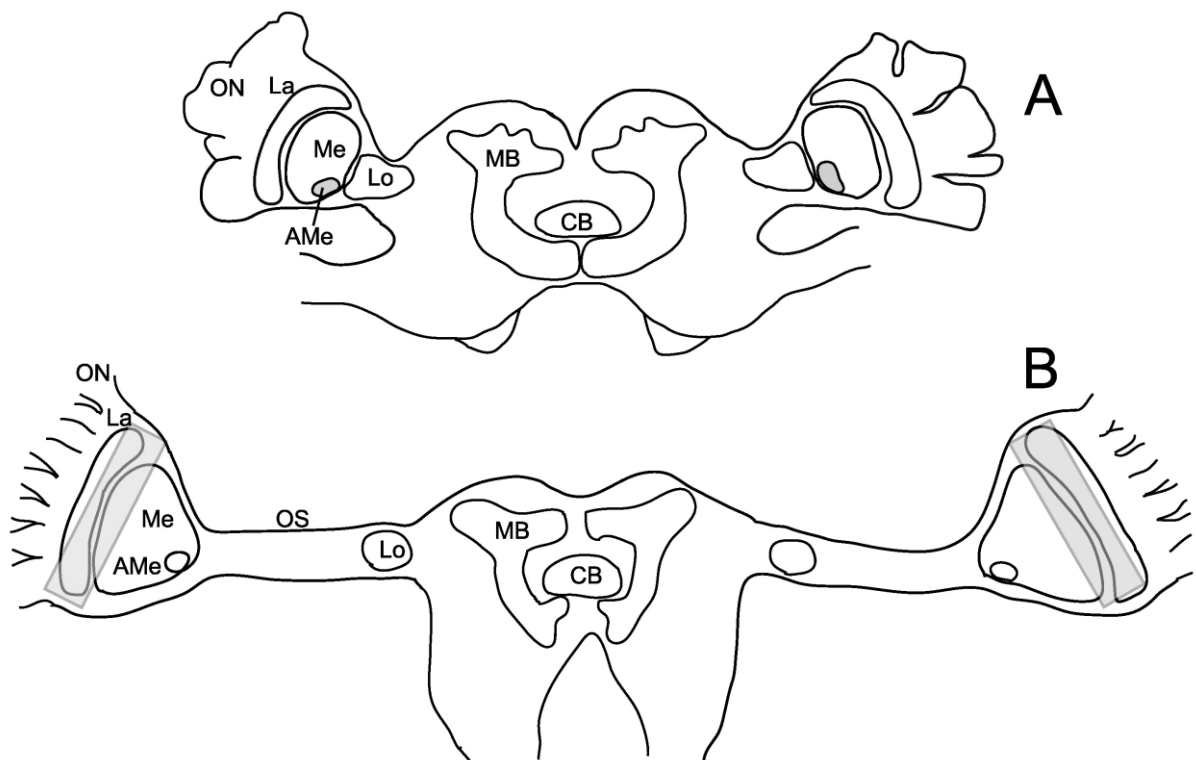
Obrázek 5: Model molekulárních hodin octomilky obecné zobrazuje dvě transkripční/translační zpětnovazebné smyčky. (Meireles-Filho and Kyriacou 2013)

3.3 Nervové

Nervové řízení cirkadiánního chování je nejlépe popsáno u savců. Biologické hodiny, které řídí cirkadiánní rytmy, nalezneme v suprachiasmatických jádrech. Jsou to shluky mozkových buněk, které jsou uloženy v středním hypotalamu a vykazují silné cirkadiánní rytmy v metabolické aktivitě, v expresi genů a ve fotosenzitivě (Illnerová and Sumová 2008).

Co přesně ovlivňuje aktivitu u denních a co u nočních savců? Výzkum, který porovnával noční a denní hlodavce zjistil, že většina základních prvků cirkadiánního systému je stejná, včetně mechanismu, který seřizuje rytmus pomocí světla a molekulárních oscilátorů (Smale et al. 2008). Podle výzkumu je hlavním rozdílem pacemaker v suprachiasmatickém jádře v hypotalamu (Vosko et al. 2009). Výzkum denních hlodavců zjistil, že jejich rytmy mohou být značně plastické. Tedy, že za určitých podmínek se mohou stát nočními tvory. Tato změna je umožněna nejspíše změnou oscilátorů v suprachiasmatickém jádře. Změna aktivity může pomoci zvířatům přizpůsobit se změnám okolních podmínek (Kronfeld-Schor, Bloch, et al. 2013).

Existují výzkumy o nervovém řízení rytmů u hemimetabolního hmyzu, ale zatím není známo konkrétní místo v rámci nervové soustavy, které by řídilo cirkadiánní rytmy, tak jako u savců. Bylo nalezeno více míst, které ovlivňují rytmy. Jedním z nich je složené oko. Centrum cirkadiánních hodin uvnitř optického laloku je u každého druhu trochu jiné. Nejprve se předpokládalo, že u švábů je to lobula, nyní se přiklání většina autorů k tomu, že místo odkud jsou rytmy řízeny je medulla. U cvrčků je to distální část optického laloku včetně vnějších oblastí medully. U holometabolního hmyzu byla objevena accessory medulla (AMe), je to pozůstatek larválního optického neuropilu. Po vylíhnutí larvy ztrácí neuropil svůj význam a stává se z něj centrum cirkadiánních rytmů, ale AMe nalezneme i u hemimetabolního hmyzu, kde plní nejspíše funkci cirkadiánních hodin. AMe u hemimetabolního hmyzu je znázorněna na obrázku 6. Pro přesnou identifikaci centra cirkadiánních hodin jsou potřeba další výzkumy. Nyní se ví, že jsou rytmy v mozku ovlivňovány pomocí nervových drah, ve kterých jsou hlavními chemickými posly serotonin a pigment-dispersing factor (PDF) (Homberg et al. 1991, Tomioka and Abdelsalam 2004).



Obrázek 6: Schématické znázornění oblastí mozku. Na obrázku můžeme vidět schématické znázornění oblastí mozku, které řídí cirkadiánní rytmy u A) švába, B) cvrčka. Šedě jsou zvýrazněna místa, u kterých se předpokládá, že řídí cirkadiánní rytmy. Vysvětlení zkratk: AMe: accessory medulla, CB: central body, La: lamina, Lo: lobula, MB: mushroom body, Me: medulla, ON: optic nerve (Tomioka and Abdelsalam 2004).

4 Plasticita cirkadiálních rytmů

Střídání dne a noci je vcelku stabilní podnět, podle kterého se organismy synchronizují. Ale ne všechny organismy žijí v podmínkách, kde se osvit střídá. V hloubkách v oceánech, nebo v jeskynních se osvit nemění a cykly nemohou být synchronizovány podle střídání dne a noci. Je tedy možné, že se rytmy zvládnou adaptovat na okolní podmínky?

Byly nalezeny druhy ryb a členovců, které žijí v konstantních podmínkách a nemají žádné cirkadiální rytmy, nebo vykazují jen občasné rytmy. Tyto rytmy jsou dlouhé jako cirkadiální, ale chybí jim periodicita. To znamená, že v konstantních podmínkách není výhodné udržovat dlouhodobě cirkadiální rytmy (Sharma 2003). Ale byly nalezeny jeskynní druhy ryb, u kterých i přes konstantní podmínky jsou cirkadiální rytmy zachovány. Trajano a Menna-Barreto (1996) provedli experiment na rybách z čeledi *Trichomycteridae*, které žijí v jeskyních v Brazílii. V těchto jeskyních je velmi stabilní klima, to znamená, že cirkadiální rytmy těchto ryb nemohou být řízeny změnou teplot. Hluboko v jeskyni připravili akvária, do kterých umístili ryby. Celou arénu snímalo několik fotobuněk a po vyhodnocení pohybu zjistili, že všechny ryby vykazují pravidelné rytmy (Trajano and Menna-Barreto 1996). Tento jev je možné vysvětlit tak, že udržování rytmů je výhodné pro vnitřní koordinaci buněčných procesů (Sharma 2003). Důležitou funkcí cirkadiálních hodin, je také časová koordinace vnitřních metabolických událostí. Nekompatibilní procesy, tak mohou být odděleny časově (Krieger 1982).

Většina pokusů je prováděna v laboratorních podmínkách, ale okolní prostředí je mnohem složitější. Nemění se jeden faktor, tedy osvit, ale pokaždé se mění více podmínek (rozdílná vlhkost, teplota, proměnlivá intenzita světla). Nemění se jen abiotické podmínky, ale i ty biotické, jako je dostupnost potravy. Všechny tyto změny mohou významně ovlivnit aktuální aktivitu organismů. Proto je důležité, pokusy přesunout do přirozeného prostředí (Kronfeld-Schor, Bloch, et al. 2013). Například pokus na čipmancích východních (*Tamias striatus*) dokázal, že je výhodné udržovat cykly a v některých denních dobách být v úkrytu, chráněn před predací. Autoři odchytili skupinu čipmanků, kterou rozdělili do dvou podskupin, kde jedné skupině upravili denní rytmy operativně zásahem do

suprachiasmatického jádra a druhou skupinu použili jako kontrolní vzorek. Všem čipmankům dali sledovací obojky a po rekonvalescenci čipmanků po operaci, všechny vypustili. Čipmanci po operaci s arytmiickým chováním rychle podlehli predaci. Na tomto experimentu je jasně vidět, že je důležité počítat i s ostatními selekčními tlaky okolí a pokusit se přesunout experimenty do přirozeného prostředí (DeCoursey et al. 2000).

Role denního světla je známá, ale co měsíční svit? Nemůže i ten být dalším faktorem, který je rozdílný při laboratorních pokusech? Podle výzkumu vedeného Kronfeld-Schorem, Dominoni et al. 2013 měsíční svit ovlivňuje nejen noční, ale i denní živočichy. Například larvy *Myrmeleon obscurus* si hloubí do písku pasti, každý den jsou tyto pasti přestavovány. Za úplňku jsou pasti veliké a když je měsíc v novu jsou pasti malé. Nejspíše je za měsíčního svitu vyšší pravděpodobnost ulovení kořisti a je výhodné investovat energii do stavby (Kronfeld-Schor, Dominoni, et al. 2013).

Rytmy se mohou u organismu adaptovat i podle dělby práce. To je dobře ukázáno na sociálním hmyzu, jako jsou včely a mravenci. Například u včely medonosné (*Apis mellifera*) larvy potřebují neustálou péči, takže mladé dělnice se neustále starají o larvy a jejich rytmy jsou tedy arytmiické. Starší dělnice, které létají pro nektar, vykazují silné rytmické chování (Moore 2001). Dalším příkladem je čmelák zemní (*Bombus terrestris*), u kterého jsou velké rozdíly ve velikosti mezi jednotlivými jedinci. Ti menší, kteří zůstávají v úlu a starají se o larvy, mají oslabené cirkadiální rytmy. Ti větší létají pro nektar a mají silné cirkadiální chování. Pokud byli malí čmeláci vystaveni v úlu střídání dnu a noci, zůstali arytmičtí, ale když byli drženi osamocně, tak se jim rychle začaly cirkadiální rytmy rozvíjet. To znamená, že tento hmyz má velice plastické rytmy, které se upravují podle okolních podmínek (Yerushalmi 2006). Také mravenec (*Camponotus compressus*) má dost flexibilní rytmy. Například královna vykazuje rytmické chování před pářením. Po páření, kdy shazuje křídla a začíná klást vajíčka je její chování arytmiické. Když přestane klást vajíčka, tak zase obnovuje rytmické chování (Sharma et al. 2004).

5 Vnitrodruhový polymorfismus cirkadiálních rytmů

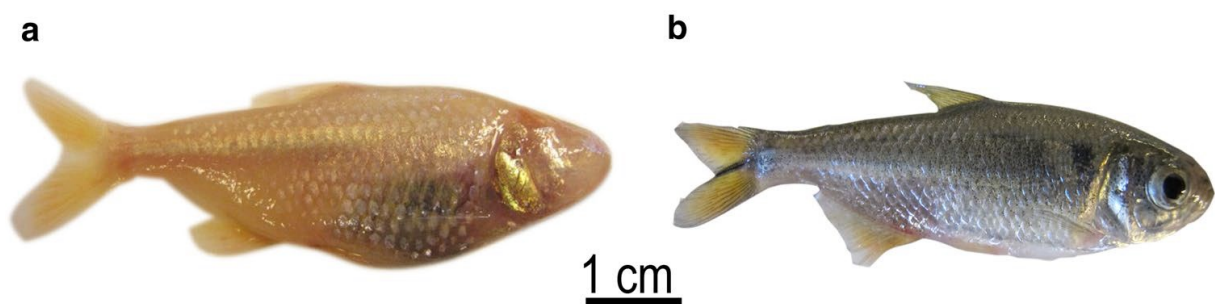
Polymorfismy v cirkadiálních hodinách u stejných druhů v jiných ekologických podmínkách mohou být důkazem toho, že cirkadiální rytmy jsou schopné se adaptovat (Hut et al. 2013). Tato kapitola uvádí příklady organismů, které mají v různých okolních podmínkách adaptované rytmy.

Co znamená přesně adaptace? Adaptace je fenotypová varianta (mutace), díky níž má organismus vyšší fitness v daném prostředí oproti normálnímu (divokému) typu (Reeve and Sherman 1993).

Důkaz schopnosti adaptovat se představuje rostlina *Arabidopsis thaliana.*, která se hojně vyskytuje po celé severní polokouli. Z výzkumu rytmů těchto rostlin získaných v různých zeměpisných šířkách se zjistilo, že délka cyklu cirkadiálních hodin je závislá na zeměpisné šířce původu rostliny. Rostliny z větších zeměpisných šířek mají delší cykly a i pohyby jejich listů jsou závislé na místě původu rostliny. To znamená, že tyto rostliny mají cykly adaptované podle teploty (Michael 2003).

V hodinových genech octomilky domácí byly nalezeny polymorfismy v kódování theonine-glycinu, které jsou pravděpodobně adaptací na rozdílné teploty. Rozdílné theonine-glycinové kódování mají octomilky z Evropy a octomilky ze Severní Ameriky což dokazuje, že existují adaptace na genové úrovni. V experimentu, ve kterém byly nechány octomilky s oběma variantami kódování, byly samice schopné rozlišit samce se stejnou mutací a rozmnožovaly se především s nimi. Možná jim k tomu pomohl hlasový projev samců, protože samci z Ameriky používali kratší zvukové signály než ti z Evropy. Předpokládá se, že schopnost samic rozlišovat mezi různými alelami může být jedním z mechanismů zajišťujících potřebnou alelickou rovnováhu pro zajištění lepší adaptability na měnící se lokální mikroklimatické podmínky (Zamorzaeva et al. 2005). Dalším důkazem je nalezení polymorfismů cirkadiálního genu *OtsClock1a* a *OtsClock1b* u lososa čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*), kde byla při porovnávání lososů z různých míst nalezena mutace genu, která je adaptací na různé ekologické podmínky (O'Malley and Banks 2008).

Předchozí experimenty ukazují polymorfismus v cirkadiálních rytmech, který je ovlivněn především různou okolní teplotou. Následující experiment dokazuje, že se organismy nemusí adaptovat pouze na teplotu. Beale et al. zkoumali tetru mexickou (*Astyanax mexicanus*), u nichž se před tisíci lety oddělila populace žijící v jeskynních, zatímco ostatní žily dále v okolních řekách. Všimli si rozdílného vzhledu ryb žijících v jeskynních a mimo ně. Při zjišťování vazeb mezi DNA opravami a změnami cirkadiálních rytmů zjistili, že u ryb žijících v jeskynních vznikla genetická mutace, která se fenotypově projevuje ztrátou očí a pigmentace kůže (obrázek 7), ale i bez očí u nich přetrvávají cirkadiální rytmy. U ryb žijících mimo jeskyně se za světelné fáze mutace opravují (Beale et al. 2016).



Obrázek 7: Fenotypový rozdíl mezi a) tetrou mexickou žijící v jeskyni a b) tetrou mexickou žijící v okolních řekách (Beale et al. 2016)

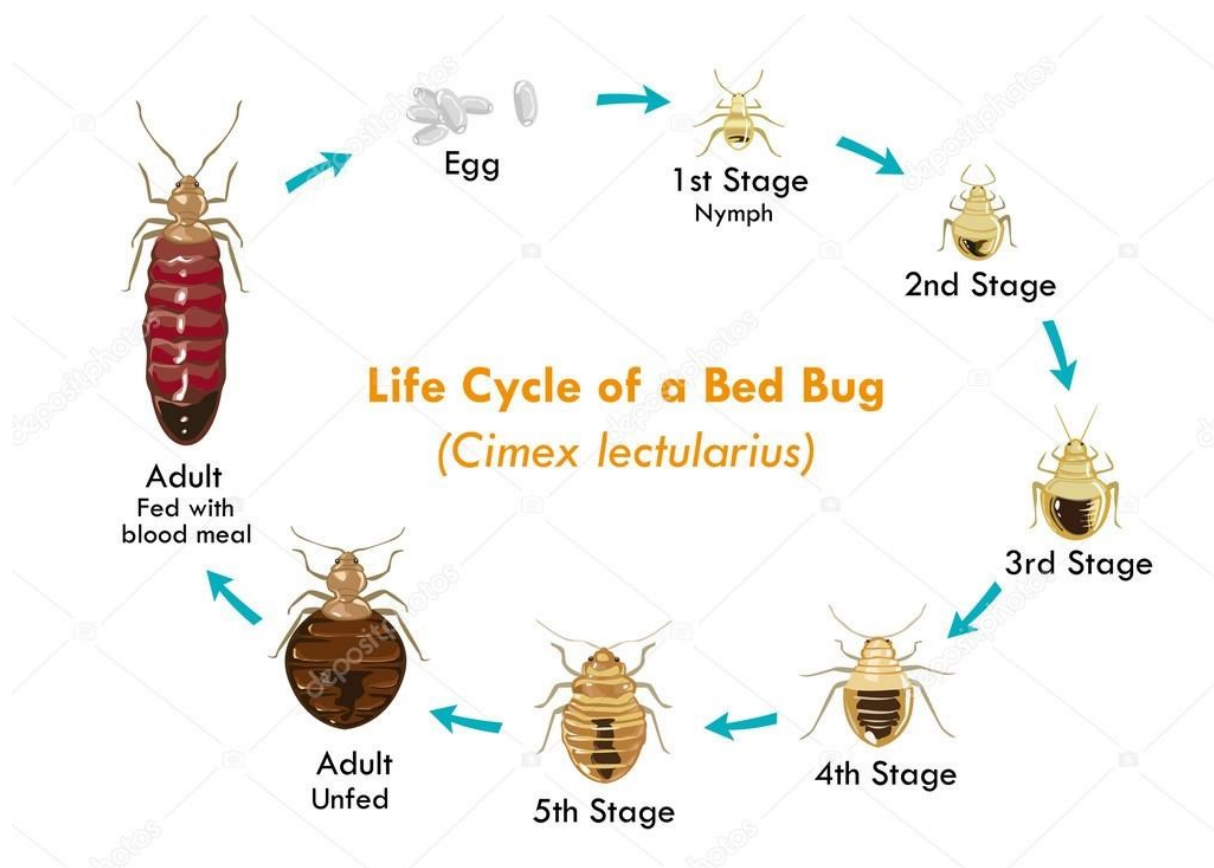
Jak je možné, že tyto polymorfismy vznikají? Výše uvedené experimenty ukazují, že je pro organismy výhodné upravit si cirkadiální rytmy podle okolních podmínek prostředí. Pomocí mutací mají lépe rozvržené chování, snáze se jim získává potrava a díky tomu mají více času a dostupné energie k rozmnožování. Adaptace druhů, ale i vnitrodruhové adaptace na vnější ekologické podmínky zvyšují organismům fitness (Abhilash and Sharma 2016).

6 Charakteristika druhu *Cimex lectularius*

Štěnice domácí (*Cimex lectularius*) je červenohnědý, bezkřídlý, krev sající ektoparazit člověka a netopýrů, patřící mezi hemimetabolní hmyz s pěti juvenilními stadii (obrázek 8). Nymfy jsou po vylíhnutí světle žluté. V dospělosti jsou štěnice pět až sedm mm veliké, mají oválné ploché tělo a křídla jsou zakrnělá v drobné přívěsky, jsou mikropterní. Člověka využívají pouze, jako zdroj potravy (obě pohlaví i larvy), ale nežijí na něm permanentně. Sání trvá pět až deset minut a probíhá přibližně jednou týdně. Aby zamezily srážení krve, vstříkují do rány při krmení antikoagulanty. Při cestování za potravou ujdou i relativně dlouhé vzdálenosti (i více jak 20m) (Usinger 1966).

Samice kladou vajíčka, která jsou asi jeden milimetr velká, při 22°C se vylíhnou za deset až dvanáct dní. Pokud je teplota vyšší, v rozmezí 30-35°C, tak se líhnou za čtyři až pět dní. Každé stadium se potřebuje alespoň jednou nakrmit krví, aby se mohlo svléknout. Při 22°C vývoj v dospělce trvá šest až devět týdnů, zatímco při 30°C trvá jen okolo tří týdnů (Russell et al. 2013).

Rozmnožují se pomocí traumatické inseminace. Samec prorazí penisem samici břišní stěnu na pravé straně, kde má redukovány ovaria a spermie vstříkne do paragenitálního ústrojí, které se nachází laterálně na abdominu samice. Samice jsou schopné si spermie uschovat až 35-50 dní uvnitř paragenitálního systému. Zajímavostí je že, vajíčka jsou oplodněna už v ovariích a ne až ve vejcovodech. Traumatický způsob kopulace některé samice nepřežijí, ale pomáhají jim k hojení ran hemocyty, což je hlavní složka v imunitní obraně hmyzu (Reinhardt and Siva-Jothy 2007, Usinger 1966).



Obrázek 8: Životní cyklus štěnice domácí (*Cimex lectularius*)

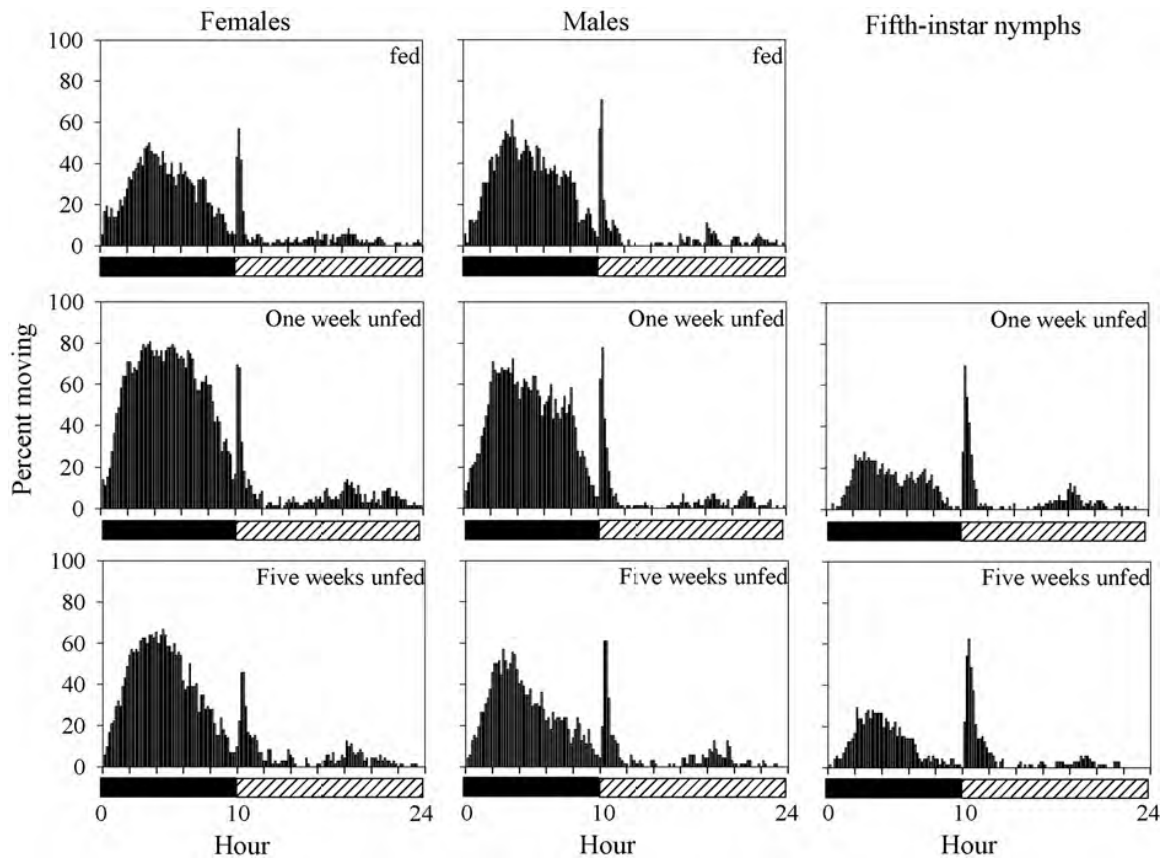
(autor : <https://cz.depositphotos.com/103506698/stock-illustration-life-cycle-of-the-bed.html>)

7 Cirkadiální rytmy štěnice

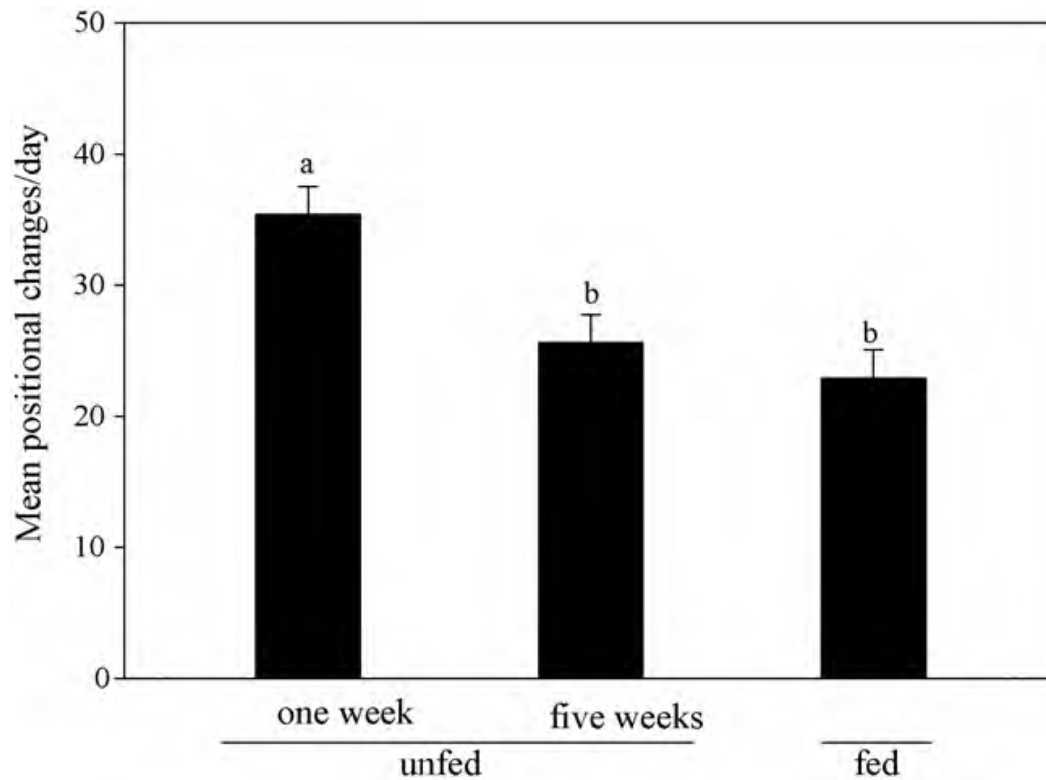
Cirkadiální rytmy štěnic jsou velmi málo prozkoumané, proto tato kapitola čerpá jen z jediného zdroje, který podrobněji popisuje jejich rytmy. Pro porovnání uvádím cirkadiální rytmy další hematofágní plošnice a to zákeřnice (*Triatoma infestans*).

Štěnice žijí v lidské blízkosti a jejich rytmy se musely přizpůsobit hostiteli tak, aby eliminovaly možnost, že je hostitel objeví, proto je jejich rytmus obrácený k lidskému. Tedy přes den jsou v úkrytu a v noci, když člověk spí, se jdou krmit. Jejich cirkadiální rytmus je silně vázán na světlo. Světelný signál je hlavním mechanismem řídícím jejich aktivitu. Pokud jim laboratorně změním den na noc změnou osvětlení a ostatní podmínky jako vlhkost a teplota zůstanou stejné, tak bude trvat čtyři dny, než se jejich cyklus synchronizuje s obráceným režimem. Všechna stádia štěnic mají endogenní cyklus, tedy za konstantních podmínek se jejich aktivita cyklicky mění. Za konstantní tmy je jejich cyklus dlouhý cca 26h a za konstantního světla cca 24h. Většina štěnic se začíná pohybovat ihned po zhasnutí světla, přičemž nejrychlejší nárůst pohybu zaznamenáváme první čtyři hodiny po zhasnutí. Při přechodu ze tmy na světlo se u většiny hmyzu rychle zvýší aktivita, ale ta zase velice rychle klesá a po celou dobu fotofáze zůstává nízká (obrázek 9) (Romero et al. 2010).

Jejich pohybová aktivita je také závislá na tom, kdy naposledy jedly. Na obrázku 9 je znázorněn počet pohybů (změn pozic) u nenakrmených týden, nenakrmených pět týdnů a nakrmených štěnic. Dospělí jedinci, kteří jsou jen krátkou dobu bez potravy, se přemísťují mnohem častěji, než najedení. Již po 5 týdnech bez jídla sníží svoji aktivitu (obrázek 10), ale schopni přežít bez jídla jsou i více než rok. Pokud mají dostatek potravy, tak jsou reprodukčně nejaktivnější, v případě, kdy je zdrojů potravy málo, tak šetří energii (Romero et al. 2010).



Obrázek 9: Graficky znázorňuje pohyb samic, samců a pátých nymfálních instarů štěnice domácí v průběhu dne. Pod každým grafem je černě znázorněna tma a šrafovane světlo. Na všech grafech je jasně vidět, že aktivita štěnic je nejvyšší za tmy. Po rozsvícení se aktivita skokově zvýší, to je způsobeno reakcí na světlo, kdy se štěnice chce rychle vrátit do úkrytu. Za světla zůstává aktivita po celou dobu nízká pohybu samic, samců a pátých instarů v závislosti na denní době (Romero et al. 2010).



Obrázek 10: Grafické znázornění počtu pohybů u týden nenakrmených, pět týdnů nenakrmených a nakrmených štěnic (Romero et al. 2010).

7.1 Porovnání cirkadiálních rytmů štěnice a zákeřnice (*Triatoma infestans*)

Zákeřnice (*Triatoma infestans*) je hematofágní parazit, který přenáší v tropických zemích Chagasovu chorobu. Má stejně jako štěnice velmi plastické cirkadiální rytmy. Tyto zákeřnice sají krev velké škále živočichů a to nočním i denním. Hlavními hostiteli jsou lidé a domácí zvířata, na kterých se krmí přes noc, ale byly nalezeny i na mnoha divokých zvířatech, například na netopýrech, kteří jsou aktivní v noci. To znamená, že jejich rytmy jsou silněji ovlivňovány aktuální nabídkou potravy než světelným signálem. Ektoparazité, kteří mají rytmy řízené podle L-D cyklu, jako například štěnice, spoléhají na předvídatelné chování hostitele, ale pro snadnější získání potravy je výhodnější řízení rytmů podle pohybové aktivity hostitele, které mají zákeřnice. Pro potvrzení těchto informací provedla Valentinuzzi et al. 2014 experiment. Zákeřnice, které byly chovány v konstantních podmínkách a jejichž rytmy byly cca 24 hodinové, po několik dní dostávaly vždy ve stejný čas, jako stimul živé kuře, což způsobilo, že se jejich rytmy synchronizovaly s aktuální nabídkou potravy (Valentinuzzi et al. 2014).

8 Metodika

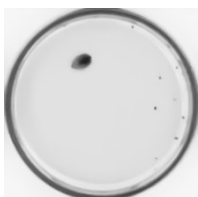
Tato kapitola seznamuje čtenáře s metodikou výzkumu cirkadiánních rytmů štěnice domácí. Výzkum a jeho výsledky budou součástí plánované diplomové práce, níže je popsán průběh pilotního výzkumu. Inspirací pro metodiku byl článek (Romero et al. 2010). Štěnice byly chovány v plastových nádobkách (falkonkách) o objemu 50ml, které měly síťované dno, skrze které se mohly krmit. Do falkonek jsme dali několik složených černých papírů, které jim simulovaly úkryt (obrázek 11). Chovy byly uloženy v klimaboxech s teplotou 27°C. Byly použity dva klimaboxy, jeden s fotofází od 17:00 do 5:00 a druhý s fotofází od 5:00 do 17:00. Krmili jsme jednou týdně, vždy přibližně ve stejný čas a to uprostřed periody. Štěnice byly krmeny lidskou krví uchovávanou v lednici, která byla ohřívána na vodní lázni pro navození přirozených podmínek. Nejprve jsme si vyrobili pytlíčky z parafilmu (obrázek 12), do kterých jsme stříkačkou přenesli krev. Poté se na vodní lázeň umístily pytlíčky a na ně posadily nádobky. Teplota vody ve vodní lázni se udržovala po celou dobu krmení na 40°C, protože jsme zjistili, že při této teplotě má krev v sáčkích 37°C. Z těchto chovů vybíráme nakrmené páté nymfální instary, které následně po jednom ukládáme do eppendorfek skladovaných v klimaboxech. Po týdně vybereme dospělé jedince a přetřídíme je podle pohlaví. Tím zajistíme panenské (neoplozené) jedince. Poté použijeme malé Petriho misky a pod každou dáme jednu štěnici. Petriho misky umístíme na bílý papír a celou arénu snímáme fotoaparátem každých 5 minut po dobu minimálně jednoho týdne. Z vyhotovených digitálních fotografií poté pomocí programu EthoWatcher vyhodnocujeme pohyb jedinců (Crispim Jun. et al. 2012). Za pohyb jedince je považován posun o 10 a více pixelů, výřez fotografie jedné Petriho misky má rozlišení 240 x 240 pixelů (obrázek 13).



Obrázek 11: Kolonie štěnic domácích v úkrytu, který jim simuluje složený černý papír



Obrázek 12: Sáček s krví vytvořený z parafilmu



Obrázek 13: Výřez fotografie jedné Petriho misky (autor: Ondřej Balvín)

9 Závěr

Na základě literární rešerše lze říci, že mechanismy řízení cirkadiánních rytmů jsou na sobě v jisté míře závislé. Vylučování hlavního hormonu, který ovlivňuje cirkadiánní rytmy, tedy melatoninu, je závislé na nervovém řízení. Signální dráha melatoninu začíná v oku, které přijme světelný signál. Molekulární hodiny octomilky jsou také synchronizovány pomocí světelného signálu. Tedy i genetické řízení je provázané s nervovým. V experimentech, ve kterých byly švábům a cvrčkům odebrány zrakové orgány, bylo zjištěno, že po odebrání zvířata zůstala arytmiická (Tomioka and Abdelsalam 2004). To znamená, že u některých organismů je nervové řízení, jako hlavní, ale i u nich je ovlivňováno pomocí hormonálních drah, ve kterých jsou hlavními chemickými posly serotonin a pigment-dispersing factor (PDF). Toto zjištění je důležité k další diskuzi v diplomové práci, kde mi umožní pochopit, jaká změna by teoreticky mohla zapříčinit změnu v cirkadiánních rytmech štěnice.

Zmíněné studie prokázaly, že cirkadiánní rytmy mohou být značně plastické. Bylo nalezeno mnoho polymorfismů v cirkadiánních rytmech na genetické úrovni. Za nedostatek, ale považuji nedostatek experimentálních studií snažících se prokázat adaptivní význam rytmu a jejich polymorfismů. Proto jsme si pro studium vybrali štěnici, která má proměnlivou ekologii (více hostitelů s různou aktivitou). Dalším nedostatkem je jistě málo existujících informací o cirkadiánních rytmech štěnice domácí (*Cimex lectularius*). Pro další studie by bylo jistě přínosné vědět více o mechanismech řízení cirkadiánních rytmů u hmyzu, ale bohužel toto téma ještě není dostatečně prozkoumané.

10 Použitá literatura:

- Abhilash, L., and V. K. Sharma. 2016.** On the relevance of using laboratory selection to study the adaptive value of circadian clocks: Selection toolkit for the study of circadian clocks. *Physiol. Entomol.* 41: 293–306.
- Beale, A. D., D. Whitmore, and D. Moran. 2016.** Life in a dark biosphere: a review of circadian physiology in “arrhythmic” environments. *J. Comp. Physiol. B.* 186: 947–968.
- Bertossa, R. C., J. van Dijk, W. Diao, D. Saunders, L. W. Beukeboom, and D. G. M. Beersma. 2013.** Circadian Rhythms Differ between Sexes and Closely Related Species of *Nasonia* Wasps. *PLoS ONE.* 8: e60167.
- Crispim Jun., C. F., C. N. Pederiva, R. C. Bose, V. A. Garcia, C. Lino-de-Oliveira, and J. Marino-Neto. 2012.** ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput. Biol. Med.* 42: 257–264.
- Darwin, C., and C. Darwin. 1989.** The power of movement in plants, The works of Charles Darwin. New York University Press, New York.
- DeCoursey, P. J., J. K. Walker, and S. A. Smith. 2000.** A circadian pacemaker in free-living chipmunks: essential for survival? *J. Comp. Physiol. [A].* 186: 169–180.
- Dubruille, R., A. Murad, M. Rosbash, and P. Emery. 2009.** A Constant Light-Genetic Screen Identifies *kismet* as a Regulator of Circadian Photoresponses. *PLoS Genet.* 5: e1000787.
- Dvornyk, V., O. Vinogradova, and E. Nevo. 2003.** Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 2495–2500.
- Hill, R. W., G. A. Wyse, and M. Anderson. 2018.** Animal physiology. Sinauer Associates, New York.

- Homberg, U., S. Wurden, H. Dirksen, and K. R. Rao. 1991.** Comparative anatomy of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects. *Cell Tissue Res.* 266: 343–357.
- Huang, R.-C. 2018.** The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomed. J.* 41: 5–8.
- Hut, R. A., S. Paolucci, R. Dor, C. P. Kyriacou, and S. Daan. 2013.** Latitudinal clines: an evolutionary view on biological rhythms. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280: 20130433.
- Illnerová, H., and P. A. Sumová. 2008** Vnitřní časový systém. *Fyziologický Úst. AV ČR Praha Interní Medicína Praxi.*3.
- Johnson, C. H., and S. S. Golden. 1999.** Circadian Programs in Cyanobacteria: Adaptiveness and Mechanism. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 389–409.
- Konopka, R. J., and S. Benzer. 1971.** Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2112–2116.
- Krieger, D. T. 1982.** The Clocks that Time Us: (Physiology of the Circadian Timing System): *Psychosom. Med.* 44: 559–560.
- Kronfeld-Schor, N., G. Bloch, and W. J. Schwartz. 2013.** Animal clocks: when science meets nature. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280: 20131354.
- Kronfeld-Schor, N., D. Dominoni, H. de la Iglesia, O. Levy, E. D. Herzog, T. Dayan, and C. Helfrich-Forster. 2013.** Chronobiology by moonlight. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280: 20123088.
- Langmeier, M. 2009.** *Základy lékařské fyziologie.* Grada, Praha.
- Mairan, M. 1729.** pp.421. In: Hill, R. W., G. A. Wyse, and M. Anderson. 2018. *Animal physiology.* Sinauer Associates, New York.

- Meireles-Filho, A. C. A., and C. P. Kyriacou. 2013.** Circadian rhythms in insect disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 108: 48–58.
- Michael, T. P. 2003.** Enhanced Fitness Conferred by Naturally Occurring Variation in the Circadian Clock. *Science.* 302: 1049–1053.
- Moore, D. 2001.** Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *J. Insect Physiol.* 47: 843–857.
- O'Malley, K. G., and M. A. Banks. 2008.** A latitudinal cline in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) *Clock* gene: evidence for selection on PolyQ length variants. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275: 2813–2821.
- Reeve, H. K., and P. W. Sherman. 1993.** Adaptation and the Goals of Evolutionary Research. *Q. Rev. Biol.* 68: 1–32.
- Reinhardt, K., and M. T. Siva-Jothy. 2007.** Biology of the Bed Bugs (Cimicidae). *Annu. Rev. Entomol.* 52: 351–374.
- Rokyta, R. 2000.** Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech. ISV, Praha.
- Romero, A., M. F. Potter, and K. F. Haynes. 2010.** Circadian rhythm of spontaneous locomotor activity in the bed bug, *Cimex lectularius* L. *J. Insect Physiol.* 56: 1516–1522.
- Rosbash, M. 2009.** The Implications of Multiple Circadian Clock Origins. *PLoS Biol.* 7: e1000062.
- Russell, R. C., D. Otranto, and R. Wall. 2013.** The encyclopedia of medical and veterinary entomology. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Boston, MA.
- Schwarzenberger, A., and A. Wacker. 2015.** Melatonin synthesis follows a daily cycle in *Daphnia*. *J. Plankton Res.* 37: 636–644.

- Sharma, V. K. 2003.** Adaptive Significance of Circadian Clocks. *Chronobiol. Int.* 20: 901–919.
- Sharma, V.K., S. Lone, and A. Goel. 2004.** Clocks for sex: loss of circadian rhythms in ants after mating? *Naturwissenschaften.* 91.
- Sheeba, V., V. K. Sharma, M. K. Chandrashekar, and A. Joshi. 1999.** Persistence of Eclosion Rhythm in *Drosophila melanogaster* After 600 Generations in an Aperiodic Environment. *Naturwissenschaften.* 86: 448–449.
- Shinkawa, Y., S.-I. Takeda, K. Tomioka, A. Matsumoto, T. Oda, and Y. Chiba. 1994.** Variability in Circadian Activity Patterns within the *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 31: 49–56.
- Smale, L., A. A. Nunez, and M. D. Schwartz. 2008.** Rhythms in a diurnal brain. *Biol. Rhythm Res.* 39: 305–318.
- Sosniyenko, S., D. Parkanová, H. Illnerová, M. Sládek, and A. Sumová. 2010.** Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298: R959–R971.
- Tomioka, K., and S. Abdelsalam. 2004.** Circadian Organization in Hemimetabolous Insects. *Zoolog. Sci.* 21: 1153–1162.
- Trajano, E., and L. Menna-Barreto. 1996.** Free-Running Locomotor Activity Rhythms in Cave-Dwelling Catfishes, *Trichomycterus* sp., from Brazil (Teleostei, Siluriformes). *Biol. Rhythm Res.* 27: 329–335.
- Trojan, S. 2003.** *Lékařská fyziologie.* Grada, Praha.
- Usinger Robert. 1966.** Monograph of Cimicidae. Entomological Society of America – The Thomas Say Foundation, Baltimore, Maryland 53: 222.

- Valentinuzzi, V. S., I. Amelotti, D. E. Gorla, S. S. Catalá, and M. R. Ralph. 2014.** Circadian entrainment by light and host in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*. *Chronobiol. Int.* 31: 265–275.
- Vaneckova, H., O. Bazalova, B. C. Wu, L. Pivarciova, S. Cada, D. Dolezel, M. Pivarci, P. Kment, J. Kotwica-Rolinska, O. Peckova, and J. Provaznik. 2016.** Unexpected Geographic Variability of the Free Running Period in the Linden Bug *Pyrrhocoris apterus*. *J. Biol. Rhythms.* 31: 568–576.
- Vosko, A. M., M. H. Hagenauer, D. L. Hummer, and T. M. Lee. 2009.** Period gene expression in the diurnal degu (*Octodon degus*) differs from the nocturnal laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296: R353–R361.
- Yerushalmi, S. 2006.** Developmentally determined attenuation in circadian rhythms links chronobiology to social organization in bees. *J. Exp. Biol.* 209: 1044–1051.
- Zamorzaeva, I., E. Rashkovetsky, E. Nevo, and A. Korol. 2005.** Sequence polymorphism of candidate behavioural genes in *Drosophila melanogaster* flies from “Evolution canyon.” *Mol. Ecol.* 14: 3235–3245.