

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 德國蜚蠊生物時鐘掩蓋機制探討(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-058-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所

計畫主持人：李後晶

報告類型：完整報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 德國蜚蠊生物時鐘掩蓋機制探討

計畫類別：■個別型計畫      □整合型計畫

計畫編號：NSC90 - 2313 - B - 002 - 331 -

NSC91 - 2313 - B - 002 - 274 -

NSC92 - 2313 - B - 002 - 058 -

執行期間：90年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：李後晶

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學昆蟲學系

中華民國九十三年十月二十日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 德國蜚蠊生物時鐘掩蓋機制探討

### The masking mechanisms of the biological clock in the

### German Cockroach *Blattella germanica*

計畫編號：NSC90 - 2313 - B - 002 - 331 -

NSC91 - 2313 - B - 002 - 274 -

NSC92 - 2313 - B - 002 - 058 -

執行期限：90 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：李後晶 國立臺灣大學昆蟲學系

#### 一、中文摘要

由於德國蜚蠊活動行為的表現上，雌蟲會因為卵巢的發育，而造成活動行為日週律動被掩蓋的現象，本計劃嘗試深入探討此掩蓋機制。首先我們進行觸角電位圖譜 (Electroantennogram, EAG) 的偵測，當作第二個生物時鐘外在表徵：利用雌蟲之觸角電位圖譜的偵測，我們可以了解雌蟲活動行為之掩蓋現象其作用之機制位於生物時鐘系統的哪一部位。另外因為德國蜚蠊活動行為的掩蓋現象是生殖行為的生理活動運作的結果，我們同時選取交尾活性 (mating activity) 作為另一個生物時鐘的外在表徵來研究掩蓋現象。

其次，德國蜚蠊與雙紋姬蠊這兩個同胞種在交尾前期的日週律動的表現有很大的差異，是探討「日週律動掩蓋機制」很好的材料。在基因層次的研究方面，針對時鐘基因 *per* 在德國蜚蠊與雙紋姬蠊之 DNA 序列上做比較，希望從時鐘基因 *per* 的分子演化上了解影響生物時鐘表現的因子為何。

最後，由於掩蓋現象是生物時鐘節律器 (pacemaker) 的時間訊息在輸出 (output) 的過程中受到生殖因子的影響而造成活動行為日週律動消失，為了想要知道生物時鐘與生殖的關係在其它物種的情況為何，我們比較不同職務的白蟻(生殖型與非生殖型)之 PER、PDF 以及 Corazonin 三種蛋白質在不同時間點的表現差異(包含日夜變化)，分析其作用位置與活動行為日週律動訊息傳遞路徑的關係，進而了解此掩蓋作用之機制，同時藉此研

究對昆蟲之生物時鐘與生殖的關係有更進一步的了解。

**關鍵詞：**掩蓋效應、活動行為、日週律動、時鐘基因、視網膜電位圖譜、德國蜚蠊、雙紋姬蠊、交尾活性、去氧核醣核酸序列、白蟻。

#### Abstract

The locomotor circadian rhythm was masked by the development of ovaries in female German cockroach (*Blattella germanica*). This study explores the masking mechanisms of the biological clock in cockroach. Firstly, we proceed the detection of Electroantennogram (EAG) as the second external indicator of circadian clock. We realize the localization of masking mechanism of biological clock based on EAG results. Since the masking phenomenon is result from physiological activity of reproduction, we choose the mating activity as an other indicator to study the masking effect.

Secondly, *Blattella germanica* and *B. bisignata* are close-related species, but they show huge differences in the expression of circadian rhythm s before mating. The comparative study of the expression of circadian rhythm between two species, is a good theme in the investigation of ecological significance of circadian rhythm. Comparing the DNA sequences of *per* gene between *B. germanica* and *B. bisignata*, we understand which factor influences the

expression of circadian clock based on the molecular evolution of *per* gene.

Finally, in order to understand the effect of reproductive factor on the output pathway and masking the circadian rhythm of locomotion, termite are used to investigate the relationship between reproduction and circadian clock in non-cockroach species. We compare the expression of three clock gene (*per*, *pdf* and *corazonin*) in individual of different casts at different time point. This result shows the locations where these clock genes the interaction takes place between the expression and transmission pathway of time signal for locomotion. Based on the above research, the masking mechanism are understood clearly.

**Keywords:** masking effect, locomotor behavior, circadian rhythm, *period* gene, Electroretinogram, *Blattella germanica*, *Blattella bisignata*, mating activity, DNA sequence, termite, PDF, Corazonin.

## 二、緣由與目的

基因表現、生理週期性變動與行為表現上的日週律動，都是由生物個體內的調律器(pacemaker)所控制，也由於調律器屬於細胞層次，因此也被稱為時鐘細胞(clock cell)。生物時鐘運作系統主要有三個組成(Takahashi, 1995)：(一)調律器(pacemaker)，是產生時間訊息之所在。(二)環境訊息輸入路徑(input pathway)，負責傳遞外界環境訊息至調律器中樞，以使調律器能與外界環境時間同步。(三)時間訊息輸出路徑(output pathway)，傳遞調律器所生之時間訊息至下游，在生化上、生理上、行為上表現出日週律動現象。目前，在生物時鐘運作機制研究的領域裡，已建立出調律器中樞時間訊息產生的分子機制。整個日週律動系統是由自我調節的迴饋循環(autoregulatory feedback loop)所控制(Dunlap, 1999)。

第一個生物時鐘基因 *per*，由 Konopka 及 Benzer 於 1971 年所發表，他們以黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 羽化為日週律動

之觀察指標，找到了 *per* 基因的突變型。從此以後，開始生物時鐘分子機制研究的新紀元。*per* 基因在多種果蠅和許多昆蟲都有發現，而且胺基酸序列有相似的保守性(Colot *et al.*, 1988)。在日夜二十四小時交替下的 LD 環境中 *per*RNA 及 PER 蛋白質表現量呈穩定約二十四小時週期，而最大的表現量都在夜晚。在全暗 DD 的環境下，也就是沒有外界環境時間訊息的情況下，*per* RNA 及 PER 蛋白質表現量呈現一個週期接近二十四小時的自由律動(free-running)。這種現象行為觀測的結果相符。

德國蜚蠊雌性成蟲的卵巢在發育的過程中，會抑制雌性成蟲活動行為的日週律動；但是卵巢摘除後的雌成蟲則恢復具有日週律動的活動行為(Lin and Lee, 1998)。關於卵巢掩蓋活動行為日週律動現象的機制並不十分清楚。掩蓋的機制有兩種可能性：(一)卵巢存在擾亂了調律器的運作，故活動行為不具日週律動現象。(二)卵巢存在阻礙訊息輸出路徑，故活動行為不具日週律動現象。藉由研究日週律動被掩蓋的現象，有助於我們找出正常的訊息輸出路徑，進一步建立訊息輸出路徑的可能機制。

要解答以上的問題可以 *per* 基因表現情形作為分子指標，常用的方式是用北方墨點法(northern blotting)偵測 RNA 的表現，或是用西方墨點法(western blotting)偵測蛋白質的表現；此外也可藉由找尋其他指標進行偵測判斷。我們用觸角神經圖譜(electroretinogram (ERG))以及交尾活性(mating activity) 這兩種指標來瞭解掩蓋作用與訊息輸出路徑的關係。

觸角神經圖譜已經被證實是測量嗅覺感受性很有效的方法，已有許多昆蟲利用 ERG 來測量視覺感受性的日週律動(Rosén *et al.*, 2004)。因為 EAG 是一種很好的測量生理反應日週律動的指標，本計畫利用嗅覺感受性的日週律動系統來瞭解德國蜚蠊的日週律動系統的調控。尤其雌蟲活動行為日週律動的掩蓋現象，是否會造成 EAG 的不規律表現，可以證實卵巢發育之掩蓋機制是否位於調律器上或時間訊息的輸出路徑上。

另一個指標是交尾活性。Sakai and

Ishida (2001) 證實果蠅的交尾活性呈現出日週律動，而且該現象是受時鐘基因 *per* 控制。同樣地，為了證實卵巢發育之掩蓋機制是否位於調律器上或時間訊息的輸出路徑上，我們想知道雌蟲活動行為日週律動的掩蓋現象，是否會造成交尾活性的非日週律動表現。

本計畫也將從德國蜚蠊與雙紋姬蠊活動行為規律性之差異來研究掩蓋效應的成因。德國蜚蠊在性接受期間，不僅夜晚的活動量高，白天的活動量亦很高，沒有表現出明顯的晝夜律動 (Lee and Wu, 1994)。雙紋姬蠊雌蟲的活動模式則顯然與德國蜚蠊不同：雙紋姬蠊在性接受期間活動量也會增高，但大部份的活動仍侷限於夜晚，因此仍表現日週律動；由於德國蜚蠊與雙紋姬蠊是同胞種，但在活動行為日週律動之掩蓋現象上卻有截然不同的表現，因此將以雙紋姬蠊為材料探討掩蓋現象不發生的原因。因為在種化的過程中常常伴隨而來的是遺傳組成上的分化 (Genetic differentiation)，為了對雙紋姬蠊的日週律動的分子調控機制有更深入的了解，必須先對雙紋姬蠊 *per* 基因有基本的認識，此部份的研究首先要進行的是雙紋姬蠊 *per* 基因的 DNA 序列分析。

許多實驗證明 pigment-dispersing factor (*pdf*) 基因與日週律動活動之訊息輸出有關，也就是節律器用來影響其下游目標細胞的作用分子。將 PDH 注射入馬德拉螞蟻腦內的 accessory medulla 附近，結果會使得馬德拉螞蟻每日活動開始之時間提前或延後 (Petri and Stengl, 1997)。*pdf* 基因突變的果蠅，受到光暗周期的導引作用時，能表現近似正常的活動日週律動 (其 light-off activity 提前 1 小時開始)；若將其置於完全黑暗的環境中，前二天還能表現近似正常的活動日週律動，但自第三天起，活動之日週律動就消失了 (Renn *et al.*, 1999)。此外 *pdf* 基因的表現受到許多 clock 基因的調控；研究發現當果蠅的 *clock* 或 *cycle* 基因發生突變，均會影響 *pdf* RNA 的生成，所以推測 *pdf* 基因的轉錄應是受到 CLOCK、CYCLE 這兩種轉錄因子的調控 (Park *et al.*, 2000)；而 *period* 或 *timeless* 基因突變果蠅之 PDF 含量，則有週期異常或

含量持續過低的現象，由此可推論，*period* 及 *timeless* 基因之產物對 *pdf* 基因的轉錄並無影響，其作用之層次應是在轉譯 (translation) 的階段 (Park *et al.*, 2000)。

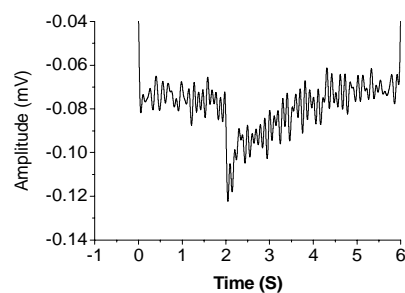
另一個與日週律動活動之訊息輸出有關的基因為 *corazonin* (*cr*)，其產物 (Corazonin) 是昆蟲的神經調節物 (neuropeptides)，有 [Arg7]-corazonin 和 [His7]-corazonin 2 種 homologs，最初是在美洲蜚蠊的心側腺 (corpora cardiaca, CC) 中被發現；corazonin 普遍存在於各種昆蟲內，但有多種功用 (Veenstra, 1989; Tanaka *et al.*, 2002; Roller *et al.*, 2003)。目前猜測 corazonin 可能是日週律動生物時鐘訊息輸出路徑的調節物，因為 (1) 在 *Manduca sexta* 中，[Arg7]-corazonin 和 PER 的表現位置相同；(2) 在 *Bombyx mori* 中，corazonin 和 DBT 的表現位置相同 (Qi-miao *et al.*, 2003)。

本計畫打算用西方墨點法 (western blotting) 偵測 PDF 與 Corazonin 蛋白質的表現，進而了解這些 Output 基因與掩蓋效應的關係。此部份的研究所用的材料為白蟻 (termite)，因為白蟻有社會結構，族群中的個體有生殖型與非生殖型 (工蟻或兵蟻) 兩類；利用這個特性我們可以比較這兩種個體之時鐘基因的表現，藉此對昆蟲之生物時鐘與生殖的關係有更進一步的了解。

### 三、結果與討論

(一) 觸角電位圖譜 (Electroantennogram, EAG) 日週律動的偵測：

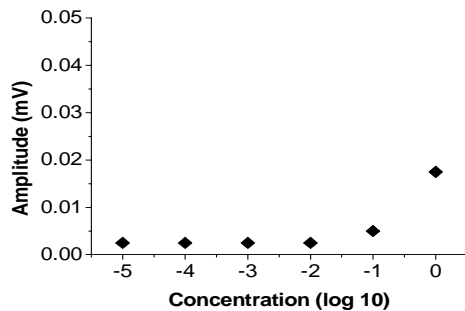
1. 給予德國蜚蠊一秒鐘之醋酸乙酯 (ethyl acetate) 刺激的觸角電位圖譜反應 (圖一)，其反應強度的變異值約為 0.04mV (-0.08~-0.12) (重覆六次)。



圖一、德國蜚蠊雄蟲對醋酸乙酯的觸角電

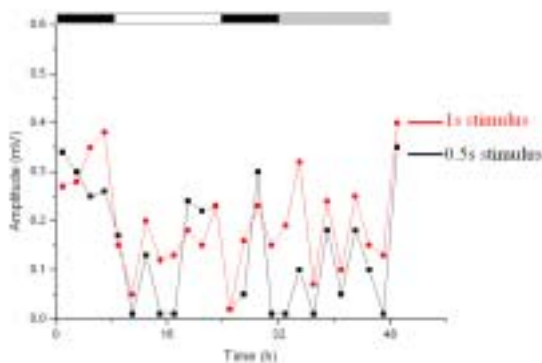
位圖譜。橫軸代表時間，縱軸是反應強度 (amplitude)。

2. 醋酸乙酯的稀釋反應曲線 (dilution response curve) 見圖二。結果顯示醋酸乙酯在稀釋到十倍以上後就無法引起德國蜚蠊的觸角電位圖譜反應。



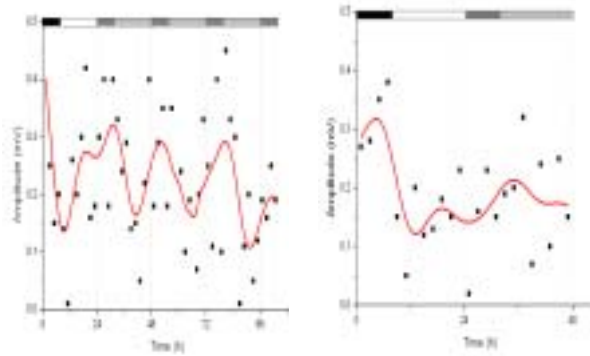
圖二、德國蜚蠊雄蟲對不同濃度之醋酸乙酯的觸角電位圖譜。橫軸是醋酸乙酯的濃度，縱軸是反應強度；每個點是六次重覆的平均(每次重覆間隔五分鐘)

3. 圖三是德國蜚蠊雌蟲在不同時間的醋酸乙酯刺激下，觸角電位圖譜反應的日週律動分析圖。結果顯示刺激時間愈長，觸角電位反應愈大。



圖三、德國蜚蠊雌蟲的觸角電位圖譜。橫軸是醋酸乙酯的刺激時間，縱軸是反應強度。

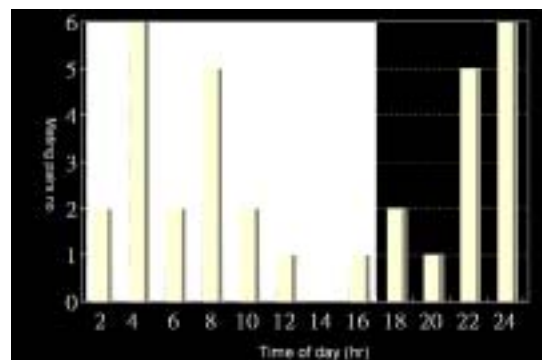
4. 圖四是德國蜚蠊觸角電位圖譜反應的日週律動分析圖。圖中顯示雌性與雄性的德國蜚蠊對 100% 的醋酸乙酯在不同的時間點有不同的觸角電位圖譜反應強度。



圖四 五天大之德國蜚蠊(A)雄蟲與(B)雌蟲對醋酸乙酯之觸角電位圖譜的日週律動分析。實驗條件為 16 小時光照 8 小時黑暗 (圖上方的白色長方形代表光期，黑色代表暗期，灰色代表自由律動期)。將德國蜚蠊先在有日夜變化的實驗條件下先進行導引 (entrainment)，接著進入全暗期讓其自由律動。每兩小時取樣一次。圖中的平滑線是觸角電位反應之變化的最適曲線 (best fitted line)。

(二)、德國蜚蠊交尾活性之日週律動

圖五的結果顯示德國蜚蠊之交尾活性 (mating activity) 有日週律動，也就是在該特徵上並沒有掩蓋效應出現。我們發現德國蜚蠊的交尾高峰出現在暗期快結束與光期開始。



圖五、德國蜚蠊交尾活性的日夜變化。實驗條件為 16 小時光照 8 小時黑暗。

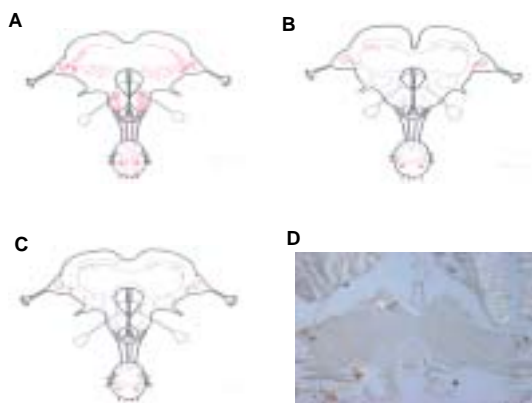
(三)、雙紋姬蠊 *per* 基因之 DNA 序列分析：

抽取雙紋姬蠊頭部之 mRNA 後，再利用 degenerate primer 進行反轉錄 PCR 反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction)，最後跑膠得到一個大小約 1Kb

的產物。將該產物進行核酸定序後，與實驗室之前找到的德國蜚蠊 *per* 基因之 DNA 序列做比對，結果顯示在 759 bp 長度的比對序列中，兩者的 DNA 相似度 (identities) 約為 93%；接著再以美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*) 做外群 (outgroup) 做 DNA 序列比對，結果顯示在 575 bp 的比對序列中，兩者的 DNA 相似度 (identities) 約為 74%。由此可知雙紋姬蠊 *per* 基因之 DNA 序列與德國蜚蠊非常相似，符合預期。

#### (四) 各種職務之白蟻的頭部神經組織的免疫染色 (immunostaining)

我們針對與日週律動相關的兩種蛋白質 (PDF、Corazonin)，對各種職務之白蟻的頭部神經組織進行免疫染色，希望了解社會性昆蟲白蟻的生物時鐘是否因職務不同而不同。取 Pseudogates、Soldier (兵蟻) 以及 reproductive nymph 之佛羅里達濕木白蟻 *Prorhinotermes simplex*，針對不同時間點之白蟻進行 anti-PDF、anti-corazonin 免疫染色，以判斷 PDF、corazonin 兩種蛋白質之表現是否具有日週律動。此外還比較在長日照 (L:D= 16:8) 與短日照 (L:D=10:14) 的不同處理下三種蛋白質之表現。圖六的結果顯示 Pseudogates、Reproductive nymph 和 Soldier 染出的結果是一樣的(不同時間點、不同性別、不同光期處理)。



圖六、(A). Pseudogate (B) Reproductive nymph 以及 (C) Soldier 三種職務之白蟻 anti-PDF 免疫染色結果示意圖；(D) Soldier 切片，腦部表現 PDF 之細胞與軸突。

在 Corazonin 的結果方面(圖七)，

Pseudogates 和 Reproductive nymph 以及 Soldier 三者染出的結果是一樣的(不同時間點、不同性別、不同光期處理)。染出的細胞數目各有差異，推測應是個體差異。

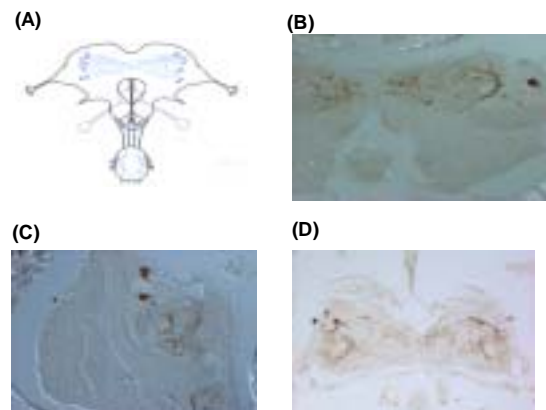


Fig. 7. (A). Pseudogate 之 anti-Corazonin 免疫染色結果示意圖(B) Pseudogate (C) Reproductive nymph 以及(D) Soldier 三種職務之白蟻的切片，腦部表現 Corazonin 之細胞與軸突。

#### 四、計畫成果自評

本計畫為三年期計畫，研究內容皆依原計畫期程分年執行，與原計畫大致相符。在計畫執行期間，我們達成了下列預期目標：

- (一)、完成了德國蜚蠊觸角電位圖譜 (Electroantennogram, EAG) 日週律動的偵測，由此可知造成活動行為日週律動消失的因子並未作用在觸角的嗅覺反應上。
- (二)、德國蜚蠊之交尾活性表現出日週律動，顯示雖然雌蟲交尾前期的活動行為的日週律動因為卵巢的發育而被掩蓋，但掩蓋並未作用在交尾活性的表現上。
- (三)、比較雙紋姬蠊與德國蜚蠊 *per* 基因後發現兩者之 DNA 序列差異不大，推測兩者在活動行為日週律動表現上的差異可能是 *per* 基因表現上的差異，或是生物時鐘節律器的時間訊息在輸出的過程中受到其它因子的影響而造成德國蜚蠊活動行為日週律動消失。
- (四)、比較生殖型與非生殖型白蟻頭

部織的免疫染色，結果顯示兩者在 PDF 與 Corazonin 的表現上在各個處理組間並無不同，同時在光期與暗期的表現上也沒有差異。

## 五、參考文獻

- Colot, H. V., J. C. Hall, and M. Rosbash. 1988. Interspecific comparison of *period* gene of *Drosophila* reveals large blocks of non-conserved coding DNA. *EMBO* 7: 3929-3937.
- Crispi, S., E. Giordano, P. P. D'Avino, and M. Furia. 1998. Cross-talking among *Drosophila* nuclear receptors at the promiscuous response element of the *ng-1* and *ng-2* intermolt genes. *J. Mol. Bio.* 275: 561-574.
- Darlington, T. K., K. Wager-Smith, M. F. Ceriani, D. Staknis, N. Gekakis, T. D. L. Steeves, C. J. Weitz, J. S. Takahashi, and S. A. Kay. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280: 1599-1603.
- Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Glossop, N. R. J., L. C. Lyons and P. E. Hardin. 1999. Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286: 766-768.
- Helfrich-Forster C., M. Stengl, and U. Homberg. 1998. Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol. Int.* 15: 567-594.
- Hogenesch, J. B., Y. Gu, S. Jain and C. A. Bradfield. 1998. The Basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5474-5479.
- Honig, M. G., and R. I. Hume. 1989. DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labeling and pathway tracing. *TINS* 12: 333-341.
- Jindra, M., F. Malone, K. Hiruma, and L. M. Riddiford. 1996. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Bio.* 180: 258-272.
- King-Jones, K., G. Korge, and M. Lehmann. 1999. The helix-loop-helix proteins dAP-4 and daughterless bind both *in vitro* and *in vivo* to SEBP3 sites required for transcriptional activation of the *Drosophila* Gene Sgd-4. *J. Mol. Bio.* 291: 71-82.
- Koehler W. K., and G. Fleissner. 1978. Internal desynchronization of bilaterally organized circadian oscillators in the visual system of insects. *Nature* 174: 708-710.
- Konopka, R. J. and S. Benzer. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2112-2116.



- Koontz, M., and J. S. Edward. 1980. The projection of neuroendocrine fibers in the brain of three Orthopteroid insect. *J. Morphol.* 165: 285-299.
- Lee, C., K. Bae, and I. Edery. 1999. PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMALI heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Molecular and Cellular Biology* 19: 5316-5325.
- Lee, H. J. and Y. L. Wu. 1994. Mating effects on the feeding and locomotion of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Physiol. Entomol.* 19: 39-45.
- Lezzi, M., T. Bergman, J. -F. Mouillet, and V. C. Henrich. 1999. The ecdysone receptor puzzle. *Arch. Insect Bio. Physio.* 41: 99-106.
- Lin, T. M., and H. J. Lee. 1996. The expression of locomotor circadian rhythm in female German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Chronobiol. Int.* 13: 81-91.
- Lin T. M., and H. J. Lee. 1998. Parallel control mechanisms underlying locomotor activity and sexual receptivity of the female German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* 44: 1039-1051.
- Lococo, D. J., and S. S. Tobe. 1984a. Neuroanatomy of the retrocerebral complex, in particular the pars intercerebralis and pars lateralis in the cockroach *Diploptera punctata*. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 13: 65-76.
- Lococo, D. J., and S. S. Tobe. 1984b. Retrograde and orthograde axon transport by brief-exposure to nickel chloride: methodology and parameters for success in the brain-retrocerebral complex of the cockroach *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.* 30: 635-642.
- Park J. H., Helfrich-Förster C., Lee G., Liu L., Rosbash M., and Hall J. C. 2000. Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3608-3613.
- Petri B. and Stengl M. 1997. Pigment-dispersing hormone shifts the phase of the circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. Neurosci.* 17: 4087-4093.
- Plautz, J. D., M. Kaneko, J. C. Hall, and S.A.Kay. 1997. Independent photoreceptive circadian clock throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632-1635.
- Renn S. C. P., Park J. H., Rosbash M., Hall J. C., and Taghert P. H. 1999. A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause

- severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 99: 791-802.
- Roller, L., Tanaka, Y., Tanaka, S., 2003. Corazonin and corazoninlike substances in the central nervous system of pterygote and apterygote insects. *Cell and Tissue Research* 312, 393–406.
- Rosén, W. Q., G.-B. Han, and C. Lofstedt. 2004. 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. Rhythm.* 18: 402-08.
- Saez, L. and M. W. Young. 1988. *In situ* localization of the *per* clock protein during development of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5378-5385.
- Sakai, T., and N. Ishida. 2001. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *PNAS* 98:9221-9225.
- Sassone-Corsi, P. 1998. Molecular clocks: mastering time by gene regulation. *Nature* 392:871-874.
- Sauman, I. and S. M. Repper. 1996. Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of Period protein regulation. *Neuron* 17: 889-900.
- Stocker, A. J., J. M. Amabis, E. Gorab, C. Elke, and M. Lezzi. 1997. Antibodies against the D-domain of a *Chironomus* ecdysone receptor protein react with DNA puff sites in *Trichosia pubescens*. *Chromosoma* 106:456-464.
- Takahashi, J. S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 531-553.
- Tanaka, S., Zhu, D.-H., Hoste, B., Breuer, M., 2002. The dark-color inducing neuropeptide, [His7]-corazonin, causes a shift in morphometric characteristics towards the gregarious phase in isolated reared (solitarious) *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology* 48, 1065–1074.
- von Bartheld, C. S., D. E. Cunningham, and E. W. Rubel. 1990. Neuronal tracing with DiI: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 725-733.
- Wen, H. W., and H. J. Lee. 2000. Unequal coupling between locomotor pacemakers of the German cockroach, *Blattella germanica*(L.). *J. Insect Physiol.* 46: 89-97.
- Wills S. A., T. L. Page, and C. S. Colwell. 1985. Circadian rhythms in the electroretinogram of cockroach. *J. Biol. Rhythms* 1: 35-37.