



光周期和温度对生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫节律表达的影响*

刘孝明^{1**} 张松斗¹ 马木提·赛丽蔓² 邹 驰¹
李 贞¹ 张青文¹ 刘小侠^{1***}

(1. 中国农业大学昆虫系, 北京 100193; 2. 新疆博尔塔拉蒙古自治州农业技术推广中心, 博乐 833400)

摘 要 【目的】生物钟普遍存在于生物体的生长发育、行为及生理等各个方面。本研究旨在探究光周期和温度对生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫昼夜节律表达的影响。【方法】通过转录组测序获得了生物钟基因 *cwo* 的 cDNA 开放阅读框全长, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析了生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫中的时空表达, 以及其在不同光周期和不同温度条件下的昼夜表达节律。【结果】序列分析结果显示, 棉铃虫生物钟基因 *cwo* 的 cDNA 序列开放阅读框为 1 335 bp, 编码 444 个氨基酸残基, 预测蛋白的分子质量为 49.95 ku。时空表达分析表明, *cwo* 基因在棉铃虫幼虫组织中以脑和腹神经索表达量较高, 在卵孵化期、蜕皮期、蛹变态期及羽化前 1 d 高峰期表达。头部昼夜节律表达分析表明, 正常光周期条件下生物钟基因 *cwo* 呈昼夜节律表达, 在暗期高表达; 短时间持续暗期/光期处理使 *cwo* 表达的时间相位提前, 长时间持续暗期/光期处理使 *cwo* 表达的节律性显著降低; 38 处理使 *cwo* 表达短期内显著上调, 并改变了其节律性, 18 处理使 *cwo* 表达在暗期显著下调, 但是节律性不变。【结论】生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫头部的昼夜节律表达受到光周期和温度的影响。

关键词 棉铃虫幼虫, 生物钟基因, 光周期, 温度, 昼夜节律, 转录表达

The effect of photoperiod and temperature on the diurnal expression of the circadian clock gene *cwo* in larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)

LIU Xiao-Ming^{1**} ZHANG Song-Dou¹ MAMUTI·Sailiman² ZOU Chi¹ LI Zhen¹
ZHANG Qing-Wen¹ LIU Xiao-Xia^{1***}

(1. Department of insect in China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Agricultural Technology Extension Center of Xinjiang Bortala Mongolia Autonomous Prefecture, Bole 833400, China)

Abstract 【Objectives】Circadian clock is easily traced in the growth, behavior, physiology and other aspects of organisms. To explore the effect of photoperiod and temperature on the diurnal expression of the circadian clock gene *cwo* in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, larvae. 【Methods】The full-length ORF (open reading frame) of *cwo* cDNA was obtained through transcriptome sequencing. The spatial and temporal expression of *cwo* and its circadian rhythm of expression under different photoperiod and temperature conditions were analyzed with real-time PCR. 【Results】Sequence analysis showed that the ORF of the cotton bollworm *cwo* cDNA sequence was 1 335 bp, encoding 444 amino acid residues, and had a predicted protein molecular mass of 49.95 ku. Spatial and temporal expression analysis showed that the *cwo* gene was more

*资助项目 Supported projects : 国家科技支撑计划 2012BAD19B05

**第一作者 First author , E-mail : liuxiaoming0318@126.com

***通讯作者 Corresponding author , E-mail : liuxiaoxia611@cau.edu.cn

收稿日期 Received : 2016-05-13 , 接受日期 Accepted : 2016-08-17

highly expressed in the brain and ventral nerve cord than in other tissues. Transcription of this gene peaked during the hatching stage, the molting period, larval-pupal metamorphosis and 1 d before eclosion. Analysis of the expression of this gene in the head of cotton bollworm larvae indicated that under normal photoperiod conditions the expression of *cwo* had an obvious circadian rhythm and peaked during the scotophase. Under a short scotophase, or photophase, the timing of *cwo* expression was advanced, whereas long scotophase or photophase significantly decreased the circadian oscillation of *cwo* expression. *cwo* expression was significantly up-regulated in the short term at 38 °C, and its rhythm was disturbed, whereas at 18 °C expression was significantly down-regulated during the scotophase and its rhythm was unchanged. [Conclusion] The circadian expression of the circadian clock gene *cwo* in larvae of the cotton bollworm is influenced by photoperiod and temperature.

Key words *Helicoverpa armigera* larvae, circadian clock gene, photoperiod, temperature, circadian rhythm, transcript expression

地球表面光照和温度随着地球自转和公转不断进行着周期性变化,产生了昼夜和季节的交替,生物体为了适应这种外界环境,经过长期进化在生理、形态、行为等生命活动中表现出了不同的生物节律。生物节律由生物钟控制,生物钟通常指生物体内激发生物节律并使之维持稳定的内部定时机制,生物钟通过生物钟基因的表达来调控生物节律(任爽等,2012),这些生物钟基因的表达受到外界环境信号和内源因子共同调控(Dolezel *et al.* 2008;宋艳等,2009)。

果蝇是研究生物钟调控分子机制的最重要的模式生物,目前已从中鉴定了许多生物钟相关基因(Tataroglu and Emery, 2015),其中 *cwo* 基因是最新发现的核心钟基因,因为其有一个 ORANGE 结构域,所以被称为 Clockwork orange (*cwo*),主要在脑部昼夜节律神经元表达,其转录被 CLOCK (CLK)/CYCLE (CYC) 复合体激活,然后 CWO 能促进 PERIOD (PER)/TIMELESS (TIM) 复合体抑制 CLK/CYC 调控的转录,*cwo* 与其他生物钟基因 *vri* (*vri*), *par* domain protein 1 (*Pdp1*), *period* (*per*) 和 *timeless* (*tim*) 一起都是 CLK 的靶标基因,进而抑制这些基因的转录,形成自动调节反馈环(Kadener *et al.*, 2007;Lim *et al.*, 2007;Matsumoto *et al.*, 2007)。Fathallah-Shaykh 等(2009)用数学模型建立了一个 *cwo*、*per*、*tim*、*vri*、*Pdp1* 组成的新的核心钟反馈回路模型。Chen 等(2014)发现果蝇中 CLK/CYC 可以刺激促前胸腺激素(PTTH)的产生,进而促进蜕皮激素的释放,蜕皮激素与受体结合后上调 miRNA let-7, 而 let-7 能够抑制 *cwo* 翻译生成 CWO。生物钟的调控网络十分复杂而

且精细,*cwo* 基因从中起着非常重要的作用。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是全球重要的农业害虫,之前是我国棉田重要的害虫,引入转基因 Bt 抗虫棉后,对棉花的危害大幅度减少(Wu, 2008),但是对其他农作物仍有很大危害,如玉米(郭松景等,2004)。棉铃虫幼虫活动与成虫一样也是昼伏夜出(王耀东,2000;苏静等,2008),其活动规律可能由生物钟来调控的,相关机制还不清楚。本文通过转录组测序结果及基因克隆获得了棉铃虫生物钟基因 *cwo* 的开放阅读框全长,利用荧光定量 PCR 技术分析了其在棉铃虫不同发育时期和幼虫不同组织中的表达,以及不同光周期和不同温度条件下头部组织的昼夜节律表达。以期探究生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫头部的昼夜节律表达,为棉铃虫生物钟调控机制的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和试验试剂

供试昆虫棉铃虫为实验室饲养种群,幼虫采用人工饲料饲养,成虫用 10% 的蜂蜜水补充营养,正常饲养温度为 (27±1) °C,相对湿度为 60%~80%,光周期为 L:D=14:10。

试验试剂:总 RNA 抽提试剂(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、荧光定量试剂盒(SYBR Primer Script RT-PCR Kit)、DNA Marker 以及 T 载体(pMD18-T)均购自 TaKaRa 公司。感受态细胞(*Trans1-T1*)购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 引物设计

根据转录组得到的棉铃虫 *cwo* 基因序列,利

用 Primer 5.0 软件设计引物,引物合成由上海生物工程技术有限公司完成。引物及具体用途见表 1。

表 1 引物序列列表
Table 1 List of the primer sequences

引物用途 Primer use	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
测序引物 Primers for sequencing	Har-cwoCEXU F1	GTGGCCGCGAAGCTCTTAGAGTGAC
	Har-cwoCEXU R1	CTATACAGCCCGCCACTGGTCTCG
	Har-cwoCEXU F2	CGAGACCAGTGGCGGGCTGTATAG
	Har-cwoCEXU R2	CCATAAAATATTTAACATTTATTTTC
荧光定量 PCR 引物 Primers for qPCR	Har-cwoRT F1	CAGTACAGGAGGATGGTTTC
	Har-cwoRT R1	GTCTGATTTCTGAGGGGAT
	Har-rps15RT F1	CTGAGGTCGATGAAACTCTC
	Har-rps15RT R1	CTCCATGAGTTGCTCATTG

1.3 序列分析

对棉铃虫 *cwo* 基因序列进行分析,利用 DNA club 软件进行 ORF 预测及蛋白质翻译;蛋白理化性质预测采用蛋白组学在线 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析,蛋白质的结构域采用 SMART 在线软件分析。运用 NCBI BLAST 在线软件在 GenBank 中对棉铃虫该基因氨基酸序列进行同源性搜索,利用生物软件 DNAMAN 6.0 对 *cwo* 基因氨基酸序列结构域进行多重比较分析。

1.4 时空表达分析

自棉铃虫卵期第 1 天开始,每天上午收集样品,直至成虫第 1 天结束,样品分别为:卵期第 1、2、3 天,1、2、3、4 龄幼虫的第 1、2 天及各龄的蜕皮期,5 龄幼虫的第 1、2、3、4、5 天,蛹期新化蛹及第 1、2、3、4、5、6、7、8、10 天,成虫期第 1 天,其中卵期的每个样品分别为 100 粒左右,1 龄期样品分别为 30 头,2 龄期样品分别为 20 头,3 龄期样品分别为 10 头,4 龄期以上(含 4 龄期)的分别为 5 头,所取样品先用液氮速冻,然后保存至 -80℃ 冰箱备用,用于比较 *cwo* 基因在棉铃虫不同发育时期的相对表达量。在显微镜下解剖棉铃虫 5 龄第 2 天幼虫 25 头,收集脑(Brain),腹神经索(Ventral nerve

cord), 精巢(Testis), 气管(Trachea), 马氏管(Malpighian tubule), 表皮(Cuticula), 中肠(Midgut), 唾液腺(Salivary gland), 脂肪体(Fat body), 血细胞(Hemocyte), 用 4℃ 预冷的 1×PBS 缓冲液冲洗,再用干净滤纸吸干,放入 Trizol 中,用研磨棒充分研磨后,保存至 -80℃ 冰箱备用,用于检测 *cwo* 基因在棉铃虫幼虫不同组织中的相对表达量。所有样品均有 3 次重复。

1.5 昼夜节律表达

以不同光周期和温度处理棉铃虫幼虫,光周期分为正常光周期(L:D=14:10)、持续黑暗和持续光照,温度分为 38、26、18℃,具体见图 5、图 6,自 5 龄第 1 天开灯时间(ZT0)开始 48 h 连续取样,每 3 h 取样一次,每次取 5 头棉铃虫幼虫,剪取头部组织放入 Trizol 中,用研磨棒充分研磨后,保存至 -80℃ 冰箱备用,用于检测光周期和温度对 *cwo* 基因在棉铃虫幼虫头部组织的节律表达。所有样品均有 3 次重复。

1.6 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采用 Trizol 法分别提取各样品的总 RNA,用紫外分光光度计检测其纯度和浓度,检测质量合格后,根据反转录试剂盒说明,取 1 μg 总 RNA 样品合成 cDNA。

1.7 测序验证序列及实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative PCR)

以棉铃虫 5 龄幼虫头部样品的 cDNA 为模板, 用测序引物进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 预变性 3 min, 95 30 s, 55 30 s, 72 90 s 共 35 个循环, 72 延伸 10 min, 然后将目的片段连接至 T 载体并进行测序, 将测序结果与转录组序列进行比对, 为了验证转录组测序的正确性。qPCR 采用相对定量的方法计算, 以棉铃虫 *RPS15* (Ribosomal protein S15e) 为内参基因, 按照试剂盒 SYBR Primer Script RT-PCR Kit 方法, 在 CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统上进行操作, 反应条件如下: 95 预变性 3 min, 95 10 s, 60 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线参数为默认设置。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算。

1.8 统计分析

荧光定量 PCR 的试验均重复 3 次, 数值表示平均值 \pm 标准误。运用 SPSS 19.0 软件的 Tukey's HSD 多重比较方法对 *cwo* 基因在棉铃虫幼虫不同组织中的表达差异性进行统计分析 ($P < 0.05$)。使用 *t*-测验对 *cwo* 基因在不同温度处理样品中的表达差异性进行分析 (*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 *cwo* 基因 cDNA 序列分析及系统进化树构建

通过转录组测序获得 *cwo* 基因 cDNA 序列, 并利用基因克隆测序验证序列正确。序列分析表明 棉铃虫 *cwo* 基因 cDNA 开放阅读框为 1 335 bp, 编码 444 个氨基酸残基, 预测的蛋白分子量为 49.95 ku, 等电点为 7.14。上传至 GenBank 数据库的登陆号为 KX236197。利用 SMART 在线软件分析棉铃虫 *cwo* 基因氨基酸序列含有 HLH 结构域 (helix loop helix, HLH domain) 和 ORANGE 结构域 (图 1), 而且这两个结构域在昆虫 *cwo* 基因中高度保守 (图 2)。

2.2 棉铃虫 *cwo* 基因的时空表达模式

棉铃虫幼虫不同组织表达结果显示, 生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫不同组织中均有表达, 在脑和腹神经索中表达量显著高于其他组织 (图 3)。不同发育时期表达结果显示, 其在棉铃虫幼虫蜕皮期 (1 龄蜕皮期除外)、蛹变态期及羽化前期都有高峰表达 (图 4)。

2.3 不同光周期处理对 *cwo* 基因昼夜节律表达的影响

正常光周期 (L : D=14 : 10) 条件下, 生物钟基因 *cwo* 呈昼夜节律性表达, 进入光期后开始低谷表达, 在光期 12 h (ZT12) 表达开始上调, 进入暗期后高峰表达, 暗期 7 h (ZT21) 后开始下调, 这样随着光周期呈节律性变化 (图 5 : A)。当由正常光周期转至持续暗期 24 h 后, 相位提前了 14 h 左右, 而且振荡幅度明显减弱 (图 5 : B); 当由正常光周期转至持续光期 34 h 后, 相位提前了 6 h 左右, 振荡幅度也明显减弱 (图 5 : D)。在持续暗期处理 96 h 后, 昼夜节律表达出现紊乱, 只有微弱的周期性, 表达出现小高峰的时间在 ZT15 左右, 与正常光周期有一定的一致性 (图 5 : C); 在持续光期处理 106 h 后, 昼夜节律表达同样出现了紊乱, 然后逐渐恢复, 但仍只有微弱的周期性, 高峰期也在 ZT15 前后 (图 5 : E)。

2.4 不同温度处理对 *cwo* 基因昼夜节律表达的影响

38 热脉冲处理约 10 h 后, 短期内 *cwo* 基因表达与对照 (26) 相比显著上调, 并失去节律性, 24 h 后基本恢复正常节律, 而且表达量略高于对照 (图 6)。低温 (18) 条件下, 昼夜节律正常, 只是在暗期表达量显著低于对照 (图 6)。

3 讨论

为了保证生理活动和行为在最适合的时间表现出来, 几乎所有的生命形式都依赖于生物钟系统的调控 (Eri Morioka, 2012)。昆虫也不例外, 如全变态昆虫的蜕皮、化蛹、羽化、性信息

CAGAGTGGCCGGAAGCTCTTAGAGTGACGACGTTTGCAACACGCTCCATACATGCAGTAAATACGATAACAACAATTTATAT	84
TTACTGTGATCGTTTATCGAAAATGGATTGCGGCGAACTAAGTGTACTGTGATTAGTGTGAACGAATATACCCGTGAC	168
GGGAATAAAATGTAACAGACAACCTGTATTTGATAAATCATCTGCAATTTGTGAAACACAGTGGTTTGTGTTTTTGTGTGG	252
TCCCAAATGAATATGGAACAAGGCATTACTGGGAGGAGAACGCACTCCGTCAAGTATGACAACATAATCCAACGACGGC	336
<u>M E T R H Y W E E N G H S V K Y D N Y N S N D G</u>	24
TTCAGCCGCGTGGCGGGGAGCAGCTCAACTTCGCAGCGCCCTCGGAGGACGAAGCGGAGTACCCGCCCGCGCTTATCTGAAG	420
F S R V A G E Q L N F A A P S E D E A E Y P P G A Y L K	52
AAGGGGAAGCAAGACCCGATGTCGCACCGAATAATAGAGAAGCGTGTGCGGACCGCATGAACAACCTGCCTGGCCGATCTCTCG	504
<u>K Y K Q D P M S H R I I E K R R R D R M N N C L A D L S</u>	80
CGGCTCATACCCCTGAGTACCTCAAGAAAAGCCGCGGAGGGTGCAAAAGACCGAAAATCATCGAGATGGCAATACGCCACCTC	588
<u>R L I P P E Y L K K G R G R V E K T E I I E M A I R H L</u>	108
AAGTACCTTCAGGAACGCGGAACGCTGCCGAGCGGTTGCCGGAGAGGAACACTTCAGAGCCGGTACCAAGACGCGAGTCCGC	672
<u>K Y L Q E R A N A A E R G A G E E H F R A G Y Q D A V A</u>	136
GAAGTGATGCGATTCTCGTGAAGTTCATGGCTACGGGCCCGAGATGGTCTGTGTGTGCAATTGGCAGCTCATATCGAGAGG	756
<u>E V M R F L V E V H G K V Y S H K R R R A A K P A P S T</u>	164
CATTGCGAAGCTATTGCTAAAGGTGAACCCGTTCTCGGAAAAAGCACGATCGCATCCCGTTTCATCTCAGAAAACGCGAGT	840
<u>H C E A I A K G E P V P R E K A R S H P G S S S E T A S</u>	192
TCGTGGGCGAGTTCGCATGGCTACGCCATGAAACCTGGCGTATTGCTCAGGCTCCACCGCCGCGCCACCACCTTCGCCCCA	924
<u>S S G S S H G Y A M K P G V I A Q A P P P A P P P F A P</u>	220
GATACGTATGAGGACGACCGCAAGAACACCCCTATTCTTGAATGCGATAGAGTAGCTCAAACACCTATAGCAGGGGAGGGC	1008
<u>D T Y E E R P Q E H P Y S M E C D R V A Q T P I A G E G</u>	248
GAAGGACTGCCTGAATCGGAGCCCCGCCCCTGGACGGGCGACGTAAGAGAGAGCCACTCTACGCACCGTGAGGAAGCCCGAA	1092
<u>E G L P E S E P L P L D G R R K R E P T L R T V R K P E</u>	276
CATACAGAAGATTACCTTCATTATACAAGTTCAGAACTCCATAGAAAGCGATTTCCTAGATCACAAGATACTGAGCGCGCC	1176
<u>H T E D Y L H S Y K F K N S I E R R F S R S Q D T E A A</u>	304
GACATGCTGGCCCGCACGGCGCACGGCAAGGTGACTCGCACAAGCGCCGCGCCGCGCCCAAGCCCGCCCTCCACA	1260
<u>D M L A R T A H A H G K V Y S H K R R R A A K P A P S T</u>	332
TCCACCTCAACTCCGATCCACTGAAGACGCAGACACCTCGCCACAGGACAGTCCAGCGAATCGCCTCATCATCAT	1344
<u>S T S N S G S T E D A R D T S P Q D T S S E S P H H H H</u>	360
TACGACAAGCCGCTCCACCCGCCAATATGTTCTGTTTTGCGGTTGAATGCTCTTGAAAATATTACGTGCCGCTAAGTGT	1428
<u>Y D K P P P A Q Y V P V F A L N A L G K Y Y V P L S V</u>	388
GACTACGCTGCTTCAGAGCATCTCGGCCCTACGATGCTGGACGCAAGAGCAGTGCATCTAGCCGCGCCCTACATCCC	1512
<u>D Y A C L Q R H L G P Y D V L D A R A V H L A A P L H P</u>	416
GTCACCATCCACGTTAACTTTCAACCTGTCTCAACTATCACGTCAAGAGGGAACCAACGACCGAGACCAGTGGCGGGCTGTA	1596
<u>V T I H V N F Q P C L N Y H V K R E P N D R D Q W R A V</u>	444
<u>TAGACAAAAGACGATCCAGTGCCAACAGTCTATGATACGACCGCATCTTGCTAAAATATGGCGCAACATTTAAAAA</u>	1680
*	
AGGCAGCTAATATTTCAAAATATATTTTGGAGGCAAATTAATACCATATTAGAAAATGAAAGAAAGATGCCATAAAAAATAA	1764
AAAGCCTTCGAGCAAAGTATTTTCATAAAAAGAAAATATATTTTGTAAATCAAAACAGCTGGATATTTTGTAGATTACATAA	1848
TTTGTATACTTACCTATAATCAAAGACTTACCTAAAAAAATTTGAGACTAAATGTCCGAAGCAGGAAAAGCATAAAATAGGT	1932
GTCTACTTACTAAGAAAACAAAGCGGCGAAGTTTGAAGTTATCGAAGGTGTGAAAAGTTTATCATATCAATTAGGAACAT	2016
ATTAGTTACAGTGATAAAATATTTTGAACCTAAAACCTGGCATAATCTTCAGCTGTTCTAGTCAACTGTAAGTCAATCCAAGT	2100
GCAATGTGGAACGTTGCATATGTAATACTTACAAGAATACCATATAGAAGGCAGTGTGTTTAAAAATAAATAATTTATCT	2184
GTGGGCATAAAAAGAAAGGACATTAATACTTAAGTTTCTAGCTATGAACACGCTATGCCATAGTTTCGGCGCGCGCGTAC	2268
TGTGAACGTTTATTTGAAAGACAACATGGTGTGGACAATGTTTTCAGTGTCTAGTTACGGCTGTGATATAAGAGTAGTCAAT	2352
ATGTAGCTGACCGTGGGTGCTTTATTAACAGTACAGGAGGATGGTCCACATTTGATACTGTGATATAAGAGTAGTCAAT	2436
AATATAAAATTAGAATAAAAAGTCAATCAGTGTGCAAGTTGCAAGAAATCATCTGGCTTATCTTTGTAATAATTTTATA	2520
ATATTGTGCTGATATAGTATAAAGTCAAGTCAAGGCAAGCTCAGACTAAGTATGATAAAATCCCTCAGAAAATCAGAGCTTACTAAT	2604
AATTTGAAACACTATAAGCTGATTCAAGGCCAAAACAAAATTTTAAAGACATTACCTTTCCACCAAAAATCCACAGCCTTA	2688
ATATGCAGTTTAGCATACAGGAAGTTGCTGCTGAATATGTTTCAAAATGTTTTTATTATTTTGTAGTGTGTTGGAGGTAGCG	2772
GTGGAAGAATTTAAGTGTGGTCTCTCTTGGACAAGATAAAGACTGAGGTTTTTATTTAGTGGTAGAGTTATGATTGTTT	2856
TAGCATTGGATTTCACCCCATATATATACAGCAGGTTAGAGTCAATGTGCAAAAAGTGTCAAAATTTACGTAACGTTAGT	2940
TCTAGATACCATTAATAAGTCTGTTACTATAAATACTTTATATTTGTAATAAAGAAATAATGTTAAATATTTTATGAAA	3024

图 1 棉铃虫生物钟基因 *cwo* 的基因序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *cwo* from *Helicoverpa armigera*

核苷酸序列双下划线处分别为起始密码子和终止密码子；氨基酸序列下划线处为预测的 HLH 结构域，虚线处为预测的 ORANGE 结构域。

The double underlined nucleotide sequences are initiation codon and termination codon, respectively. The underlined amino acid sequence indicates the predicted HLH (helix loop helix domain) domain sequence, the dashed line indicates the predicted ORANGE domain sequence.

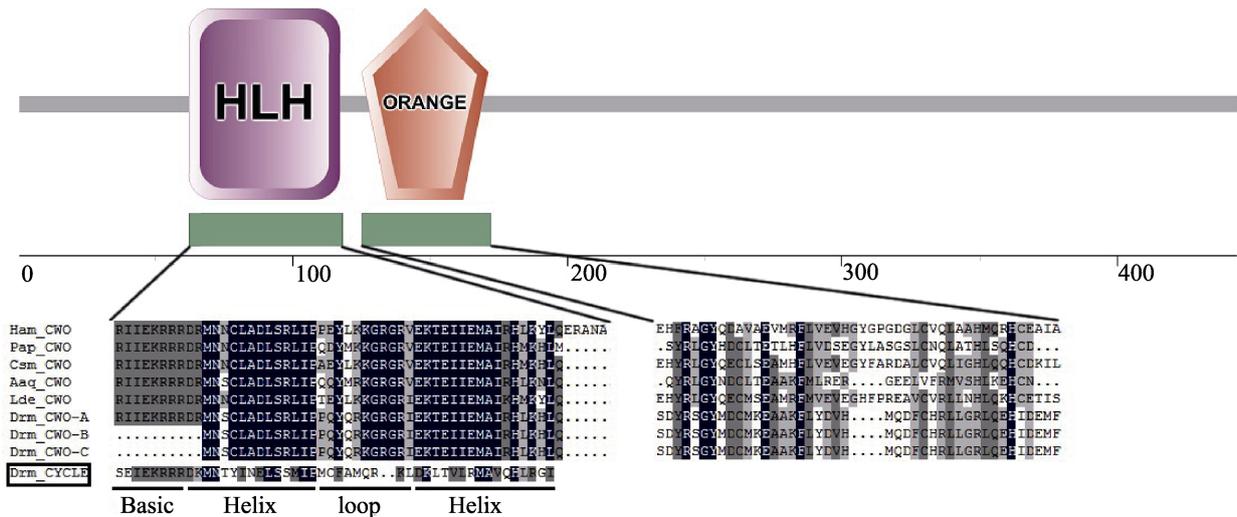


图 2 生物钟基因 *cwo* 氨基酸序列结构域的多重联配

Fig. 2 Multiple sequence alignments of *Helicoverpa armigera* CWO domain with other species

黑色阴影表示 100%一致, 灰色为 75%~90%, 浅灰为 50%~75%, 白色为 50%以下, HLH 表示预测的 HLH (helix loop helix) 结构域, ORANGE 表示预测的 ORANGE 结构域。The black shading indicates 100% identity, gray for 75%-90%, light gray for 50% -75%, white for less than 50%, HLH indicates the predicted HLH (helix loop helix) domain and ORANGE indicates the predicted orange domain sequence. Ham :棉铃虫 *H. armigera* KX236197 ;Pap :始红蜡 *Pyrrhocoris apterus* AGI17571.1 ;Csm :榕小蜂 *Ceratosolen solmsi marchali* AHW98218.1 ;Aaq :咸水按蚊 *Anopheles aquasalis* JAA99678.1 ;Lde :马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* AKG92774.1 ;Drm :黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* CWO-A : AAF54527.2 , CWO-B : AFH06342.1 , CWO-C : AFH06343.1 ;Drm_CYCLE :黑腹果蝇 *D. melanogaster* NP_524168.2.

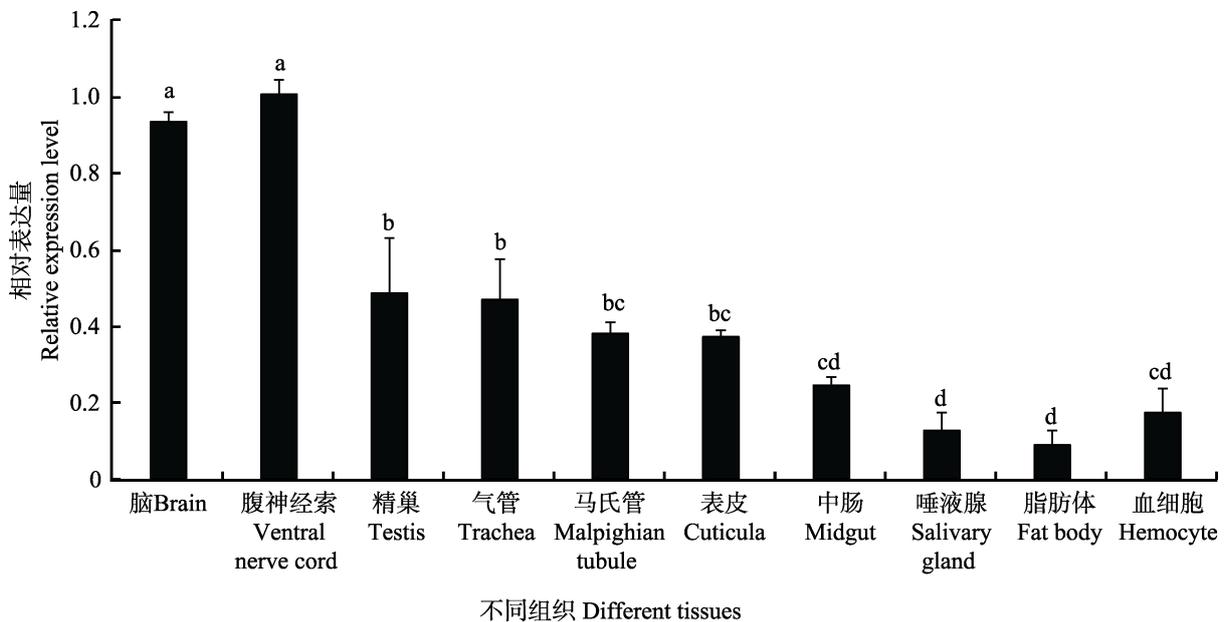


图 3 生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫组织中的相对表达量

Fig. 3 The relative expression level of *cwo* in different tissues of *Helicoverpa armigera* larvae

图中数据为平均值±标准误, 采用 Tukey's HSD 多重比较检验法比较, 柱形图上标有不同字母表示 $P < 0.05$ 水平显著差异。

The data in the figure are mean ±SE, histograms with different letters indicate significant difference at 0.05 level by Tukey's HSD multiple-range test.

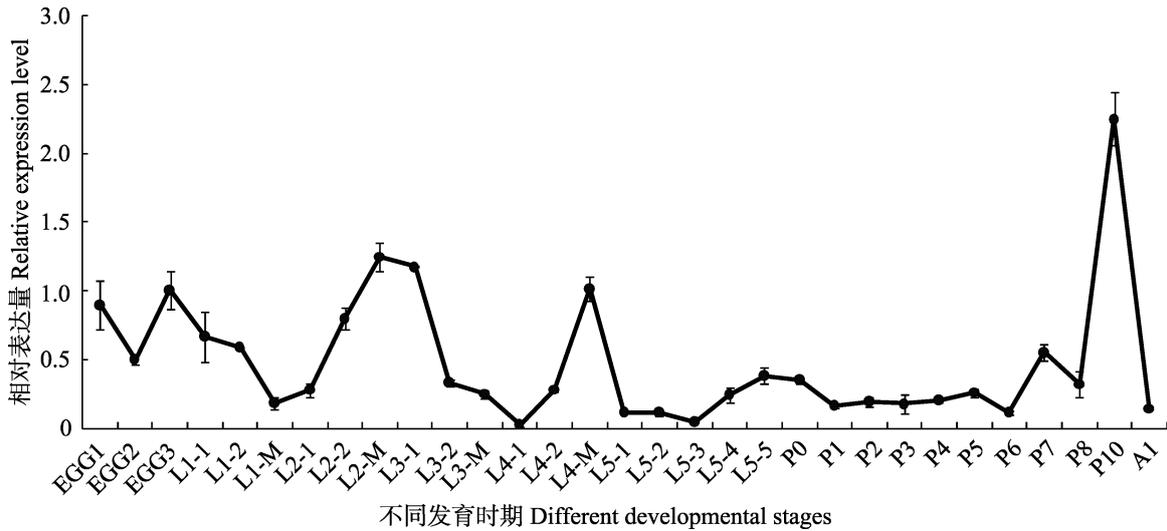


图 4 生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫不同发育时期的相对表达量

Fig. 4 The relative expression level of *cwo* in different developmental stages of *Helicoverpa armigera*

EGG1、EGG2、EGG3 : 卵期第 1、2、3 天 ; L1-1、L1-2、L2-1、L2-2、L3-1、L3-2、L4-1、L4-2 :

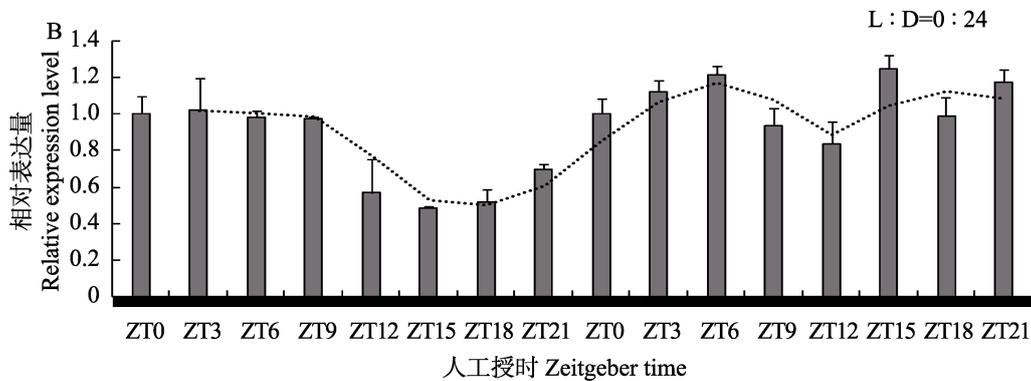
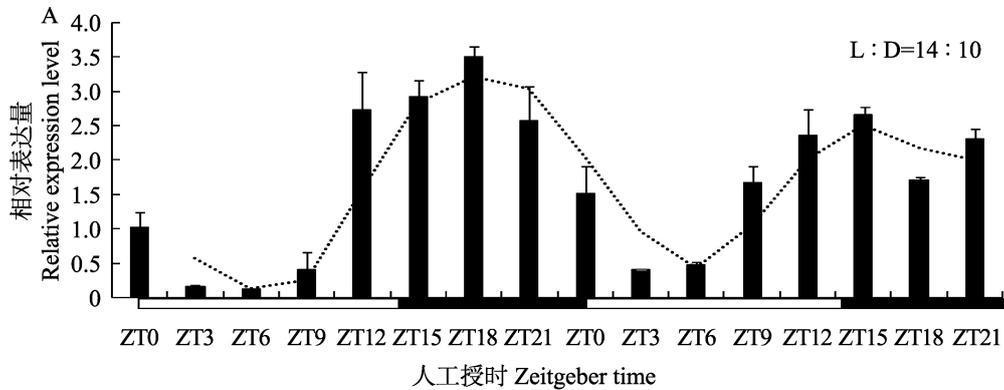
1、2、3、4 龄幼虫第 1、2 天 ; L1-M、L2-M、L3-M、L4-M : 1、2、3、4 龄幼虫蜕皮期 ;

L5-1、L5-2、L5-3、L5-4、L5-5 : 5 龄幼虫第 1、2、3、4、5 天 ; P0 : 新化的蛹 ; P1、P2、P3、P4、P5、

P6、P7、P8、P10 : 蛹期第 1、2、3、4、5、6、7、8、10 天 ; A1 : 成虫第 1 天。图中数据为平均值±标准误。

EGG1, EGG2, EGG3: The first, second, third day of egg stage; L1-1, L1-2, L2-1, L2-2, L3-1, L3-2, L4-1, L4-2: The first, second day of the first, second, third, 4th instar larvae; L1-M, L2-M, L3-M, L4-M: The molting stage of the first, second, third, 4th instar larvae; L5-1, L5-2, L5-3, L5-4, L5-5: The first, second, third, 4th, 5th day of the 5th instar larvae; P0: New pupa; P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P10: The first, second, third, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th, 10th day of the pupal stage;

A1: The first day of adult stage. The data in the figure are mean ±SE.



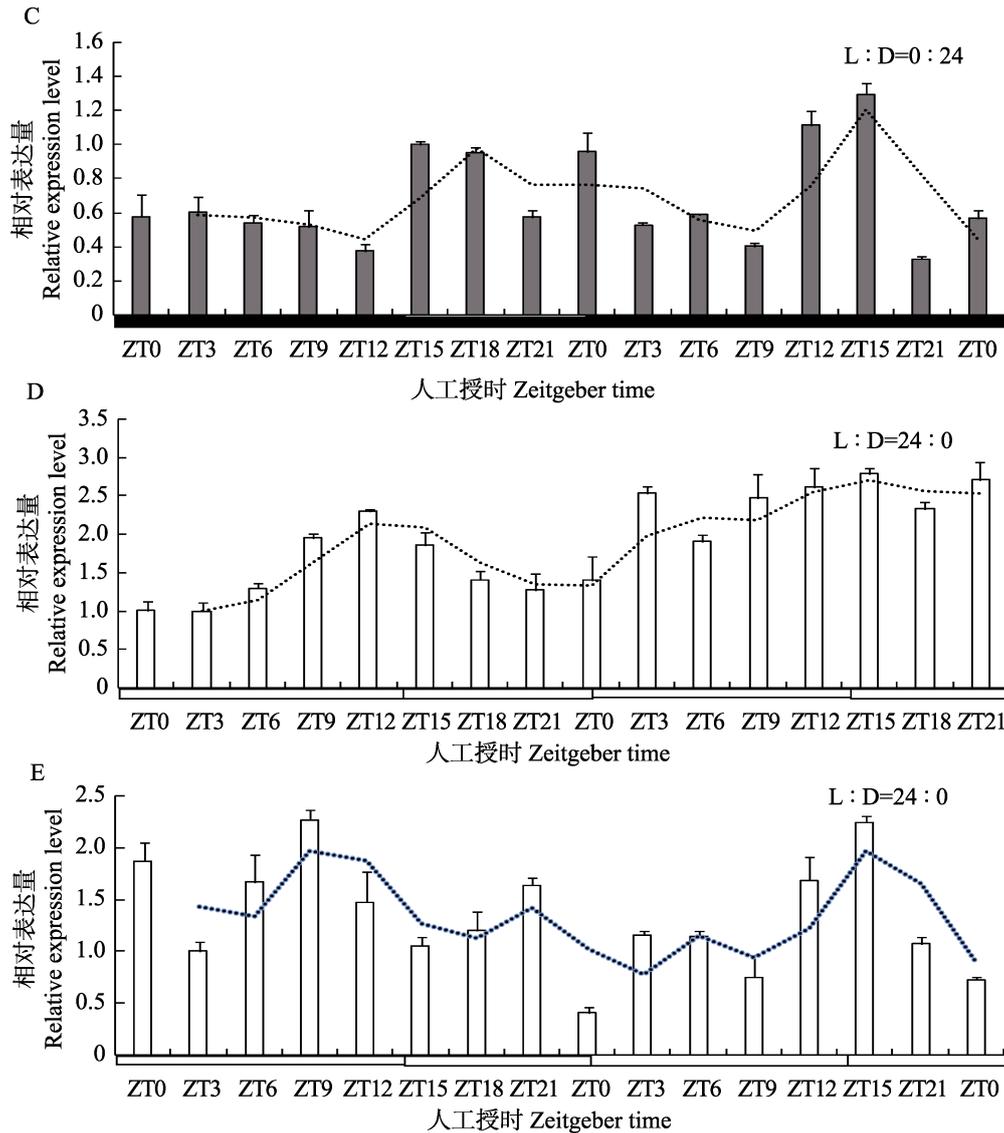


图5 不同光周期条件下生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫 5 龄幼虫头部组织的节律性表达

Fig.5 The rhythmic expression of *cwo* in the heads of 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* under different photoperiod

图中 ZT0 表示开灯时间, 横坐标白框表示光照阶段, 黑色表示黑暗阶段, 虚线表示表达的周期性趋势。试验取样所用棉铃虫均为 5 龄第 1 天至第 2 天幼虫, 每 3 h 收集一次头部组织, 持续 48 h。A: 正常光周期 (L:D=14:10) 条件下 *cwo* 的节律性表达; B, C: 持续黑暗 (L:D=0:24) 条件下 *cwo* 的节律性表达, 当光周期由正常 (L:D=14:10) 转变为持续黑暗 (L:D=0:24) 后 24 h 左右时开始取样 (B), 光周期由正常 (L:D=14:10) 转变为持续黑暗 (L:D=0:24) 后 96 h 左右时开始取样 (C); D, E: 持续光照 (L:D=24:0) 条件下 *cwo* 的节律性表达, 当光周期由正常 (L:D=14:10) 转变为持续光照 (L:D=24:0) 后 34 h 左右时开始取样 (D), 当光周期由正常 (L:D=14:10) 转变为持续光照 (L:D=24:0) 后 106 h 左右时开始取样 (E)。图中数据为平均值±标准误。

ZT0 is designed as lights-on, the white box on the horizontal line indicates photophase and the black is scotophase, the dash curve represents periodicity trend of expression. Cotton bollworm larvae in the experiments are all from 5L-1 d to 5L-2 d, heads are collected at regular intervals of 3 h for 48 h. A: The rhythmic expression of *cwo* on normal photoperiod (L:D=14:10); B, C: The rhythmic expression of *cwo* on continuous scotophase (L:D=0:24), start with sampling 24 h after the normal photoperiod changed into continuous scotophase (B), start with sampling about 96 h after the normal photoperiod changed into continuous scotophase (C); D, E: The rhythmic expression of *cwo* on continuous photophase (L:D=24:0), start with sampling 34 h after the normal photoperiod changed into continuous photophase (D), start with sampling about 106 h after the normal photoperiod changed into continuous photophase (E).

The data in the figure are mean±SE.

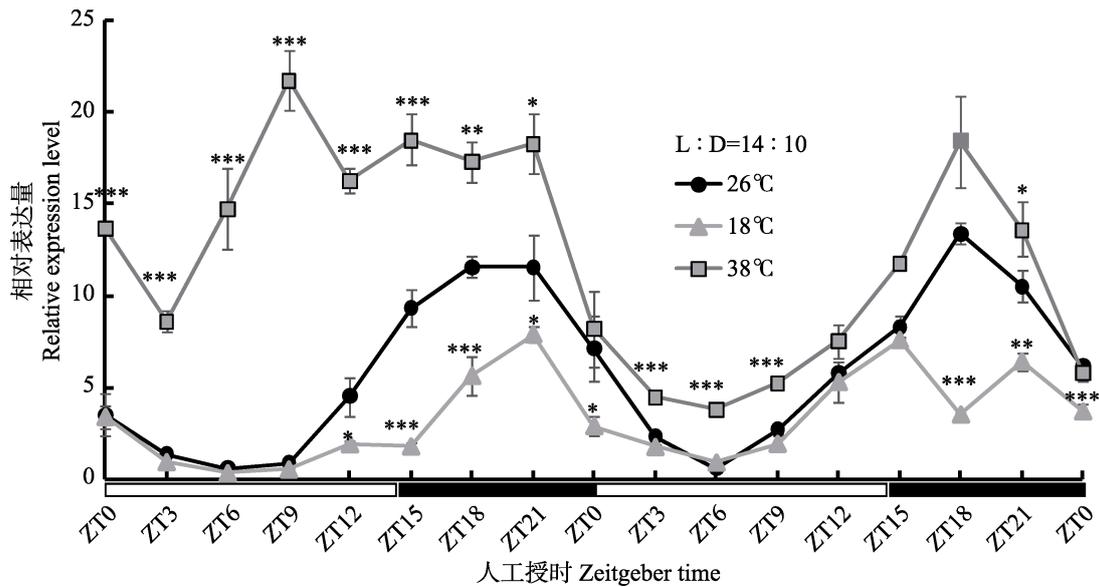


图 6 不同温度条件下生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫 5 龄幼虫头部组织的节律性表达

Fig. 6 The rhythmic expression of *cwo* in the heads of 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* under distinct temperature

图中 ZT0 表示开灯时间, 横坐标白框表示光照阶段, 黑色表示黑暗阶段。

试验取样所用棉铃虫均为 5 龄第 1 天至第 2 天幼虫, 均在温度 (38 , 18) 处理 10 h 后开始取样, 每 3 h 收集一次头部组织, 持续 48 h。图中数据为平均值±标准误, 图上的星号表示非正常温度 (黑色=38 , 灰色=18) 处理各时间点分别与 26 比较经 *t*-测验差异显著

(*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$)

In the figure, ZT0 is designed as lights-on, the white box on the horizontal line indicates photophase and the black is scotophase. Cotton bollworm larvae in the experiments are all from 5L-1 d to 5L-2 d, both start with sampling after 10 h temperature treatment (38 and 18), heads are collected at regular intervals of 3 h for 48 h. The data in the figure are mean±SE, the asterisks indicate significant difference between the abnormal temperature (black=38 , grey=18) and normal (26) at different time points determined by the Student's *t*-test, respectively (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

素的释放、交配、产卵、昼夜活动等行为的出现并非随机,而是受到外界环境和内源因子的共同调控,这其中必然有生物钟系统的参与。我们已经知道生物钟 *cwo* 基因是果蝇生物钟系统中的重要调控分子,但在其他昆虫中研究较少。本文以重要的农业害虫棉铃虫为研究对象,通过转录组测序获得了棉铃虫 *cwo* 基因序列(图 1),其氨基酸序列含有高度保守的 HLH 和 ORANGE 结构域,HLH 序列与果蝇 CYCLE 氨基酸的 HLH 结构域有一定的一致性(图 2),之前研究已经证明在果蝇中 CWO 能竞争性结合 CLK/CYC 靶基因的 E-box 序列从而抑制 CLK/CYC 转录调控 (Kadener *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007),*cwo* 氨基酸序列结构域

具有高度保守性,但 *cwo* 在棉铃虫生物钟系统中是否起着类似的作用还需要进行验证。

生物钟基因 *cwo* 在棉铃虫幼虫脑和腹神经索的表达量显著高于其他组织(图 3),可能 *cwo* 基因在中枢性生物钟系统中发挥着更大的作用。Zhao 等(2006)发现有生物钟调控相关蛋白在棉铃虫幼虫蜕皮期特异性表达,Dolezel 等(2008)研究发现保幼激素能调控始红蜡 *Pyrrhocoris apterus* 外周组织中生物钟基因 *per* 和 *Pdp1* 的表达,Chen 等(2014)发现蜕皮激素能通过上调 miRNA let-7 抑制 *cwo* 的翻译。我们发现 *cwo* 基因主要在棉铃虫卵孵化期、蜕皮期、预蛹期、羽化前期高水平表达(图 4),这些时期都涉及到棉铃虫的蜕皮,我们知道昆虫的蜕皮由蜕皮激素

和保幼激素起关键作用, 蜕皮激素导致蜕皮, 蜕皮特性由保幼激素调节, 在鳞翅目烟草天蛾 *Manduca sexta* 中研究比较深入, 蜕皮激素和保幼激素滴度均在烟草天蛾的蜕皮期和预蛹期显著升高 (Riddiford, 1991)。此外, 我们研究发现其他生物钟基因也是在棉铃虫类似的时期高表达, 而且激素处理后这些生物钟基因表达量发生显著变化。综上所述, 生物钟基因的表达可能受到保幼激素和蜕皮激素影响, 具体作用机制还有待阐明。

生物钟表现为 24 h 的行为和转录表达振荡, 这些振荡是由转录反馈环相互联系产生的。目前研究表明, 果蝇生物钟的调控由 3 个相互联系的反馈环 (陈文锋等, 2011), 其中包括 CWO 通过特异性结合 CLK/CYC 的靶基因 E-box 元件而抑制 CLK/CYC 转录调控, 从而抑制自身和 *vri*, *per*, *tim* 等转录 (Kadener *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007), 参与反馈环的生物钟基因均呈昼夜节律表达。我们研究发现正常光周期 (L:D=14:10) 条件下钟基因 *cwo* 在棉铃虫头部也呈昼夜周期性表达, 当转至短期持续暗期/光期条件下, *cwo* 表达相位向前推移, 周期性振荡减弱 (图 5:B, D), 长期持续黑暗/光照处理后, *cwo* 表达节律性减弱更加显著, 但是这微弱的节律性高峰期似与正常光周期时相一致 (图 5:C, E), 这表明 *cwo* 的节律表达受到光信号的影响, 而其本身也存在着内源性节律。果蝇中只研究了 *cwo* 的自动反馈调控环, 并没有研究光信号对 *cwo* 表达的影响, 光信号能通过光受体隐花色素蛋白 CRY (Cryptochrome) 诱导 TIM 蛋白的降解辅助 PER/TIM 的反馈调控环, 那么光信号是通过什么来影响 *cwo* 表达的还有待研究。

温度对昼夜节律生物钟的影响很早就开始被研究, 虽然其分子机制与光调控机制相比研究较少, 但是其对生物钟可能有更重要的影响 (Fan *et al.*, 2007), 有研究表明在上半夜给予野生果蝇一个 37 的热脉冲, 能够引起 PER 和 TIM 蛋白降解, 导致果蝇活动节律推迟数小时 (Sidote *et al.*, 1998)。最新研究发现温度调控昼夜节律

生物钟的过程中有 Ca^{2+} 参与, 在光调控生物钟机制中, CRY 接受到光信号后结构发生改变, 然后与 TIM 蛋白结合并使其降解, 而在温度调控机制中是由 Ca^{2+} 结合蛋白钙调素 (Calmodulin, CaM) 结合降解 TIM 蛋白, 然后进一步调控昼夜节律 (Tataroglu *et al.*, 2015)。我们研究了不同温度对 *cwo* 基因的节律表达的影响, 发现 38 热脉冲处理能够短暂地打乱 *cwo* 表达的节律性, 并使其表达显著上调, 18 处理虽然没有影响 *cwo* 表达的节律性, 但是使其在暗期表达量显著下调 (图 6)。不同恒温处理确实影响了 *cwo* 的表达, 然而产生这些结果的原因尚不清楚。生物钟调控网络比较复杂, 不同昆虫中的生物钟分子机制并不完全相同, 每个钟基因在不同昆虫中参与的生理和行为节律也有差异, 目前的研究主要集中在果蝇的核心钟分子机制, 昆虫生物钟分子机制的研究还有很长的路要走, 将来应更多关注在生物钟与昆虫的生理及行为的关联。

参考文献 (References)

- Chen W, Liu Z, Li T, Zhang R, Xue Y, Zhong Y, Bai W, Zhou D, Zhao Z, 2014. Regulation of *Drosophila* circadian rhythms by miRNA let-7 is mediated by a regulatory cycle. *Nat. Commun.*, 5(5): 5549–5549.
- Chen WF, He CX, An CJ, Zhao ZW, 2011. Advances in molecular regulation of insect circadian clock. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1586–1595. [陈文锋, 贺春霞, 安春菊, 赵章武, 2011. 昆虫生物钟分子调控研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1586–1595.]
- Dolezel D, Zdechovanova L, Sauman I, Hodkova M, 2008. Endocrine-dependent expression of circadian clock genes in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(6): 964–969.
- Eri Morioka AM, Masayuki Ikeda, 2012. Neuronal influence on peripheral circadian oscillators in pupal *Drosophila* prothoracic glands. *Nat. Commun.*, 3(2): 177–180.
- Fan JY, Muskus MJ, Price JL, 2007. Entrainment of the *Drosophila* circadian clock: more heat than light. *Sciences Stake Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(413): pe65.
- Fathallah-Shaykh HM, Bona JL, Kadener S, 2009. Mathematical model of the *Drosophila* circadian clock: loop regulation and transcriptional integration. *Biophysical Journal*, 97(9): 2399–2408.
- Guo SJ, Li SM, Zhuo XN, Ma LP, Zhang JG, 2004. The damage

- feature and distribution pattern of Cotton bollworm in cornfield. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, (11): 45–47. [郭松景, 李世民, 卓喜牛, 马林平, 张建国, 2004. 玉米田棉铃虫的发生危害特点及分布型研究. *河南农业科学*, (11): 45–47.]
- Kadener S, Dan S, McDonald M, Nawathean P, Rosbash M, 2007. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev.*, 21(13): 1675–1686.
- Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J, Allada R, 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Current Biology*, 17(12): 1082–1089.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Matsumoto A, Ukaitadenuma M, Yamada RG, Houli J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh T Q, Takahashi K, Ueda R, 2007. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.*, 21(13): 1687–1700.
- Ren S, Wei HM, Chen B, 2012. Research status and perspectives of insect clock genes. Academic Exchange and Seminar of Chongqing Insect Society in 2012. [任爽, 魏慧敏, 陈斌, 2012. 昆虫钟基因研究现状及展望. 重庆市昆虫学会 2012 年学术交流及研讨会.]
- Riddiford LM, 1991. Hormonal control of sequential gene expression in insect epidermis// Binnington K, Retnakaran A (eds.). *Physiology of the Insect Epidermis*. Melbourne: CSIRO Publications. 46–54.
- Sidote D, Majercak J, Parikh V, Edery I, 1998. Differential effects of light and heat on the *Drosophila* circadian clock proteins PER and TIM. *Molecular & Cellular Biology*, 18(4): 2004–2013.
- Song Y, Zhu XS, Xu L, Xu SQ, 2009. The molecular mechanism of insect circadian clock entrained by light and temperature. *Acta Sericologica Sinica*, 35(2): 451–456. [宋艳, 朱晓芬, 徐丽, 徐世清, 2009. 光照和温度影响昆虫昼夜节律生物钟的分子机制. *蚕业科学*, 35(2): 451–456.]
- Su J, Wei XT, Wei XS, 2008. Behavior of *Helicoverpa armigera* larvae related with pest control. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 45(2): 287–289. [苏静, 魏新田, 魏修山, 2008. 棉铃虫幼虫的活动规律及其防治时机探讨. *应用昆虫学报*, 45(2): 287–289.]
- Tataroglu O, Emery P, 2015. The molecular ticks of the *Drosophila* circadian clock. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 7: 51–57.
- Tataroglu O, Zhao XH, Busza A, Ling JL, O'Neill JS, Emery P, 2015. Calcium and SOL protease mediate temperature resetting of circadian clocks. *Cell*, 163(5): 1214–1224.
- Wang YD, 2000. Spraying time decided according to the nocturnal rhythm of the cotton bollworm larvae. *Xinjiang Agricultural Sciences*, (S1): 69–70. [王耀东, 2000. 根据棉铃虫幼虫夜间活动规律决定喷药时间. *新疆农业科学*, (S1): 69–70.]
- Wu K, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678.
- Zhao XF, He HJ, Dong DJ, Wang JX, 2006. Identification of differentially expressed proteins during larval molting of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Proteome Research*, 5(1): 164–169.