基于光周期线索的草地贪夜蛾羽化昼夜节律探究*

吕长宁[1**] 黄 旭[1] 王玮彤[1] 何煜堃[1] 胡 高[1]
潘卫东[2] 陈法军[1] 万贵钧[1***]

（1. 南京农业大学植物保护学院，南京 210095；
2. 中国科学院电工研究所生物电磁学北京市重点实验室，北京 100190）

摘 要 **【目的】** 明确草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 羽化昼夜节律对不同光周期线索的响应，探究建立以其羽化昼夜节律为表型的生物钟机制的研究方法。**【方法】** 持续黑暗（Dark-Dark，DD）、持续光照（Light-Light，LL）、DD 延长 1 日（DD+1）及 LL 延长 1 日（LL+1）光周期设置之前，试虫均饲养于 L14∶D10（LD）光周期下，且 LD 处理组中 LD 光周期设置贯穿整个世代周期。将蛹龄为 9 d（针对 DD+1 与 LL+1）或 10 d（针对 LD、DD 和 LL）的蛹转移至自主建立的“基于时间生物学的小型动物生物节律表型全时监测装置”中，结合不同光周期线索设置监测蛹历期、成虫羽化历时及羽化昼夜节律。**【结果】** LD、DD、DD+1 与 LL 光周期设置下成虫羽化主要发生于暗期或 LD 导引过程中暗期对应的相位，LD 下成虫羽化最高峰出现于授时因子时间（Zeitgeber time，ZT）15-16（24%），且在暗期开始前存在成虫羽化的光暗转换预期现象（Light-to-dark anticipation），DD 与 DD+1 下羽化最高峰进一步后移，分别出现于昼夜节律时间（Circadian time，CT）17-18（24%）和 CT21-22（22%）。虽然 LL 下仍存在较弱的成虫羽化昼夜节律，但额外 1 日的 LL 处理（即 LL+1）完全扰乱了成虫羽化昼夜节律。**【结论】** 草地贪夜蛾存在受光暗循环线索导引（Entrain）及生物钟协同调控的羽化昼夜节律，其羽化高峰在 LD 下发生于暗期，羽化昼夜节律自由运转生物钟周期 τ 大于 24 h，足够时长的持续光照处理可扰乱该昼夜节律。综上，草地贪夜蛾羽化昼夜节律可作为其生物钟机制研究的可靠表型。

关键词 草地贪夜蛾；迁飞昆虫；光周期；羽化行为；昼夜节律；生物钟

The circadian eclosion rhythm of *Spodoptera frugiperda* in response to photoperiod cues

LÜ Chang-Ning[1**] HUANG Xu[1] WANG Wei-Tong[1] HE Yu-Kun[1]
HU Gao[1] PAN Wei-Dong[2] CHEN Fa-Jun[1] WAN Gui-Jun[1***]

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Beijing Key Laboratory of Bioelectromagnetics, Institute of Electrical Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract **[Objectives]** To determine the circadian eclosion rhythm of *Spodoptera frugiperda* in response to photoperiod cues and establish an eclosion behavior-based assay to explore the endogenous circadian clock of this pest. **[Methods]** *S. frugiperda* were kept under a L14∶D10 (LD) photoperiod before being randomly subdivided into one of four treatment groups; constant darkness (dark-dark, DD), constant light (light-light, LL), and two groups with an extra day of exposure to either constant darkness (DD+1) or constant light (LL+1). The control group was kept under the original LD photoperiod for an entire generation. Nine-day-old (for DD+1 and LL+1 groups) or 10-day-old (for LD, DD, and LL) pupae were transferred to

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划（2021YFD1400701）；国家自然科学基金项目（32072413、32172414）；江苏省自然科学基金（BK20221510）；江苏省科协青年科技人才托举工程（TJ-2021-003）

**第一作者 First author，E-mail：12118202@njau.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：guijunwan@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2022-08-01；接受日期 Accepted：2022-10-06

a purpose built, chronobiology-based, full-time monitoring device for determining the biological rhythm phenotype of small animals. Pupal duration, eclosion duration, and circadian eclosion rhythm were monitored and determined by combining different photoperiod cues. **[Results]** Adult eclosion mainly occurred in the dark phase, or the corresponding phase of the dark phase, during LD entrainment under the LD, DD, DD+1, and LL photoperiods. The adult emergence peak occurred at Zeitgeber Time ZT15-16 (24%) under LD. Moreover, anticipation of the light-to-dark transition for eclosion was found during the light phase under LD. Adult emergence peaks in the DD and DD+1 groups were delayed, occurring at Circadian Time CT17-18 (24%) and CT21-22 (22%), respectively. Although poor eclosion rhythm was still evident under LL, an extra day of exposure to LL (i.e., LL+1) completely disrupted the circadian eclosion rhythm of *S. frugiperda*. **[Conclusion]** A circadian eclosion rhythm exists in *S. frugiperda* that is regulated by both light-dark cycle entrainment and an endogenous circadian clock. The adult eclosion peak occurs during the dark phase of a long day photoperiod, and the free-running circadian period underlying the circadian eclosion rhythm of *S. frugiperda* is longer than 24 hours. Overall, adult circadian eclosion rhythms appear to be a reliable phenotype that can help reveal circadian clockwork mechanisms in *S. frugiperda*.

Key words *Spodoptera frugiperda*; migratory insect; photoperiod; eclosion behavior; circadian rhythm; circadian clock

地球的自转与公转产生了周而复始的昼夜交替与季节更迭，大多生物已适应了这种日际和年际循环，并形成了内源性生物节律（Endogenous biological rhythm），其中内源性昼夜节律最为普遍和重要（即通常所指的生物钟，Circadian clock）。生物的许多生理、行为活动都表现出明显的昼夜节律（Bertossa *et al.*，2010；Groot，2014；陶卉和徐世清，2015；王晗，2015；张珞颖和叶晓雪，2015；张云峰和黄国存，2015；张行国等，2017；Zhang *et al.*，2021）。

内源性昼夜节律（生物钟）由四个典型属性定义：（1）产生的节律性振荡（Oscillation）在恒定环境条件下（如持续黑暗；Dark-Dark，DD）恒定存在或自由运行（表明存在可自我维持的内源性“时钟”）。（2）该“时钟”驱动的事件（如节律性生理或行为表型）大约间隔 24 h 重现一次。（3）该节律性振荡可被光暗循环（如光周期）或温度循环等外界线索导引（Entrain）。（4）虽然“时钟”的相位对环境变化敏感，但其周期（tau，τ）在较宽温度范围保持稳定，即存在温度补偿效应（Pittendrigh，1954；Allada and Chung，2010）。基于以上特性，生物钟系统主要由自我维持时间的核心生物钟、将核心生物钟与外界导引线索同步的输入通路和进行信息传递以在时间尺度上动态调控行为和生理活动的输出通路三个单元构成，三者彼此协调且并不互相排斥，共同形成复杂、多样的昼夜节律调控机制及相应表型（Allada and Chung，2010；陈文锋等，2011）。其中，核心生物钟是昼夜节律系统的“心脏”，其主要组件为自主调节运行的转录-翻译反馈回路（Transcriptional-translational feedback loop，TTFL），该回路完成单个循环所需时间恰好约为 24 h（Patke *et al.*，2020；Ashton *et al.*，2022）。生物钟在时间尺度上可有效调控生物的行为和生理，以适应和预期（Anticipate）包括光照、温度、食物可及性等方面涉及的环境变化。同时，生物钟机制保守的存在于从细菌到哺乳动物在内的生物中，反映出其在维系生物最优适合度方面的关键作用（Hurd and Ralph，1998；Ouyang *et al.*，1998；Woelfle *et al.*，2004；Takahashi *et al.*，2008）。

最早被研究的昼夜节律包括完全变态昆虫的羽化节律（Bunning，1935；Kalmus，1935；Rosbash，2021）。完全变态昆虫的羽化发生于蛹期结束时，其群体羽化分布谱在恒定温度的持续黑暗条件下（即无授时线索情况下）存在持续的近 24 h 节律周期，且该节律具有温度补偿效应（Zimmerman *et al.*，1968），因此属于典型的内源性昼夜节律（Pittendrigh，1954；Pittendrigh and Skopik，1970；Mark *et al.*，2021）。羽化昼夜节律研究较多的物种包括黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（Konopka and Benzer，1971；Mark *et al.*，2021），葱地种蝇 *Delia antiqua*（Watari，2002），长红猎蝽 *Rhodnius prolixus*（Ampleford and Steel，1982；Myers，2003），家蚕 *Bombyx mori*（Shimizu and Matsui，1983；Ikeda *et al.*，2019），

黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*（Froy *et al.*，2003）等。研究表明，光暗循环（如光周期线索）（Beer *et al.*，2019）、温度循环（Tanaka and Watari，2003；Takahashi *et al.*，2020）或二者协同均可作为昆虫羽化昼夜节律的授时因子（Zeitgeber），从而导引或同步昆虫的内源性羽化昼夜节律（Watari and Tanaka，2010）。不同物种的羽化节律表现出种的特异性，如黑腹果蝇和黑脉金斑蝶在光周期线索下的羽化高峰均出现于光期起始阶段（Froy *et al.*，2003；De *et al.*，2012），独居蜂 *Osmia bicornis* 在光周期线索下的羽化高峰出现于暗期（Morris and Takeda，2008；Beer *et al.*，2019），小菜蛾 *Plutella xylostella* 在光周期线索下的羽化高峰出现于光期开始和结束附近（田厚军等，2022），美国白蛾 *Hyphantria cunea* 的羽化高峰相位与光期长短有关（Morris and Takeda，2008）。值得注意的是持续光照（Light-Light，LL）可干扰基于隐花色素（Cryptochrome，CRY）光感受的生物钟系统，造成昆虫的羽化昼夜节律丧失。这主要是由于持续的光照线索诱导 CRY 保持激活，从而导致 Timeless（TIM）蛋白持续降解，如黑腹果蝇和黑脉金斑蝶等在 LL 下均表现为羽化的无节律性（Froy *et al.*，2003；Tataroglu and Emery，2014）。

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是一种源于美洲热带、亚热带地区的农业重大夜间迁飞性害虫。其 2019 年在我国云南省被首次发现，随后迅速在我国蔓延为害，目前已被中华人民共和国农业农村部列入《一类农作物病虫害名录》（江幸福等，2019；陈辉等，2020，2021）。目前已报道的草地贪夜蛾昼夜节律相关研究包括与生殖相关的召唤、交配和求偶行为（田太安等，2020；张罗燕等，2021），产卵行为（金涛等，2020）以及自发活动行为（Locomotor activity）等（Leppla *et al.*，1979；Miranda-Anaya *et al.*，2010），未见系统的羽化行为昼夜节律研究报道。此外，虽然 Hanniger 等（2017）对其核心钟基因转录动态表达开展了初步探究，但其昼夜节律系统的内在机制远未清晰。

本文以农业重大迁飞性害虫草地贪夜蛾为研究对象，通过自主研发的“基于时间生物学的小型动物生物节律表型全时监测装置”（以下简称“节律监测装置”）（实用新型专利：ZL202120866706.1），参照完全变态昆虫基于生物钟系统的羽化昼夜节律研究范式，设置不同光周期线索（L14∶D10，DD，LL 及将 DD 与 LL 设置各延长 1 日的 DD+1 与 LL+1），探究其在光周期线索影响下的成虫羽化昼夜节律，并进一步建立基于该表型的内源性昼夜节律（生物钟）机制研究方法，有助于促进对夜间迁飞性昆虫生物钟机制，尤其是迁飞时控机制的深入解析。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究所用草地贪夜蛾实验种群原始虫源采自广西农业科学院实验基地（108.06′E，23.25′N），带回实验室后在人工气候箱（RXZ-500E；宁波江南仪器厂）内继代饲养，饲养条件为光周期 L14∶D10（LD；暗期开始时间为每日 22:30），温度 26 ℃，相对湿度 70%。

1.2 幼虫的饲养

使用灭菌的组培瓶（底面直径 67 mm，高 110 mm），编号后瓶内置入 3 个棉球，使用移液枪向每个棉球加 2 mL 的 10%蜂蜜水。将成虫 1 雌 2 雄放入组培瓶内进行配对，将纱布（产卵布）蒙在瓶口并旋紧盖子，记录配对时间，每日固定时间更换产卵布。将产卵量最多日期的卵放入装有新鲜玉米叶片（苏科甜 1506）的塑料密封盒中（徐川峰等，2021），置于培养箱中孵化。将初孵幼虫等量转移至新的塑料密封盒中，1 龄 和 2 龄幼虫继续在密封盒中饲喂新鲜玉米叶片，及时清理饲养空间及更换新鲜玉米叶片。3 龄至老熟幼虫使用灭菌的塑料果蝇饲养管（直径 24 mm，高 95 mm）单头单管饲养，每管置入 1 cm^3 的固体人工饲料（李子园等，2019），根据饲料消耗速率定期统一更换人工饲料，观察记录草地贪夜蛾幼虫发育情况，舍弃发育不同步的幼虫以确保羽化昼夜节律所用试虫具有较好的发育同

步性。

1.3　成虫羽化昼夜节律的监测装置

本研究使用“节律监测装置”对草地贪夜蛾成虫羽化昼夜节律进行监测。如装置设计简图所示（图 1：A），本装置由 5 个系统组成：（1）小型动物试验处理系统，由饲养仓卡槽、待测动物饲养仓、角支架和饲养仓支架盒组成，用于独立喂养待测的小型动物。本研究中的待测动物饲养仓使用定制超透明玻璃管（内径为 2 cm；长度为 7 cm），两端使用 10%蜂蜜水浸渍的棉球封口，以提供初羽化成虫的食物来源。（2）生物节律表型全时自动监测系统，由红外可变焦摄像头连接远程录像机，与升降平台、升降支臂、升降基座及调控其升降的微调旋钮共同组成，位于小型动物试验处理系统的下方或周侧以自动监测独立喂养的小型动物，红外摄像头固定在升降平台上，通过调节微调旋钮升降平台以进一步优化红外可变焦摄像头的清晰对焦成像。（3）环境因子控制监测系统，包括封闭的有机玻璃箱体、自动加湿器、温控系统、温湿度传感器及光强计。（4）开源光源控制系统，由全光谱光源、匀光板和光源设置处理器组成。（5）同轴数据采集储存系统，包括同轴传输器、配置 UPS 电源的同轴监测和数据存储控制中心。其中，同轴传输器用于和生物节律表型全时自动监测系统中的红外可变焦摄像头相连接，同轴监测和数据存储控制中心配置有 UPS 电源并同远端的显示屏相连，以实现数据的采集和存储。本次研究中为提高试虫饲养及羽化昼夜节律监测的连续性和准确性，将生物节律表型全时自动监测系统核心组件（图 1：B）置于人工光照气候箱（RXZ-500E；宁波江南仪器厂）中，温湿度、光照强度和光周期均由人工光照气候箱控制。

1.4　不同光周期线索下的蛹历期测定

每日 21:00 定时查看人工气候箱内的幼虫饲养管，将同一天化蛹的蛹转移至铺有潮湿吸水纸的塑料透明盒内，记录其化蛹日期，并继续在与幼虫一致的温湿度条件下饲养。本研究的光周期线索设置主要包括 L14：D10（LD；贯穿整个世代周期）；持续黑暗（Dark-Dark，DD；蛹龄为 10 d 开始处理，处理前为 LD）；持续光照（Light-Light，LL；蛹龄为 10 d 开始处理，处理前为 LD）；提前 1 日开始持续黑暗（DD+1；蛹龄为 9 d 开始处理，处理前为 LD，即 DD 处理延长 1 日）；提前 1 日开始持续光照（LL+1；蛹龄为 9 d 开始处理，处理前为 LD，即 LL 处理延长 1 日）。由于 LD 设置贯穿草地贪夜蛾整个世代周期，根据其他不同光周期线索设置，当蛹龄为 8 d（LL+1 和 DD+1 处理）或 9 d（LL 和 DD 处理）时，提前将蛹从塑料透明盒转移至长 7 cm，内径 2 cm 的两端开口超白透明玻璃管作为待测动物饲养仓，并用蘸取 10%蜂蜜水的棉球对玻璃管两端封口。将装有蛹的待测动物饲养仓置于“节律监测装置”的饲养仓卡槽中（图 1）。将该羽化昼夜节律监测装置核心组件（图 1：B）放入人工气候箱内使用，温湿度设置与幼虫阶段一致，开启录像功能实时监测蛹的发育情况。以成虫羽化当日为界，测定光周期线索 LD、DD、LL 下的蛹历期。蛹历期的确定可为 DD 或 LL 下探究维持成虫羽化昼夜节律的生物钟性质提供重要的蛹期处理时间及时长参考。

1.5　不同光周期线索下的成虫羽化历时测定

在远端显示屏（对实验处理无干扰）观察羽化昼夜节律监测装置中超透明玻璃管（即待测动物饲养仓）内草地贪夜蛾成虫羽化过程，羽化前 1-2 d 蛹的头部明显可见颜色加深（图 2：A），羽化前 0.5 h 左右可见该部位颜色明显变浅，接近破蛹前蛹体可见伸长膨胀且伴有蠕动，本研究中以成虫头部顶破蛹壳时间点为羽化历时测定的起始时间点（图 2：B），以成虫恰好脱离蛹壳的瞬间为羽化历时结束时间点（图 2：C）以确定羽化历时。羽化历时的确定将为成虫羽化昼夜节律分析的时间间隔选择提供重要参考。

1.6　不同光周期线索下的羽化昼夜节律测定

据 1.4 中光周期线索设置及蛹的处理方法，使用成虫羽化昼夜节律监测装置（图 1）实时监

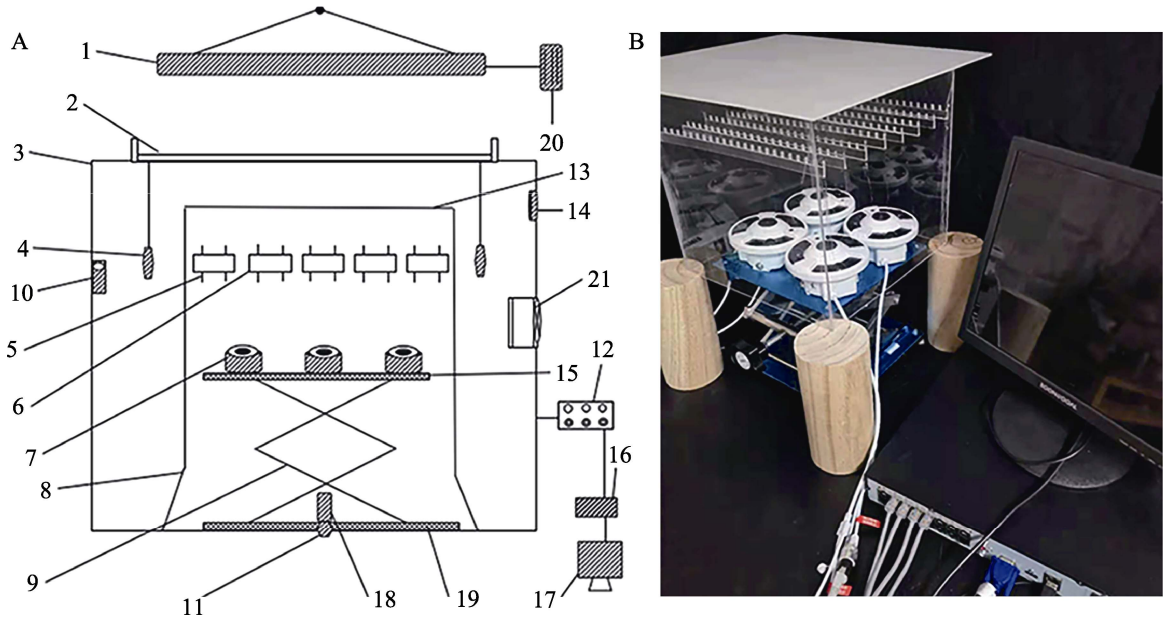

图 1　基于时间生物学的小型动物生物节律表型全时监测装置

Fig. 1　The chronobiology-based full-time monitoring device for biological rhythm phenotype in small animals

A. 装置设计图及主要组件（1：全光谱光源；2：匀光板；3：有机玻璃箱体；4：温湿度传感器；5：饲养仓卡槽；6：待测动物饲养仓；7：红外可变焦摄像头；8：角支架；9：升降支臂；10：光强计；11：微调旋钮；12：同轴传输器；13：饲养仓支架盒；14：红外补光灯；15：升降平台；16：同轴监测和数据存储控制中心；17：显示屏；18：自动加湿器；19：升降基座；20：光源设置处理器；21：温控系统）；B. 生物节律表型全时自动监测系统核心组件实物图。

A. Device schematic and the main parts (1: Full spectrum light source; 2: Light diffuser; 3: Organic glass box; 4: Temperature and humidity sensor; 5: Feeding chamber holder; 6: Animal feeding chamber; 7: Infrared camera; 8: Angle bracket; 9: Lifting arm; 10: Light intensity meter; 11: Fine tuning knob; 12: Coaxial transmitter; 13:Feeding chamber support box; 14: Fnfrared light supplements; 15: Lifting platform; 16:Coaxial monitoring and data storage center; 17: Display; 18: Automatic humidifier; 19: Lifting base; 20: Light source setting processor; 21: Temperature control system); B. Picture of the core components of the full-time automatic monitoring system for biological rhythm phenotypes.

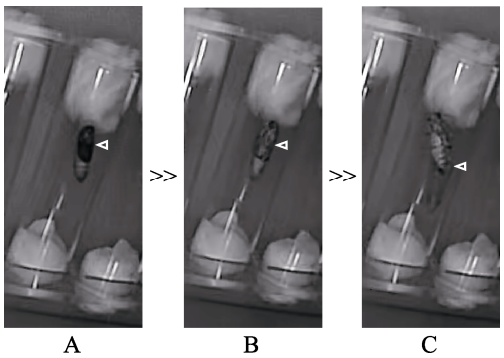

图 2　草地贪夜蛾成虫羽化过程

Fig. 2　The adult emergence process of *Spodoptera frugiperda*

A. 羽化前蛹体一端变黑；B. 临近羽化前蛹体膨胀头部突破蛹壳；C. 成虫完全脱离蛹壳瞬间。

A. One end of the pupa turns black before eclosion; B. Before eclosion, the pupa expands in length and the adult head breaks through the pupal case; C. The adult just emerge from the pupal case completely.

测草地贪夜蛾成虫羽化情况。客观暗期（Objective dark）和主观暗期（Subjective dark）开始时间均为北京时间 22:30（Zeitgeber time（ZT）14 或 Circadian time（CT）14），以暗期开始为起始时间点监测记录羽化昼夜节律。LD、DD、LL、DD+1 及 LL+1 下的羽化昼夜节律为分别施加以上光周期线索设置后所有成虫从 ZT14 或 CT14 开始监测的 24 h 羽化节律。为了判定生物钟的周期及羽化昼夜节律是否可被持续光照 LL 所打乱，特别对应 DD 和 LL 设置 DD+1 与 LL+1 光周期线索，后二者相当于羽化前施加相应处理的时长延长 1 d。最终，以单只成虫头部初破蛹壳为羽化行为记录时间点（图 2），测定并分析不同光周期线索设置下的 24 h 内成虫羽化昼夜节律。

1.7　数据处理与分析

所有数据通过 Microsoft Excel 2019 软件进行汇总整理，羽化昼夜节律数据以 1 h 为间隔，转换该时段绝对虫量为该小时羽化虫量占 24 h 羽化总虫量的百分比。采用 IBM SPSS 26.0 软件进行数据统计，不同光周期线索设置下的蛹历期及成虫羽化历时均值均采用 Tukey HSD 事后检验（Post-hoc Tukey HSD；$P<0.05$）进行分析。

2　结果与分析

2.1　基于不同光周期线索的蛹历期

明确不同光周期线索，尤其是持续黑暗（DD）和持续光照（LL）下草地贪夜蛾的蛹历期，可为以成虫羽化昼夜节律为表型的生物钟特性研究提供重要的蛹期处理时间参考。如图 3 所示，L14∶D10（LD）、DD 和 LL 下蛹的平均历期分别为（10.92±0.04）、（10.92±0.05）和（11.08± 0.03）d，不同光周期线索下蛹历期之间无显著性差异（$P>0.05$）。

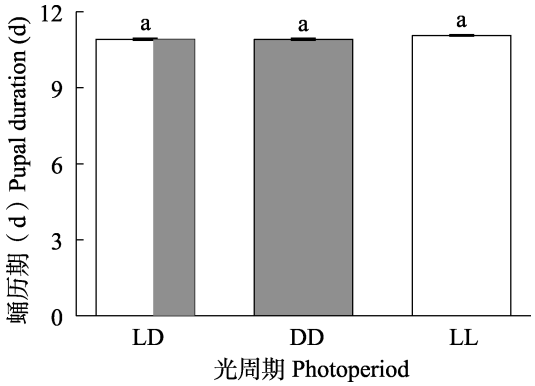

图 3　3 种不同光周期线索下草地贪夜蛾的平均蛹历期

Fig. 3　Average pupal duration of *Spodoptera frugiperda* over three photoperiod cues

样本量（N）：N_{LD}=76，N_{DD}=75，N_{LL}=65；LD、DD 和 LL 分别表示 L14∶D10、持续黑暗与持续光照 3 种光周期线索；图中数值为平均值±标准误；柱上标有相同字母表示不同处理平均蛹历期经 Post-hoc Tukey HSD 检验（$P<0.05$）无显著差异。图 4 同。

Sample size (N): N_{LD}=76, N_{DD}=75, N_{LL}=65. LD, DD and LL represent the photoperiod cues of L14∶D10, constant darkness and constant light, respectively. Data are shown in mean ± SE. Histograms with same lowercase letters indicate the average pupal duration is no significant difference among different treatments at 0.05 level by the Post-hoc Tukey HSD test. The same for Fig. 4.

2.2　基于不同光周期线索的成虫羽化历时

本研究羽化历时特指通过成虫羽化昼夜节律监测装置所采集视频录像可清晰分辨的草地贪夜蛾成虫头部开始破壳到完全脱离蛹壳的持续时间。明确成虫羽化历时可为其羽化昼夜节律分析所用时间间隔提供重要参考。如图 4 所示，LD、DD 和 LL 下成虫羽化平均历时分别为（68.98±3.79）、（80.84±4.18）和（79.06±2.83）s，不同光周期线索下其羽化历时之间无显著性差异（$P>0.05$）。

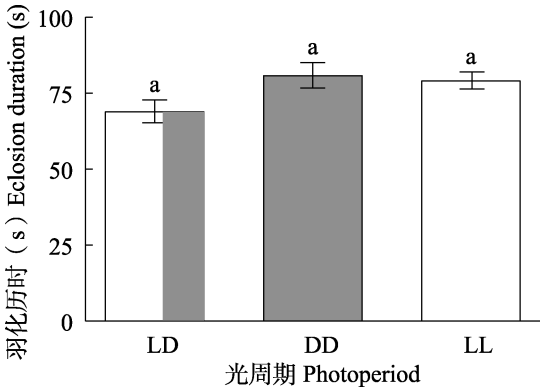

图 4　3 种不同光周期线索下草地贪夜蛾的平均羽化历时

Fig.4　Average eclosion duration of *Spodoptera frugiperda* over three photoperiod cues L14∶D10, constant darkness (DD) and constant light (LL)

样本量（N）：N_{LD}=42，N_{DD}=50，N_{LL}=32。

Sample size (N): N_{LD}=42, N_{DD}=50, N_{LL}=32.

2.3　基于不同光周期线索的成虫羽化昼夜节律

如图 5 所示，LD（90%）、DD（100%）和 DD+1（89%）下草地贪夜蛾成虫羽化集中在客观（Objective dark）或主观暗期（Subjective dark；即持续黑暗条件下与前期 LD 光周期线索导引过程中暗期对应的时段）发生。LD 下成虫羽化最高峰出现于 ZT15-ZT16（24%），且在紧邻暗期的光期存在成虫羽化的光暗转换预期（Light-to-dark anticipation）现象，其他光照时

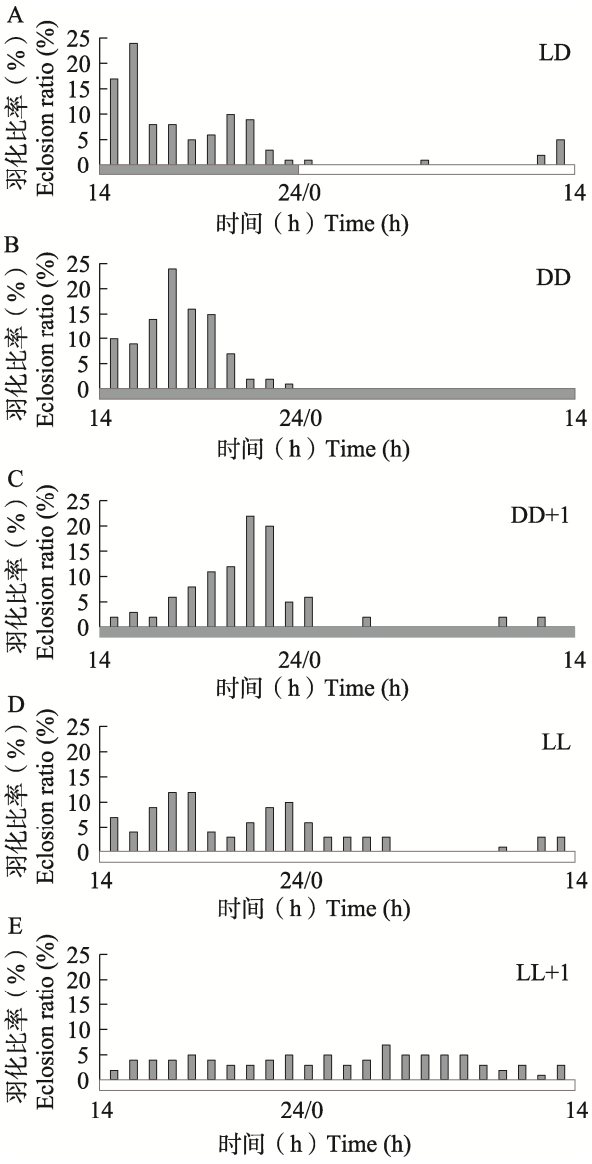

图 5　不同光周期线索下草地贪夜蛾成虫羽化昼夜节律

Fig. 5　The circadian eclosion rhythm of *Spodoptera frugiperda* in response to different photoperiod cues.

A. L14∶D10（LD）；B. 持续黑暗（DD）；C. 持续黑暗延长 1 d（DD+1）；D. 持续光照（LL）；E. 持续光照延长 1 d（LL+1）。横坐标所示为授时因子时间（Zeitgeber time，ZT；A）和昼夜时间（Circadian time，CT；B-E）；单个柱子表示 24 h 内每小时所占的羽化比率；样本量（*N*）：N_{LD}=93，N_{DD}=92，N_{DD+1}=65，N_{LL}=69，NL_{L+1}=91。

A. L14∶D10 (LD); B. Constant darkness (DD); C. An extra day of exposure to DD (DD+1); D. Constant light (LL); E. An extra day of exposure to LL (LL+1). The x-axis shows zeitgeber time (ZT) for panel A, and circadian time (CT) for panels B to E. A single column represents the eclosion ratio per hour in 24 hours. Sample size (*N*): N_{LD}=93, N_{DD}=92, N_{DD+1}=65, N_{LL}=69, NL_{L+1}=91.

段仅极少成虫羽化（图 5：A）。设置持续黑暗 DD 及 DD+1 旨在探究恒定环境条件下草地贪夜蛾生物钟特性，研究发现 DD 下羽化最高峰相较于 LD 后移，出现于 CT17-CT18（24%）（图 5：B），而 DD+1 的羽化最高峰则进一步后移，出现于 CT21-CT22（22%）（图 5：C）。设置持续光照 LL 及 LL+1 旨在探究昼夜羽化节律是否可在持续光照的情况下被破坏。在 LL 下成虫羽化仍表现出一定节律性，出现两个小高峰，分别在 ZT17-ZT19（12%）及 ZT23-ZT24（10%）对应的相位，羽化亦主要发生在与 LD 导引过程中暗期对应的相位（75%）（图 5：D）。延长 1 日 LL 处理，即 LL+1 下成虫羽化昼夜节律丧失，表现为无明显的羽化高峰，LD 导引过程中暗期对应的相位羽化率仅为 42%，24 h 内羽化逐时分布趋于平均（图 5：E）。

3　讨论

昆虫的羽化行为研究已有大量报道，但羽化昼夜节律表型和基于此解析生物钟机制的研究主要局限于包括模式昆虫果蝇在内的较少昆虫种类（Froy *et al.*，2003；Myers，2003；Mark *et al.*，2021）。羽化行为也是首个用于监测果蝇昼夜节律的行为表型（Bunning，1935；Kalmus，1935）。本研究首次基于生物钟调控的羽化昼夜节律表型（Circadian rhythm）研究范式，基于自主建立的成虫羽化昼夜节律监测装置，首次系统开展了草地贪夜蛾成虫羽化昼夜节律研究，并初步建立了基于该表型的内源性昼夜节律（生物钟）机制研究方法体系。

由于光周期的变化可能影响草地贪夜蛾的发育进程（He *et al.*，2021；孟令贺等，2022），本研究首先探究了不同光周期线索设置对蛹历期的潜在影响。参照完全变态昆虫基于生物钟调控的羽化昼夜节律研究范式（Froy *et al.*，2003；Tataroglu and Emery，2014；Zhang *et al.*，2022），结合本研究中草地贪夜蛾成虫在实验室饲养光周期 L14∶D10 下平均羽化时长为（10.92±0.04）d，因此在蛹龄第 10 天尝试设置 DD 和 LL 恒定环境条件处理，发现该蛹龄开始

DD 和 LL 光周期线索设置未显著影响蛹历期(差异短于 1 d)(图 3)，确保了后续羽化昼夜节律监测和分析的同步性。进一步探究了成虫从头部开始突破蛹壳到恰好完全脱离蛹壳的羽化历时，该羽化历时仅为约 1 min，且在 LD、DD 和 LL 光周期设置下无显著性差异（图 4）。因此，在以 1 h 为时间间隔的羽化节律分析中，该羽化历时极少发生于相邻时段分界处，进一步确保了本研究中羽化昼夜节律分析的准确性。通过以上细节的优化，结合本工作测定的草地贪夜蛾成虫羽化昼夜节律图谱（图 5），佐证了基于本团队自主研发“基于时间生物学的小型动物生物节律表型全时监测装置”的鳞翅目昆虫羽化昼夜节律研究方法体系的有效性。

以黑腹果蝇为主要对象的研究发现，昆虫的羽化昼夜节律主要由位于下丘脑的视交叉上核（Suprachiasmatic nucleus，SCN）中央时钟（Central clock）和位于前胸腺的外周时钟共同调控（Myers *et al.*，2003；Rieger *et al.*，2003），最新研究表明生物钟可能通过作用于蜕皮激素受体调控昆虫变态时间进程来调控昆虫羽化（Mark *et al.*，2021）。本研究发现 LD 光周期线索下草地贪夜蛾在暗期开始前存在成虫羽化的光暗转换预期现象（Light-to-dark anticipation），这是生物钟调控羽化昼夜节律的典型特征（Allada and Chung，2010；Patke *et al.*，2020）。此外，LD 下成虫羽化主高峰发生于暗期开始阶段，在暗期结束前似乎存在羽化量的再次小幅上升（图 5：A），与井上蛀果斑螟 *Assara inouei* 等鳞翅目昆虫基于光周期线索的羽化昼夜节律类似（何超等，2016)。该表型在 DD 和 DD+1 光周期线索设置下均未显现（图 5：B，C），而在 LL 中出现类似羽化节律（图 5：D），推测与 LD 中光暗循环线索引起的掩蔽（Masking）效应有关，暗示中央时钟或前胸腺中外周时钟的光感受蛋白在其羽化昼夜节律调控中或发挥重要作用（Rieger *et al.*，2003；Allada and Chung，2010；Ni *et al.*，2017）。

恒定环境条件（即无光暗循环的光周期线索设置下）可见 DD 中草地贪夜蛾羽化昼夜节律稳健且最高峰后移（图 5：B），而 LL 中成虫羽化昼夜节律虽然明显减弱但仍然存在（图 5：D）。因此，分别进一步延长 DD 和 LL 光周期设置为 DD+1 及 LL+1，发现 DD 中成虫羽化昼夜节律仍保持稳健，且最高峰进一步后移，说明涉及调控羽化昼夜节律的核心生物钟自由运行周期τ大于 24 h（图 5：C），该周期与已报道的草地贪夜蛾自发活动运行周期一致（Miranda-Anaya *et al.*，2010）。而 LL+1 下草地贪夜昼夜节律被明显扰乱，暗示其存在基于 CRY 光感受的核心生物钟系统（Froy *et al.*，2003；Allada and Chung，2010；Tataroglu and Emery，2014；Patke *et al.*，2020）。综上，利用本研究中自主研发装置并参照模式昆虫基于羽化昼夜节律的生物钟机制探究范式（Allada and Chung，2010），结合本研究中对草地贪夜蛾蛹期进行 LD 导引及不同处理时长的恒定光周期线索设置，初步建立了草地贪夜蛾基于羽化昼夜节律的生物钟机制研究方法。

草地贪夜蛾具有罕见的异时（Allochronic）分化品系（Hanniger *et al.*，2017；Tessnow *et al.*，2022），为开展昼夜节律及生物钟进化相关研究提供了宝贵机遇。未来将结合入侵我国草地贪夜蛾的不同异时分化型及本研究所建立的基于羽化昼夜节律的研究方法，进一步推动以夜间迁飞性重大害虫草地贪夜蛾为研究对象的生物钟机制研究：理论上，将进一步深入解析迁飞昆虫（尤其是迁飞害虫）迁飞调控相关的内源性昼夜节律系统运行机制，促进揭示迁徙性动物迁徙的时控之谜；实践上，将最终服务于迁飞害虫的测报预警并助力开辟基于时间生物学的害虫田间防治新思路。

参考文献 (References)

Allada R, Chung BY, 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annual Review of Physiology*, 72: 605–624.

Ampleford EJ, Steel CGH, 1982. Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Physiology*, 147: 281–286.

Ashton A, Foster RG, Jagannath A, 2022. Photic entrainment of the circadian system. *International Journal of Molecular Sciences*,

23(2): 729.

Beer K, Schenk M, Helfrich-Forster C, Holzschuh A, 2019. The circadian clock uses different environmental time cues to synchronize emergence and locomotion of the solitary bee *Osmia bicornis*. *Scientific Reports*, 9: 17748.

Bertossa RC, van Dijk J, Beersma DG, Beukeboom LW, 2010. Circadian rhythms of adult emergence and activity but not eclosion in males of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 805–812.

Bunning E, 1935. Zur kenntnis der endonomen tagesrhythmik bei insekten und bei pflanzen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 53(7): 594–623.

Chen H, Huang L, Gesang YZ, Deji ZM, Zhu JZ, Hu G, Chen FJ, Zhao JY, Wan GJ, 2021. Analysis of migration and meteorological background field for the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* found in Shandong province in 2019. *Journal of Environmental Entomology*, 43(4): 867–878. [陈辉, 黄乐, 格桑玉珍, 德吉卓玛, 朱军生, 胡高, 陈法军, 赵婧妤, 万贵钧, 2021. 2019 年山东省草地贪夜蛾迁飞过程及气象背景场分析. 环境昆虫学报, 43(4): 867–878.]

Chen H, Wu MF, Liu J, Chen AD, Jiang YY, Hu G, 2020. Migratory routes and occurrence divisions of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in China. *Journal of Plant Protection*, 47(4): 747–757. [陈辉, 武明飞, 刘杰, 谌爱东, 姜玉英, 胡高, 2020. 我国草地贪夜蛾迁飞路径及其发生区划. 植物保护学报, 47(4): 747–757.]

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.]

De J, Varma V, Sharma VK, 2012. Adult emergence rhythm of fruit flies *Drosophila melanogaster* under seminatural conditions. *Journal of Biological Rhythms*, 27(4): 280–286

Froy O, Gotter AL, Casselman AL, Reppert SM, 2003. Illuminating the circadian clock in monarch butterfly migration. *Science*, 300(5623): 1303–1305.

Groot AT, 2014. Circadian rhythms of sexual activities in moths: A review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2: 43.

Hanniger S, Dumas P, Schofl G, Gebauer-Jung S, Vogel H, Unbehend M, Heckel DG, Groot AT, 2017. Genetic basis of allochronic differentiation in the fall armyworm. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1): 1–14.

He C, Shen DR, Yin LH, Li XL, Yuan SY, Tian XJ, 2016. Circadian rhythmic behavior of *Assara inouei*. *Plant Protection*, 42(3): 137–140. [何超, 沈登荣, 尹立红, 李锡良, 袁盛勇, 田学军, 2016. 井上蛀果斑螟昼夜行为节律研究. 植物保护, 42(3): 137–140.]

He L, Ge S, Zhang H, He W, Yan R, Wu K, 2021. Photoregime affects development, reproduction, and flight performance of the invasive fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Environmental Entomology*, 50(2): 367–381.

Hurd MW, Ralph MR, 1998. The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *Journal of Biological Rhythms*, 13(5): 430–436.

Ikeda K, Daimon T, Sezutsu H, Udaka H, Numata H, 2019. Involvement of the clock gene period in the circadian rhythm of the silkmoth *Bombyx mori*. *Journal of Biological Rhythms*, 34(3): 283–292.

Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Song LL, 2019. Advances in migration and monitoring techniques of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Plant Protection*, 45(1): 12–18. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 宋琳琳, 2019. 草地贪夜蛾迁飞行为与监测技术研究进展. 植物保护, 45(1): 12–18.]

Jin T, Lin YY, Ma GC, Xiang KP, Chu XQ, Peng ZQ, Yi KX, 2020. Oviposition rhythm of *Spodoptera frugiperda* and its oviposition preferences to different medium. *Plant Protection*, 46(3): 99–103. [金涛, 林玉英, 马光昌, 向凯萍, 楚小强, 彭正强, 易克贤, 2020. 草地贪夜蛾的产卵节律及其对不同介质的产卵选择性. 植物保护, 46(3): 99–103.]

Kalmus H, 1935. Periodizität und autochronie (ideochronie) als zeitregelnde eigenschaffen der organismen. *Biologia Generalis*, 11(1): 93–114.

Konopka RJ, Benzer S, 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9): 2112–2116.

Leppla NC, Hamilton EW, Guy RH, Lee FL, 1979. Circadian rhythms of locomotion in six noctuid species. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(2): 209–215.

Li ZY, Dai QX, Kuang ZL, Liang MR, Wang L, Lu YY, Chen KW, 2019. Effects of three artificial diets on development and reproduction of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Journal of Environmental Entomology*, 41(6): 1147–1154. [李子园, 戴钎萱, 邝昭琅, 梁铭荣, 王磊, 陆永跃, 陈科伟, 2019. 3 种人工饲料对草地贪夜蛾生长发育及繁殖力的影响. 环境昆虫学报, 41(6): 1147–1154.]

Mark B, Bustos-Gonzalez L, Cascallares G, Conejera F, Ewer J, 2021. The circadian clock gates *Drosophila* adult emergence by controlling the timecourse of metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(27): e2023249118.

Meng LH, Jiang XF, Li P, Xia JX, Zhang TQ, Cheng YX, Zhang L, 2022. Comparison of bisexual life tables of *Spodoptera frugiperda* in different photoperiods. *Plant Protection*, 48(3): 63–73. [孟令贺, 江幸福, 李平, 夏吉星, 张同强, 程云霞, 张蕾, 2022. 不同光周期下草地贪夜蛾两性生命表的比较. 植物保护, 48(3): 63–73.]

Miranda-Anaya M, Guevara-Fefer P, García-Rivera BE, 2010. Circadian locomotor activity in the larva and adult fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae): Effect of feeding with the resistant variety of maize CML67. *Biological Rhythm Research*, 33(5): 475–486.

Morris MC, Takeda S, 2008. The adult eclosion rhythm in *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae): Endogenous and exogenous light effects. *Biological Rhythm Research*, 25(4): 464–476.

Myers EM, 2003. The circadian control of eclosion. *Chronobiology International*, 20(5): 775–794.

Myers EM, Yu J, Sehgal A, 2003. Circadian control of eclosion: Interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 13(6): 526–533.

Ni JD, Baik LS, Holmes TC, Montell C, 2017. A rhodopsin in the brain functions in circadian photoentrainment in *Drosophila*. *Nature*, 545(7654): 340–344.

Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH, 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15): 8660–8664.

Patke A, Young MW, Axelrod S, 2020. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2): 67–84.

Pittendrigh CS, 1954. On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40(10): 1018–1029.

Pittendrigh CS, Skopik SD, 1970. Circadian systems. V. The driving oscillation and the temporal sequence of development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 65(3): 500–507.

Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Forster C, 2003. Cryptochrome, compound eyes, hofbauer-buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms,* 18(5): 377–391.

Rosbash M, 2021. Circadian rhythms and the transcriptional feedback loop (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 60(16): 8650–8666.

Shimizu I, Matsui K, 1983. Photoreceptions in the eclosion of the silkworm, *Bombyx mort*. *Photochemistry and Photobiology*, 37(4): 409–413.

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL, 2008. The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(10): 764–775.

Takahashi Y, Tamura Y, Tanaka K, 2020. Thermoperiodic regulation of the adult eclosion rhythm in the commercial silk moth, *Bombyx mori*. *Annual Report of the Institute of Living and Environmental Sciences*, 52: 1–5.

Tanaka K, Watari Y, 2003. Adult eclosion timing of the onion fly, *Delia antiqua*, in response to daily cycles of temperature at different soil depths. *Naturwissenschaften*, 90(2): 76–79.

Tao H, Xu SQ, 2015. Research progress in the circadian rhythm mechanism of Lepidopteron. *Chinese Bulletin of Life Science*, 27(11): 1355–1363. [陶卉, 徐世清, 2015. 鳞翅目昆虫昼夜节律的授时机制研究进展. 生命科学, 27(11): 1355–1363.]

Tataroglu O, Emery P, 2014. Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods,* 68(1): 140–150.

Tessnow AE, Raszick TJ, Porter P, Sword GA, 2022. Patterns of genomic and allochronic strain divergence in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Ecology and Evolution*, 12(3): e8706.

Tian HJ, Xu RB, Chen Y, Chen YX, Lin S, Yu H, Yang G, 2022. Effect of photoperiod on eclosion rhythm of *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(1): 75–83. [田厚军, 徐瑞斌, 陈勇, 陈艺欣, 林硕, 余荟, 杨广, 2022. 光周期对小菜蛾羽化节律的影响. 应用昆虫学报, 59(1): 75–83.]

Tian TA, Liu JF, Yu XF, Dong XL, Li ZM, Yang MF, 2020. Effects of different light sources on the reproductive behavior of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection*, 47(4): 822–830. [田太安, 刘健锋, 于晓飞, 董祥立, 李治模, 杨茂发, 2020. 不同光源对草地贪夜蛾生殖行为的影响. 植物保护学报, 47(4): 822–830.]

Wang H, 2015. Circadian biology and its recent progresses. *Chinese Bulletin of Life Science*, 27(11): 1313–1319. [王晗, 2015. 生物钟生物学及其研究进展. 生命科学, 27(11): 1313–1319.]

Watari Y, 2002. Comparison of the circadian eclosion rhythm between non-diapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*. *Journal of Insect Physiology*, 48(9): 83–89.

Watari Y, Tanaka K, 2010. Interacting effect of thermoperiod and photoperiod on the eclosion rhythm in the onion fly, *Delia antiqua* supports the two-oscillator model. *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1192–1197.

Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K, Johnson CH, 2004. The adaptive value of circadian clocks: An experimental assessment in cyanobacteria. *Current Biology*, 14(16): 1481–1486.

Xu CF, Sa RN, He JY, Guo X, Lu F, Cheng W, Hu G, Chen FJ, Wan GJ, Zhao JY, 2021. Comparative study on adaptability of *Spodoptera frugiperda* to different maize varieties. *Journal of Environmental Entomology*, 43(4): 891–900.[徐川峰, 萨日娜, 何佳玥, 郭笑, 芦芳, 成玮, 胡高, 陈法军, 万贵钧, 赵婧妤, 2021. 草地贪夜蛾对不同品种玉米的适应性比较研究. 环境昆虫学报, 43(4): 891–900.]

Zhang J, Li S, Li W, Chen Z, Guo H, Liu J, Xu Y, Xiao Y, Zhang L, Arunkumar KP, Smagghe G, Xia Q, Goldsmith MR, Takeda M, Mita K, 2021. Circadian regulation of night feeding and daytime detoxification in a formidable Asian pest *Spodoptera litura*. *Communications Biology*, 4(1): 1–11.

Zhang LY, Wang F, Wan XS, Xu J, Ye H, 2021. Reproductive behavior and circadian rhythms of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Environmental Entomology*, 44(3): 509–522. [张罗燕, 汪分, 万小双, 徐进, 叶辉, 2021. 草地贪夜蛾生殖行为及其昼夜节律研究. 环境昆虫学报, 44(3): 509–522.]

Zhang LY, Ye XX, 2015. The regulatory mechanism of *Drosophila* circadian rhythm. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 27(11): 1345–1354. [张珞颖, 叶晓雪, 2015. 果蝇昼夜节律的调控机制. 生命科学, 27(11): 1345–1354.]

Zhang XG, Jia YF, Wen Y, Zhang YF, Wan GJ, Chen FJ, 2017. Behavioral rhythms of three Lepidopteran pests, *Mythimna separata*, *Agrotis ypsilon* and *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(2): 190–197. [张行国, 贾艺凡, 温洋, 张逸飞, 万贵钧, 陈法军, 2017. 粘虫、小地老虎和棉铃虫三种鳞翅目害虫上灯行为节律研究. 应用昆虫学报, 54(2): 190–197.]

Zhang Y, Iiams SE, Menet JS, Hardin PE, Merlin C, 2022. TRITHORAX-dependent arginine methylation of HSP68 mediates circadian repression by PERIOD in the monarch butterfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(4): e2115711119.

Zhang YF, Huang GC, 2015. The circadian clock mechanism of *Neurospora crassa*. *Chinese Bulletin of Life Science*, 27(11): 1328–1335. [张云峰, 黄国存, 2015. 生物钟在粗糙脉孢菌中的运行机制. 生命科学, 27(11): 1328–1335.]

Zimmerman WF, Pittendrigh CS, Pavlidis T, 1968. Temperature compensation of the circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *Journal of Insect Physiology*, 14(5): 669–684.