

DOI: 10.13376/j.cbls/2015188

文章编号: 1004-0374(2015)11-1355-09



徐世清, 苏州大学农业生物技术与生态研究院副院长, 苏州大学医学部教授。重点研究鳞翅目昆虫生物钟作用及分子机制。国家科技支撑计划重大项目承担者, 国家“973”计划和“863”计划重大项目/主题项目研究团队负责人。中国科学技术发展基金会首届十大青年科技成果奖获得者, 江苏省六大高峰人才。近3年发表SCI论文20篇, 主持完成的研究成果获江苏省科学技术奖等2项省部级一等奖。

## 鳞翅目昆虫昼夜节律的授时机制研究进展

陶 卉<sup>1,2</sup>, 徐世清<sup>1,2\*</sup>

(1 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院应用生物学系, 苏州 215123;

2 苏州大学农业生物技术与生态研究院, 苏州 215123)

**摘 要:** 鳞翅目昆虫生物钟环路的核心成员, 在蛋白质分子进化和相互作用网络等方面, 与哺乳类, 甚至与果蝇等经典模式昆虫有较大差异。总结了昼夜节律对鳞翅目昆虫孵化与进食、生长与变态、生殖与滞育、呼叫与迁徙等生理行为的影响, 以及核心钟基因 *Cry*、*Per* 和 *Tim* 等的研究进展, 分析了鳞翅目昆虫生物钟负反馈环路与哺乳动物和果蝇的差异, 介绍了鳞翅目昆虫作为温度授时的生物钟负反馈环路研究和外周生物钟分子机制研究等方面的材料优势。

**关键词:** 生物钟; 信号转导; 行为; 代谢; 鳞翅目

**中图分类号:** Q965; Q969.42 **文献标志码:** A

## Research progress in the circadian rhythm mechanism of lepidopteron

TAO Hui<sup>1,2</sup>, XU Shi-Qing<sup>1,2\*</sup>

(1 Department of Applied Biology, School of Biology and Basic Medical Sciences, Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2 Institute of Agricultural Biotechnology and Ecology, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** The zeitgeber plays an important role in the output and input loop of circadian rhythms clock in lepidopteron, which has large differences in the aspects of protein evolution and molecular interaction network with the classic mode insects such as *Drosophila melanogaster*. In this article, the effects of the circadian clock on hatching, eating, growth, metamorphosis, reproduction, diapause, calling behavior and migration in lepidopteron were summarized, as well as the research progress in core genes of clock signal input circuit in lepidopteron such as *Cry*, *Per* and *Tim*. Then the differences of the biological clock feedback loop between lepidopteron and mammals or

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172264); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2011AA100306); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011327); 江苏省优势学科项目(苏政办发[2011]6号)

\*通信作者: E-mail: szsqxu@suda.edu.cn; Tel: 0512-65880185

*Drosophila* were compared and analyzed. Through above analysis, we introduced the advantage of lepidopteron as an experimental animal for studying temperature zeitgeber and the peripheral clock mechanism.

**Key words:** circadian clock; signal transduction; physiological behavior; metabolism; lepidopteron

起源于昆虫昼夜节律的趣味生物钟研究, 今天已经在包括生物医学和农业生物学等诸多领域得到深入发展和应用, 成为一个广受关注的热点领域。昆虫生物钟的授时信号输入和输出环路中的核心成员, 在蛋白质分子进化和分子相互作用网络等方面与哺乳类具有较大的差异, 因此, 其相关研究具有重要的生物学意义。

昆虫的生物钟研究主要以双翅目的果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、膜翅目的蜜蜂 (*Apis mellifera*) 和蜚蠊目蟑螂 (*Periplaneta americana*) 等非鳞翅目为对象。已知的主要农林害虫近 70% 属于鳞翅目, 其生物钟研究相对零乱, 也缺乏系统, 鳞翅目昆虫生物钟机制的研究进展对于深入探明鳞翅目昆虫的孵化与进食、生长与变态、生殖与滞育、呼叫与迁徙等生理行为分子机制, 进一步有效开展鳞翅目经济昆虫的生产与鳞翅目害虫防治有重要作用, 具有重大的农业和生态的基础和应用研究价值, 也直接影响经济昆虫家蚕 (*Bombyx mori*)、柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 等昆虫生产和农业害虫控制。

## 1 鳞翅目昆虫生理行为生物钟

### 1.1 生物钟对鳞翅目昆虫生殖的影响

鳞翅目昆虫生物钟的早期研究主要集中在生殖行为生理方面, 尤其是直接影响交配行为的信息素 (pheromone) 的分泌和响应, 这是影响昆虫种群密度, 与经济昆虫生产和农业害虫控制密切相关的性状。鳞翅目昆虫的交配行为被生物钟节律所调节<sup>[1-3]</sup>, 交配前的鳞翅目雌性成虫通过尾部的性腺节律性地分泌和释放信息素, 这种节律性响应光照的变化, 并具有温度补偿效应<sup>[3-5]</sup>; 雄性昆虫以灵敏的触角响应雌性分泌的信息素, 并且这种响应与交配行为的节律是一致的, 也具有日节律<sup>[6-7]</sup>。近期研究还发现, 二点织蛾 (*Aphomia sabella* Hampson) 雄性成虫会周期性地分泌 6 种信息素样物质, 雌性也可以接收这种信号<sup>[8]</sup>。在黄地老虎 (*Agrotis segetum*) 中的研究表明, 上述行为是由于信息素生物合成激活神经肽 (sex pheromone biosynthesis activating neuropeptide, PBAN) 的分泌节律性引起<sup>[9]</sup>, 并且由中枢神经系统生物钟控制<sup>[10]</sup>。

鳞翅目昆虫精液的节律性释放和精子活力节律性

变化也被广泛调查。在灰翅夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 和苹果小卷蛾 (*Cydia pomonella*) 中, 精液从睾丸通过输精管 (semiferous duct) 释放, 再从输精管输送到储精囊 (seminal vesicle) 的过程, 都具有生物钟节律性<sup>[11-12]</sup>。深入研究后证明, 这种节律性是生殖系统本身固有的节律机制造成的<sup>[13]</sup>, 它可能被生物钟控制的睾丸和血淋巴中蜕皮类固醇 (ecdysteroid) 的水平调控<sup>[14]</sup>。还有研究表明, 鳞翅目昆虫精子的活力也具有节律性<sup>[5]</sup>, 这可能是输精管的 pH 值被碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 周期性调控造成的<sup>[15]</sup>。2014 年, 在环带锦斑蛾 (*Pseudopidorus fasciata*) 中还发现, 对于交配的控制, 光照比温度具有更大的影响力<sup>[16]</sup>。

虽然鳞翅目昆虫的产卵受到产卵场所, 特别是宿主气味的强烈影响, 但一个共同的特点是受到光节律影响, 普遍具有暗产卵习性, 这在绢丝昆虫家蚕和柞蚕中早已成为养蚕业者的一个基本常识, 并且得到生产利用。在玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)<sup>[17]</sup> 等农业害虫中也早有调查。

### 1.2 生物钟与鳞翅目昆虫发育与变态

鳞翅目昆虫是完全变态昆虫, 个体发育经过卵、幼虫、蛹和成虫 4 个形态构造和生活习性明显不同的时期。生物钟周期对鳞翅目昆虫生长与发育的影响贯穿在卵孵化、幼虫蜕皮生长、化蛹和羽化变态等整个生物发生过程。舞毒蛾 (gypsy moth) 中发现, 其羽化节律是随光节律夹带 (entrained) 的, 这种节律在转入黑暗之后仍然维持, 说明羽化节律是其内源的生物钟节律<sup>[18]</sup>; 在印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 中发现, 其羽化节律不仅受光照影响, 还具有温度补偿效应<sup>[19]</sup>; 进一步研究发现, 排除光照影响的情况下, 仅仅是温度振幅也影响到甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 的羽化节律<sup>[20]</sup>。但有趣的是, 光照并不是唯一影响羽化节律的因素。对环带锦斑蛾 (*P. fasciata*) 的研究发现, 对于羽化节律, 温度比光照更具有影响力<sup>[16]</sup>; 而在烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 中则发现, 饮食和营养元素会影响羽化的节律<sup>[21]</sup>。

玉米螟 (*Diatraea grandiosella*) 的羽化和孵化都有生物钟节律性, 且孵化的节律性更敏感, 更容易被短暂的光扰乱影响<sup>[22]</sup>。本实验室观察到家蚕的卵孵化具有典型的日节律, 温度虽然有补偿效应, 但

光照的影响是决定性的<sup>[23]</sup>。家蚕卵在恒明和持续黑暗条件下的孵化没有日节律, 而 12 h 光照与 12 h 黑暗交替条件下具有明显的日节律, 孵化集中在预设的光照开始后数小时内, 其他时间几乎不孵化。进一步的调查发现, 光照诱导上调了基于蜕皮类固醇受体基因 (ecdysteroid receptor, *Ecr*) 表达产物参与调节的蜕皮激素 (ecdysone) 作用活性, 引发了孵化样酶基因 (hatching enzyme-like gene, *BmHel*) 和几丁质酶基因 (chitinase, *Cht*) 表达上调, 并主要通过提高孵化样酶 (hatching enzyme, *BmHEL*) 活性引发孵化行为<sup>[23]</sup>。

滞育 (diapause) 是昆虫受环境条件诱导主动产生的一种发育停滞和极低代谢水平状态, 是昆虫长期适应不良环境而形成的遗传特性和对外界环境温度、光照主动适应的生理现象, 对昆虫物种的保存和繁衍具有重要意义<sup>[24]</sup>, 也是关系养蚕生产中的家蚕化性调控和农林害虫防治的重要目标性状。滞育有异于其他动物的冬眠 (hibernation) 或蛰伏 (dormancy), 不是由当时的不良环境条件所引起, 而是由滞育发生的前一个世代或前一个发育虫态的环境条件所决定。温度和日照长度等环境变化通过神经-内分泌系统转化为体内激素的消长变化, 从而支配鳞翅目昆虫滞育的决定 (diapause determination) 和解除 (diapause termination)。破坏鳞翅目害虫的滞育诱导和活化规律, 是一种非常经济和环境生态友好的害虫控制途径, 而家蚕等产业昆虫的滞育和活化控制则是产业化生产未完全解决的核心技术。现有的鳞翅目蛹滞育昆虫的生物钟研究, 主要集中在滞育开始前的诱导阶段 (diapause induction)。在条纹小叶蛾 (*Thyrassia penangae*)、黑纹粉蝶 (*Pieris melete*)、二化螟 (*Chilo suppressalis*)、环带锦斑蛾 (*P. fasciata*) 和玉米螟 (*O. nubilalis*) 中, 已经证明滞育诱导取决于黑暗时间的长短, 而且在夜晚实施光照中断之后会造成滞育的效果下降<sup>[25-30]</sup>。由此推断, 因为地理位置造成的夜晚时间长短不同, 是造成不同地区鳞翅目蛹滞育害虫不同滞育状态的原因<sup>[29]</sup>; 梨小食心虫 (*Grapholita molesta*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 和美国白蛾 (*Hyphantria cunea*) 的相关实验证明, 温度和光照都会影响滞育诱导的效果<sup>[31-33]</sup>; 也有相关文献证明, 玉米螟不同纬度化性的差别是由于生物钟系统控制的滞育情况有所差别<sup>[34]</sup>。除此之外, 现有研究仅仅在菜粉蝶 (*Pieris rapae linne*) 中调查出了滞育终止具有光敏性<sup>[35]</sup>, 但这些蛹滞育生物钟现象的分子机制未见报道。

鳞翅目昆虫卵滞育的生物钟研究主要集中在鳞

翅目模式生物家蚕。家蚕卵的滞育性受亲代胚胎发育后期及胚后幼虫时期授时因子温度和光照节律等的诱导, 特别是受到器官形成期至孵化阶段的环境温度调节, 而光照长度有补偿高温作用; 在胚后幼虫与蛹期的子代卵形成过程中, 家蚕通过预设的滞育激素 (diapause hormone) 等内分泌代谢途径, 诱导子代卵发生滞育特性, 并由子代卵产下后的温度诱导决定卵的滞育表现。除了温度与光照节律的影响以外, 相对湿度、空气中 CO<sub>2</sub> 等的含量都对蚕卵的滞育性有一定的影响<sup>[36-37]</sup>。温度和光照等授时因子产生的生物钟信号如何输出, 并与家蚕等鳞翅目昆虫内分泌代谢途径发生关联, 这是一个几乎空白, 同时影响卵滞育现象更好应用的一个关键问题。

家蚕滞育卵的活化研究长期以来聚焦在一个与卵能量利用有关的金属糖蛋白 (esterase A4, EA4)<sup>[38-39]</sup> 分子构象的节律性变化机制上。EA4 的 ATPase 酶瞬时活性有依赖低温和盐酸刺激等环境活化刺激因子诱导的蛋白质空间结构变化的特性, 因此, 该蛋白被称为时间间隔测定酶 (time interval measuring enzyme, TIME-EA4)<sup>[38,40]</sup>。TIME-EA4 是一个同型二聚体 ATPase, 每个亚基包含一个 Cu/Zn SOD 结构域<sup>[41]</sup>。TIME-EA4 具有糖基化和非糖基化两种形式<sup>[42]</sup>, 非糖基化 TIME-EA4 除了糖链和 N-末端溶解倾向性不同, 即 N-末端区域能够结合一个或多个 Cu 离子外, 与糖基化 TIME-EA4 蛋白结构非常相似<sup>[41]</sup>。在体外, TIME-EA4 的生物钟 ATPase 活性能够由解除蚕卵滞育的低温条件所诱导的蛋白质空间结构变化而诱导出现<sup>[41]</sup>, 此过程并未出现 TIME-EA4 基因转录本水平的升高<sup>[43]</sup>。进一步的研究发现, 一种来自蚕卵内 ESP 蛋白质水解产物的多肽 (a time measurement-regulating peptide inhibitory needle, PIN)<sup>[42]</sup>, 通过与 TIME-EA4 结合改变状态, 参与了 ATPase 的活性调节<sup>[39-40,44-45]</sup>。

除此之外, 鳞翅目昆虫的其他时期发育也被认为与生物钟基因有关, 如有研究认为, 棉铃虫 (*H. armigera*) 的复眼发育, 尤其是视蛋白的表达, 除了受到营养等因素的调节, 也受生物钟系统和光节律的调节<sup>[46]</sup>。同样地, 在高粱蛀茎夜蛾 (*Sesamia cretica*) 和瓜绢野螟 (*Diaphania indica*) 中发现, 温度对胚胎期、幼虫、蛹的发育都会有影响<sup>[47-48]</sup>。

### 1.3 生物钟与鳞翅目昆虫呼叫及其他行为

鳞翅目昆虫呼叫行为 (calling behavior) 是生物钟行为学中研究非常丰富的部分, 但其在昆虫生产和害虫控制方面的应用还没有真正开始。在棉铃虫

(*Heliothis armigera*)、一星黏虫(*Pseudaletia unipuncta*)、烟草天蛾(*M. sexta*)、烟草夜蛾(*Helicoverpa assulta*)、印度谷螟(*P. interpunctella*)和地中海粉螟(*Ephesia kuehniella*)中,都发现了呼叫行为的节律性。尽管不同的鳞翅目昆虫在不同光照下表现节律的调节各有不同,但都对光照响应,仅在李桃翅蛾(*Synanthedon exitiosa*)中发现这种节律对温度也有响应<sup>[49-54]</sup>

近年来,大红斑蝶(*Danaus plexippus*)的季节性迁徙机制研究取得了较大进展。大红斑蝶通过神经输出,建立内在的光指南机理,从而使复眼接受光信号之后能够判断方向,达到迁徙的目的<sup>[55-56]</sup>。除此之外,鳞翅目成虫自由运动的节律也有调查<sup>[57]</sup>。

## 2 鳞翅目昆虫的生物钟信号转导机制

昆虫生物钟信号环路的授时因子包括光照、温度、磁场、湿度、食物和群体密度等很多因子,但目前只有光照授时因子得到比较深入的研究,蟑螂中在食物授时因子的影响方面积累了丰富的成果,果蝇中的研究也主要集中在光授时因子的作用机制。由于昆虫是野外生活的变温动物,温度授时因子对昆虫的生物钟行为影响,比哺乳类等恒温动物更加深刻而广泛,其作用机制也更加复杂,但相关研究报道还非常少。

### 2.1 鳞翅目昆虫生物钟信号输入环路的核心钟基因

鳞翅目昆虫生物钟基因的克隆和鉴定工作目前还只有为数不多的几篇报道,有一定研究的有周期蛋白基因(*Period, Per*)、永恒蛋白基因(*Timeless, Tim*)和隐花色素基因(*Cryptochrome, Cry*)等少数几个生物钟信号输入环路的核心钟基因<sup>[58-63]</sup>。周期循环蛋白基因(*Cycle, Cyc*)和时钟蛋白基因(*Clock, Clk*)仅在柞蚕(*A. pernyi*)中被克隆<sup>[64]</sup>。

#### 2.1.1 隐花色素基因Cry

昆虫隐花色素基因(*Cry*)在长期的进化过程中产生了两大基因家族,即*Cry1*和*Cry2*家族<sup>[65]</sup>。在鳞翅目大红斑蝶(*D. plexippus*)中发现了两种CRY蛋白同时存在,其中CRY1作为光感受器,CRY2则进入生物钟环路。CRY1接受光信息后,引起TIM的磷酸化,使得PER、TIM和CRY2复合体降解为PER/CRY2二聚体<sup>[62]</sup>。在家蚕<sup>[63]</sup>和柞蚕<sup>[65]</sup>中,都克隆出了两种*Cry*基因。其中,本课题组在家蚕中确认了*Cry1*基因的翻译产物具有光信号受体作用,并且家蚕中可能存在*Cry1*基因的补偿作用基因,而CRY2可能作为温度节律调控的振荡器中的信号接受因子发挥作用<sup>[66]</sup>。有意思的是,无论是光照还

是黑暗条件下,本课题组用免疫荧光方法在家蚕细胞核内都观察不到CRY1,也观察不到CRY2蛋白的存在。这表明鳞翅目昆虫与仅有CRY1的果蝇和仅有CRY2的蜜蜂等膜翅目昆虫及鞘翅目的赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)中的机制都有所不同。还有研究表明,敲除大红斑蝶的*Cry2*基因会导致分子节律的受损以及羽化节律的破坏<sup>[67]</sup>。

与其他昆虫相似,鳞翅目昆虫CRY蛋白的N-末端保守性很强,而C-末端保守性很低,且长短相差较大。王文栋等<sup>[63]</sup>推测,由于CRY蛋白的N-末端和C-末端结构域执行不同的功能,且承受不同的进化选择压力,它们的进化模式出现了差异。其中C-末端承受的进化压力要小一些,不同昆虫物种间呈现出相当大的中性进化导致的差异性,也导致CRY的C-末端具有了不同的功能,如稳定蛋白质、与TIM结合、光敏或是核内定位等。昆虫CRY都具有DNA光解酶功能域和FAD结合功能域,但CRY1和CRY2的功能域保守位点不同。CRY1在不同物种中这两个功能域的保守性都没有CRY2相应的功能域的保守性高,推测这与CRY1和CRY2进化分歧时序和调控细节有关,有可能是它们产生功能差异的基础。虽然它们都是由DNA光解酶进化而来,但在进化过程中,由于承受不同的进化选择压力而出现差异,而且CRY1在不同物种中的变异要比CRY2要高<sup>[63]</sup>。

#### 2.1.2 周期蛋白基因Per

PER蛋白含有PAS结构域,这是昼夜节律生物钟转录因子共有的特征<sup>[68]</sup>。果蝇*Per*基因编码的PER蛋白虽然长达1200个氨基酸,其中一个氨基酸被取代就会引起昼夜节律生物钟周期的改变;PER蛋白与TIM蛋白以异二聚体的形式作为负反馈调节因子参与生物钟的反馈环路,*Per*是果蝇生物钟的主控基因<sup>[68]</sup>。在鳞翅目昆虫地中海粉螟(*E. kuehniella*)中,已经检测到PER蛋白在中脑多数神经、食管下复合体、神经血管系统,以及视神经和眼中存在,并具有表达节律<sup>[69]</sup>。鳞翅目昆虫灰翅夜蛾(*S. littoralis*)中,干涉*Per*基因的mRNA表达,结果造成了输精管周期性酸化(periodic acidification)的推迟,从而导致精液的释放推迟<sup>[70]</sup>;研究还发现,灰翅夜蛾睾丸中的卵黄蛋白释放与*Per*参与的分子振荡器有关<sup>[71]</sup>。在家蚕中,敲除*Per*而会导致家蚕卵孵化节律受损,卵到成虫的生长时间减少<sup>[72]</sup>;在柞蚕中研究发现,PER蛋白的表达位置与促前胸腺激素(prothoracico-tropic hormone, PTTH)位置相近,

揭示其可能控制 PTH 释放, 而且 PER 是卵孵化的必需蛋白<sup>[73]</sup>。

家蚕 PER 蛋白与 TIM 一样, 具有蛋白质信号转导互作基序位点, 家蚕 PER 是以蛋白质形式在生物钟环路中发挥信息传递作用。本实验室束梅影干涉家蚕 *Per* 基因, 结果发现几乎所有调查的生物钟基因都发生了显著表达量变化, 基因表达的振荡相位发生改变, 振荡节律也变弱<sup>[66]</sup>。蛋白质亚细胞定位实验结果显示, 家蚕 PER 蛋白在细胞核和细胞质中的分布不受光照和黑暗条件的影响, 在细胞核内始终能够观察到 PER, 推测 PER 在转录翻译环路中协助运输其他核心生物钟蛋白。

### 2.1.3 永恒蛋白基因 *Tim*

在果蝇中发现了两种类型的 *Tim* 基因: 永恒蛋白基因 (*Timeless*, *Tim1*) 和逾时蛋白基因 (*Timeout*, *Tim2*), 它们的编码产物 TIM1 和 TIM2 蛋白的 N-末端序列比 C-末端序列保守, 且蛋白质氨基酸序列有很大差异; TIM1 蛋白具有 N-末端核定位序列 (NLS) 和结合 PER 蛋白的结构域, 而 C-末端富含酸性氨基酸; TIM1 蛋白与 PER 蛋白可形成异二聚体, 在生物钟负反馈环路中发挥重要作用<sup>[74]</sup>。鳞翅目昆虫中, 仅有 *Tim1* 同源基因的报道, 在地中海粉蛾中检测到 TIM1 蛋白在头部的分布并且出现震荡节律<sup>[69]</sup>; 在家蚕中报道的 *Tim1* 还是一个影响卵滞育的相关基因<sup>[43]</sup>。本实验室利用蛋白质亚细胞定位方法发现, 家蚕的 TIM1 蛋白受光照诱导逐渐从细胞质转运至细胞核内, 因而推测光照是促使家蚕 TIM 蛋白转运的信号<sup>[66]</sup>。

## 2.2 鳞翅目昆虫生物钟环路与哺乳动物和果蝇的差异

鳞翅目昆虫生物钟分子机制的研究主要集中在生物钟光接收 CRY1, 以及核心负反馈调节环路 PER、TIM 和 CRY2 的研究。除了柞蚕中对 *Clk* 和 *Cyc* 这一核心正反馈调节环路基因有克隆报告<sup>[64]</sup>外, 家蚕中对 *Vri*、*Pdp*、*Tim2*、*Cyc* 和 *Clk* 等基因也有推测序列<sup>[63]</sup>, 而其他生物钟环路的基因在鳞翅目昆虫中完全不清楚。家蚕中还有几个可能与生物钟有关的基因和蛋白, 如 *Bmlark* 和 *Rab* 家族基因的研究报告<sup>[75-77]</sup>, 以及输出通路相关乙酰基转移酶 aaNAT (arylalkylamine N-acetyltransferase) 的报道<sup>[78]</sup>。这些并不清晰的内容还值得进一步深入研究。为了更好地比较鳞翅目昆虫的生物钟分子机制环路, 此处以鳞翅目昆虫中有初步结果的大红斑蝶生物钟环路与果蝇和哺乳动物的生物钟环路进行比较, 分析鳞翅目昆虫生物钟环路的特点。

果蝇分子生物钟机制共有三个转录反馈环。第一个环路中, PER/TIM 蛋白在细胞质中形成二聚体, 夜间转移至细胞核, 抑制 CLK/CYC 的转录活性, 从而抑制自身的转录。第二个环路中, PDP1 $\epsilon$  是 *Clk* 基因转录的激活物, VRI 与 PDP1 $\epsilon$  竞争 P/V-box 结合位点, 抑制或去抑制 *Clk* 基因的转录。第三个环路中, *Cwo* 基因与 CLK/CYC 的靶标 E-box 元件特异性结合而抑制 CLK/CYC 介导的转录活性, 抑制自身转录和 *Pdp1 $\epsilon$* 、*Vri*、*Tim* 和 *Per* 等基因的转录<sup>[79-80]</sup>。

在以小鼠为代表的哺乳动物的生物钟机制中<sup>[81]</sup>, 一方面 BMAL1 蛋白和 CLOCK 蛋白通过 bHLH-PAS 形成异源二聚体, 激活 *mPer1*、*mPer2*、*mPer3*、*mCry1* 和 *mCry2* 基因的转录<sup>[82-83]</sup>。另一方面, mCRYs 蛋白 (mCRY1、mCRY2) 和 mPERs 蛋白 (mPER1、mPER2、mPER3) 相互作用形成二聚体, 其中, mPER 蛋白进入细胞核, 在细胞核内 mCRYs 蛋白抑制 CLOCK/BMAL1 复合体形成, 从而抑制 *mPer*s 和 *mCrys* 基因的转录<sup>[84]</sup>。由此两方面共同构成一个完整的哺乳动物的生物钟调控环路。

大红斑蝶的生物钟机制结合了果蝇和哺乳动物的昼夜节律生物钟分子机制的特点, 与两者有相同的部分亦有明显的区别。与前两者相同的是, 在大红斑蝶中, 同样由 CRY1 发挥感光作用, 同样由 CLK/CYC 二聚体发挥正向调控作用, 与 *Per*、*Tim*、*Cry2* 等其余核心生物钟基因的 E-box 增强子结合, 驱动这些生物钟核心基因的转录; 不同的是, 发挥负反馈调节作用的不是果蝇型的 PER/TIM 二聚体, 也不是哺乳动物型的通过 mCRYs/mPERs 二聚体使 mPERs 发挥负反馈调节作用, 而是 PER/TIM/CRY2 形成三聚体发挥作用。当大红斑蝶的 CRY1 接收到光信号后, 在细胞质中首先引起 PER/TIM/CRY2 三聚体中 TIM 的降解, 随后 PER 发生磷酸化, 以 CRY2/PER 异源二聚体的形式协助 CRY2 进入细胞核, 从而抑制 CLOCK/CYCLE 二聚体的转录, 进一步抑制自身基因的转录<sup>[62]</sup>。可见, 大红斑蝶的昼夜生物钟分子机制中, CRY2 是最关键的成员, 发挥了重要的转录抑制作用, 显示鳞翅目昆虫的生物钟机制与哺乳动物以及果蝇等传统模式生物有着显著的区别。

## 3 鳞翅目昆虫是多种授时因子作用环路研究的优势材料

鳞翅目昆虫种类繁多, 具有丰富多彩的特点和

一些特殊的发育和行为特征, 展示出果蝇等经典模式昆虫不具备的材料优势。鳞翅目大红斑蝶光指南针 (sun compass) 原理的发现和分子机制研究进展, 对于探明昆虫季节性迁徙这个有趣的生物现象和重大的昆虫生态学课题发挥了很好的模式作用<sup>[55-56, 85-86]</sup>。目前昆虫生物钟的研究聚焦在生物钟的核心环路上, 并且已经详细深入地阐明了光节律的信号环路, 但是温度、限食、磁场等授时因子<sup>[87-89]</sup>的生物钟分子信号途径 (作用环路) 还没有得到详细阐述。尤其是温度作为一个补偿授时因子虽然已经得到普遍认可, 但是其作用机制, 特别是温度授时信号如何转变成内源性信号, 是否与光照协调或者是否存在与光照类似的调节方式, 还没有明确的证据。昆虫是变温动物, 环境温度能够敏感地通过内源性生物钟系统调控内分泌及其他生理过程, 因此, 温度节律的信号环路是昆虫生物钟研究面临的一个重大科学问题。鳞翅目昆虫有许多生理过程, 如滞育和孵化, 对温度的反应极为敏感, 其中家蚕等卵滞育生理现象就是温度主导、光照补偿的决定过程<sup>[90]</sup>, 而且滞育与非滞育的生物学特征清晰可辨, 选用鳞翅目昆虫作为温度授时的生物钟环路研究材料更为简单、可靠, 特别是随着家蚕作为中国特色的实验动物模式化的扎实推进, 为家蚕生物钟的研究提供了很好的基础平台<sup>[91]</sup>。

目前, 生物钟的研究进展几乎都集中在基于中枢神经的核心生物钟 (central clocks) 方面, 对于普遍存在于其他组织中的外周生物钟 (peripheral clocks) 研究还非常缺乏, 外周生物钟的调节机制研究是生物钟研究的重要发展方向<sup>[92]</sup>。昆虫的外周组织有比哺乳动物更强的发育独立性, 而鳞翅目昆虫由于个体大小上比果蝇和线虫更易进行结扎和组织培养与观察, 具有外周生物钟研究的材料优势。Nobata 等<sup>[93]</sup>在切除头部的家蚕幼虫中也观察到腹部组织对光的感受性。家蚕幼虫头部结扎是一个简单而经典的发育和内分泌生理实验技术, 能够切断脑神经肽对胸部和腹部的发育调控影响, 稳定形成头部变态蜕皮化蛹, 而后部保持幼虫体态的个体。家蚕造血器官的体外培养也是一个经典的方法, 能够在脱离中枢神经调控, 甚至脱离内分泌影响的状态下, 稳定观察造血器官的血球形成和分泌<sup>[94]</sup>。

鳞翅目昆虫生物钟环路虽然与哺乳动物和果蝇存在差异, 但也有非常保守和相同或相似的部分。隐花色素 (CRY) 属于光解酶/隐花色素超蛋白质家族, 有植物 CRY、动物 CRY/6-4 光解酶 (修复 6-4

嘧啶酮光化学产物)、CPD 光解酶 (修复环丁烷嘧啶二聚体 CPD) 和 CRY-DASH 四大类<sup>[95-96]</sup>, 这是为数不多的从植物到动物神经系统之间的进化联系。鳞翅目昆虫与果蝇和线虫不同, 与模式哺乳动物一样同时具有 CRY1 和 CRY2。

在哺乳动物中, 昼夜节律钟除了通过调节代谢通路中限速酶的表达来调节代谢途径外, 还能调节与代谢相关核受体的表达, 或者对代谢相关转录因子或辅因子进行蛋白质翻译后修饰, 从而调节代谢通路。鳞翅目昆虫中昼夜节律钟对代谢的影响虽然还缺乏系统和深入的报道, 但其代谢特点与生物钟的关系值得深入研究, 如鳞翅目的幼虫几乎不停地在进食, 即使给予高糖和高脂肪食物, 也不会出现高血糖、肥胖等代谢疾病。家蚕中已经建立的尿酸代谢模型<sup>[97]</sup>、色素代谢模型<sup>[98-99]</sup>, 则为研究生物钟调节代谢研究提供了特色的平台。近期一则报道证明, 柞蚕的 NAT (N-acetyltransferase) 蛋白作为中间桥梁, 连接生物钟系统与内分泌系统, 尤其是褪黑激素、促前胸腺激素及其释放的蜕皮激素, 为柞蚕生物钟影响生理代谢提供了基础, 并提示可以更加深入地探讨生物钟与代谢之间的关系<sup>[100]</sup>。

可以预见, 鳞翅目昆虫作为多种授时因子作用环路研究的优势材料, 不仅在许多生物钟的研究领域与课题发挥独特作用, 还能够直接服务于家蚕等鳞翅目经济昆虫的生产和大部分农业害虫的控制, 对推动生物医学实验动物领域的中国特色无脊椎动物替代研究也具有重要的积极意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] Miyatake T. Insect quality control: synchronized sex, mating system, and biological rhythm. *Appl Entomol Zool*, 2011, 46(1): 3-14
- [2] Liu H, Zhao W, Yang M, et al. Diel rhythms of sexual behavior and pheromone titers in *Isoceras sibirica* Alpheraky (Lepidoptera, Cossidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, 2013, 84(1): 15-26
- [3] Liao HJ, Qian Q, Liu XD. Heat shock suppresses mating and sperm transfer in the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis*. *Bull Entomol Res*, 2014, 104(3): 383-92
- [4] Sower LL, Shorey HH, Gaston LK. Sex pheromones of noctuid moths. XXV. Effects of temperature and photoperiod on circadian rhythms of sex pheromone release by females of *Trichoplusia ni*. *Ann Entomol Soc Am*, 1971, 64 (2): 488-92
- [5] Fatzinger CW. Circadian rhythmicity of sex pheromone release by *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae (Phycitinae)) and the effect of a diel light cycle on its precopulatory behavior. *Ann Entomol Soc Am*, 1973,

- 66(5): 1147-53
- [6] Shorey HH, Gaston LK. Sex pheromones of noctuid moths. V. Circadian rhythm of pheromone-responsiveness in males of *Autographa californica*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am*, 1965, 58(5): 597-600
- [7] Silvegren G, Löfstedt C, Qi Rosén W. Circadian mating activity and effect of pheromone pre-exposure on pheromone response rhythms in the moth *Spodoptera littoralis*. *J Insect Physiol*, 2005, 51(3): 277-86
- [8] Levi-Zada A, David M, Fefer D, et al. Circadian release of male-specific components of the greater date moth, *Aphomia (Arenipsex) sabella*, using sequential SPME/GC/MS analysis. *J Chem Ecol*, 2014, 40(3): 236-43
- [9] Závodská R, von Woweren G, Löfstedt C, et al. The release of a pheromonotropic neuropeptide, PBAN, in the turnip moth *Agrotis segetum*, exhibits a circadian rhythm. *J Insect Physiol*, 2009, 55(5): 435-40
- [10] Rosén WQ, Han GB, Löfstedt C. The circadian rhythm of the sex-pheromone-mediated behavioral response in the turnip moth, *Agrotis segetum*, is not controlled at the peripheral level. *J Biol Rhythms*, 2003, 18(5): 402-8
- [11] Syrova Z, Sauman I, Giebultowicz JM. Effects of light and temperature on the circadian system controlling sperm release in moth *Spodoptera littoralis*. *Chronobiol Int*, 2003, 20(5): 809-21
- [12] Giebultowicz JM, Brooks NL. The circadian rhythm of sperm release in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol Exp Appl*, 1998, 88(3): 229-34
- [13] Bebas P, Cymborowski B, Giebultowicz JM. Circadian rhythm of sperm release in males of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Insect Physiol*, 2001, 47(8): 859-66
- [14] Polanska MA, Maksimiuk-Ramirez E, Ciuk MA, et al. Clock-controlled rhythm of ecdysteroid levels in the haemolymph and testes, and its relation to sperm release in the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *J Insect Physiol*, 2009, 55(5): 426-34
- [15] Kotwica J, Ciuk MA, Joachimiak E, et al. Carbonic anhydrase activity in the vas deferens of the cotton leafworm - *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) controlled by circadian clock. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57(8): 107-23
- [16] Wu S, Refinetti R, Kok LT, et al. Photoperiod and temperature effects on the adult eclosion and mating rhythms in *Pseudopidorus fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae). *Environ Entomol*, 2014, 43(6): 1650-5
- [17] Schurr K, Holdaway FG. Periodicity in oviposition of *Ostrinia nubilalis* (HBN.) (Lepidoptera: Pyraustidae). *Ohio J Sci*, 1966, 66(1): 76-80
- [18] Michael M, Schnee ME, Grunewald HJ, et al. Circadian rhythm of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) adult eclosion. *Ann Entomol Soc Am*, 1982, 75(4): 411-7
- [19] Kikukawa S, Hashizume R, Honda M, et al. Effects of photoperiod and temperature on the rhythm and free-running of adult eclosion in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *Physiol Entomol*, 2012, 37(3): 258-65
- [20] Tanaka K, Kimura Y, Watari Y. The cabbage moth modulates the adult eclosion time in response to the amplitude of temperature cycle. *Biol Rhythm Res*, 2013, 44(1): 163-7
- [21] Suzuki Y, Koyama T, Hiruma K, et al. A molt timer is involved in the metamorphic molt in *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31): 12518-25
- [22] Takeda M. Ontogeny of the circadian system governing ecdysial rhythms in a holometabolous insect, *Diatraea grandiosella* (Pyralidae). *Physiol Entomol*, 1983, 8(3): 321-31
- [23] 张达燕. 基于光节律诱导的家蚕孵化节律及分子机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013
- [24] Schiesari L, O'Connor MB. Diapause: delaying the developmental clock in response to a changing environment. *Curr Top Dev Biol*, 2013, 105: 213-46
- [25] Wei X, Xue F, Li A. Photoperiodic clock of diapause induction in *Pseudopidorus fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae). *J Insect Physiol*, 2001, 47(12): 1367-75
- [26] Hua A, Xue FS, Xiao HJ, et al. Photoperiodic counter of diapause induction in *Pseudopidorus fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae). *J Insect Physiol*, 2005, 51(12): 1287-94
- [27] Xiao HJ, Wu XF, Wang Y, et al. Diapause induction and clock mechanism in the cabbage butterfly *Pieris melete Ménétriés*. *J Insect Physiol*, 2009, 55(5): 488-93
- [28] He HM, Xian ZH, Huang F, et al. Photoperiodism of diapause induction in *Thyrassia penangae* (Lepidoptera: Zygaenidae). *J Insect Physiol*, 2009, 55(11): 1003-8
- [29] Takeda M, Skopik SD. Geographic variation in the circadian system controlling photoperiodism in *Ostrinia nubilalis*. *J Comp Physiol A*, 1985, 156 (5): 653-8
- [30] Chen F, Han Y, Hu Q, et al. Diapause induction and photoperiodic clock in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *Entomol Sci*, 2011, 14(3): 283-90
- [31] Neto e Silva OA, Bernardi D, Botton M, et al. Biological characteristics of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) induced to diapause in laboratory. *J Insect Sci*, 2014, 14: 217
- [32] Chen C, Xia QW, Xiao HJ, et al. A comparison of the life-history traits between diapause and direct development individuals in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J Insect Sci*, 2014, 14: 19
- [33] Chen C, Wei X, Xiao H, et al. Diapause induction and termination in *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiinae). *PLoS One*, 2014, 9(5): e98145
- [34] Levy RC, Kozak GM, Wadsworth CB, et al. Explaining the sawtooth: latitudinal periodicity in a circadian gene correlates with shifts in generation number. *J Evol Biol*, 2015, 28(1): 40-53
- [35] Brunnarius J, Dumortier B. Existence of a light-sensitive phase in the photoperiodic termination of diapause in *Pieris brassicae* L. (Insecta: Lepidoptera) and comparison with diapause induction. *J Comp Physiol A*, 1984, 155(2): 161-9
- [36] Hasegawa K. The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 1957, 179: 1300-1

- [37] 徐丽, 宋艳, 朱晓苏, 等. 滞育诱导温度与光照对家蚕近日节律基因 $per$ 表达的影响. 蚕业科学, 2010, 36(1): 52-9
- [38] Xu SQ, Kai H, Xu JL, et al. Changes of esterase A4-activity and its relationship with diapause in acid-treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*. Sci Sericult, 1998, 24: 95-9
- [39] Ti X, Tani N, Isobe M, et al. Time-measurement-regulating peptide PIN may alter a timer conformation of Time Interval Measuring Enzyme (TIME). J Insect Physiol, 2006, 52(5): 461-7
- [40] Kai H, Kotani Y, Miao Y, et al. Time interval measuring enzyme for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol, 1995, 41(41): 905-10
- [41] Hiraki T, Shibayama N, Akashi S, et al. Crystal structures of the clock protein EA4 from the silkworm, *Bombyx mori*. J Mol Biol, 2008, 377: 630-5
- [42] Isobe M, Suwan S, Kai H, et al. Amino acid sequence of PIN peptides conducting TIME (Time-Interval-Measuring-Esterase) activation for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. Bioorg Med Chem Lett, 1995, 5: 2851-4
- [43] Xu L, Liang H, Niu Y, et al. Differential expression of the *Bombyx mori* diapause-termination timer gene Ea4 in diapause-inducing temperature and photoperiod. Arch Insect Biochem Physiol, 2012, 79(3):182-94
- [44] Kai H, Arai T, Yasuda F. Accomplishment of time-interval activation of esterase A4 by simple removal of PIN fraction. Chronobiol Int, 1999, 16: 51-8
- [45] Xu SQ, Kai H, Xu JL, et al. Target of hydrochloric acid in acid-treatment of diapausing eggs of *Bombyx mori*. Acta Entomol Sin, 2001, 44: 51-5
- [46] Yan S, Zhu J, Zhu W, et al. The expression of three opsin genes from the compound eye of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is regulated by a circadian clock, light conditions and nutritional status. PLoS One, 2014, 9(10): e111683
- [47] Soltani Orang F, Aghdam HR, Abbasipour H, et al. Effect of temperature on developmental rate of *Sesamia cretica* (Lepidoptera: Noctuidae) immature stages. J Insect Sci, 2014, 14: 197
- [48] Hosseinzade S, Izadi H, Namvar P, et al. Biology, temperature thresholds, and degree-day requirements for development of the cucumber moth, *Diaphania indica*, under laboratory conditions. J Insect Sci, 2014, 14: 61
- [49] Nordlund DA, Brady UE. The calling behavior of female *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) under two light regimes. Environ Entomol, 1974, 3(5): 793-6
- [50] Kou R, Chow YS. Calling behavior of the cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Ann Entomol Soc Am, 1987, 80(4): 490-3
- [51] Delisle J, McNeil JN. The effect of photoperiod on the calling behaviour of virgin females of the true armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae). J Insect Physiol, 1986, 32(3): 199-206
- [52] Itagaki H, Conner WE. Calling behavior of *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) with notes on the morphology of the female sex pheromone gland. Ann Entomol Soc Am, 1988, 81(5): 798-807
- [53] Kamimura M, Tatsuki S. Effects of photoperiodic changes on calling behavior and pheromone production in the oriental tobacco budworm moth, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). J Insect Physiol, 1994, 40(8): 731-4
- [54] Závodská R, Fexová S, von Wöbern G, et al. Is the sex communication of two pyralid moths, *Plodia interpunctella* and *Ephestia kuehniella*, under circadian clock regulation? J Biol Rhythms, 2012, 27(3): 206-16
- [55] Reppert SM, Gegear RJ, Merlin C. Navigational mechanisms of migrating monarch butterflies. Trends Neurosci, 2010, 33(9): 399-406
- [56] Heinze S, Reppert SM. Sun compass integration of skylight cues in migratory monarch butterflies. Neuron, 2011, 69(2): 345-58
- [57] Leppla NC, Hamilton EW, Guy RH, et al. Circadian rhythms of locomotion in six noctuid species. Ann Entomol Soc Am, 1979, 72(2): 209-15
- [58] Yan S, Ni H, Li H, et al. Molecular cloning, characterization, and mRNA expression of two Cryptochrome genes in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol, 2013, 106(1): 450-62
- [59] Merlin C, François MC, Queguiner I, et al. Evidence for a putative antennal clock in *Mamestra brassicae*: molecular cloning and characterization of two clock genes-period and cryptochrome in antennae. Insect Mol Biol, 2006, 15(2): 137-45
- [60] Reppert SM, Tsai T, Roca AL, et al. Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkworm *Antheraea pernyi*. Neuron, 1994, 13(5): 1167-76
- [61] Iwai S, Fukui Y, Fujiwara Y, et al. Structure and expressions of two circadian clock genes, period and timeless in the commercial silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol, 2006, 52(6): 625-37
- [62] Zhu H, Sauman I, Yuan Q, et al. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. PLoS Biol, 2008, 6(1): e4
- [63] 王文栋, 梁辉, 朱晓苏, 等. 家蚕生物钟基因 $Bmcry1$ 和 $Bmcry2$ 的克隆及生物信息学分析. 昆虫学报, 2011, 54(1): 9-19
- [64] Chang DC, McWatters HG, Williams JA, et al. Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38149-58
- [65] Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, et al. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. Mol Biol Evol, 2007, 24(4): 948-55
- [66] 束梅影. 家蚕BmN培养细胞昼夜节律生物钟基因的表达特征[D]. 苏州: 苏州大学, 2013
- [67] Merlin C, Beaver LE, Taylor OR, et al. Efficient targeted mutagenesis in the monarch butterfly using zinc-finger



- nucleases. *Genome Res*, 2013, 23(1): 159-68
- [68] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clock. *Cell*, 1999, 96: 271-90
- [69] Kobelková A, Závodská R, Sauman I, et al. Expression of clock genes period and timeless in the central nervous system of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*. *J Biol Rhythms*, 2015, 30(2): 104-16
- [70] Kotwica-Rolinska J, Gvakharia BO, Kedzierska U, et al. Effects of period RNAi on V-ATPase expression and rhythmic pH changes in the vas deferens of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43(6): 522-32
- [71] Kotwica J, Bebas P, Gvakharia BO, et al. RNA interference of the period gene affects the rhythm of sperm release in moths. *J Biol Rhythms*, 2009, 24(1): 25-34
- [72] Kotwica J, Joachimiak E, Polanska MA, et al. Diurnal rhythm in expression and release of yolk protein in the testis of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem Mol Biol*, 2011, 41(4): 264-72
- [73] Sauman I, Reppert SM. Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Dev Biol*, 1996, 178(2): 418-29
- [74] Benna C, Scannapieco P, Piccin A, et al. A second *timeless* gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian *tim*. *Science*, 2000, 282(14): 1628-30
- [75] Wang ZL, Li J, Xia QY, et al. Identification and expression pattern of Bmlark, a homolog of the *Drosophila* gene lark in *Bombyx mori*. *DNA Seq*, 2005, 16(3): 224-9
- [76] Uno T, Hata K, Hiragaki S, et al. Small GTPases of the Rab family in the brain of *Bombyx mori*. *Histochem Cell Biol*, 2010, 134(6): 615-22
- [77] Uno T, Sakamoto K, Isoyama Y, et al. Relationship between the expression of Rab family GTPases and neuropeptide hormones in the brain of *Bombyx mori*. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(2): 299-308
- [78] Sehadová H, Markova EP, Sehnal F, et al. Distribution of circadian clock-related proteins in the cephalic nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Rhythms*, 2004, 19(6): 466-82
- [79] Kadener S, Stoleru D, McDonald M, et al. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila circadian* pacemaker component. *Genes Dev*, 2007, 21(13): 1675-86
- [80] Hirota T, Fukada Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci*, 2004, 21(4): 359-68
- [81] Košťál V. Insect photoperiodic calendar and circadian clock: independence, cooperation, or unity? *J Insect Physiol*, 2011, 57(5): 538-56
- [82] King DP, Zhao YL, Sangoram AM, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 1997, 89(4): 641-53
- [83] Bungler MK, Wilsbacher LD, Moran SM, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 2000, 103: 1009-17
- [84] Kume K, Zylka MJ, Sriram S, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 1999, 98: 193-205
- [85] Guerra PA, Merlin C, Gegear RJ, et al. Discordant timing between antennae disrupts sun compass orientation in migratory monarch butterflies. *Nat Commun*, 2012, 3: 958
- [86] Merlin C, Gegear RJ, Reppert SM. Antennal circadian clocks coordinate sun compass orientation in migratory monarch butterflies. *Science*, 2009, 325(5948): 1700-4
- [87] Glaser FT, Stanewsky R. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol*, 2005, 15: 1352-63
- [88] Lohmann KJ, Lohmann CM, Putman NF. Magnetic maps in animals: nature's GPS. *J Exp Biol*, 2007, 210: 3697-705
- [89] Fuller PM, Lu J, Saper CB. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science*, 2008, 320: 1074-7
- [90] 梁辉, 徐丽, 宋艳, 等. 诱发滞育的温度和光照条件对家蚕胚胎生物钟信号主要基因表达的影响. *蚕业科学*, 2010, 36(5): 88-9
- [91] 朱晓苏, 宋艳, 徐世清. 家蚕作为模式生物在现代生物学中的应用. *实验动物与比较医学*, 2009, 29(1): 61-5
- [92] Kyriacou CP, Hastings MH. Circadian clocks: genes, sleep, and cognition. *Trends Cogn Sci*, 2010, 4(6): 259-67
- [93] Nobata H, Oishi K, Takeda M, et al. Photoreception in decapitated larvae of silkworm *Bombyx mori*. *Entomol Sci*, 2012, 15(4): 392-9
- [94] 徐世清, 木口宪尔, 凌尔军, 等. 重离子射线照射对家蚕造血器官的生理效应. *蚕业科学*, 2002, 3: 194-8
- [95] Kanai S, Kikuno R, Toh H, et al. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol*, 1997, 45: 535-48
- [96] Lin C, Todo T. The cryptochromes. *Genome Biol*, 2005, 6(5): 220
- [97] 刘劲, 代方银, 朱勇, 等. 家蚕突变体的嘌呤代谢. *蚕学通讯*, 2005, 3: 6-11
- [98] Sakudoh T, Sezutsu H, Nakashima T, et al. Carotenoid silk coloration is controlled by a carotenoid-binding protein, a product of the Yellow blood gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(21): 8941-6
- [99] Dai FY, Qiao L, Tong XL, et al. Mutations of an arylalkylamine-N-acetyltransferase, Bm-iAANAT, are responsible for silkworm melanism mutant. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19553-60
- [100] Mohamed AA, Wang Q, Bembenek J, et al. N-acetyltransferase (nat) is a critical conjunct of photoperiodism between the circadian system and endocrine axis in *Antheraea pernyi*. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92680