

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

蛻皮激素對德國蜚蠊與雙紋姬蠊之活動行為日週律動的影  
響(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-054-

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：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 28 日

# 行政院國家科學委員會專題研究進度報告

蛻皮激素對德國蜚蠊及雙紋姬蠊之活動行為日週律動的影響 (2/3)

## The Effect of the ecdysone on the locomotor circadian rhythm of the German cockroach and the double-striped cockroach

計畫編號：NSC92 - 2313 - B - 002 - 054 -

執行期限：92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

德國蜚蠊雌成蟲在活動行為的表現上，會因卵巢的發育而出現活動行為日週律動被掩蓋的現象。由於德國蜚蠊卵巢的掩蓋效應是由荷爾蒙系統所調控，推測卵巢所分泌最大量的激素「蛻皮激素」就是掩蓋因子。為了了解蛻皮激素如何影響活動行為，必須先分析蛻皮激素之受器基因，因為蛻皮激素會調控特定組織的蛻皮激素受器，進而影響下游基因的表現。本年度的工作是進行蛻皮激素之受器 (ecdysone receptor, EcR) 的分析，利用源自於鱗翅目的抗體進行 western blotting；接著以免疫染色的方法找出蛻皮激素在德國蜚蠊成蟲體內作用之位置；最後做蛻皮激素受器的蛋白質定序。前述實驗流程在雙紋姬蠊也進行相同的操作。由於德國蜚蠊與雙紋姬蠊處女雌蟲的日週律動表現上出現差異，比較這兩種蜚蠊之蛻皮激素與掩蓋效應的關係，可以了解造成日週律動表現在種間差異的生理機制為何。

**關鍵詞：**德國蜚蠊、雙紋姬蠊、活動行為日週律動、掩蓋效應、蛻皮激素

### Abstract

The expression of locomotor circadian rhythm in female German cockroach is masked by the development of ovaries. Since the masking effect is mediated through the regulation of hormone, we propose the ecdysone, the major hormone secreted from ovaries, is the masking factor. Firstly, by analyzing the ecdysone receptor (EcR) gene

to realize ecdysone how to influence the locomotor circadian rhythm, because ecdysone will control the EcR gene which influence expression of the gene on the downriver. Firstly, using the antibody from Lepidoptera to work the western blotting. In addition, we will employ immunostain method against ecdysone receptor to reveal the action sites. These sites may shine light on the interference of circadian signals with masking factor-ecdysone. In order to prove the masking role of ecdysone, ovariectomized females who showed unmasked locomotor circadian rhythm will be treated with ecdysone analog to regain the masked rhythm. Finally, protein sequencing of EcR was done. Since the sibling species of the Germany cockroach, the double-striped cockroach is a feral species and expresses locomotor circadian rhythm in virgin females, it is a great advantage to use this species as a comparative study to further demonstrate the function of ecdysone on the locomotor circadian rhythm. The same experimental procedures, therefore, will be repeated on the double-striped cockroach. The main focus of this proposal is to investigate the physiological mechanism of masking effect on the locomotor circadian rhythm by ecdysone.

**Keywords:** Germany cockroach, double-striped cockroach, locomotor circadian rhythm, masking effect, ecdysone

### 二、緣由與目的

日週律動意指生物週期接近 24 小時週期性的生理或行為表現 (Brady, 1982)。為了適應 24 小時日夜變化的地

球環境，從細菌到哺乳動物，幾乎所有的生物都演化出日週律動的生物時鐘 (circadian clock)，並且具有相同的基礎性質 (Moore-Ede *et al.*, 1982; Gekakis *et al.*, 1995; Giebultowicz, 2000)。首先，生物個體內的日週律動時鐘無須依靠外界訊息，本身即可規律地振動 (oscillation)，因此在全暗或者全亮、並且定溫的恆定環境之下，仍可保持週期接近 24 小時的律動；這種「節律器依照自身週期所表現出的規律現象」，被稱為「自由律動 (free-running)」 (Saunders, 1976; Brady, 1982)。第二，在環境具有週期性變化 (例如明暗週期、溫度週期、餵食週期等) 的情況下，日週律動時鐘可受到環境週期的導引 (entrainment)，而與外界訊息同步 (synchronization) (Sommer, 1975; Saunders, 1976; Aschoff *et al.*, 1982; Brady, 1982)；具有導引效果的週期性訊息，則稱為「時間指標 (zeitgeber, time-giver)」 (Brady, 1969, 1982; Colwell and Page, 1990)。第三，日週律動時鐘必須能在不同的溫度下以幾乎相同的速率運轉，這個性質稱為「溫度補償 (temperature compensation)」，所有的生物反應都是化學反應，而一般化學反應的  $Q_{10}$  值大約為 2——亦即當溫度上升 10℃，反應速率約為原來的 2 倍；然而，生物時鐘的  $Q_{10}$  值則接近於 1 (Brady, 1982; Takahashi, 1995; Hardin, 2000)。

日週律動的調控系統包含了 3 個組成：(1) 環境訊息輸入路徑 (input pathway)：將外界的環境訊息傳遞至節律器中樞；(2) 節律器 (pacemaker)：即產生震盪週期 (oscillation) 的部位，因為屬於細胞層次，所以也被稱為時鐘細胞 (clock cells)；(3) 時間訊息輸出路徑 (output pathway)：將節律器產生之時間訊息傳遞至下游，表現出各類生化、生理、行為的日週律動現象 (Hardin, 2000)。

德國蜚蠊 [*Blattella germanica* (L.)] 的活動行為依照各個齡期、性別和生殖狀況而不同 (Lin and Lee, 1996)。

在固定溫度並固定光週期的環境下，雄性的成蟲會表現出日週律動的活動行為 (Sommer, 1975)，但雌性成蟲則不然。在 28℃，光週期 (LD cycles) 24 小時 (16 小時亮 8 小時暗，16L:8D) 的情況下，雄性德國蜚蠊成蟲表達週期為 24 小時的週期性活動行為；然後將這些雄性成蟲移至缺乏環境時間訊息的全暗環境下 [28℃，DD (constant darkness)]，這些雄性成蟲會表現出週期略短於 24 小時的自由律動 (約為 23.6 小時) (Lin and Lee, 1996)。相對地，在同樣的環境下，德國蜚蠊雌性成蟲的活動行為和雄性成蟲完全不同：處女成蟲不表現日週律動的活動行為，日活動量呈現與生殖週期相配合的週期性 (Lin and Lee, 1996)。然而，經過切除卵巢手術之後，雌蟲便可表現出與雄蟲完全相同的活動模式：在亮暗週期 (LD) 下表現出 24 小時週期的日週律動，在全暗 (DD) 環境下表現出自由律動，日週期長度與雄蟲的沒有顯著差異，活動高峰也與雄蟲相同。由此可知，雌蟲的活動行為仍然受到節律器的控制，但卵巢會對日週律動活動行為產生掩蓋效應 (masking effect) (Lin and Lee, 1996)。

雙紋姬蠊 [*B. germanica* (Brunner)] 與德國蜚蠊不但同屬，而且都是 *germanica* species group 的一員，在外觀、生活史、生殖週期、求偶行為等各方面都非常近似。

兩者最明顯的不同在於居地：德國蜚蠊生活於人類家屋之中，並且性習群聚，會產生聚集費洛蒙；雙紋姬蠊生活於野外，並且習於個體行動，因而並不製造聚集費洛蒙。德國蜚蠊之雌蟲僅與同種雄蟲交尾，而雙紋姬蠊的雌蟲會接受同種與德國蜚蠊的雄蟲。值得注意的是，兩者雖然如此接近，在活動行為上，雙紋姬蠊卻沒有上述德國蜚蠊所表現的「卵巢對活動行為的掩蓋效應」，因而可在掩蓋效應的研究上做為良好的對照。雙紋姬蠊與德國蜚蠊一樣，雌蟲懷孕期會攜帶卵鞘，且不管交尾與否皆會週期性地形成卵鞘，因此皆具有週期性的

生殖現象。由於雌蟲於懷孕期間不需覓食及尋找配偶，活動量非常低，因此無法表現活動行為的日週律動，所以雙紋姬蠖與德國蜚蠊懷孕雌蟲皆受到懷孕的負向掩蓋作用 (negative masking effect)。兩物種不同的是雙紋姬蠖處女雌蟲可以表現行為日週律動，而且活動都侷限於相對夜晚 (subjective night)；但是在同一條件下，德國蜚蠊的處女雌蟲在性接受期間不論相對夜晚或白天，活動量都很高，也導致活動行為的日週律動無法表現。因此雙紋姬蠖雌蟲只具有懷孕的負向掩蓋因子，而德國蜚蠊雌蟲則具有懷孕和性接受期的雙重負向掩蓋因子。但是雙紋姬蠖不管交尾與否皆有週期性的生殖現象，也就是卵巢都會發育並且形成卵鞘，若是如此，理論上掩蓋因子應該會掩蓋行為日週律動的表現，然而雙紋姬蠖處女雌蟲仍可以表現行為日週律動，是否有其它因子影響仍屬未知 (Tsai and Lee, 2001)。

使用切除法已知德國蜚蠊活動行為的節律點位在大腦視葉的 lobula 和 medulla 之間 (Wen and Lee, 2000)，而活動行為的表現顯然需要腳部的配合。掩蓋效應必然是會作用在腦部到腳部之間。那麼掩蓋因子是經由什麼管道由卵巢傳達到訊息輸出路徑而阻斷它呢？生物體內傳遞訊息有兩大系統：神經系統和內分泌系統。已知在德國蜚蠊雌性成蟲中，切斷腹神經索對活動行為並無顯著影響。切斷腹神經索後，卵巢的訊息便無法經過神經網路傳遞，但是此項掩蓋作用仍然不會消失，可見卵巢對於雌蟲日週律動的掩蓋因子並非經過神經網路，而可能是經由內分泌路徑調控的 (Lin and Lee, 1998)。由以上推論，掩蓋因子應該是由卵巢發出的荷爾蒙。到目前為止，尚未有任何文獻提出掩蓋作用的確實機制。我們懷疑造成掩蓋作用的調控荷爾蒙，乃是德國蜚蠊卵巢主要分泌的荷爾蒙——蛻皮激素 (ecdysone)。

蛻皮激素是一種控制蛻皮 (包括變態) 的荷爾蒙 (a molting hormone)，和青春激素 (juvenile hormone, JH) 配合共同控制蛻皮與變態。傳統的觀念認為

蛻皮激素作用在幼蟲或若蟲時期 (Kozlova and Thummel, 2000)。而在這個時期，蛻皮激素是由前胸腺 (prothoracic gland) 或其同源組織 [例如環狀體 (ring gland) 或腹側體 (ventral gland)] 所分泌的 (Hoffmann and Hetru, 1983; Nijhout, 1994)。因為大多數昆蟲的成蟲已經不需要蛻皮，而且前胸腺退化不再有作用，所以傳統的觀念並不認為成蟲具有蛻皮激素。然而最近對成蟲蛻皮激素的研究顯示，蛻皮激素在成蟲期具有的功用和在幼期完全不同。目前所知在雌性的成蟲中，卵巢中的濾泡細胞 (ovarian follicles) 都會分泌高濃度的蛻皮激素，在卵巢的成熟、卵黃蛋白 (yolk protein) 的合成和卵的發育中扮演了重要的角色。但其作用的細節，則因昆蟲生殖行為上高度演化輻射造成的多樣性，而隨昆蟲的種類而異 (Hoffmann and Hetru, 1983; Nijhout, 1994)：在蜚蠊目中，胎生性的蜚蠊 *Diploptera punctata* 中，卵巢分泌蛻皮激素來刺激腦分泌 allatohibins，從而抑制咽喉側腺 (corpora allata, CA) 對青春激素的分泌；在雙翅目的埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 中，卵巢分泌蛻皮激素刺激脂肪體產生卵黃素 (vitellogenin)；而蛻皮激素在半翅目的吸血椿象 *Rhodnius prolixus* 中的角色，則與 *Diploptera punctata* 類似。

#### 蛻皮激素 (ecdysone) 相關之基因：

在黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 的遺傳研究中發現許多與蛻皮類固醇生合成 (ecdysteroid biosynthesis) 有關的基因很多，包括參與蛻皮激素之生成、代謝以及與蛻皮激素反應之受器 (ecdysteroid receptor) 蛋白質產生有關的基因。舉例來說，P450 基因群在蛻皮類固醇生合成複雜的途徑中佔有相當比例的重要性，包括將膽固醇 (cholesterol) 轉換成 7-dehydrocholesterol (是蛻皮類固醇生合成的第一步)，而在將蛻皮激素 (ecdysone) 轉換成 20-hydroxyecdysone 的過程中所需的 ecdysone 20-monooxygenase 也是由一種 P450 基因產生 (Feyereisen, 1999)。除了 P450 之外，還有許多基因也與蛻皮激素的

合成與代謝有關，但是到目前為止絕大多數被發現的都是影響幼蟲或若蟲蛻皮與變態 (metamorphosis) 的基因，與成蟲蛻皮激素有關的基因很少，*ecdysoneless (ecd)* 基因是少數被證實與成蟲卵巢蛻皮激素合成有關的基因 (Warren *et al.*, 1996)。研究顯示 *ecd<sup>l</sup>* 突變會使膽固醇或膽固醇的衍生物 (derivatives, 25-hydroxycholesterol) 最後轉換成蛻皮類固醇的量少很多，而這種現象在果蠅幼蟲的環狀體 (ring glands) 或是成蟲的卵巢都有發現。因此該基因在探討德國蜚蠊成蟲蛻皮激素與日週律動掩蓋效應的關係上應該是一個理想的標的基因。另外前面曾提到的有一種 P450 基因可以產生 ecdysone 20-monoxygenase，將蛻皮激素 (ecdysone) 轉換成 20-hydroxyecdysone，由於後者才是真正與蛻皮激素受器作用的活化態，是蛻皮類固醇可以真正作用的關鍵化合物，目前在德國蜚蠊已經選殖出兩個 P450 基因的 cDNA (*CYP6K1* 與 *CYP6J1*) (Wen and Scott, 2001)，比較德國蜚蠊 P450 的 *CYP6K1* 與 *CYP6J1* 跟 *Locusta migratoria* 的 P450 *CYP6H1* 在胺基酸序列上的差異，發現有高的相似性。由於 *Locusta migratoria* 的 P450 *CYP6H1* 已證實與 ecdysone 20-hydroxylase 的產生有關，而這個酵素可以影響蛻皮激素 (ecdysone) 轉換成 20-hydroxyecdysone 的過程，因此推測這些 P450 基因也是研究德國蜚蠊成蟲蛻皮激素與日週律動掩蓋效應的重要因子。

由於雙紋姬蠊與德國蜚蠊在生活環境以及生殖策略有顯著差異，而這樣的差異是否會反應在蛻皮激素與日週律動表現關係上，是一個非常值得探討的問題。

## 結果與討論

### Westerning blotting of ecdysone receptor

使用購自 Hybridoma center 之 ecdysone receptor 的抗體(編號 10F1)進行 western blotting，這個抗體是以 *Manduca sexta* 的 ecdysone receptor (EcR) 蛋白序列中第 127 到-354 的 amino acid 片段放進大腸菌 (*E.coli*) 中表現蛋白，研究顯示 10F1 抗體可以對 *Manduca*; *Bombyx mori*;

*Locusta migratoria*; *Drosophila melanogaster* 等不同目 (包括鱗翅目、直翅目、雙翅目) 昆蟲有反應，表示該抗體是一種 common antibody，也就是其可以辨識不同目之 ecdysone receptor (EcR) 蛋白質的保守區域，因此利用該抗體應該可以偵測到雙紋姬蠊與德國蜚蠊的 ecdysone receptor (EcR) 蛋白質。



圖一、德國蜚蠊雌成蟲的卵巢(ovary) 與生殖副腺 (accessory glands)

先將雙紋姬蠊與德國蜚蠊雌成蟲的頭及卵巢 (圖一) 取下，放進 sample buffer 中以均質機將組織完全磨碎後，在 4°C 下離心五分鐘，取上清液在乾浴槽 (drybath) 中加熱五分鐘，接著將煮過的上清液 loading 到含有 SDS 的 polyacrylamide gel 中，也就是跑電泳 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)，由於 SDS 是一種可以將蛋白質的多維結構破壞，使其變成單純的線性結構，因此跑膠體電泳時，可以由蛋白質的分子指標 (marker) 直接讀出某蛋白質的分子大小。

再將跑好的 SDS-gel 轉印到 PVDF membrane 上，再以 10F1 抗體進行免疫反應，實驗結果 (圖二) 如預期，在 47KD 與 76KD markers 間有一呈色帶 (掃描後不是很清楚)，但以 Ponceau-S 呈色證實在 47KD 與 76KD markers 之間確實有蛋白質轉印過去，推測可能是該蛋白質的量不是很多。



圖二、雙紋姬蠅與德國蜚蠊之蛻皮激素受器蛋白的 western blotting 1 與 9 是果蠅做為對照組；2 與 3 分別雙紋姬蠅與德國蜚蠊雌成蟲的頭；4, 5, 6 是雙紋姬蠅雌蟲的卵巢，而 7, 8 則是德國蜚蠊雌蟲的卵巢。

之前不同昆蟲的 ecdysone receptor (EcR) 蛋白質的分子量在 70~80 KD 之間，因此這次 western blotting 的結果找到的 antigen 應該就是雙紋姬蠅與德國蜚蠊之蛻皮激素受器蛋白。接下來的工作是把轉印膜上的呈色帶剪下來，直接進行蛋白質定序的工作，然而嘗試之後發現雜質太多，與台大農化所莊榮輝實驗室的成員討論過後，決定先把蛋白質純化出來後再做定序的工作，目前正在做蛋白質純化的工作；另外現在正在嘗試以免疫染色的方法找出蛻皮激素在德國蜚蠊成蟲體內作用之位置。

### 德國蜚蠊蛻皮激素反應之受器 (ecdysteroid receptor) 基因的選殖

由於已經找到雙紋姬蠅與德國蜚蠊之蛻皮激素受器蛋白的同源片段，因此以不同昆蟲的該片段設計 degenerate primer 以進行 ecdysone receptor (EcR) 基因的 cDNA 選殖(cloning)，我們設計了兩組引子，分別是

**EcR51:** 59 ATG TG(c/t) (c/t)TI GTI TG(c/t) GGI GA, (forward, 1855 to 1874);

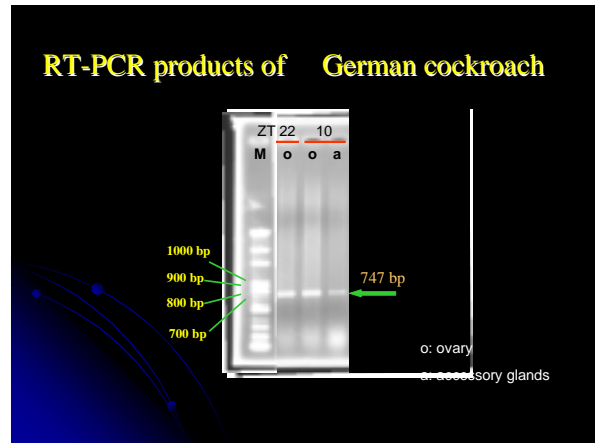
**EcR53:** 59 TG(c/t) GAI ATI GA(c/t) AT(c/g) TA(c/t) ATG, (forward, 1984 to 2004);

**EcR33:** 59 C(g/t)I GCC A(c/t)I C(g/t)(c/g) A(a/g)C ATC AT, (reverse, 2578 to 2597);

**EcR31:** 59 (c/g)IA (c/t)(a/g)T CCC A(a/g)A

(c/t)(c/t)T CIT CIA (a/g)GA A, (reverse, 3001 to 3025).

目前正在抽 RNA 以便進行 RT-PCR。



圖三、德國蜚蠊雌成蟲的卵巢(ovary,o) 與生殖副腺 (accessory glands, a) 在不同時間 (ZT10 與 ZT22)之 cDNA 的表現量。

### 德國蜚蠊卵巢 *permRNA* 表現的測定

為了了解德國蜚蠊雌成蟲的卵巢中 *permRNA* 的表現情形，我們抽取 ZT10 與 ZT22 兩個時間(相對白天與夜晚) 的卵巢 RNA，反轉錄後比較兩時間的 *per* 表現量有何不同，圖三顯示德國蜚蠊雌成蟲的卵巢中的 *per* 基因日夜皆有表現，但兩者的量無顯著差異，也就是卵巢中的 *per* 並無日週律動，而這種現象與蛻皮激素或掩蓋效應的關係仍不清楚，需要進一步實驗證明釐清。

### 四、計畫成果自評

本計畫的研究內容皆依原計畫執行，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)、已確認雙紋姬蠅與德國蜚蠊的 ecdysone receptor (EcR) 蛋白質的分子量約在 60-70KD 之間。
- (二)、德國蜚蠊雌成蟲的卵巢中的 *per* 基因日夜皆有表現，但兩者的量無顯著差異。

### 五、參考文獻

Aschoff, J. , S. Daan, and K. I. Honma.



1982. Zeitgebers, entrainment, and masking: some unsettled questions. In: J. Aschoff, S. Daan, and G. Groos (eds.). *Vertebrate Circadian Systems: Structure and Physiology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 13-24.
- Bosher, J. M., M. Labouesse. 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell. Biol.* 2:E31-E36.
- Brady, J. 1969. How are insect circadian rhythms controlled. *Nature* 223: 781-784.
- Brady, J. 1982. Circadian rhythms in animals physiology. pp. 121-140. In: J. Brady (eds.) *Biological Timekeeping*. Cambridge Univ. Press, London.
- Chang, H. W. 2000. The relationship between locomotion pacemaker and circadian rhythm of ERG in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). Master' thesis. National Taiwan Univ. Press, Taipei. 49pp.
- Colwell, C. S., and T. L. Page. 1990. A circadian rhythm in neural activity can be recorded from the central nervous system of the cockroach. *J. Comp. Physiol. A* 166: 643-649
- Delbecq, J. and K. Slama. 1980. Ecdysteroid titers during autonomous metamorphosis in a dermestid beetle. *Z. Naturforsch.* 35c: 1066-1080.
- Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Ederly, I. 1999. Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: lessons from *Drosophila*. *Chronobiol. Int.* 16: 377-414.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44:507-533.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Gekakis, N., L. Saez, A. M. Delahaye-Brown, M. P. Myers, A. Sehgal, M. W. Young and C. J. Weitz. 1995. Isolation of *timeless* by PER protein interaction: defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant PER<sup>L</sup>. *Science* 270: 811-815.
- Giebultowicz, J. M. 2000. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 769-793.
- Hagedorn, H. H. 1985. The role of ecdysteroids in reproduction. pp. 205-262 in G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon, New York.
- Hardin, P. E. 2000. From biological clock to biological rhythms. *Genome Biol.* 1(4): 1023.1-1023.5.
- Hoffmann, J. A. and C. Hetru. 1983. Ecdysone. pp. 65-88 in R. G. H. Downer and H. Laufer, 2<sup>nd</sup>ed. *Endocrinology of insects*. ARL., New York.
- Kozlova, T. and C. S. Thummel. 2000. Steroid Regulation of Postembryonic Development and Reproduction in *Drosophila*. *TEM Vik.* 11 7: 276-280.
- Lin, T. M. and H. J. Lee. 1996. The expression of locomotion circadian rhythm in female German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Chronobiol. Int.* 13:81-91.

- Lin, T. M. and H. J. Lee. 1998. The parallel control mechanisms underlying locomotor activity and sexual receptivity of female German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* 44: 1039-1051.
- Moore-Ede, M. C., F. M. Sulzman and C. A. Fuller. 1982. *The clocks that time us.* Harvard Univ. Press, Cambridge. 448pp.
- Nijhout, H. F. 1994. *Insect hormone.* Princeton Univ. Press, New Jersey. 267pp.
- Romer, F., H. Emmerich, and J. Nowock. 1974. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor in vitro*. *J. Insect Physiol.* 20: 1975-1987.
- Saunders, D. S. 1976. *Insect Clocks.* Pergamon Press, Oxford. 279 pp.
- Scully, A. L., and S. A. Kay. 2000. Time files for *Drosophila*. *Cell* 100: 297-300.
- Sommer, S. H. 1975. Experimental investigation of the circadian locomotor activity of *Blattella germanica* L. (Dictyoptera: Blattellidae). *Biol. Zentralbl.* 94: 455-467.
- Stokkan, K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki and M. Menaker. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.
- Takahashi, J. S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 531-553.
- Tsia, C. W. and H. J. Lee. 2001. Analysis of specific adaptation to a domicile habitat: a comparative study of two closely related cockroach species. *J. Med. Entomo.* 38: 245-252.
- Tsia, W. H., A. S. Chang, and Y. S. Chow. 1999. Mitogenic effects of 20-hydroxyecdysone on neurogenesis in adult mushroom bodies of the cockroach, *Diploptera punctata*. *J. Neurobiol.* 39: 264-274.
- Warren, J. T., J. S. Bachmann, J.-D. Dai, L. I. Gilbert. 1996. Differential incorporation of cholesterol and cholesterol derivatives into ecdysteroids by the larval ring glands and adult ovaries of *Drosophila melanogaster*: a putative explanation for the *l(3)ecd<sup>1</sup>* mutation. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 26:931-943.
- 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.
- Wen, Z., and J. G. Scott. 2001. Cloning of two novel P450 cDNAs from German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). *CYP6K1* and *CYP6J1*. *Insect Molecular Biology* 10:131-137.